

Tesis de Posgrado

Alteraciones proteicas debidas al estrés oxidativo promovido por la activación del tetracloruro de carbono a radicales libres

Galelli, Mirta Esther

2000

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Galelli, Mirta Esther. (2000). Alteraciones proteicas debidas al estrés oxidativo promovido por la activación del tetracloruro de carbono a radicales libres. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3233_Galelli.pdf

Cita tipo Chicago:

Galelli, Mirta Esther. "Alteraciones proteicas debidas al estrés oxidativo promovido por la activación del tetracloruro de carbono a radicales libres". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3233_Galelli.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***“Alteraciones proteicas debidas al estrés oxidativo
promovido por la activación del
tetracloruro de carbono a radicales libres”***

Mirta Esther Galelli

Director: Dr. José Alberto Castro

**Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones Toxicológicas
CEITOX-CITEFA/CONICET**

33

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires**

Alteraciones proteicas debidas al estrés oxidativo promovido por la activación del tetracloruro de carbono a radicales libres

M. E. Galelli

El CCl_4 afectó a proteínas por distintos mecanismos. *In vivo* disminuyó transitoriamente la incorporación de ^{14}C -Leucina a proteínas nucleares (totales y distintas fracciones proteicas) y microsomaes hepáticas de rata, siendo el efecto máximo a la hora. La cicloheximida causó un efecto similar.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 (triclorometilo ($\cdot\text{CCl}_3$) y triclorometilperoxilo ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$)) formados por activación con luz ultravioleta C (UVC) causaron el aumento de grupos carbonilos ($\uparrow\text{CO}$) y la disminución del contenido de grupos sulfhidrilo ($\downarrow\text{SH}$) en albúmina de huevo (alb) y el $\uparrow\text{CO}$ en 20 aminoácidos. El $\uparrow\text{CO}$ en alb fue parcialmente inhibido por Trolox y EDTA pero no α -tocoferol. Los metabolitos del CCl_4 formaron HCCl_3 por reacción con alb (parcialmente inhibido por Trolox) y cisteína, posiblemente por abstracción de hidrógeno. La luz UVC per se $\uparrow\text{CO}$, abrió el puente disulfuro, pero casi no afectó los SH de la alb.

El $\cdot\text{CCl}_3$ y el $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ $\uparrow\text{CO}$ y $\downarrow\text{SH}$ en proteínas microsomaes *in vitro*, por acción directa o vía productos de peroxidación de lípidos (PL) ya que fue parcialmente inhibido por antioxidantes y EDTA. No afectaron los CO y SH de proteínas nucleares, mitocondriales y citosólicas *in vitro*. El NADPH *in vitro* (probablemente vía PL) $\uparrow\text{CO}$ y $\downarrow\text{SH}$ de proteínas microsomaes y nucleares, pero no mitocondriales. Produjo $\uparrow\text{SH}$ pero no de CO de compuestos citosólicos.

El CCl_4 *in vivo* aumentó transitoriamente el contenido de CO de proteínas microsomaes pero no de nucleares hepáticas de rata.

Las alteraciones causadas por los metabolitos reactivos del CCl_4 en proteínas permitirían explicar algunas de las alteraciones observadas en la intoxicación por CCl_4 (pérdida de funciones celulares, daño a la bomba de calcio del retículo endoplásmico), que podrían causar la muerte o desencadenar mecanismos de protección celulares.

Palabras claves: tetracloruro de carbono, radicales libres, síntesis de proteínas, proteínas nucleares, oxidación de proteínas, carbonilos proteicos, sulfhidrilos proteicos, peroxidación de lípidos, UVC.

Protein alterations due to the oxidative stress promoted by carbon tetrachloride activation to free radicals

M. E. Galelli

CCl_4 affected proteins through different mechanisms. It temporarily decreased ^{14}C -Leucine incorporation into both, nuclear proteins (total and different protein fractions) and microsomal proteins *in vivo*. The main effect was observed at 1-hour poisoning. The effect of cicloheximide on ^{14}C -Leu incorporation was similar to that of CCl_4 .

Trichloromethyl ($\cdot\text{CCl}_3$) and trichloromethylperoxyl ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) free radicals generated by ultraviolet C light (UVC) activation of CCl_4 promoted both, carbonyl formation ($\text{CO}\uparrow$) and sulfhydryl decrease ($\text{SH}\downarrow$) in chicken egg albumin (alb) and $\text{CO}\uparrow$ in the common 20 amino acids. They also led to HCCl_3 formation from alb (partially inhibited by Trolox) and cysteine, probably by hydrogen abstraction. The $\text{CO}\uparrow$ in alb was partially prevented by Trolox and EDTA, but not by α -tocopherol. UVC light by itself caused $\text{CO}\uparrow$, opened disulfide bonds, but it did not affect SH in alb.

$\cdot\text{CCl}_3$ and $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ $\text{CO}\uparrow$ and $\text{SH}\downarrow$ in microsomal proteins *in vitro*. These effects were partially prevented by antioxidants and EDTA, which indicates these could be due to both, CCl_4 -free radical direct action or lipid peroxidation products (PL). CCl_4 -free radicals did not affect CO and SH in nuclear, mitochondrial and cytosolic proteins *in vitro*. NADPH *in vitro* (probably through PL) caused $\text{CO}\uparrow$ and $\downarrow\text{SH}$ in microsomal and nuclear but not in mitochondrial proteins. It also produced SH increase but not $\text{CO}\uparrow$ in cytosolic substances.

CCl_4 *in vivo* caused a transitory $\text{CO}\uparrow$ in rat liver microsomal but not in nuclear proteins.

These CCl_4 -induced alterations might explain some of the effects of this hepatotoxin (for example, cellular function loss or damage to microsomal calcium pump) that might induce cellular death or trigger cellular protection mechanisms.

Key words: carbon tetrachloride, free radicals, protein synthesis, nuclear proteins, protein oxidation, protein carbonyl, protein sulfhydryl, lipid peroxidation, UVC.

Agradecimientos:

Al Dr. José Alberto Castro, Director de mi Tesis, por su constante preocupación, estímulo y apoyo, así como por ofrecerme su experiencia académica en todo momento.

A la Dra. María Isabel Díaz Gómez por brindarme sus conocimientos y su apoyo.

Al Técnico Electrónico Aníbal Ramón Petricio por el diseño y producción de dispositivos empleados en este Trabajo de Tesis.

A la Dra. María Montalto de Mecca por su constante apoyo y estímulo y por ayudarme en la revisión de los manuscritos.

A las Dras Silvia Laura Fanelli y Edith Graciela Valles por la revisión parcial de los manuscritos.

A todo el personal del CEITOX por su permanente compañerismo y colaboración.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, por mi formación de grado, postgrado y por las becas otorgadas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, por las becas otorgadas.

A mi familia

***Hay tres maneras fundamentales de adquirir conocimientos:
observación de la naturaleza, reflexión y experimentación.
La observación reúne hechos,
la reflexión los combina,
la experimentación verifica el resultado de tal combinación***

- Denis Diderot (1713-1784)

ÍNDICE

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.A.- Introducción General.....	1
I.A.I. Introducción.....	1
I.A.II.- CCl ₄ como sistema modelo	2
I.B.- Procesos que sufre una sustancia en el organismo	3
I.B.I.- Introducción	3
I.B.II.- Absorción, distribución, excreción.....	4
I.B.II.1.- Absorción.....	4
I.B.II.2.- Distribución.....	5
I.B.II.3.- Excreción.....	5
I.B.III.- Biotransformación	6
I.B.III.1.- Importancia del hígado en la biotransformación	7
I.B.III.2.- Etapas de la biotransformación	8
I.B.III.2.1.- Reacciones de fase I	8
I.B.III.2.2.- Reacciones de fase II	10
I.B.III.3.- Enzimas de fase I.....	11
I.B.III.3.1.- Enzimas de fase I que no contienen citocromo P450.....	11
I.B.III.3.2.- Enzimas de fase I que contienen citocromo P450	11
I.B.IV.- Sistema de oxidasa de función mixta	11
I.B.IV.1.- Componentes del sistema de oxidasa de función mixta	11
I.B.IV.1.1.- Citocromo P450	12
I.B.IV.1.2.- NADPH-citocromo P450 reductasa	13
I.B.IV.1.3.- Fosfolípidos.....	14
I.B.IV.1.4.- Citocromo b ₅ /citocromo b ₅ reductasa	14
I.B.IV.2.- Reacciones catalizadas por el sistema de oxidasa de función mixta	14
I.B.IV.2.1.- Reacciones de oxidación	14
I.B.IV.2.1.1.- Mecanismo de oxidación	15
I.B.IV.2.2.- Reacciones no oxidativas	16
I.B.IV.2.2.1.- Mecanismo de reducción del citocromo P450	16
I.B.IV.3.- Inactivación suicida.....	16
I.B.IV.4.- Inducción de los sistemas metabolizantes.....	17
I.B.IV.4.1.- Mecanismos de inducción	17
I.B.IV.5.- Factores que modifican la intensidad de los procesos de biotransformación	18
I.B.IV.6.- Degradación de los citocromos	19
I.B.IV.7.- Citocromos importantes en la intoxicación por CCl ₄	19
I.B.IV.7.1.- Cyp2E1	19
I.B.IV.7.2.- Cyp2B	20
I.C.- Radicales libres.....	21
I.C.I.- Introducción.....	21
I.C.II.- Reacciones de formación de radicales libres.....	22
I.C.III.- Reacciones de los radicales libres	22
I.C.IV.- Especies reactivas importantes toxicológicamente.....	23
I.C.V.- Formación de radicales libres en los sistemas biológicos	25
I.C.VI.- Daños producidos por los radicales libres.....	26

I.D.- Características del Tetracloruro de carbono	27
I.D.I.- Introducción	27
I.D.II.- Contaminación/fuentes	27
I.D.III.- Concentraciones máximas permitidas en ambientes laborales	27
I.D.IV.- Absorción, distribución y excreción	28
I.D.V.- Activación del CCl ₄ a sus metabolitos reactivos	29
I.D.V.I.- Lugares subcelulares de activación del CCl ₄	30
I.D.V.2.- Activación por medios físicos	30
I.D.V.3.- Mecanismo de activación	30
I.D.V.4.- Citocromos involucrados	32
I.D.V.5.- Inducciones de los citocromos 2E1 y 2B en el estudio del CCl ₄	32
I.D.V.6.- Inhibición del citocromo P450	33
I.D.VI.- Productos finales formados por metabolización del CCl ₄	33
I.D.VII.- Reacciones de los metabolitos reactivos del CCl ₄	34
I.E.- Peroxidación de lípidos.....	35
I.E.1.- Introducción	35
I.E.II.- Mecanismo de peroxidación de lípidos.....	35
I.E.II.1.- Iniciación.....	36
I.E.II.2.- Propagación.....	37
I.E.II.2.1.- Descomposición de peróxidos de lípidos.....	37
I.E.II.3.- Terminación	38
I.E.III.- Productos formados en la peroxidación de lípidos	39
I.E.IV.- Principales productos de la peroxidación de lípidos con relevancia toxicológica	41
I.E.IV.1.- 4-hidroxinonenal.....	41
I.E.IV.2.- Malondialdehído	41
I.E.V.- Importancia toxicológica de la peroxidación de lípidos.....	42
I.E.VI.- Reacciones de los aldehídos reactivos con proteínas	43
I.E.VI.1.- Reacción de Michael.....	43
I.E.VI.2.- Formación de bases de Schiff.....	44
I.F.- Estrés oxidativo/Defensas celulares.....	45
I.F.I.- Estrés oxidativo.....	45
I.F.II.- Defensas celulares	45
I.F.II.1.- Mecanismos de protección	46
I.F.II.2.- Componentes de los sistemas de defensa	46
I.F.II.2.1.- Vitamina E/α-tocoferol	47
I.F.II.2.2.- Otras sustancias	48
I.F.II.2.3.- Enzimas antioxidantes.....	49
I.G.- Sulfhidrilos Proteicos.....	50
I.G.I.- Introducción	50
I.G.II.- Grupos sulfhidrilos en enzimas.	50
I.G.III.- Relación con la estructura espacial de las proteínas	51
I.G.IV.- Grupos sulfhidrilos regulados en forma redox	51
I.G.V.- Tiolación	52
I.G.VI.- Grupos tioles blancos de radicales libres	53
I.G.VII.- Grupos sulfhidrilos de proteínas en situaciones fisiológicas y patológicas	54

I.H.- Síntesis de proteínas.....	55
I.H.I.- Introducción	55
I.H.II.- ARNs que intervienen en la síntesis de proteínas	55
I.H.II.1.- ARN mensajero:.....	55
I.H.II.2.- ARN de transferencia	56
I.H.II.3.- Ribosomas.....	57
I.H.III.- Traducción	57
I.H.III.1.- Iniciación	58
I.H.III.2.- Elongación.....	58
I.H.III.3.- Terminación	60
I.H.IV.- Lugar de síntesis de las proteínas	60
I.H.IV.1.- Síntesis de proteínas en el citosol.....	61
I.H.IV.2.- Síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico	62
I.H.V.- Localización final de las proteínas	63
I.H.VI.- Transporte nuclear	65
I.H.VI.1.- Núcleo.....	66
I.H.VI.2.- Complejo del poro nuclear.....	66
I.H.VI.3.- Señales de localización nuclear	68
I.H.VI.4.- Mecanismos de transporte desde y hacia el núcleo	68
I.H.VI.4.1.- Importación.....	68
I.H.VI.4.2.- Exportación	70
I.H.VI.5.- Forma de regulación del transporte nuclear	70
I.H.VII.- Proteínas nucleares	71
I.H.VIII.- Degradación de proteínas.....	72
I.H.VIII.1.- Proteosoma.....	72
I.H.VIII.2.- Marcación de proteínas para su degradación	73
I.I.- Oxidación de proteínas	74
I.I.I.- Introducción	74
I.I.II.- Formación de especies reactivas.....	75
I.I.III.- Sistema de oxidación catalizada por metales	76
I.I.IV.- Oxidaciones de aminoácidos y proteínas	77
I.I.IV.1.- Aminoácidos.....	77
I.I.IV.2.- Proteínas.....	78
I.I.V.- Alteraciones químicas observadas en las proteínas oxidadas	78
I.I.V.1.- Fragmentaciones y enlaces cruzados	79
I.I.V.1.1.- Cadena principal	79
I.I.V.1.2.- Cadenas laterales.....	80
I.I.V.1.3.- Aminoácidos afectados determinados experimentalmente	82
I.I.V.2.- Reacción con productos de peroxidación de lípidos	83
I.I.V.3.- Glicosilación.....	84
I.I.V.4.- Peróxidos de proteínas	85
I.I.V.5.- Formación de grupos DOPA.....	86
I.I.V.6.- Modificación de proteínas por peroxinitrito	87
I.I.VI.- Determinación de alteraciones en proteínas	88
I.I.VI.1.- Formación de grupos carbonilos	88
I.I.VI.2.- Disminución del contenido de grupos sulfhidrilos.....	89
I.I.VII.- Protección y reparación de proteínas.....	89
I.I.VIII.- Degradación de proteínas oxidadas	90
I.I.VIII.1.- Sistemas de degradación de proteínas oxidadas	91
I.I.VIII.2.- Factores que afectan la proteólisis de proteínas.....	92
I.I.IX.- Acumulación de proteínas oxidadas	93
I.I.X.- Oxidación de proteínas en situaciones fisiológicas y patológicas.....	93

I.J.- Homeostasis cálcica	95
I.J.I.- Introducción	95
I.J.II.- Niveles intracelulares de calcio	95
I.J.III.- Lugares de almacenamiento intracelulares de calcio	97
I.J.IV.- Mecanismos de regulación de concentración de calcio intracelular	98
I.J.V.- Sistemas celulares afectados por el aumento de calcio intracelular	99
I.J.VI.- Relación entre el calcio citosólico y los tioles proteicos.....	100
I.K.- Efectos del tetracloruro de carbono	101
I.K.I.- Efectos del CCl ₄ en organismos	101
I.K.I.1.- Patologías que produce el CCl ₄	101
I.K.I.1.1.- Efecto agudo	101
I.K.I.1.2.- Efecto crónico.....	101
I.K.I.2.- Efectos observados en la intoxicación por CCl ₄ en humanos	102
I.K.II.- Características del daño causado por CCl ₄	103
I.K.II.1.- Aspectos generales de la intoxicación por CCl ₄	103
I.K.II.1.1.- Posibles causas de la necrosis hepática producida por el CCl ₄	103
I.K.II.1.2.- Secuencia temporal.....	104
I.K.II.1.2.1.- Etapas en la intoxicación por CCl ₄	105
I.K.III.- Alteraciones bioquímicas causadas por el CCl ₄	106
I.K.III.1.- Unión covalente.....	106
I.K.III.1.1.- Introducción	106
I.K.III.1.2.- Unión covalente a lípidos.....	106
I.K.III.1.3.- Unión covalente a proteínas	107
I.K.III.1.4.- Unión covalente a ácidos nucleicos	107
I.K.III.1.5.- Unión covalente a nucleótidos	107
I.K.III.2.- Peroxidación de lípidos.....	108
I.K.III.2.1.- Introducción	108
I.K.III.2.2.- Peroxidación de lípidos en el retículo endoplásmico	108
I.K.III.2.3.- Peroxidación de lípidos en núcleos	109
I.K.III.2.4.- Peroxidación de lípidos en mitocondrias	109
I.K.III.2.5.- Peroxidación de lípidos por NADPH en sistemas <i>in vitro</i>	109
I.K.III.3.- Efecto del CCl ₄ sobre la síntesis de proteínas	110
I.K.III.3.1.- Introducción	110
I.K.III.3.2.- Alteraciones morfológicas	110
I.K.III.3.3.- Alteración de la incorporación de un aminoácido a proteínas	110
I.K.III.3.4.- Efecto del CCl ₄ sobre componentes de la maquinaria de síntesis proteica.....	111
I.K.III.4.- Otros efectos sobre proteínas y aminoácidos	112
I.K.III.4.1.- Introducción	112
I.K.III.4.2.- Alteración de la variedad de proteínas sintetizadas	112
I.K.III.4.3.- Efectos del CCl ₄ sobre aminoácidos	112
I.K.III.5.- Efecto de CCl ₄ sobre la homeostasis cálcica.....	113
I.K.III.5.1.- Introducción	113
I.K.III.5.2.- Alteración de los niveles intracelulares de calcio.....	113
I.K.III.5.3.- Posible relación con sulfhidrilos proteicos.....	114
I.K.III.5.4.- Producción de daño por alteración de la homeostasis cálcica	114
I.K.III.6.- Otros efectos.....	115

I.L.- Misceláneas.....	116
I.L.I.-Cicloheximida	116
I.L.II.- Radiación Ultravioleta	116
I.L.II.1.- Luz UVC	117
I.L.III.- Albúmina de huevo.....	118
I.L.IV.- α -Tocoferol	118
I.L.V.- Hemisuccinato de α -tocoferol.....	118
I.L.VI.- Trolox.....	119
I.L.VII.- EDTA.....	119
 II.- OBJETIVOS	 120
 III.- MATERIALES Y MÉTODOS	 122
III.A.- Materiales y Métodos Generales	122
III.A.I.- Materiales	122
III.A.I.1- Sustancias químicas	122
III.A.I.2.- Equipamiento	123
III.A.I.3.- Animales.....	124
III.A.II.- Métodos	124
III.A.II.1.- Obtención de fracciones subcelulares	124
III.A.II.1.1.- Obtención de núcleos altamente purificados	124
III.A.II.1.2.- Obtención de microsomas	126
III.A.II.1.3.- Obtención de fracción mitocondrial	127
III.A.II.1.4.- Obtención de fracción citosólica.....	128
III.A.II.2.- Determinación de proteínas.....	128
III.A.II.3- Estadística	129
III.B.- Técnicas empleadas en el estudio del efecto del CCl₄ sobre la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas.....	130
III.B.I.- Dosis empleadas	130
III.B.II.- Tratamientos	130
III.B.II.1.- Proteínas nucleares y microsomales totales	131
III.B.II.2.- Fracciones proteicas nucleares	131
III.B.II.3.- Pretratamiento con cicloheximida	131
III.B.III.- Aislación de proteínas totales	132
III.B.IV.- Fraccionamiento de proteínas nucleares.....	133
III.B.V.- Determinación de radioactividad en proteínas.....	135
III.C.- Técnicas empleadas en el estudio de alteraciones químicas causadas por el CCl₄ en proteínas y aminoácidos	136
III.C.I.- Sistemas químicos	136
III.C.I.1.- Activación del CCl ₄ en un sistema químico.....	136
III.C.I.1.1.- Sistema químico empleado para proteínas	137
III.C.I.1.2.- Sistema químico empleado para aminoácidos	138
III.C.I.2.- Preparación de albúmina delipidada.....	139
III.C.I.3.- Estudio del efecto de la luz UVC sobre el glutatión oxidado	140

III.C.I.4.- Estudio de formación de productos volátiles por CCl ₄	140
III.C.I.4.1.- Albúmina	140
III.C.I.4.2.- Cisteína	141
III.C.I.4.3.- Análisis cromatográfico de los productos volátiles	141
III.C.II.- Sistemas <i>in vitro</i>	142
III.C.II.1.- Incubación de microsomas	142
III.C.II.2.- Incubación de núcleos	143
III.C.II.3.- Incubación de mitocondrias	145
III.C.II.4.- Incubación de fracción citosólica	145
III.C.II.5.- Incubaciones de microsomas con distintas sustancias	146
III.C.III.- Sistema <i>in vivo</i>	147
III.C.III.1.- Tratamientos	147
III.C.IV.- Medición de grupos carbonilos y grupos sulfhidrilos	148
III.C.IV.1.-Determinación de grupos carbonilos	148
III.C.IV.1.1.- Medición de grupos carbonilos en proteínas	148
III.C.IV.1.1.1- Preparación de las muestras de proteínas nucleares	148
III.C.IV.1.2. Medición de grupos carbonilos en aminoácidos	149
III.C.IV.2.- Técnica de determinación de grupos sulfhidrilos	149
III.C.IV.2.1.- Sustancias solubles	149
III.C.IV.2.2.- Proteínas insolubles	150
 VI.- RESULTADOS	 151
IV.A.- Estudio del efecto del CCl ₄ sobre la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas hepáticas de rata	151
IV.A.1.- Incorporación de ¹⁴ C-Leucina a las proteínas nucleares y microsomales totales de hígado de rata a distintos tiempos de intoxicación	152
IV.A.2.- Efecto del pretratamiento con cicloheximida sobre la incorporación de ¹⁴ C-Leucina a proteínas totales y microsomales de ratas intoxicadas con CCl ₄	153
IV.A.3.- Efecto del CCl ₄ sobre la incorporación de ¹⁴ C-Leucina en fracciones proteicas nucleares de rata a la hora y a las dos horas de intoxicación	154
IV.A.3a.- 1 hora de intoxicación	154
IV.A.3b.- 2 horas de intoxicación	155
IV.B.- Efecto de los metabolitos reactivos del CCl ₄ sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas	156
III.B.I - Sistemas Químicos	156
IV.B.I.1.- Proteínas	157
IV.B.I.1.1.- Efecto del CCl ₄ y de la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa en medio aerobio	157
IV.B.I.1.2.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa en atmósfera de nitrógeno	158
IV.B.I.1.3.- Formación de grupos carbonilos debida al CCl ₄ y la luz UVC en albúmina de huevo y albúmina de huevo delipidada	159
IV.B.I.1.4.- Efecto del α-tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl ₄ y luz ultravioleta C en albúmina de huevo	160
IV.B.I.1.4a.- Efecto del α-tocoferol 1 mM en atmósfera aerobia	160
IV.B.I.1.4b.- Efecto del α-tocoferol 1 mM en atmósfera anaerobia	161

IV.B.I.1.5.- Efecto del Trolox 1mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl ₄ y UVC en albúmina de huevo	162
IV.B.I.1.5a.- Efecto del Trolox 1 mM en atmósfera aerobia	162
IV.B.I.1.5b.- Efecto del Trolox 1 mM en atmósfera anaerobia.....	163
IV.B.I.1.6.- Efecto del EDTA 3mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl ₄ y UVC en albúmina de huevo	164
IV.B.I.1.6a.- Efecto del EDTA 3 mM en atmósfera aerobia.....	164
IV.B.I.1.6b.- Efecto del EDTA 3 mM en atmósfera anaerobia	165
IV.B.I.II.- Aminoácidos.....	166
IV.B.I.II.1.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina.....	166
IV.B.I.II.2.- Efecto del CCl ₄ y de la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos serina, treonina y prolina.....	167
IV.B.I.II.3.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptofano.....	168
IV.B.I.II.4.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos cisteína y metionina.....	169
IV.B.I.II.5.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos lisina, arginina e histidina	170
IV.B.I.II.6.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos aspártico, glutámico, asparragina y glutamina.....	171
IV.B.II.- Sistemas <i>in vitro</i>	172
IV.B.II.1.- Distintas fracciones subcelulares.....	172
IV.C.II.1.1.- Efecto del CCl ₄ <i>in vitro</i> sobre el contenido de grupos carbonilos de proteínas microsomales hepáticas de rata	173
IV.B.II.1.2.- Efecto del CCl ₄ y del CBrCl ₃ <i>in vitro</i> sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas nucleares hepáticas de rata.....	174
IV.B.II.1.2a.- Efecto del CCl ₄	174
IV.B.II.1.2b.- Efecto del CBrCl ₃	175
IV.B.II.1.3.- Efecto del CCl ₄ <i>in vitro</i> sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata	176
IV.B.II.1.4.- Efecto del CCl ₄ <i>in vitro</i> sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas citosólicas hepáticas de rata	177
IV.B.II.2.- Estudio sobre microsomas.....	178
IV.B.II.2.1.- Efecto del CCl ₄ sobre la formación de grupos carbonilos en las proteínas microsomales en atmósfera de aire y de nitrógeno.....	178
IV.B.II.2.2.- Efecto del α-tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl ₄ en proteínas microsomales.....	180
IV.B.II.2.3.-Efecto del hemisuccinato de α-tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl ₄ en proteínas microsomales.....	181
IV.B.II.2.4.- Efecto del Trolox 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl ₄ en proteínas microsomales	182
IV.B.II.2.5.- Efecto del EDTA 3 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl ₄ en proteínas microsomales	183
IV.B.III.- Sistemas <i>in vivo</i>	184
IV.B.III.1.- Efecto del CCl ₄ sobre el contenido de grupos carbonilos <i>in vivo</i> en proteínas microsomales hepáticas de rata.....	184

IV.B.III.2.- Grupos carbonilos presentes en proteínas nucleares hepáticas de rata a distintos tiempos de intoxicación con CCl ₄	185
IV.C.- Efecto de los metabolitos reactivos del CCl ₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas	186
III.C.I. - Sistemas Químicos.....	186
IV.C.I.1.- Determinación del contenido de grupos sulfhidrilos	187
IV.C.I.1.1.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de albúmina de huevo nativa y albúmina de huevo delipidada.....	187
IV.C.I.1.2.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre los grupos sulfhidrilos de albúmina de huevo bajo atmósfera de aire o nitrógeno	188
IV.C.I.1.3.- Efecto de la luz ultravioleta C sobre el contenido de grupos sulfhidrilos del glutatión oxidado en atmósfera de aire y de nitrógeno	190
IV.C.I.1.4.- Efecto del CCl ₄ y la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína	191
IV.C.I.2.- Estudio de productos volátiles generados	192
IV.C.I.2.1.- Formación de compuestos volátiles por acción de los metabolitos del CCl ₄ sobre albúmina de huevo. Efecto del Trolox 1 mM	192
IV.C.I.2.1a.- Determinación de compuestos volátiles formados.....	192
IV.C.I.2.1b.- Cuantificación del efecto del Trolox sobre los productos volátiles formados por el CCl ₄	194
IV.C.I.2.2.- Formación de compuestos volátiles por acción de los metabolitos reactivos del CCl ₄ sobre el aminoácido cisteína	195
IV.C.II.- Sistemas <i>in vitro</i>	197
IV.C.II.1.- Distintas fracciones subcelulares.....	197
IV.C.II.1.1.- Estudio del efecto del CCl ₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales hepáticas de rata <i>in vitro</i>	198
IV.C.II.1.2.- Estudio del efecto del CCl ₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas nucleares hepáticas de rata <i>in vitro</i>	199
IV.C.II.1.3.- Estudio del efecto del CCl ₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata <i>in vitro</i>	200
IV.C.II.1.4.- Estudio del efecto del CCl ₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en sustancias proteicas y no proteicas citosólicas <i>in vitro</i>	201
IV.C.II.2.- Estudio sobre microsomas.....	202
IV.C.II.2.1.- Efecto del CCl ₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales en atmósfera de aire y de nitrógeno.....	202
IV.C.II.2.2.- Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl ₄ en proteínas microsomales	204
IV.C.II.2.3.- Efecto del hemisuccinato de α -tocoferol 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl ₄ en proteínas microsomales	205
IV.C.II.2.4.- Efecto del Trolox 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl ₄ en proteínas microsomales	206
IV.C.II.2.5.- Efecto del EDTA 3 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl ₄ en proteínas microsomales	207
V.- DISCUSIÓN	209
V.A.- Alteración de la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas nucleares	209

ÍNDICE

V.B.- Alteración químicas de proteínas causadas por el CCl ₄	212
V.B.1.- Formación de grupos carbonilos	212
V.B.2.-Disminución del contenido de grupos sulfhidrilos	218
V.C.- Efectos de la luz ultravioleta sobre la oxidación de proteínas	221
V.D.- Consideraciones generales.....	223
 VI.- CONCLUSIONES	228
 VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	231
 VIII.- ABREVIATURAS.....	247
 IX.- APÉNDICE	252
IX.A.- Trabajos publicados	252
IX.B.- Presentaciones a Congresos	252

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

I.A.- INTRODUCCIÓN GENERAL

➤ I.A.I.- Introducción

Durante el último siglo se ha incrementado el número de sustancias con las que el hombre y los demás seres vivos están en contacto. La sociedad ha ido tomando lentamente conciencia del riesgo que las sustancias químicas pueden implicar, lo cual se ve reflejado en regulaciones más estrictas de producción, distribución y uso de las mismas. Todo esto conlleva la necesidad de un conocimiento más profundo de los mecanismos por los cuales una sustancia resulta tóxica.

La Toxicología es la ciencia que estudia las interacciones nocivas entre las sustancias químicas y los seres vivos. El término toxicología deriva de la palabra griega "τοξικός" (tóxicos), la cual fue empleada por el historiador Herodoto para denominar al veneno que se empleaba en las puntas de las flechas (1, 2).

Es una ciencia multidisciplinaria que requiere la integración de varias áreas de conocimiento como Química (en todas sus ramas), Biología, Fisiología, Patología, etc. (1, 2).

Las bases de la toxicidad de una sustancia son las interacciones químicas. La elucidación de los factores involucrados y de los mecanismos moleculares responsables de dichas interacciones es un aspecto fundamental para el entendimiento de la toxicidad de una sustancia (3, 4, 1, 5).

La respuesta de un organismo a una sustancia química varía considerablemente en grado y magnitud en diferentes especies; incluso existen variaciones importantes entre individuos de una misma especie. Estas diferencias cuali y cuantitativas en la especificidad de los efectos determinan la vulnerabilidad o la resistencia a un tóxico de una determinada especie o individuo (6, 4, 2).

Los mecanismos iniciales de toxicidad son muy diversos y en general dependen de cuál sea la sustancia. Sin embargo, muchas veces las alteraciones finales son comunes a varios tóxicos, cualquiera haya sido el mecanismo de toxicidad inicial. Por ejemplo, sustancias tan diversas como níquel, asbesto o algunos solventes pueden producir como daños finales peroxidación de lípidos, formación de especies reactivas de oxígeno y depleción de grupos tioles (6, 7, 4).

En muchos casos, la sustancia no es tóxica per se, sino que sistemas presentes en un organismo la modifican químicamente formando sustancias reactivas que son las causantes

del daño. Para estas sustancias la presencia o no de sistemas metabolizantes en un organismo es lo que define el grado de toxicidad para el mismo (1, 3, 2, 8, 6, 9).

➤ I.A.II.- CCl_4 como sistema modelo

Dado el gran número de sustancias químicas relacionadas con los seres vivos, tanto naturales como creadas por el hombre, sería imposible estudiar con profundidad los mecanismos de toxicidad de cada una de ellas, razón por la cual se trata de elegir "sistemas modelo" (6, 1, 3).

Se denomina "sistema modelo para el estudio de daño y muerte celular por tóxicos" al conjunto integrado por una sustancia química y un sistema celular sobre el cual actúe dicha sustancia. Estos sistemas permiten un estudio más sencillo de las distintas variables que intervendrían en la toxicidad de una sustancia, con el fin de determinar mecanismos de toxicidad que luego puedan ser aplicables a otras sustancias (3, 6).

El sistema modelo "tetracloruro de carbono-hígado" emplea como sustancia tóxica al tetracloruro de carbono (CCl_4) y como blanco celular al hepatocito (célula parenquimal hepática). Este sistema es uno de los más empleados en Toxicología por varias razones (10, 1, 6, 3):

El CCl_4 es una molécula muy simple, la cual debe ser activada a metabolitos reactivos de naturaleza radicalaria para ejercer su acción tóxica. En el proceso de activación se forman pocos metabolitos reactivos, lo que facilita el estudio de sus interacciones con componentes celulares.

Existe mucha información disponible acerca de los efectos del CCl_4 , del daño intenso y reproducible que produce en varios animales de laboratorio (ratón, rata, etc.) siguiendo una secuencia de tiempo específica. De acuerdo con la dosis y la forma de aplicación produce una amplia gama de daños finales, como ser acumulación de lípidos, necrosis, cirrosis y cáncer, lo que permite el estudio del desarrollo de estas patologías y de posibles mecanismos de protección (11, 6).

En lo que respecta al hepatocito, es la célula de mamífero de estructura, bioquímica y función más conocida. Es el principal sistema de metabolización de sustancias, tanto endógenas como exógenas (12, 3, 13).

El CCl_4 es empleado también en el estudio de interacciones con otras sustancias químicas, así como de los mecanismos de reparación del daño causado por sustancias tóxicas (14, 15, 3).

I.B.- PROCESOS QUE SUFRE UNA SUSTANCIA EN EL ORGANISMO

I.B.I.- INTRODUCCIÓN

La toxicidad de una sustancia está directamente relacionada con los procesos de absorción, distribución, excreción, biotransformación y con las posibles interacciones con componentes celulares. Todos estos procesos ocurren en forma simultánea y se están modificando constantemente de acuerdo a las distintas variables presentes en cada punto de un organismo (8, 2, 16, 1). En la figura I.B.1 (2 con modificaciones) se representan los distintos procesos.

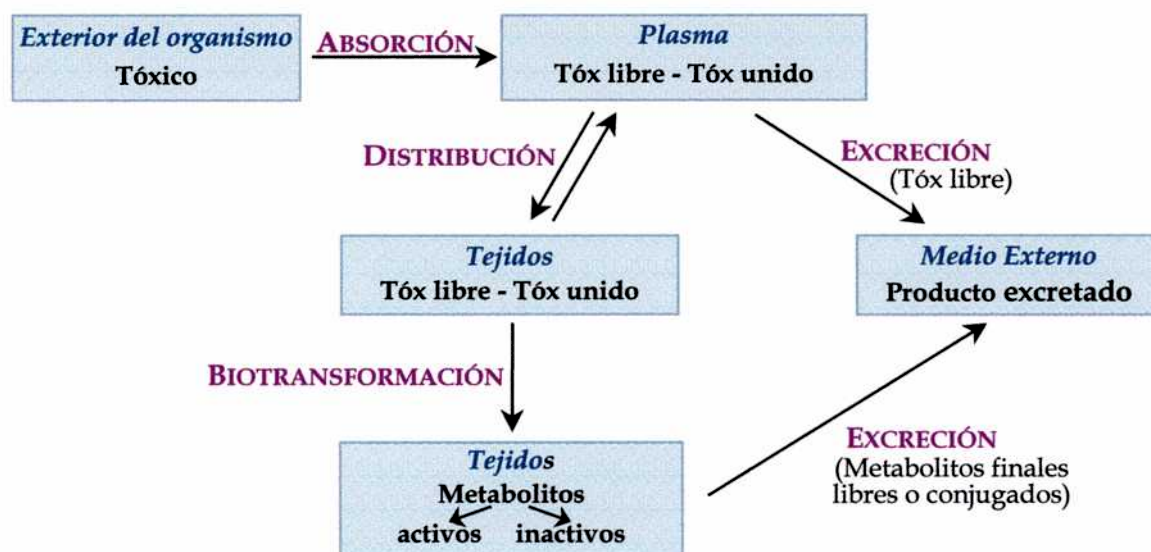


Figura I.B.1: Absorción, distribución, biotransformación y excreción de sustancias

El lugar donde una sustancia causa su efecto tóxico es denominado órgano o tejido blanco, el cual no es necesariamente el lugar de mayor concentración; en algunos casos sí coinciden (paraquat o monóxido de carbono), pero en otros casos hay mayor concentración de sustancia en otros órganos (plomo o CCl_4) (2, 8).

Se define como xenobiótico (Xb) a toda sustancia extraña al organismo. Dosis es la cantidad de sustancia que ingresa a un organismo (8, 2).

En general, la cantidad de sustancia que llegue al órgano blanco estará directamente relacionada con la cantidad de sustancia a la que el organismo esté expuesto, cuanto mayor sea la dosis mayor será la cantidad que llegue al órgano blanco. Sin embargo, otros factores que afecten los mecanismos básicos de absorción, distribución, metabolismo y/o excreción (como ser el retardo de la absorción oral o la disminución de la temperatura corporal) podrían alterar la cantidad de sustancia que llegue al lugar de acción tóxica (17, 2, 8).

A continuación se describen brevemente los distintos procesos mencionados.

I.B.II.- ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, EXCRECIÓN

➤ I.B.II.1.- Absorción

En general, para que una sustancia ejerza su acción tóxica debe ingresar primero al organismo. Son excepciones las sustancias que actúen localmente, como por ejemplo ácidos o bases fuertes que actuarían directamente sobre la piel (2, 8).

Se llama absorción al proceso por el cual una sustancia atraviesa membranas biológicas del cuerpo e ingresa al torrente sanguíneo (8, 2, 16).

La absorción de una sustancia está en gran medida determinada por la capacidad de dicha sustancia de atravesar membranas biológicas, lo cual está en relación directa con su liposolubilidad, grado de ionización y tamaño molecular. Una sustancia liposoluble atraviesa más fácilmente membranas biológicas y por lo tanto se absorbe más fácilmente. En el caso de sustancias ácidas o básicas, el pH del lugar de absorción es muy importante porque determina el grado de ionización de la sustancia (16, 2, 8, 18).

Existen varios mecanismos por los cuales una sustancia puede ingresar al organismo: atravesando directamente las membranas (difusión pasiva, la forma más común), pasando a través de poros en las membranas, o por transportadores especiales (normalmente involucrados en el ingreso de sustancias importantes para el organismo) (2, 16, 8).

Al considerar la toxicidad de una sustancia es muy importante tener en cuenta la vía de absorción, una dosis tóxica por una vía puede no serlo por otra (16, 17, 19).

Las vías de absorción más importantes son el tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio y la piel (8, 2, 16).

El tracto gastrointestinal es una vía de ingreso muy importante porque puede ser la entrada de muchos contaminantes presentes en los alimentos, el agua de bebida, etc. Existen a lo largo del mismo variaciones de pH y de sustancias presentes (enzimas, flora, etc.) que pueden llevar a una distinta absorción (16, 2).

Debido a su amplia superficie (40 veces la de la piel), su gran irrigación y la cercanía entre el aire y la sangre, la vía pulmonar es muy importante para la absorción de gases, sustancias volátiles y aerosoles. La volatilidad y la solubilidad en sangre de una sustancia son factores determinantes de la absorción de una sustancia por vía pulmonar (17, 16).

La piel se comporta cualitativamente como una membrana celular, por lo que la absorción por vía dérmica será función directa de la liposolubilidad de las sustancias (16, 17).

Una vía empleada experimentalmente es la vía intraperitoneal, la cual posibilita una rápida absorción de las sustancias a través de la circulación portal, pasando la sustancia absorbida directamente al hígado (16, 8).

➤ I.B.II.2.- Distribución

La sustancia absorbida es distribuida a todo el organismo por medio del sistema circulatorio (el sistema linfático contribuye muy poco a la distribución) (2, 16).

En la sangre la sustancia puede circular libre o unida a proteínas plasmáticas. Sólo la fracción libre es capaz de ingresar a las células, por lo que la cantidad de sustancia que llegue a un determinado órgano o tejido será función directa de la cantidad que esté libre en la sangre. La sustancia libre en sangre puede pasar a los distintos órganos o tejidos (donde puede acumularse, sufrir reacciones químicas (biotransformación), unirse a estructuras celulares, etc.) o puede ser excretada (16, 1, 8, 2).

En general, las sustancias se distribuyen en el organismo de una manera heterogénea. La cantidad de xenobiótico (Xb) que se encuentre en un determinado compartimiento en un momento dado dependerá de diversas variables: de las características fisicoquímicas de la sustancia (características ácido-base, liposolubilidad, hidrosolubilidad, grado de ionización), de la existencia en el lugar de moléculas por las que pueda ser afín, del contenido lipídico del órgano o tejido en cuestión, del pH tisular y del flujo sanguíneo de ese lugar (20, 16).

➤ I.B.II.3.- Excreción

La excreción es la eliminación de una sustancia o sus metabolitos del organismo (2, 8).

Uno de los principales sistemas de excreción en mamíferos es el sistema renal (por medio de la orina), siendo también muy importantes el hígado (mediante la bilis, siendo eliminada en las heces) y los pulmones (en el caso de sustancias volátiles) (20, 2, 8).

Todas las secreciones corporales excretan en alguna medida un dado xenobiótico. Estas secreciones secundarias (sudor, leche, saliva, semen, así como las faneras) no son significativas cuantitativamente, pero pueden tener importancia toxicológica por otras causas, por ejemplo, el que un plaguicida pueda ser excretado por leche (8, 20, 16).

Al igual que en la absorción, la excreción depende de las características fisicoquímicas de una sustancia; nuevamente la liposolubilidad es un parámetro fundamental. Las sustancias hidrofílicas son fácilmente excretadas; en cambio, las lipofílicas serán difícilmente eliminadas ya que por su liposolubilidad pueden atravesar fácilmente las membranas de los sistemas de excreción y reingresar por difusión simple al organismo (18, 19, 2, 8).

Los organismos han desarrollado estrategias para hacer las sustancias liposolubles más hidrosolubles mediante el proceso denominado biotransformación (1, 20, 2, 8).

Por lo tanto, las sustancias pueden ser excretadas sin ser modificadas o luego de sufrir alguna clase de alteración en su estructura química por transformaciones metabólicas (1, 20, 2, 8).

I.B.III.- BIOTRANSFORMACIÓN

Los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos capaces de metabolizar productos de desecho endógenos (por ejemplo, esteroides, eicosanoides) y sustancias exógenas (por ejemplo terpenos, alcaloides ingeridos con los alimentos) a productos más solubles en agua (y por lo tanto más fácilmente excretables), en un proceso denominado biotransformación (20, 2, 19, 21, 18, 22).

En la biotransformación el Xb es presentado al mismo tiempo a varias enzimas metabolizantes. La o las reacciones que sufra el Xb dependerán de las características fisicoquímicas del mismo y de su afinidad por cada una de dichas enzimas (2, 8, 6).

Los productos de la biotransformación pueden ser menos o más tóxicos que la sustancia original. En el caso de ser menos tóxicos se la llama biotransformación detoxificante, en tanto que si resultan ser más tóxicos es llamada biotransformación activante. Así, muchas sustancias no son tóxicas por sí mismas, sino debido a que se biotransforman a sustancias reactivas capaces de reaccionar con estructuras celulares; éste es el caso del CCl_4 o del acetaminofeno (17, 9, 18).

Las reacciones de detoxificación participarían en la resistencia de los insectos a los insecticidas, la de las plantas a herbicidas y en la biorremediación del medio ambiente por microorganismos entre otras (22).

Cuando una sustancia debe ser biotransformada para ejercer su efecto tóxico, la toxicidad final de la misma será función de la intensidad con que se active, de la reactividad del producto resultante y de la importancia biológica de las moléculas que los metabolitos reactivos puedan atacar (6). Las características fisicoquímicas del Xb y de sus metabolitos determinarán los destinos finales de los mismos, la velocidad de eliminación, su posible acumulación, etc.. Es muy importante el conocer la forma en que una sustancia puede ser metabolizada en un organismo para comprender los efectos que la misma pueda causar (8, 2, 9). En la figura I.B.2 (8) se indican los procesos que puede sufrir un Xb una vez que ingresó al organismo.

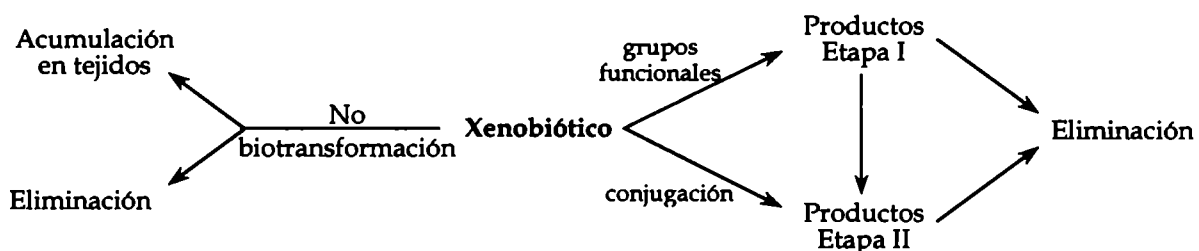


Figura I.B.2: Procesos que puede sufrir un xenobiótico en el organismo

El principal órgano metabolizante es el hígado debido a la gran cantidad y diversidad de enzimas metabolizantes que posee. Otros órganos como intestino, riñón, pulmón, adrenales, testículos, ovario, placenta, etc. también metabolizan sustancias, pero en mucho menor grado (20, 6, 23, 21).

➤ I.B.III.1.- Importancia del hígado en la biotransformación

El hígado es fundamental en la biotransformación de Xb, por lo que es blanco del efecto de una gran variedad de agentes necrogénicos naturales y sintéticos (6).

Es el órgano visceral más grande del organismo; sus células parenquimales son los hepatocitos, los cuales constituyen el 80% del volumen del hígado y el 60% del número de células. Los hepatocitos se ordenan en láminas de células formando las paredes de capilares sanguíneos denominados sinusoides (capilares sanguíneos especiales), que permiten que la sangre esté en íntimo contacto con los hepatocitos (13, 12, 2).

Existen diversos modelos para describir la estructura hepática, uno de ellos es el “acino hepático” de Rappaport, el cual lleva implícito el concepto de zona metabólica (13, 24). En este modelo la sangre circula por los sinusoides desde el sistema porta o tríada portal a la vena central del lobulillo. Estas se unen formando la vena hepática que sale del hígado. La tríada portal está formada por una rama de la arteria hepática (sangre oxigenada), una rama de la vena porta (que viene de los intestinos, páncreas, bazo y vesícula biliar) y un canalículo biliar (que conduce la bilis formada en el hígado). En la entrada del sinusoide se mezcla la sangre de la arteria hepática (20-25%) con la de la vena porta (75-80%) y la mezcla circula a lo largo del sinusoide hasta desembocar en la vena centrolobulillar (13, 21, 24, 12).

A medida que la sangre va pasando a lo largo de los sinusoides va siendo modificada por intercambios con los hepatocitos. Basándose en esto se han definido tres zonas; una “zona periportal” alrededor de la tríada portal, en la cual la sangre tiene un alto contenido de oxígeno, una zona intermedia y una zona perivenosa o centrolobulillar (alrededor de la vénula hepática), donde la sangre ya ha intercambiado gases y metabolitos. La zona centrolobulillar es la menos oxigenada, por lo que en ella está favorecido el metabolismo reductivo (13, 24, 25).

Los principales encargados de la metabolización de sustancias en el hígado son los hepatocitos, y dentro de ellos, la estructura metabolizante más importante es el retículo endoplásmico, principalmente el liso. Este último es significativamente más abundante en los hepatocitos perivenosos. La membrana nuclear también es capaz de metabolizar sustancias, aunque en una mucho menor proporción (13, 12, 21, 20, 14).

En muchos casos las enzimas presentes en la zona periportal y en la zona perivenosa son diferentes, pudiendo, además, variar con las condiciones metabólicas. Esto causa diferencias en la forma en que una sustancia pueda afectar a dichas zonas (13, 12, 21).

Los hepatocitos realizan más de 500 procesos metabólicos, por ejemplo, síntesis y secreción de proteínas, funciones importantes relacionadas con carbohidratos, proteínas y lípidos utilizados en todo el organismo, almacenamiento de glucógeno, lípidos y vitaminas, inactivación de hormonas esteroideas y polipeptídicas, procesamiento de productos de desecho endógenos y detoxificación de venenos metabólicos y exógenos (12).

➤ I.B.III.2.- Etapas de la biotransformación

El metabolismo de xenobióticos se divide generalmente en dos fases: la Fase I y la Fase II (20, 19, 2, 8).

En las reacciones de fase I la molécula es alterada químicamente por introducción o desenmascaramiento de grupos polares tales como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) y amino (-NH₂). De esta manera la molécula resultante es más hidrofílica y por lo tanto más fácilmente excretable (2, 18, 23, 20).

En las reacciones de fase II se produce la conjugación de grupos polares de la molécula con sustancias endógenas hidrofílicas de bajo peso molecular. El conjugado está bastante disociado a pH fisiológico, siendo así soluble en agua. Los grupos polares formados en la fase I sirven como sitios de reacción para las reacciones de fase II (20, 2, 23, 19).

Es importante la existencia de estas dos etapas ya que no siempre la etapa I de la biotransformación resulta en la pérdida de la actividad biológica indeseable para el organismo o en una hidrosolubilidad suficiente que permita su rápida excreción (20).

Las enzimas metabolizantes de fase I y II se distribuyen en el hígado de forma heterogénea. Por ejemplo, algunas enzimas son principalmente centrolobulillares, mientras que otras son fundamentalmente periportales. También tienen distinta distribución dentro del hepatocito; así, las enzimas de fase I se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico, en tanto que la distribución de las de fase II es más heterogénea. Por ejemplo, la glucuronil transferasa y la epóxido hidratasa están en el retículo endoplásmico, en tanto que la sulfoquinasa es citosólica (20, 26, 23, 21).

A continuación se describen cada una de estas fases.

➤ I.B.III.2.1.- Reacciones de fase I

Las reacciones que se producen en esta fase son oxidaciones, reducciones e hidrólisis, las cuales introducen un grupo polar en las moléculas (20, 2, 19, 23).

De las reacciones de fase I las más comunes son las oxidaciones. Las reducciones son mucho menos usuales, pero son importantes desde el punto de vista toxicológico (20, 2, 19, 23).

En las reacciones de fase I intervienen varias clases de enzimas, las cuales pueden ser divididas en dos grandes grupos, enzimas que poseen citocromo P450 en sus moléculas y enzimas que no lo poseen. La mayoría de las activaciones de las sustancias a metabolitos reactivos son atribuidas a las enzimas que poseen al citocromo P450 (26, 27, 20, 23, 18).

Las enzimas involucradas en la fase I serán descriptas más adelante.

Las reacciones de la fase I están indicadas en la tabla I.B.1 (20).

Tabla I.B.1: Reacciones de biotransformación de fase I

Tipo de reacción	Reacción química	Ejemplos
Oxidaciones		
Hidroxilación C alifático	$R-CH_2-R' \longrightarrow R-CHOH-R'$	pentobarbital, tolueno.
Hidroxilación C aromático	$R-C_6H_5 \longrightarrow R-C_6H_4OH$	benceno, anilina, benzopireno.
O-dealquilación	$R-O-CH_2-R' \longrightarrow R-OH + R'-C=O$	codeína, anisol, acetofenetidina.
N-dealquilación	$R-NH-CH_2-R' \longrightarrow R-NH_2 + R'-CH=O$ $\begin{matrix} R \\ \\ R_1-N-CH_2-R' \\ \\ R_1 \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} R \\ \\ R_1-NH \\ \\ R_1 \end{matrix} + R'-CH=O$	morfina, aminopirina, metadona clorpromazina, atropina.
S-dealquilación	$R-S-CH_2-R' \longrightarrow RSH + R'-CH=O$	dimetilsulfuro, metiltiopurina, metilbenzotiazol.
N-Oxidación	$R-NH-R' \longrightarrow R-NH(R')-OH$ $\begin{matrix} R_1 \\ \\ R_2-N \\ \\ R_3 \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} R_1 \\ \\ R_2-N-O \\ \\ R_3 \end{matrix}$	naftilamina, aminobifenilo, anilina acetamidofluoreno clorpromazina, imipramina, trimetilamina.
S-Oxidación	$R-S-R' \longrightarrow R-S(=O)-R'$	clorpromazina, tioacetamida.
Desulfuraciones	$R-C(=S)-R' \longrightarrow R-C(=O)-R'$ $\begin{matrix} R_2 \\ \\ R_1-P-S \\ \\ R_3 \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} R_2 \\ \\ R_1-P=O \\ \\ R_3 \end{matrix}$	tiobarbituratos. paratión, malatión, guthion.
Epoxidación	$R-CH=CH-R' \longrightarrow R-CH(O)-CH(R')-$	benzopireno, aflatoxina B ₁ , cloruro de vinilo, tricloroetileno.
Deaminación	$\begin{matrix} R_1 \\ \\ R_2-CH-NHR' \\ \\ R_2 \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} R_1 \\ \\ R_2-C=O \\ \\ R_2 \end{matrix} + R'-NH_2$	anfetamina, metanfetamina, efedrina, norefedrina.
Alcoholes	$R-CH_2-OH \longrightarrow R-C=O$ $\begin{matrix} R_1 \\ \\ R_2-CH-OH \\ \\ R_2 \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} R_1 \\ \\ R_2-C=O \\ \\ R_2 \end{matrix}$	metanol, etanol, feniletanol. isopropanol, meprofendiol, ciclohexanol.
Aldehídos	$R-CH=O \longrightarrow R-COOH$	formaldehído, acetaldehído, benzaldehído.
Reducciones		
grupos azo	$R-N=N-R' \longrightarrow RNH_2 + R'-NH_2$	colorantes azoicos, dimetilaminobenceno.
grupos nitro o nitroso	$R-NO_2 \rightarrow R-N=O \rightarrow R-NHOH \rightarrow R-NH_2$	nitrobenceno, cloranfenicol, nitrosobenceno, trinitrotolueno.
dehalogenaciones reductivas	$R-CH_2X \longrightarrow R-CH_3$	halothano, tetracloruro de carbono, DDT.

Tabla I.B.1 (continuación): Reacciones de biotransformación de fase I

Hidrólisis		
ésteres carboxílicos	$R-COOR' \longrightarrow R-COOH + R'OH$	ácido acetilsalicílico, procaína, cocaína.
ésteres fosforados	$\begin{array}{c} R_2O \\ \\ R_1-P-X \\ \\ R_3 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} R_2O \\ \\ R_1-P-OH \\ \\ R_3 \end{array}$	insecticidas fosforados.
ésteres nitrados	$R-NO_3 \longrightarrow NO_3^- + ROH$	nitroglicerina, tetranitrato de pentaeritrol.
halógenos de alquilo	$R-Cl \longrightarrow ROH + Cl^-$	DDT, tricloroetileno.
amidas	$R-CONH-R' \longrightarrow RCOOH + R'NH_2$	lidocaína, fenacetina, procainamida.

➤ I.B.III.2.2.- Reacciones de fase II

Las reacciones de fase II son reacciones biosintéticas en las que se conjugan sustancias con productos endógenos, lo que les da una mayor hidrosolubilidad. Estas reacciones son normalmente empleadas por el organismo para excretar sustancias endógenas, por ejemplo, bilirrubina. En general existen mecanismos especializados de excreción para los conjugados formados. Las reacciones de fase II se encuentran en todos los organismos, pero existen diferencias tanto cuali como cuantitativas (8, 2).

Las conjugaciones se producen sobre grupos polares como alcoholes, fenoles, restos carboxílicos de un ácido, grupos aminos, etc. (20, 6).

Las reacciones de fase II son en general detoxificaciones, pero también pueden ocurrir activaciones, por ejemplo, se pueden formar grupos N-hidroxilados a partir de aminas aromáticas, ser conjugados en el hígado, pasar a sangre, pasar a la vía renal y llegar a la vejiga; si la orina es ácida, el grupo glucuronilo se puede separar, liberándose el N-hidroxiderivado que es carcinogénico para el epitelio de la vejiga (2, 23).

Las principales reacciones de la fase II son las conjugaciones con ácido glucurónico (la más importante cuantitativamente), con glutatión, con sulfato o con aminoácidos; en estas reacciones las sustancias o sus metabolitos se conjugan con compuestos endógenos activados (2, 26, 20, 23, 8).

En otros casos se producen acetilaciones y metilaciones. En el caso de las acetilaciones existe un marcado polimorfismo en los seres humanos, esto divide a la población en acetiladores lentos y rápidos, lo cual se puede reflejar en distinta respuesta a medicamentos (2, 23).

Una enzima importante de la fase II es la epóxido hidrolasa, la cual es la encargada de la detoxificación de epóxidos, los cuales hidrata a dioles (2, 23, 20).

➤ I.B.III.3.- Enzimas de fase I

En las reacciones de fase I intervienen varias clases de enzimas, las que pueden ser divididas entre las que poseen citocromo P450 y las que no lo poseen (20, 27, 23, 18).

➤ I.B.III.3.1- Enzimas de fase I que no contienen citocromo P450

Muchas de las enzimas de fase I que no poseen citocromo P450 catalizan reacciones que son importantes en el metabolismo de Xb. Son ejemplos: la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa que intervienen en el metabolismo del alcohol etílico, así como enzimas que participan en la metabolización de aminas como las flavinmonooxigenasas (que también participan en el metabolismo de tioles y tioureas), la monoaminoxidasa, la xantino oxidasa (que participa en el metabolismo de las purinas) o la aldehído oxidasa (que cataliza la oxidación de aldehídos) (6, 27, 23).

En muchos casos estas reacciones son catalizadas también por enzimas que sí poseen citocromo P450, lo que dificulta mucho su estudio (27, 23).

➤ I.B.III.3.2.- Enzimas de fase I que contienen citocromo P450

Estas enzimas forman parte del sistema de oxidasa de función mixta. Son muy importantes por la gran variedad de reacciones que catalizan, por lo que serán estudiadas a continuación en más detalle.

I.B.IV.- SISTEMA DE OXIDASA DE FUNCION MIXTA

Su nombre deriva de que un átomo de la molécula de oxígeno que participa en estas reacciones es incorporado al sustrato, mientras que el otro es reducido a agua. Este sistema está formado por tres componentes básicos: el citocromo P450, la NADPH-citocromo P450 reductasa y fosfolípidos (20, 28).

En este sistema el citocromo es el que cataliza la reacción final. Los electrones necesarios para la reacción provienen del NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida), siendo transferidos por la citocromo P450 reductasa (20, 6).

➤ I.B.IV.1.- Componentes del sistema de oxidasa de función mixta

A continuación se describen los distintos componentes de este sistema.

► I.B.IV.1.1.- Citocromo P450

Los citocromos son proteínas hémicas tioladas que catalizan reacciones de biotransformación; modifican la estructura de miles de moléculas orgánicas, pudiendo bioactivar muchos compuestos a metabolitos reactivos o radicales libres, a veces con consecuencias críticas para la salud y el funcionamiento de los organismos (6, 29).

Los citocromos P450 participan en la modificación y eliminación de compuestos endógenos (en muchos casos moléculas regulatorias) como ser esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos, leucotrienos, prostaglandinas y aminas biogénicas (20, 24).

La familia del citocromo P450 está formada por proteínas similares (isoenzimas) con el mismo centro activo, donde se ubica un grupo prostético hemo (hierro-protoporfirina IX), el cual está unido en parte por fuerzas hidrofóbicas. Hay un grupo hemo por molécula de citocromo (23, 18, 24, 20, 30).

El grupo hemo está coordinado en su quinta posición con un tiolato fijo de un residuo de cisteína de la apoproteína y con una molécula de agua reemplazable en su sexta posición. El grupo tiolato es el que le da a los citocromos P450 sus propiedades catalíticas dado que genera distintos estados de oxidación del hierro, todos ricos en electrones y con diferentes reactividades. El grupo cisteína se conserva entre los distintos citocromos (28, 18, 22, 23, 30).

Los citocromos P450 son proteínas de aproximadamente 57.000 daltons (unos 500 residuos). La parte proteica es la que le da la especificidad de reacción al determinar la topología del sitio activo. Se los clasifica en familias, las que se indican con números arábigos; los miembros de cada familia tienen al menos una homología del 40%. Cuando la homología es mayor del 55-60%, son agrupados dentro de una misma subfamilia, las cuales son indicadas con letras mayúsculas (A, B, etc.). Las formas individuales de P450 en una subfamilia son numeradas secuencialmente, por ejemplo, 2B1, 2B2, 2B3, etc. Así, un citocromo P450 se nombraría *cyp2E1* o CYP2E1 (18, 24, 20, 30, 31, 29, 32, 33).

En humanos se han identificado al menos 25-30 citocromos P450 diferentes, en tanto que en ratas se han identificado más de 40. La rata es la especie mejor estudiada respecto a la ubicación de los distintos citocromos en el acino hepático (34, 30, 24).

Inicialmente el término citocromo P450 fue utilizado para identificar una hemoproteína hepática microsomal; su nombre deriva de que cuando se combina en estado reducido con monóxido de carbono da una banda de absorción característica a 450 nm, por lo que se la llamó pigmento P450 o P450. El monóxido de carbono compite con el oxígeno por la sexta posición de coordinación. La presencia del ligando tiolato de la cisteína en posición trans al monóxido de carbono es lo que produce el inusual espectro de absorción (23, 29, 22, 31, 20).

Los citocromos están presentes en virtualmente todos los organismos, desde los microbios hasta el hombre. Se los ha encontrado principalmente en hígado, riñón y

adrenales, y en menor cantidad en otros tejidos como pulmón, intestino, cerebro y placenta. En el hígado los citocromos son más abundantes en la zona centrolobulillar (o perivenosa) del acino hepático (20, 29, 35, 24, 22, 36).

Intracelularmente los citocromos son más abundantes en el retículo endoplásmico. Los que están en el retículo endoplásmico del hígado catalizan una gran variedad de reacciones, en tanto que los que están en otros tejidos son más selectivos en cuanto a qué sustrato metabolizan (23, 24, 37).

Existe un considerable solapamiento en la eficiencia para catálisis de las diferentes isoenzimas. Así, varias isoenzimas pueden catalizar la misma reacción, aunque con diferentes velocidades. Sin embargo, en muchos casos es una única enzima o es fundamentalmente una la que cataliza el metabolismo de una determinada sustancia (ya sea la detoxificación o la activación) (20, 30). El fenotipo expresado en un determinado órgano define tanto el metabolismo como la toxicidad o la actividad farmacológica de un compuesto en ese lugar (34).

Los citocromos P450 tienen la característica de ser enzimas inducibles (19, 36, 23, 14).

➤ I.B.IV.1.2.- NADPH-citocromo P450 reductasa

La citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH es la encargada de la transferencia de los electrones del NADPH hacia el citocromo P450. Es una flavoproteína que contiene un mol de FAD (flavinadenina-dinucleótido) y un mol de FMN (flavina-mononucleótido) como grupos prostéticos por cada molécula de proteína. Los cofactores son importantes para el flujo de electrones del NADPH al FAD, al FMN y finalmente hacia el aceptor de electrones citocromo P450 (31, 35, 33, 30).

Esta enzima ha sido detectada en todos los tejidos ensayados, siendo especialmente activa en hígado, adrenales, intestino delgado, riñón y pulmón. El nivel de la NADPH-citocromo P450 reductasa hepática al nacimiento es similar al de un adulto (7, 35).

Al igual que los citocromos P450, la citocromo P450 reductasa se ubica principalmente en la región centrolobulillar. En el retículo endoplásmico hay una reductasa por cada 10-20 moléculas de P450; se formaría un acople multienzimático que tendría una cierta movilidad en la membrana (33, 20, 19).

En la mitocondria el papel de la NADPH-citocromo P450 reductasa es realizado por dos proteínas: una reductasa tipo ferredoxina oxidoreductasa (la cual contiene FAD) y una ferredoxina (la que contiene un centro hierro-azufre) (30).

Esta enzima, al igual que los citocromos, es inducible (19).

➤ I.B.IV.1.3.- Fosfolípidos

Se ha demostrado en sistemas reconstituídos que los fosfolípidos son necesarios para la actividad del sistema de oxidasa de función mixta o monooxigenasa. El principal fosfolípido es la fosfatidilcolina. La función de los lípidos no es muy clara; se cree que facilitan la transferencia de electrones al citocromo P450 y aumentan la afinidad del sustrato y de la citocromo P450 reductasa por el citocromo P450 (20, 6, 26).

➤ I.B.IV.1.4.- Citocromo b_5 /citocromo b_5 reductasa

El citocromo b_5 por medio de la citocromo b_5 reductasa podría transferir el segundo electrón del ciclo catalítico del P450 (ver más adelante). El sustrato que se esté metabolizando determina si el segundo electrón proviene de la reductasa o del citocromo b_5 (38, 20, 6, 39).

La presencia de b_5 puede cambiar la afinidad y la velocidad de reacción de un sustrato respecto de *cyp2E1* (38, 20, 6, 39).

➤ I.B.IV.2.- Reacciones catalizadas por el sistema de oxidasa de función mixta

Muchas de las reacciones de biotransformación de fase I son catalizadas por este sistema que contiene citocromo P450. En líneas generales se las puede dividir en reacciones de oxidación y reacciones no oxidativas, incluyéndose entre estas últimas las reducciones.

➤ I.B.IV.2.1.- Reacciones de oxidación

Dentro de las reacciones de oxidación las más comunes son las monooxigenaciones, por las cuales, como se indicó anteriormente, recibe su nombre este sistema. En estas reacciones se produce la transferencia de un átomo de oxígeno a un determinado sustrato. Las reacciones más comunes son hidroxilaciones, epoxidaciones, O-dealquilaciones y N-dealquilaciones oxidativas, N-hidroxilaciones, S-oxidaciones (28, 20).

Otra actividad oxidativa importante es la de oxidasa, por la que los citocromos son capaces de formar especies reactivas de oxígeno en presencia o no de sustrato. Se forma radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 y H_2O por reducción del oxígeno. Este fenómeno es particularmente importante en el caso del metabolismo de xenobióticos, ya que al no ser sustratos endógenos naturales de estos citocromos P450 podrían ubicarse incorrectamente en el sitio activo para recibir el oxígeno. Esta actividad de oxidasa podría dar origen a la peroxidación de lípidos en sistemas microsomales hepáticos de rata in vitro (28, 40).

Algunos citocromos son capaces de realizar otras reacciones menos usuales como catalizar la unión oxidativa de dos fenoles, la deshidrogenación con formación de un doble enlace en la testosterona, la deformilación oxidativa en la síntesis de esteroides o la ruptura de una unión C=N en la biosíntesis de NO a partir de L-arginina (28).

Un peróxido puede sustituir al oxígeno y a los equivalentes de reducción. Esta sustitución es llamada "lanzadera del peróxido", la cual se cree que podría estar involucrada en la peroxidación de lípidos (23, 40).

► I.B.IV.2.1.1.- Mecanismo de oxidación

En las reacciones de oxidación más comunes se produce el agregado de un átomo de oxígeno al sustrato. En la figura I.B.3 (28 y 2 con modificaciones) se representan las reacciones de monooxigenación catalizadas por los citocromos P450.

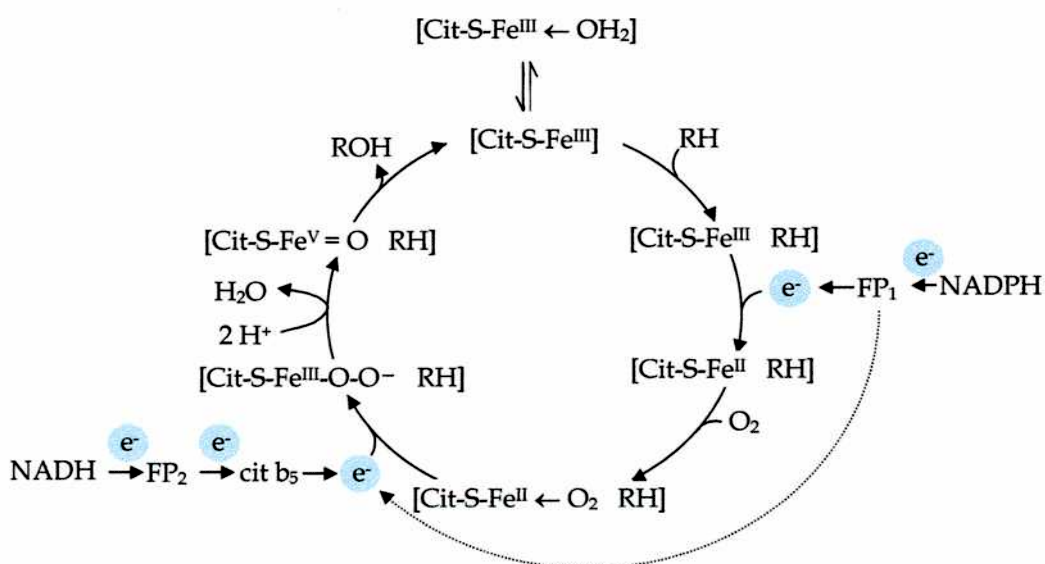


Figura I.B.3: mecanismo de oxidación por citocromo P450

En su estado de reposo los citocromos existen generalmente como una mezcla del estado hexacoordinado de bajo spin Fe(III), con una molécula de agua coordinada en la sexta posición, y un estado pentacoordinado de alto spin Fe(III), en el cual el cisteinato es el único ligando axial (28, 23, 32).

La unión de un sustrato a la proteína en un lugar cercano al hemo generalmente desplaza el equilibrio hacia la forma pentacoordinada. Luego de lo cual el Fe(III) es reducido a Fe(II) por un electrón proveniente del NADPH, el cual es transferido por la citocromo P450 reductasa (FP₁). La reducción del Fe(III) a Fe(II) permite la unión del oxígeno (28, 32).

El oxígeno se une formando el complejo Fe(II)-O₂, el cual es reducido por un segundo electrón, formando un complejo que, debido principalmente a su corta vida, no está bien caracterizado (28). El segundo electrón para la reducción puede ser derivado de la NADPH-

citocromo P450 reductasa o puede provenir del NADH, siendo transferido por el citocromo b_5 vía la NADH citocromo b_5 reductasa (FP₂) (20, 23, 32, 41).

Habría un reordenamiento del complejo formado, luego de lo cual se produce la ruptura del enlace O-O y se libera uno de los átomos de oxígeno en forma de agua. El otro átomo permanecería coordinado con el hemo, posiblemente como un intermediario oxiperferril (Cit-S-Fe^V=O) altamente reactivo, que sería el que oxida al sustrato (39, 28).

Una vez oxidado el sustrato es liberado de la enzima (39, 28).

► I.B.IV.2.2.- Reacciones no oxidativas

Los citocromos son capaces de catalizar reacciones no oxidativas, las cuales no son tan comunes como las oxidaciones pero son importantes desde el punto de vista toxicológico. En lo que respecta a los xenobióticos, la actividad no oxidativa más importante es la de reductasa, la cual está implicada en la reducción catalítica de compuestos polihalogenados, nitroaromáticos, azo-compuestos, aminas terciarias, N-óxidos y óxidos de areno. La actuación como reductasa de algunos tipos de citocromos P450 permite la activación del CCl₄ a sus metabolitos reactivos (28, 25, 20, 2).

Las reacciones de reducción también se producen en sustancias endógenas, como por ejemplo la formación de prostaciclina por isomerización de prostaglandinas (28).

► I.B.IV.2.2.1.- Mecanismo de reducción del citocromo P450

La capacidad reductora de los citocromos es posible por la existencia de Fe(II) en el sitio activo catalítico del citocromo P450. El Fe(II) es un buen agente transferente de electrones, pudiendo transferirlos tanto al oxígeno (en las reacciones de monooxigenación) como a otros sustratos muy oxidados, capaces de aceptar dicho electrón (28, 42).

Coherentemente, las reacciones de reducción catalizadas por los citocromos P450 son inhibidas por el oxígeno, ya que el sustrato a reducir debería competir con el O₂ por los electrones cedidos por el NADPH. Por esto las reducciones pueden ocurrir en mayor extensión en condiciones anaeróbicas o de baja presión de oxígeno (28, 42).

► I.B.IV.3.- Inactivación suicida

Los citocromos P450 muchas veces participan en reacciones llamadas “inactivaciones suicidas”, en las cuales el producto formado por un citocromo reacciona con la misma molécula de citocromo causando su inactivación. En el caso del CCl₄, el mismo inactiva al

citocromo por destrucción del grupo prostético a productos que se unen a irreversiblemente a la apoproteína. Esta inactivación protegería contra una nueva exposición (9, 43).

➤ I.B.IV.4.- Inducción de los sistemas metabolizantes

Una característica importante de muchas de las enzimas de los sistemas metabolizantes es que son inducibles. En general la inducción no es en el acino hepático completo sino en ciertas zonas del mismo (44, 6, 33, 24, 36, 23).

Así, los niveles de los citocromos P450 están regulados tanto por factores endógenos (por ej, hormonas gonadales) como por factores exógenos (sustancias químicas, ayuno, etc.). Las sustancias químicas pueden inducir dramáticamente a los citocromos (20, 45, 34).

Otras enzimas que contribuyen al metabolismo de sustancias químicas son también inducibles, por ejemplo: aldehído deshidrogenasa, epóxido hidrolasa, NADPH citocromo P450 reductasa, distintas glutatión-S-transferasas, flavinmonooxigenasa microsomal, monoamino oxidasa, UDP-glucuroniltransferasa, peroxidasa (prostaglandina sintetasa y la mieloperoxidasa), etc.. La inducción de las enzimas de fase II es usualmente mucho más débil que la de las de fase I; esto podría causar un desbalance entre la activación y la posible conjugación del producto activado que podría resultar dañino para la célula (24, 33, 26).

➤ I.B.IV.4.1.- Mecanismos de inducción

El caso de los citocromos es el más estudiado. Habría básicamente dos mecanismos de inducción: aumento de la transcripción o eventos post-transcripcionales (36, 45, 23).

Se conoce el mecanismo de aumento de la transcripción para el 3-metilcolantreno: un receptor después de interactuar con la sustancia se uniría al ADN y activaría la transcripción. Los mecanismos de otras sustancias (por ejemplo fenobarbital) son desconocidos (23, 33).

La inducción por eventos post-transcripcionales incluye la estabilización del mRNA o de la misma proteína citocrómica (denominado estabilización por sustrato). En la estabilización por sustrato al no haber necesidad de síntesis proteica la inducción es más rápida (45, 46, 38, 24, 23).

Una misma sustancia puede causar los dos tipos de inducciones. Por ejemplo, la acetona induce al *cyp2E1* por estabilización del citocromo, en tanto que induce al *cyp2B1* por inducción de la transcripción (45, 46, 38).

El ayuno causaría la inducción de algunos citocromos. En ratas, el ayuno induciría al *cyp2E1*, se produciría un incremento del mRNA correspondiente por aumento de la transcripción o por estabilización del mensajero. En el estudio del CCl₄ es muy utilizado el ayunar los animales la noche previa a los experimentos (46, 45).

➤ *I.B.IV.5.- Factores que modifican la intensidad de los procesos de biotransformación*

Existen diferencias cuali (distintas enzimas metabolizantes) y cuantitativas (diferencia de cantidad de enzimas metabolizantes, presencia de inhibidores naturales, balance de reacciones opuestas, reacciones competitivas, etc.) entre distintas especies. Las cualitativas conciernen principalmente a las enzimas de conjugación de fase II, en tanto que las cuantitativas son principalmente de enzimas de fase I (2, 20).

Dentro de una misma especie existen diferencias genéticas tanto en las reacciones de fase I como en las de fase II (2, 23, 20). Estas diferencias se han observado para el metabolismo de anticoagulantes como warfarina o dicumarol, así como para fármacos como la fenilbutazona o la antipirina, las cuales han sido atribuidas a factores cuantitativos. En la población humana el principal factor causante de las diferentes respuestas a un dado xenobiótico serían las variaciones en las actividades de los citocromos P450 individuales (de incluso tres órdenes de magnitud) (20, 23, 26, 39).

La calidad de la dieta, factores ambientales, sustancias presentes en los alimentos (sustancias tóxicas o no, inductoras o inhibidoras) alteran los niveles de enzimas metabolizantes. Las dietas pobres en proteínas y altas en hidratos de carbono o grasas disminuyen la capacidad de metabolización, en tanto que las dietas ricas en proteínas la aumentan (20, 2, 23).

En el caso de los seres humanos, los considerables estímulos a los que están constantemente sometidos (tabaco, alcohol, contaminantes ambientales, componentes de la dieta, medicamentos, insecticidas, etc.) hace que muchas de las enzimas metabolizantes estén inducidas (19, 23).

La edad es también un factor importante en la metabolización de sustancias. En general, el nivel de enzimas metabolizantes es menor en el momento del nacimiento y en la vejez (20, 2, 23, 19).

El contenido de citocromo P450, de la citocromo P450 reductasa o la afinidad del sustrato por el citocromo P450 son modulados por hormonas, por lo que habría variaciones de acuerdo a la hora del día (por ejemplo, en el caso de la rata debido al ritmo circadiano de los niveles de corticosterona), o por el estrés, el embarazo o el ayuno (20).

En el caso de la rata, existen diferencias en la expresión de enzimas en función del sexo, esto no sucedería en otras especies como por ejemplo el hombre. Las ratas macho poseen una mayor capacidad de metabolización de xenobióticos, por lo que en la investigación de la toxicidad del CCl_4 muchas veces se emplean ratas macho (20, 2, 23, 19).

➤ I.B.IV.6.- Degradación de los citocromos

No sólo es importante el aumento de la expresión de un determinado citocromo en la acción tóxica de una sustancia, sino también su degradación. Los distintos componentes del sistema de oxigenasa de función mixta (isoenzimas de citocromo P450, NADPH-citocromo P450 reductasa, citocromo b₅) poseen distintas vidas medias. Con excepción de unos pocos mecanismos de proteólisis selectiva, los mecanismos de recambio no son conocidos (47).

Como se ha indicado anteriormente, una de las formas de inducción del citocromo P450 es por estabilización por sustrato. Se cree que en este tipo de inducción en presencia de un determinado sustrato se forma un complejo que protege al citocromo de la degradación, aumentando así su vida media. Este es el caso del citocromo 2E1, el cual tiene una vida media muy corta (de 7 a 8 hs). En este citocromo existiría la secuencia PEST (ver Síntesis de Proteínas), la cual estaría asociada a una rápida proteólisis. Por el contrario, el *cyp2B1*, que no posee la secuencia PEST, no tendría este tipo de regulación (47, 48).

La vida media de la citocromo P450 reductasa es similar a la de las proteínas microsomales totales, en cambio la del citocromo b₅ es considerablemente mayor (19).

➤ I.B.IV.7.- Citocromos importantes en la intoxicación por CCl₄

Como se indica más adelante, se ha determinado que los citocromos que activan al CCl₄ a sus metabolitos reactivos serían *cyp2E1* y *cyp2B1/B2*. Ambos tipos de citocromos están en las células de la región perivenosa hepática, siendo más abundantes en las 6-7 capas de células más cercanas a la vena central (36, 24, 49).

Se describirán aquí las características generales de estos citocromos.

➤ I.B.IV.7.1.- Cyp2E1

La característica común que parecerían tener las moléculas metabolizadas por *cyp2E1* es su pequeño tamaño (26, 18, 24, 32).

Este citocromo es importante en la metabolización de un gran número de sustancias, algunas de las cuales causan su inducción, por ejemplo etanol, acetona, pirazol, piridina, isoniazida, imidazol, benceno, acetona, tricloroetileno. En la biotransformación de algunas de las sustancias se generan metabolitos citotóxicos y carcinogénicos (45, 50, 49, 33, 26).

El *cyp2E1*, que en el caso de la rata era antes llamado citocromo P450j, metaboliza sustancias endógenas. Es muy activo en la reducción de hidroperóxidos formados en la peroxidación de lípidos (51, 38, 52, 24, 50, 26, 19).

El *cyp2E1* es fácilmente inducible en humanos, por lo que es importante en la relación entre la exposición laboral y no laboral a sustancias, por ejemplo, se han encontrado niveles

hepáticos elevados de *cyp2E1* en alcohólicos, lo que, como se indica más adelante, podría tener consecuencias en la exposición a CCl_4 en el ámbito laboral (26, 38, 53).

Relación con la peroxidación de lípidos: El citocromo 2E1 (en presencia de NADPH) es particularmente activo en la reducción del oxígeno molecular, con generación de especies reactivas de oxígeno capaces de iniciar la peroxidación de lípidos (49, 24, 51, 38, 52, 45, 32, 37). Esto es así porque al estar constitutivamente en la forma de alto espín (característica que lo hace único) permite que sea reducido por la citocromo P450 reductasa en ausencia de sustrato (38, 37, 49, 50).

Este citocromo es regulado negativamente por los productos formados en la peroxidación de lípidos, es decir, por los productos que él mismo puede generar. La inhibición es de magnitud suficiente como para alterar significativamente la metabolización de xenobióticos (51, 52).

► I.B.IV.7.2.- *Cyp2B*

Los citocromos 2B1 y 2B2 (genéricamente *cyp2B*) son muy similares, difieren solamente en 14 de los 491 aminoácidos. Estos citocromos metabolizan un amplio espectro de sustancias lipofílicas y sustratos esteroideos, incluyendo la androstenediona (24, 33).

El *cyp2B* de rata antes era llamado P450b (46, 19). Su expresión constitutiva es muy baja en hígado de rata; la proteína 2B2 es baja, pero medible, en tanto que 2B1 es 5-10 veces menor (33, 24).

Esta subfamilia de citocromos es inducible por fenobarbital; este inductor causa un aumento de la transcripción que va acompañado de un incremento del retículo endoplásmico liso de la zona centrolobulillar, como resultado de esto se produce hipertrofia celular con el consiguiente aumento del peso del hígado (19, 33, 12).

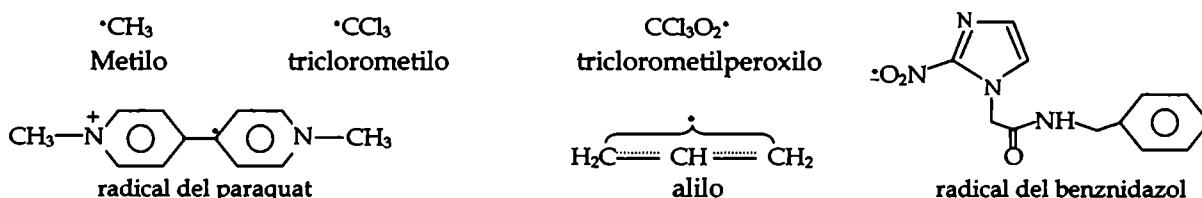
El tratamiento con fenobarbital aumenta unas 50 veces el contenido de *Cyp2B1*. En cambio no influye en la distribución y contenido de citocromo 2E1 (36, 26, 46, 24, 33, 11).

I.C.- RADICALES LIBRES

➤ I.C.I.- Introducción

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares (orgánicos o inorgánicos) que poseen al menos un electrón impar en su orbital más externo. Estas especies tienen su octeto electrónico incompleto, por lo que en general son reactivas ya que buscan aparear su electrón impar reaccionando con otras moléculas (54, 9, 37, 55, 56, 57, 3).

Son ejemplos de radicales libres:



Un radical libre será más estable cuanto mayor sea su capacidad para deslocalizar su electrón impar, lo cual depende de su estructura química y en particular de factores electrónicos y estéricos. La vida media de un radical libre es inversamente proporcional a su reactividad (9, 37).

Por ser los radicales libres moléculas electrofílicas (deficientes en electrones) tienden a reaccionar con moléculas nucleofílicas (ricas en electrones). En los sistemas biológicos serán nucleofílicas aquellas moléculas ricas en átomo de N, O o S; es por esto que son blancos frecuentes de ataque las proteínas (con aminoácidos como lisina, histidina, cisteína, metionina, etc.), así como las moléculas de ADN y ARN (9, 3).

Una célula será afectada por un radical libre solamente cuando sus moléculas esenciales se vean afectadas; así, la reacción de un radical libre con componentes celulares que estén en alta concentración o que puedan ser fácilmente reemplazados no comprometería la función o la vida de la célula (9, 34).

La importancia toxicológica que pueda tener un radical libre dependerá tanto de su reactividad como del lugar en que sea generado, así como de la distancia del lugar de generación a la que se hallen moléculas vitales para la célula. La altísima reactividad de radicales libres como $\text{HO}\cdot$, $\cdot\text{CCl}_3$ o $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ hace imposible que puedan migrar grandes distancias desde su sitio de generación sin reaccionar con algún componente celular (44, 55, 9, 54).

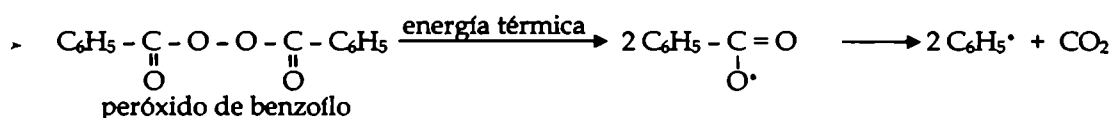
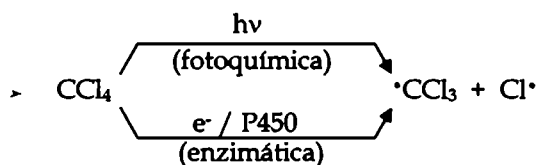
➤ I.C.II.- Reacciones de formación de radicales libres

Un radical libre puede generarse por ruptura homolítica de una unión covalente o por cesión o captación de un electrón a partir de una especie neutra en procesos físicos, químicos o biológicos (9, 54). A continuación se describen brevemente dichas reacciones.

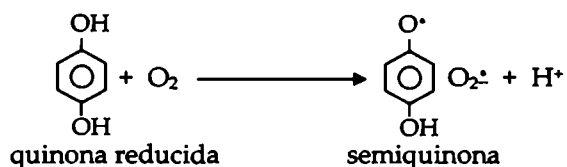
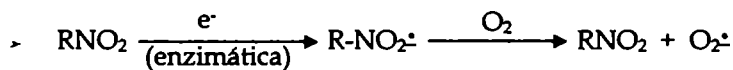
➤ *ruptura homolítica de uniones covalentes:* puede ser causada por energía fotoquímica, térmica o enzimática:



son ejemplos la ruptura homolítica del CCl_4 por luz UVC o por el sistema de oxidasa de función mixta microsomal, así como la ruptura térmica del peróxido de benzoílo (utilizado como iniciador de radicales libres) (9, 54, 55, 57):



➤ *Por cesión o captación de electrones:* en muchos de estos procesos intervienen sistemas enzimáticos (54, 58):



Los radicales libres se generan en muchos lugares de las células, como ser retículo endoplásmico, lisosomas, mitocondrias. El que se forme un radical libre depende muchas veces de que existan sistemas de metabolización adecuados (9, 58, 44).

➤ I.C.III.- Reacciones de los radicales libres

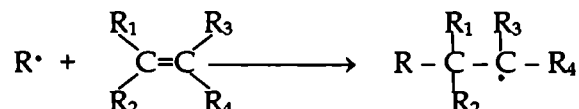
Debido a su alta reactividad los radicales libres pueden dar varios tipos de reacciones, las cuales se indican a continuación (9, 54, 3, 55):

1.- *Abstracción:* se produce la abstracción de hidrógeno de una molécula adecuada, igual o diferente a la que dio origen al radical libre, con formación de un nuevo radical libre:

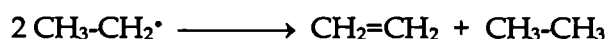


donde $R^{\bullet}$ podría ser un radical de un ácido graso, una especie radicalaria de oxígeno o un radical libre de un xenobiótico (por ejemplo $CCl_3O_2^{\bullet}$).

2.- *Adición*: Se combina un radical libre con una molécula neutra dando lugar a la formación de otra especie radicalaria:



3.- *Desproporción* (dismutación): dos radicales iguales se transforman en dos productos no radicalarios distintos:



4.- *Cancelación*: se combinan dos radicales libres, iguales o distintos, con formación de una molécula no radicalaria



Las reacciones que han sido más frecuentemente vinculadas con problemas toxicológicos así como en farmacología y patología, son las reacciones de abstracción y adición. La primera puede dar lugar a procesos como la peroxidación de lípidos y otras reacciones sobre bases de ADN y proteínas, mientras que la segunda puede originar uniones covalentes con componentes celulares (9, 3).

➤ **I.C.IV.- Especies reactivas importantes toxicológicamente**

Por la acción de xenobióticos así como en procesos fisiológicos normales se generan radicales libres. Estos pueden ser especies reactivas derivadas del xenobiótico, especies reactivas de oxígeno o radicales generados sobre moléculas biológicas como lípidos o proteínas (34, 59, 60). Se considerarán aquí algunos de ellos.

Radicales libres de oxígeno: La variedad de especies reactivas de oxígeno que se generan en los sistemas biológicos es limitada.

El oxígeno molecular es un dirradical ya que posee dos electrones ubicados en forma paralela, debería reaccionar con moléculas que tengan la misma característica. Como este tipo de molécula es raro, en general da reacciones que involucran un solo electrón. Son esta clase de reacciones las que permitirían la formación de especies reactivas de oxígeno: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidropéroxido ($HO_2^{\bullet}$) peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$) (59, 37, 57, 54).

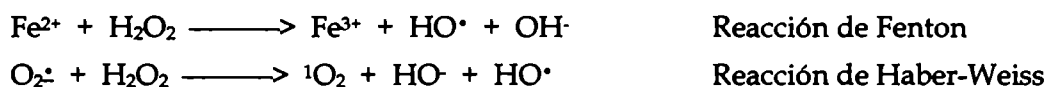
El $O_2^{\bullet-}$ es el radical libre derivado del oxígeno mejor conocido. Tiene características

únicas porque puede dar origen a otras especies reactivas como el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y el radical hidroperóxido (37).

El H_2O_2 , pese a no ser un radical libre, ha sido muy estudiado debido a que se genera frecuentemente en el organismo. No es lo suficientemente reactivo como para oxidar muchas moléculas biológicas en el medio acuoso, pero puede difundir a través de las membranas biológicas y dar origen a especies muy reactivas como el radical hidroxilo. La fuente más importante es la dismutación del O_2^- a H_2O_2 y O_2 por la superóxido dismutasa (37, 57).

De las especies reactivas generadas por el oxígeno la más reactiva es el $\text{HO}^\bullet$, considerada la especie oxidante más potente y de vida media más corta generada en circunstancias normales en un medio biológico. Por su corta vida media no puede alejarse mucho del lugar de formación, por lo que el daño que produce es amplio pero indiscriminado (44, 37, 57).

Existen dos fuentes biológicas importantes de $\text{HO}^\bullet$, la reacción de Fenton (con metales de transición como hierro (principalmente) y cobre en estado reducido) y la reacción de Haber-Weiss:



El $\text{HO}^\bullet$ es capaz de iniciar la peroxidación de lípidos por abstracción de un hidrógeno y de unirse a los dobles enlaces etileno de bases purínicas y pirimidínicas (37, 44, 58).

Otra forma reactiva de oxígeno es el oxígeno singulete (${}^1\text{O}_2$) el cual se forma por inversión de uno de los electrones desapareados del oxígeno mediante energía. El ${}^1\text{O}_2$ puede interactuar con sustancias como los ácidos grasos poliinsaturados, iniciando de esta forma la peroxidación de lípidos (44, 57).

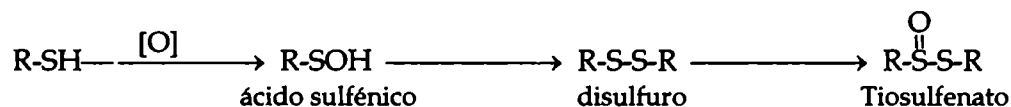
Radicales oxigenados de moléculas biológicas: También son importantes toxicológicamente los radicales oxigenados que se originan en moléculas biológicas como ser los radicales alcoxilo ($\text{LO}^\bullet$) o peroxilo ($\text{LOO}^\bullet$) provenientes de los lípidos. Los $\text{LOO}^\bullet$ son de vida media larga, pudiendo difundir del lugar de formación. Serían los responsables de la propagación de la peroxidación de lípidos. Por abstracción de un átomo de hidrogeno de otra molécula forman los hidroperóxidos (LOOH), los que por descomposición por metales de transición pueden producir los radicales alcoxilo (44, 59, 60).

Otra especie radicalaria importante son los carbonilos excitados, los cuales se forman en los procesos de peroxidación de lípidos. Estas especies pueden abstraer H de donores lipídicos, comportándose por lo tanto como iniciadores de peroxidación de lípidos (44).



Radicales libres de azufre: Se pueden formar radicales libres a partir grupos sulfhidrilos de la cisteína o por ruptura de puentes disulfuro de proteínas, generándose un radical tiilo ($RS^\bullet$), el cual puede tener un importante papel en las funciones y/o disfunciones celulares, por ejemplo, puede dar lugar a la peroxidación de lípidos (57, 9).

Los grupos tioles se pueden oxidar siguiendo la secuencia (9):



➤ I.C.V.- Formación de radicales libres en los sistemas biológicos

En muchos procesos celulares normales se generan radicales libres como intermediarios, los cuales permanecen unidos a la enzima en el lugar donde fueron formados el tiempo suficiente como para que pueda ocurrir la reacción siguiente. Al no quedar libres en el medio no serían dañinos. Esto permite reacciones como ciertas isomerizaciones, reducciones de nucleótidos para la síntesis de ADN, biosíntesis de hormonas y transducción de energía entre otras (55, 61, 57, 54).

Se sabe que intervienen radicales libres en las defensas inmunológicas como el estallido respiratorio de los neutrófilos y macrófagos, en los cuales se generan radicales libres de oxígeno ($O_2^\bullet$, H_2O_2 y también probablemente $\bullet OH$) (62, 37, 63).

El radical libre óxido nítrico formado a partir de la arginina en células endoteliales y otros tipos de células actúa en la vasodilatación, inflamación y shock (62, 63, 54, 59).

Actualmente está surgiendo la idea de implicar a ciertos radicales libres como mensajeros intracelulares; así, las reacciones de radicales libres de oxígeno o de nitrógeno sobre hierro o grupos sulfhidrilo de proteínas actuarían como señales, causando la modificación de la respuesta de sistemas como la proteína G, varios factores de transcripción, canales iónicos, ciclooxigenasa o ribonucleótido reductasa. Sería un reemplazo del sistema llave-cerradura. En el caso de los tioles, es posible la existencia de una secuencia consenso que permita la generación de un residuo de cisteína activo en forma redox, que el residuo de cisteína esté estratégicamente expuesto, o ambos (63).

En todas las situaciones anteriormente descritas puede suceder que los radicales libres formados escapen a los controles correspondientes y puedan causar daño reversible o irreversible a macromoléculas, por ejemplo proteínas o lípidos (64).

Por otra parte, las especies reactivas pueden provenir de fuentes externas como ser: radiaciones ionizantes, sustancias tóxicas, polutantes ambientales, etc.. En general, pero no siempre, cuando se ha determinado la formación de un radical libre intermediario en el camino metabólico de un xenobiótico se ha visto que dicho radical está implicado en el efecto

tóxico. Algunas sustancias generarían radicales libres que reaccionarían directamente (por ejemplo el CCl_4), en tanto que otras generarían especies reactivas de oxígeno, las cuales serían causantes de su toxicidad (por ejemplo adriamicina, paracetamol) (56, 62, 9, 55).

➤ I.C.VI.- Daños producidos por los radicales libres

Como se ha indicado, el daño que pueda causar un radical libre depende de muchos factores, entre ellos del radical mismo, del lugar en el que se genere, de la presencia de moléculas vitales en las cercanías del lugar de activación, de la existencia de defensas celulares, mecanismos de reparación o de eliminación de las moléculas dañadas, etc. (55, 9).

Entre los daños causados por los radicales libres son muy importantes las alteraciones de macromoléculas tales como proteínas, lípidos, ADN, ARN, ya sea por oxidación, unión covalente o fragmentación. Dichas reacciones pueden llegar a alterar severamente tanto la estructura como la función de dichas moléculas, así como a modificar sus características antigénicas (1, 55, 65).

Los radicales libres pueden, por ejemplo, alterar enzimas y/o receptores de las membranas, causando alteraciones en el transporte de iones que podrían derivar en la pérdida de la homeostasis celular, por ejemplo, la del calcio (65, 55, 1).

Grupos tioles proteicos y no proteicos pueden ser rápidamente oxidados por muchos radicales libres, pudiendo producir alteraciones en la actividad enzimática, la función y/o el estado redox de la célula. Se han determinado también la depleción de moléculas antioxidantes, por ejemplo glutatión, así como la alteración del balance NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ causadas por radicales libres (55, 65).

Algunos radicales libres son capaces de causar la iniciación de la peroxidación de lípidos, resultando en la alteración directa de la estructura y fluidez de la membrana y/o la formación de interuniones, con la consiguiente alteración de su funcionalidad (55, 65).

Los radicales libres han sido implicados en el proceso de envejecimiento, sugiriéndose que éste se debería a la acumulación de daño causado por dichos radicales sobre moléculas de vida media larga como colágeno, por daño oxidativo al ADN, por glicación de proteínas, etc. (66).

Se cree que los radicales libres también podrían estar involucrados, al menos en parte, en enfermedades como aterosclerosis, diabetes mellitus, cáncer, en daños al cristalino, piel, pulmones, en la activación del HIV por estrés oxidativo o en la formación de los pigmentos de la edad (37, 62).

En el caso de las proteínas, como se verá más adelante, su oxidación puede causar cambios físicos en las mismas como ser fragmentaciones, agregaciones, alteración de la susceptibilidad a la proteólisis, etc. (37, 67, 68).

I.D.- CARACTERÍSTICAS DEL TETRACLORURO DE CARBONO

➤ I.D.I.- Introducción

El tetracloruro de carbono (CCl_4) es un líquido incoloro, de olor dulce, insoluble en agua (14, 69, 70).

Por sus características químicas tuvo en el pasado una amplia gama de usos: agente desengrasante, removedor de manchas, fumigante de granos, propelente para aerosoles, así como también en extinguidores de incendio, en la manufactura de fluorocarbonos, etc.. Incluso se lo ha empleado en humanos como anestésico, analgésico, antiparasitario o en champús. Como anestésico se lo dejó de emplear debido a su toxicidad hepática y renal. Por esta misma razón se empezaron a estipular restricciones generales a su uso, especialmente en los productos disponibles para el público masivo (14, 69, 70). Sin embargo, el CCl_4 sigue teniendo en la actualidad uso industrial y de laboratorio (14, 11).

➤ I.D.II.- Contaminación/fuentes

No existen fuentes naturales conocidas de CCl_4 ; todo el que está presente en el medio ambiente (aire, agua y suelo) sería de origen antropogénico, liberado al medio ambiente durante su producción y uso, así como en la descomposición fotoquímica o combustión incompleta en la incineración de desechos químicos del percloroetileno, efluentes industriales, plantas de descarga de tratamiento municipal o derrames, etc. (14, 11).

El CCl_4 se degrada muy lentamente, por lo que ha habido una acumulación gradual en el medio ambiente. Debido a su volatilidad, la mayoría está presente en el aire, siendo muy estable en ese medio. En la estratósfera puede ser degradado por la luz ultravioleta a radicales libres (cloro y triclorometilo) capaces de degradar el ozono allí presente. En agua y suelos el CCl_4 se puede degradar biológicamente. Sólo una pequeña proporción del CCl_4 permanece unida a las partículas del suelo, el resto se evapora o se mueve hacia las napas de agua (14, 11).

➤ I.D.III.- Concentraciones máximas permitidas en ambientes laborales

En la Argentina, de acuerdo a la ley 19.587 de Higiene y Seguridad en el Trabajo correspondiente a 1999, la concentración máxima permisible ponderada en el tiempo (CMP) para el tetracloruro de carbono es de 5 ppm, no indicándose ningún valor para la

concentración máxima permisible para cortos períodos de tiempo (CMP-CPT). Se advierte en esta ley que el tetracloruro de carbono puede ser absorbido por vía dérmica y que es sospechoso de ser carcinogénico para el hombre (71).

➤ I.D.IV.- Absorción, distribución y excreción

Al ser el CCl_4 una sustancia lipofílica, se absorbe rápidamente en el sistema respiratorio y en el tracto gastrointestinal, siendo la absorción por piel más lenta (11).

La vía inhalatoria es la vía más común de absorción en trabajadores ocupacionalmente expuestos al CCl_4 . Sin embargo, es muy frecuente la ingestión del tóxico por personas que lo confunden con otras bebidas o por mal uso, por lo que la vía gastrointestinal es también importante. La intoxicación producida por absorción a través de piel es menos frecuente. La población en general está expuesta al CCl_4 por aire o el agua de bebida (14, 11).

Una vez absorbido se distribuye en todo el organismo, concentrándose más en los órganos con mayor contenido lipídico: médula ósea, cerebro, tejido adiposo (donde se almacena) y, en menor concentración, en hígado. También se observan concentraciones significativas en riñón y músculo (70, 11).

Por su lipofilicidad el CCl_4 llega a todas las estructuras subcelulares (6, 70, 11).

El CCl_4 es una hepatotoxina, pese a que sólo una pequeña cantidad del CCl_4 administrado llega al hígado (2%). Esto es debido a que para ejercer su acción tóxica el CCl_4 debe ser biotransformado a metabolitos reactivos, siendo el hígado el principal lugar de metabolización del organismo. Sólo una pequeña cantidad del CCl_4 administrado es metabolizado (70, 14).

La principal vía de excreción del CCl_4 es la pulmonar, sin metabolización previa. La excreción por heces depende de la vía de ingreso del tóxico, si el CCl_4 es absorbido en dosis bajas por pulmones, casi no hay excreción por heces, en cambio, sí la hay (por exsorción directa y por excreción por bilis) si la vía de ingreso es el tracto gastrointestinal. Relativamente poca cantidad es eliminada en orina (11).

La velocidad de excreción depende de la dosis; cuanto mayor es la dosis, más lenta es la eliminación, lo cual es consistente con la acumulación del CCl_4 en tejido adiposo. Al aumentar la dosis, mayor cantidad de CCl_4 entra al tejido adiposo, siendo la eliminación del tejido adiposo más lenta que la de sangre u otros tejidos (11).

➤ I.D.V.- Activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos

Como se indicó anteriormente, para que el CCl_4 resulte tóxico debe ser activado a sus metabolitos reactivos. La enzima que lo activa es el sistema de oxidasa de función mixta, el principal sistema de metabolización de xenobióticos del organismo. Por estar este sistema de activación en el hígado es que el CCl_4 es una hepatotoxina (1,11).

Una de las razones que indicarían su necesidad de activación es la demostración de que la toxicidad del CCl_4 no es debida a su acción como solvente, ya que otras sustancias que tienen tan buen poder solvente de lípidos como el CCl_4 , tales como CH_2Cl_2 o el CCl_3F , no producen el efecto del CCl_4 sobre el hígado; además, las concentraciones necesarias para causar una acción tóxica por un efecto solvente deberían ser mucho mayores que las alcanzadas en el organismo (7, 6).

Otra de las razones que confirman la necesidad de activación es que animales como la rata recién nacida y la gallina son muy resistentes al daño por CCl_4 , pese a que las concentraciones alcanzadas en el hígado son similares a las halladas en ratas adultas. Esto sería debido a que en estos animales existe un menor contenido de sistema metabolizante, no pudiendo ser activada la toxina a sus metabolitos reactivos en cantidad suficiente como para producir daño (14, 70, 7).

La necesidad de activación a metabolitos reactivos también explicaría la distinta toxicidad de los tetrahalometanos. La facilidad de activación es función de la energía de enlace, por lo que el CFCl_3 es menos reactivo que CBrCl_3 y éste es más reactivo que el CCl_4 . Por ejemplo, el CBrCl_3 es 30-40 veces más hepatotóxico que el CCl_4 (42, 72, 7, 55).

La biotransformación del CCl_4 es un proceso de naturaleza reductiva en el cual se produce la ruptura homolítica de la molécula con formación de los radicales libres triclorometilo ($\cdot\text{CCl}_3$) y cloro. El $\cdot\text{CCl}_3$ fue uno de los primeros radicales libres metabólicos implicados en la toxicidad de un xenobiótico (14, 3, 70, 7, 65, 54, 56).

El CCl_4 al no poseer ningún enlace C-H no puede ser metabolizado oxidativamente. En otras sustancias de estructura similar pero que poseen un enlace C-H oxidable, por ejemplo el cloroformo, el metabolismo oxidativo es posible y es la principal forma de metabolización en presencia de oxígeno. Sustratos aún menos halogenados no siguen el camino reductivo (42).

El sistema metabolizante del CCl_4 (sistema de oxigenasa de función mixta) se ubica principalmente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos de la zona centrolobulillar (65, 7).

► I.D.V.1.- Lugares subcelulares de activación del CCl_4

El CCl_4 puede ser activado a sus metabolitos reactivos en algunas fracciones subcelulares, las cuales se indican a continuación.

Retículo endoplásmico: En este lugar se encuentra el componente celular más crítico para la biotransformación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos, el citocromo P450, por lo que es el principal lugar de activación celular del CCl_4 a sus metabolitos reactivos (3, 14, 70, 73, 74).

La activación del CCl_4 es más importante en el retículo endoplásmico liso que en el rugoso (73).

Núcleos: Los núcleos hepáticos son capaces de activar al CCl_4 . Así, se ha determinado la formación de metabolitos reactivos del CCl_4 en la membrana nuclear hepática de rata (11, 75, 10, 74).

Mitocondrias: En las mitocondrias el CCl_4 puede ser activado a sus metabolitos reactivos (76, 77, 14, 78, 79). La activación puede ser enzimática (dependiente de citocromo P450 y NADPH) y o no enzimática (independiente de NADPH y no afectada por inhibidores del citocromo P450). Se cree que la activación no enzimática sería en la cadena respiratoria, en los lugares donde se produce la reducción univalente del oxígeno. Esto podría ser así debido a que los potenciales de reducción del CCl_4 y del oxígeno son similares, por lo que el CCl_4 podría reemplazar al oxígeno (78, 79).

Citosol, lisosomas: Ni el citosol ni los lisosomas tendrían los sistemas enzimáticos necesarios para la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos (77, 14).

► I.D.V.2.- Activación por medios físicos

El CCl_4 puede ser activado al radical $\cdot\text{CCl}_3$ por medio de luz ultravioleta. La forma de activación sería por ruptura homolítica del enlace C-Cl, generándose el radical $\cdot\text{CCl}_3$, el cual en presencia de oxígeno puede dar $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ (80, 81).

En este Trabajo de Tesis se utilizó esta forma de activación del CCl_4 en sistemas químicos, empleándose luz ultravioleta C (254 nm).

► I.D.V.3.- Mecanismo de activación

Como se indicó anteriormente, el sistema de oxidasa de función mixta está formado por el citocromo P450, la citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH y fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina (14, 3).

En la figura I.D.I se grafica el mecanismo de biotransformación del CCl_4 .

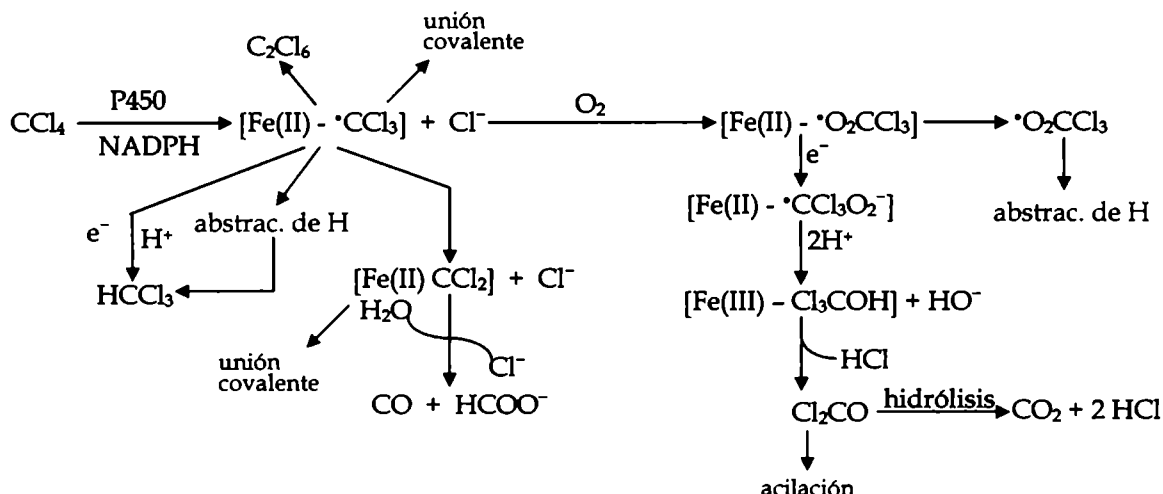


Figura I.D.1: Mecanismo de biotransformación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos

El proceso de reducción del CCl_4 se inicia con la unión de CCl_4 al citocromo P450; pudiendo estar el citocromo tanto en estado reducido como oxidado (14, 25, 7, 55). El CCl_4 es reducido por un electrón, formándose el radical $\bullet\text{CCl}_3$. El electrón proviene del NADPH y es transferido al CCl_4 por medio de la citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH (14, 3).

El citocromo P450 es el que produce la reducción del CCl_4 , la citocromo P450 reductasa por sí misma no es capaz de transferirle el electrón al CCl_4 (14, 25, 7).

El radical triclorometilo ($\bullet\text{CCl}_3$) formado puede liberarse del citocromo o seguir unido al citocromo y continuar siendo reducido (79).

Si el $\bullet\text{CCl}_3$ se libera del citocromo, puede reaccionar rápidamente con oxígeno molecular para dar el radical triclorometilperoxilo ($\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$) en un proceso denominado oxigenación reductiva. Esta reacción está controlada esencialmente por la velocidad de difusión del O_2 , por lo que la reacción es muy sensible a la concentración del mismo (3, 65, 72, 80).

Ambos radicales ($\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$) pueden intervenir en reacciones de adición, abstracción de hidrógeno, desproporción y cancelación (14).

Si el $\bullet\text{CCl}_3$ permanece unido al citocromo también puede reaccionar con una molécula de oxígeno, dando $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$. Este a su vez puede liberarse o puede ser reducido por un segundo electrón a CCl_3OH (triclorometanol), el cual se descompone rápidamente a fosgeno (Cl_2CO) por dehidrohalogenación. A su vez, la hidrólisis de fosgeno produce CO_2 , el cual es el principal metabolito del CCl_4 (42, 14, 3, 11, 79, 72).

El segundo electrón que participa en la reducción del CCl_4 puede provenir también del NADPH, vía la citocromo P450 reductasa o puede provenir de NADH, utilizando como enzima transportadora el citocromo b_5 (14, 42, 10).

Otro camino posible es que el $\cdot\text{CCl}_3$ unido al citocromo en vez de reaccionar con oxígeno sufra una nueva reducción para dar el carbanión triclorometilo, el cual puede dar diclorocarbano por eliminación de un cloruro α y finalmente dar CO por hidrólisis (42, 3, 25). Esta reducción mediante dos electrones parecería tener poca importancia toxicológica (25).

La formación de $\cdot\text{CCl}_3$ fue comprobada utilizando el atrapador de radicales libres fenilbutilnitrona (PBN). El aducto formado fue detectado tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo en sangre y bilis de ratas (14, 3, 42, 79, 11).

El CCl_4 compete con el oxígeno molecular por el lugar de unión al citocromo P450, por lo que el oxígeno es un inhibidor de la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos. Esto implica que la formación de $\cdot\text{CCl}_3$ se ve favorecida en anaerobiosis o condiciones de baja presión de oxígeno (79, 25). La concentración de oxígeno en las células hepáticas puede ser bastante baja, especialmente en la zona centrolobulillar, lo que permitiría que el CCl_4 pueda competir efectivamente con el oxígeno (25).

Una indicación de que el CCl_4 es metabolizado por el citocromo P450 es que su activación es inhibida por monóxido de carbono, lo cual, como se indicó anteriormente, es la característica de los citocromos P450 y es usado como un criterio para decidir si una reacción es realizada o no por un citocromo P450 (80).

► I.D.V.4.- Citocromos involucrados

Utilizando sistemas reconstituidos se pudo demostrar que la forma de citocromo P450 que estaría implicada en condiciones normales en la biotransformación del CCl_4 es el *cyp2E1*. Como se indicó anteriormente, dicho citocromo está presente en el hígado humanos y roedores, siendo inducible por etanol y por otros compuestos que son sustratos de este citocromo (14). Uno de los indicios de que el *cyp2E1* sería el que interviene en la metabolización del CCl_4 es que anticuerpos contra *cyp2E1* reducen *in vitro* en un 80% el metabolismo de dicha hepatotoxina (82).

El *cyp2B* también es capaz de metabolizar el CCl_4 a sus metabolitos reactivos. Sin embargo, como se indicó anteriormente, en condiciones normales está en baja cantidad. Este citocromo es inducible por fenobarbital, y en esas condiciones sería el principal citocromo que participaría en la metabolización del CCl_4 (82, 11).

La inducción de *cyp2E1* por etanol o acetona ha demostrado ser más importante en el metabolismo del CCl_4 que la resultante de la inducción del *cyp2B1* por el fenobarbital (82).

► I.D.V.5.- Inducciones de los citocromos 2E1 y 2B en el estudio del CCl_4

En el caso del estudio de la acción tóxica del CCl_4 se utiliza la inducción de los

citocromos que lo metabolizan, por lo que se referirá aquí brevemente a las formas de inducción de estos citocromos.

Una de las prácticas usuales en el estudio de las intoxicaciones por CCl_4 es el ayuno 12-14 h antes del uso de los animales. Con el ayuno se induciría el *cyp2E1*, el cual, como ha sido indicado, es la principal forma de metabolización del CCl_4 (46, 45, 82, 50, 26, 32).

Otra practica común es la inducción de los animales con fenobarbital el cual, como se indicó anteriormente, induce los citocromos B1/B2, sin afectar al *cyp2E1* (33, 19).

En la inducción con fenobarbital también se inducen la citocromo P450 reductasa y el citocromo b_5 , los cuales forman parte del sistema de metabolización del CCl_4 (19).

► I.D.V.6.- Inhibición del citocromo P450

La activación del CCl_4 es una activación suicida ya que los productos de dicha activación destruyen al citocromo P450 (14, 7, 25, 69). La destrucción de citocromo P450 por el CCl_4 es más intensa en retículo endoplásmico liso, lo cual coincide con que éste sea el lugar con mayor cantidad de sistema de activación (73). También coincidiría con que la velocidad de metabolización del CCl_4 disminuye al ir aumentando el período de exposición (11).

El CCl_4 no afecta la actividad de la citocromo P450 reductasa ni el contenido de citocromo b_5 (14, 11).

Después de la alteración del *cyp2E1* por el CCl_4 la enzima inactivada es rápidamente removida del retículo, mientras que persisten proteínas íntimamente asociadas con ella como la NADPH-citocromo P450 reductasa o el citocromo b_5 (48). El *cyp2B1* no se degrada por esta vía (48).

► I.D.VI.- Productos finales formados por metabolización del CCl_4

En la metabolización del CCl_4 se han detectado varios productos que provienen de su molécula, entre ellos CO_2 (producto mayoritario *in vivo* en todas las concentraciones ensayadas), HCCl_3 , Cl_2CO , hexacloroetano y CO en sistemas *in vitro* e *in vivo* en distintas especies (14, 42, 11, 55, 54, 79).

Por ejemplo, se detectó la presencia de HCCl_3 en aire espirado por perros y el CO_2 en monos, así como HCCl_3 y hexacloroetano en el plasma, adipocitos, riñones y músculo de conejos intoxicados con CCl_4 (7).

El HCCl_3 formado no es un intermediario del fosgeno (42). El fosgeno es muy electrofílico y puede reaccionar con tioles nucleofílicos, hidroxilos y grupos amino de proteínas y lípidos, pudiendo ser el responsable de la unión a biomoléculas pero no de la

peroxidación de lípidos. Por la cantidad generada no se considera que sea biológicamente relevante; de hecho, ninguno de los compuestos finales antes mencionados formados en la intoxicación por CCl_4 puede explicar la toxicidad del CCl_4 (14, 37, 72).

A las 24 h de intoxicación se observan niveles elevados de excreción de productos de peroxidación de lípidos (formaldehído, acetaldehído, MDA y acetona) en orina, probablemente como resultado del estrés oxidativo inducido por el CCl_4 . Los aductos de CCl_4 serían excretados por la bilis en una cantidad proporcional a su generación en el hígado. También es excretado unido a macromoléculas (un 2-4%) (11).

➤ I.D.VII.- Reacciones de los metabolitos reactivos del CCl_4

Los metabolitos reactivos del CCl_4 ($\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) tienden a dar tres tipos básicos de reacciones: de adición, de abstracción y de ruptura. Reacciones deletéreas adicionales pueden surgir como consecuencia de estas reacciones primarias (1).

Debido a la reacción del $\cdot\text{CCl}_3$ con O_2 , los productos que se formen y las reacciones que se produzcan estarán muy influenciadas por la presión de oxígeno. En anaerobiosis el único radical que se formaría es $\cdot\text{CCl}_3$ (42).

Las reacciones de adición dan lugar a la unión covalente. En las reacciones de abstracción, los metabolitos reactivos del CCl_4 abstraen un átomo de otra molécula (3). Se produce la fragmentación de la molécula en las reacciones de ruptura, por ejemplo, en las reacciones de los metabolitos reactivos del CCl_4 con aminoácidos (1, 83).

El $\cdot\text{CCl}_3$ tiende a unirse covalentemente a proteínas, lípidos, nucleótidos, etc.. Puede abstraer hidrógenos de lípidos (con iniciación de la peroxidación) o de otras moléculas biológicas, por ejemplo proteínas, ácidos nucleicos dando HCCl_3 (1, 42, 14, 72, 25, 79).

También pueden condensarse dos $\cdot\text{CCl}_3$ con formación de hexacloroetano en una reacción de cancelación (14, 42, 7).

En anaerobiosis aumenta la formación del HCCl_3 porque al no haber O_2 aumenta la vida media del $\cdot\text{CCl}_3$, con lo que tiene mayor oportunidad de abstraer H de otras moléculas. También estaría promovida la unión covalente por las mismas razones (42).

En presencia de oxígeno, cuanto menor sea la presión de oxígeno mayor será la formación de HCCl_3 , de CO y la unión covalente a proteínas, en tanto que sería menor la peroxidación de lípidos y la formación de CO_2 (42).

La abstracción de hidrógeno sería causada fundamentalmente por el $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ (3, 54, 55, 1, 42). El radical $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ es más reactivo que el $\cdot\text{CCl}_3$, lo cual explicaría el aumento de reactividad contra diferentes blancos cuando un pulso de $\cdot\text{CCl}_3$ es formado en presencia de oxígeno (14, 3).

I.E.- PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

➤ I.E.1.- Introducción

La peroxidación de lípidos (PL) es un proceso de naturaleza autocatalítica mediado por radicales libres, en el cual se produce la degradación oxidativa de lípidos de membranas biológicas, fundamentalmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (44).

Se ha implicado a la PL en un rango muy amplio de injurias celulares causadas por radicales libres así como en la toxicidad del oxígeno (84, 55, 79, 6, 4). Es cada vez más aceptado que la PL sería más un evento inespecífico resultante de la toxicidad de una sustancia que el mecanismo causante de la toxicidad (84, 4).

El proceso de peroxidación de lípidos no sólo es importante para los lípidos sino también para las proteínas, algunos de los productos de la PL son capaces de reaccionar con proteínas, causando su alteración (4, 85).

➤ I.E.II.- Mecanismo de peroxidación de lípidos:

En la figura I.E.1 (3) se representa un esquema de los mecanismos de peroxidación de lípidos.

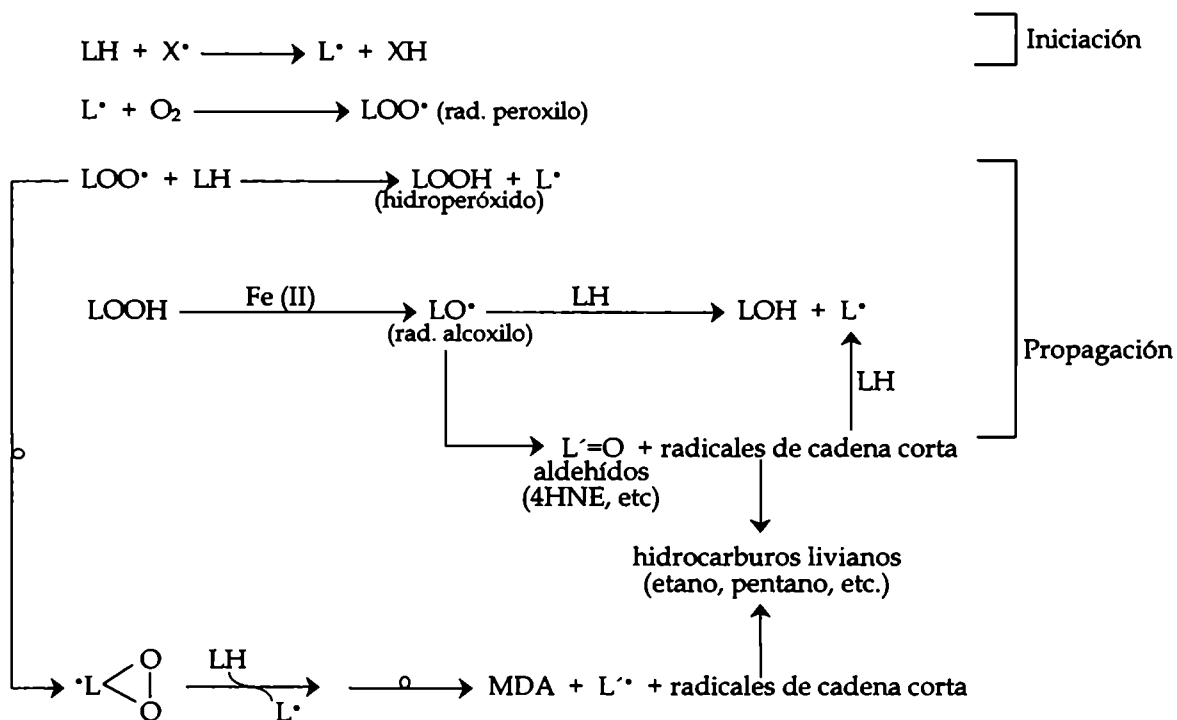


Figura I.E.1: Mecanismo de peroxidación de lípidos

La química de los procesos de LP es muy compleja, se forman una gran cantidad de productos primarios y secundarios. Los principales ácidos grasos que sufren la PL son linoleico (18:2), araquidónico (20:4), linolénico (18:3) y otros ácidos poliinsaturados. Cada ácido graso da un grupo exclusivo y característico de productos. Se produce incluso sobre PUFAs que estén esterificados en fosfolípidos. Las membranas celulares tienen una alta densidad de cadenas laterales polienoicas (44, 37, 86, 55, 57, 79, 6).

La PL procede por una reacción en cadena típica, donde hay reacciones de iniciación, propagación y terminación (44, 84, 37).

► I.E.II.1.- Iniciación

La iniciación ocurre cuando un oxidante inespecífico da origen a un radical por abstracción de un átomo de hidrógeno de un lípido:



donde LH representa la cadena de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) dentro de un lípido, $\text{X}^{\bullet}$ un radical libre y $\text{L}^{\bullet}$ un radical lipídico (44, 84).

El radical libre debe tener suficiente energía como para poder abstraer un hidrógeno de un ácido graso. Los PUFA son los blancos favoritos de la PL porque los enlaces C-H de un carbono metilénico ($-\text{CH}_2-$) adyacente a una doble ligadura son uniones débiles, por lo que ceden más fácilmente el hidrógeno (44).

La resonancia del electrón del radical libre del PUFA causa un reordenamiento de la configuración cis-cis a cis-trans que estabiliza al radical por una mayor conjugación de dobles enlaces. Dicha conjugación causa que el compuesto tenga una mayor absorción de luz ultravioleta a 234 nm, lo que es usado para medir la PL *in vitro* e *in vivo* (44, 79, 54, 57).

En muchos casos, especialmente en los sistemas biológicos, la identidad del radical libre que inicia la PL es desconocida. Ejemplos de radicales libres que pueden iniciar la PL son: $\cdot\text{OH}$, oxígeno singulete, radicales alcóxido ($\text{LO}^{\bullet}$), radicales peróxido ($\text{LOO}^{\bullet}$) y radicales alquilo ($\text{L}^{\bullet}$) u otros radicales libres originados de sustancias tóxicas. Otras especies capaces de iniciar la PL son el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$), siendo ambos componentes mayoritarios del humo de cigarrillo (84, 44, 6, 57, 86).

Las proteínas que contienen hemo como hemoglobina/mioglobina y varios citocromos (incluyendo los citocromos P450) pueden reaccionar con H_2O_2 para generar especies iniciadoras de la peroxidación de lípidos (de naturaleza exacta no conocida), las cuales podrían mediar en la peroxidación de lípidos generada *in vitro* por el NADPH (84).

Otros compuestos metabólicamente activados a especies oxidantes pueden reaccionar directamente con lípidos; un ejemplo típico es el CCl_4 (84, 44).

Los radicales tiilo (provenientes de sulfhidrilos de proteínas) son capaces de abstraer hidrógenos alílicos de lípidos. Reaccionan además con oxígeno para formar tiil peróxidos

(por ejemplo, $\text{RSO}_2\cdot$ y $\text{RSO}_2\text{O}\cdot$) Los radicales tiilo y sus derivados peroxílicos reaccionan por transferencia de hidrógeno con los hidroperóxidos de lípidos (LOOH) como lo hacen los $\text{HO}_2\cdot$ (84, 87).

Después del reordenamiento comienza la etapa del proceso dependiente de oxígeno en la cual se produce la interacción del radical lipídico con el O_2 molecular para formar un radical lipoperoxilo (44, 37, 57, 79):



La velocidad de reacción del radical lipídico con el oxígeno es muy rápida; como sucede con todo radical centrado en carbono no hay ninguna barrera energética involucrada, dependiendo únicamente de la velocidad de difusión del oxígeno (7, 65).

► I.E.II.2.- Propagación

El radical lipoperoxilo es capaz de abstraer un hidrógeno de otra molécula de lípido, formando un hidroperóxido y generando un nuevo radical lipídico; esta reacción está favorecida por el gran entrelazamiento de los lípidos en las membranas (44, 84, 7).



La etapa de propagación es la que permite que continúe la reacción en cadena; por cada lipoperoxilo formado aparece un nuevo radical, produciéndose de esta manera la verdadera amplificación ya que por cada iniciación ocurren varias reacciones de propagación (44, 84, 57, 79, 86).

El resultado es la conversión neta de ácidos grasos poliinsaturados en LOOH , lo cual lleva a una desestabilización de la integridad y la función de la membrana lipídica dada la necesidad de acomodar los grupos hidroperóxidos polares (84).

La extensión de la propagación dependerá también de la proporción lípido/proteína de la membrana dado que los peróxidos de lípidos podrían abstraer hidrógenos de una proteína, pudiendo reaccionar también con ácidos nucleicos y otras moléculas exógenas o endógenas (84, 57). Es asimismo importante la presencia de antioxidantes que interrumpan la reacción en cadena, por ejemplo, α -tocoferol (57).

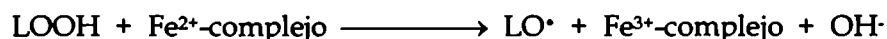
► I.E.II.2.1.- Descomposición de peróxidos de lípidos

En condiciones fisiológicas los peróxidos de lípidos son especies moleculares bastante estables, pero su descomposición puede ser catalizada por varios componentes celulares como metales de transición (hierro (principalmente) y cobre), aunque casi no existen en forma no quelada en los sistemas biológicos (37, 57, 44).

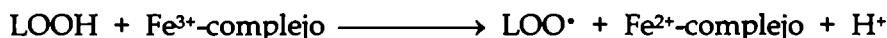
Los $\text{LOO}\cdot$ pueden sufrir una mezcla compleja de rearrreglos (vía escisiones β con

pérdida de oxígeno y recombinación con oxígeno) y ciclaciones (si hay una insaturación adyacente, como es el caso del ácido γ -linolénico) con lo que se generaría otro $\text{LOO}^\bullet$ que puede entrar en otras reacciones de propagación (84).

Los complejos de metal reducido reaccionan con los hidroperóxidos para dar radicales alcóxido ($\text{LO}^\bullet$). Esta reacción es fácil y rápida para los metales de transición biológicamente relevantes en su estado reducido debido a la debilidad del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido (84, 57, 7, 65, 37).



Los metales de transición con valencia superior reaccionan muy lentamente con los LOOH para producir radicales peróxido (84, 37):



Los radicales alcóxido y peróxido pueden iniciar nuevas rondas de reacciones de lipoperoxidación (57, 88, 86, 79).

Los citocromos P450 son también capaces de descomponer los peróxidos de lípidos. Así, de los citocromos P450 purificados, el 2E1 es el más activo en la escisión β reductiva (ver más adelante) de los 13-hidroperóxidos derivados de ácido linoleico y de los 15-hidroperóxidos derivados del ácido araquidónico, seguidos por 2B4, 3A6, 1A2 y 2C3 (52, 89). Además el *cyp2E1* es particularmente activo en la reducción del oxígeno molecular a especies reactivas de oxígeno, las que pueden contribuir a la iniciación de la peroxidación de lípidos de membrana (89, 52).

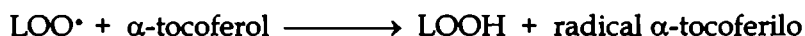
► I.E.II.3.- Terminación

Existen varias formas de terminación de las reacciones en cadena de la peroxidación de lípidos. Podría ser por reacción entre dos $\text{LOO}^\bullet$ o por reacción de un radical lipídico con otro radical de terminación para formar productos no radicalarios:



Estas condensaciones podrían llevar a reacciones de cruzamiento con cadenas laterales ácidas de fosfolípidos del entorno o a uniones lípido-proteína o proteína-proteína (79, 57, 44).

Otra forma de terminación sería la reacción de un radical con un atrapador de radicales libres, generándose especies radicalarias no propagantes (84, 34), las cuales se anulan a sí mismas por otros caminos; por ejemplo:



Los antioxidantes están presentes normalmente en las células en una alta

concentración *in vivo*, por lo que es muy factible que la reacción con antioxidantes sea la principal forma de terminación *in vivo* (84).

➤ I.E.III.- Productos formados en la peroxidación de lípidos

Los hidroperóxidos de lípido formados pueden convertirse por sucesivas escisiones, fisiones, rearrreglos y oxidaciones en una gran variedad de productos (figura I.E.2 (86), los cuales pueden contener varios grupos funcionales de oxígeno tales como aldehído-, cetonas-, hidroxi-, epoxi-, carboxi- y peroxi- (86, 79, 55, 6, 44, 54).

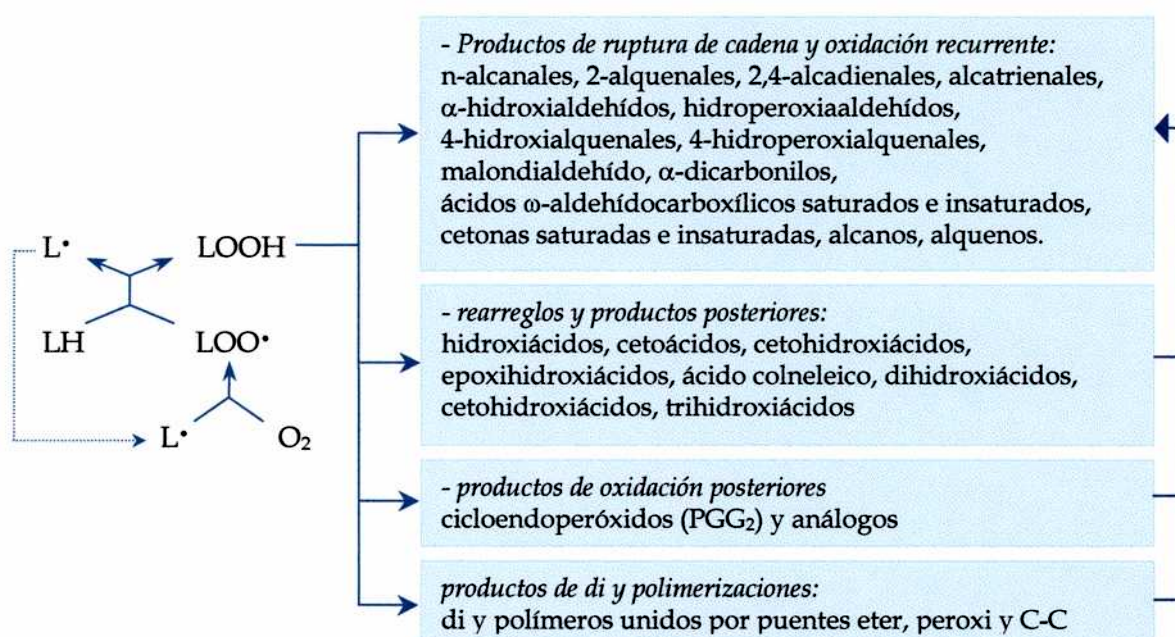


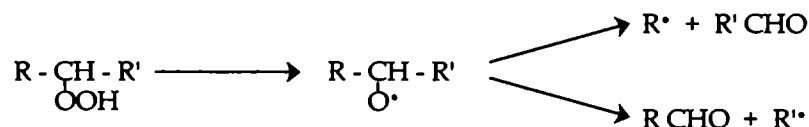
Figura I.E.2: Productos de la peroxidación de lípidos

A diferencia de los radicales libres muy reactivos, los aldehídos podrían tener una vida media lo suficientemente larga como para difundir de su lugar de origen (por ejemplo, las membranas) y alcanzar y atacar blancos intra y extracelulares distantes del lugar de generación del radical libre inicial (85).

Debido a la complejidad de las reacciones de peroxidación, las mismas no están perfectamente caracterizadas para cada uno de los productos, pero se cree que los tipos de reacciones que intervendrían serían una o más de las siguientes reacciones (86, 44, 85).

➤ **dismutación de peróxidos:** Sería el principal camino metabólico responsable de la formación de metabolitos aldehídicos a través de la ruptura homolítica de los enlaces carbono-carbono siguientes al hidroperóxido (ruptura β) (37, 85). El grupo aldehído formado puede quedar en el extremo metílico de la cadena o en el extremo carboxílico, por lo que

podrían quedar fosfolípidos con un grupo carbonilos en la posición ω (86).

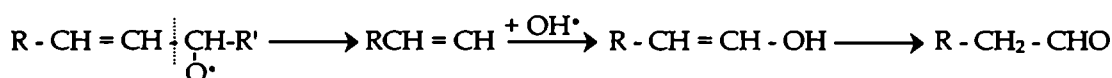


Por ejemplo, se formaría 2-hexenal a partir de 13-hidroxilinoico, 13-hidroxi- γ -linolénico o 15-hidroperóxiaraquidónico.

El mecanismo de formación de los hidroalquenes es más complejo y no está totalmente resuelto (85).

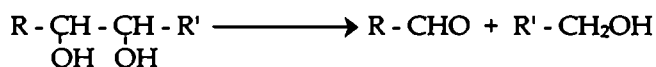
Los radicales alquilo formados puede abstraer hidrógeno de otras moléculas dando hidrocarburos volátiles (por ejemplo: formación de etano a partir de linolénico y de pentano a partir de araquidónico). La formación de etano y pentano se usa como medida de la PL (44, 52, 37, 79)

> *reordenamiento de enoles:*



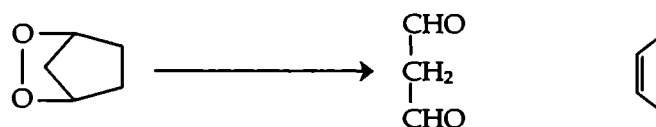
Por ejemplo, el ácido 13-hidroxilinoico (18:3) daría ácido 12-oxo-10-trans-dodecanoico y 2-hexenal (44, 85).

> *condensación aldólica reversible*



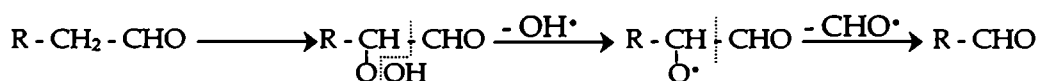
Por ejemplo, el ácido 9,10-dihidro-12-octadecenoico produciría 2-trans-nonenal (44, 85).

> *ruptura de endoperóxidos cíclicos*



Este sería, por ejemplo, el mecanismo de formación de malondialdehído a partir de PUFA con 3 o más dobles enlaces (44, 85).

> *autooxidación recurrente con dismutación*



Los aldehídos son inestables, por lo que la α -peroxidación de un aldehído saturado puede dar como intermediario un α -hidroperoxialdehído, el cual puede descomponerse a ácido fórmico (o formaldehído) y un aldehído con un átomo de carbono menos, este último puede a su vez iniciar una nueva reacción, con formación de un set de productos completamente nuevos (44, 86).

➤ *I.E.IV.- Principales productos de la peroxidación de lípidos con relevancia toxicológica*

La peroxidación de lípidos amplifica los daños producidos por los radicales libres iniciales. Los aldehídos reactivos generados en este proceso pueden actuar como "segundos mensajeros tóxicos" (85).

➤ *I.E.IV.1.- 4-hidroxinonenal*

El 4-hidroxinonenal (HNE), un hidroxialquenal, es el mayor metabolito (corresponde al 95%) de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados 1-6, siendo derivado de los 13 y 15-monohidroperóxidos de los ácidos araquidónico (principalmente), linoleico y docosahexenoico, aunque su mecanismo exacto de formación no es conocido (37, 85, 88).

El HNE es el aldehído de mayor reactividad hacia las moléculas biológicas debido al efecto inductivo del grupo hidroxilo, reacciona con lípidos y proteínas y modifica bases del ADN, lo que contribuye a su citotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad (37, 88, 86, 60). Al ser una molécula pequeña podría atravesar las membranas y difundir hacia otros lugares de la célula (55).

En la intoxicación por CCl₄ el 4-HNE sería un producto toxicológicamente importante de peroxidación de lípidos (14).

El HNE reacciona rápidamente con los grupos sulfhidrilos para formar tioéteres, con los grupos aminos primarios y con el grupo imidazol de la histidina, aunque atacará preferentemente a los grupos sulfhidrilos (la reactividad es 2-3 órdenes mayor) (86, 52, 54, 68, 67). Así, reacciona con grupos sulfhidrilos de compuestos de bajo peso molecular (por ejemplo glutatión) y de proteínas (52, 54). Algunas de las inhibiciones causadas por el HNE han sido relacionadas con la alteración de aminoácidos. Por ejemplo, se ha descrito su reacción con lisina y cisteína en la inactivación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de conejo (52).

➤ *I.E.IV.2.- Malondialdehído*

Como se indicó anteriormente, el malondialdehído (MDA) se forma principalmente por la degradación oxidativa de los PUFA por formación de endoperóxidos cíclicos en los ácidos grasos con más de dos metilenos interrumpidos por dobles enlaces, por lo tanto, los principales precursores serían el ácido araquidónico (20:4) y el ácido docosahexenoico (22:6) (85, 88, 44, 86, 57).

El MDA puede interactuar con grupos tioles, lípidos, proteínas y ADN (57). Al ser un compuesto bifuncional puede dar uniones intermoleculares por una segunda reacción de adición (90, 85), dando lugar a la formación de cromolípidos, proteínas agregadas y aductos

con ADN y proteínas (57).

La adición de MDA sería principalmente sobre los grupos lisina, histidina o cisteína; podrían estar además afectados en alguna extensión tirosina, arginina y metionina (85, 90).

Otros productos de la PL deben ser también considerados como potenciales inactivadores de enzimas (89).

➤ I.E.V.- Importancia toxicológica de la peroxidación de lípidos

Los mecanismos por los cuales la peroxidación de lípidos causa alteraciones celulares subsecuentes son muy complejos y no están totalmente entendidos, pero básicamente se podría considerar la producción de daño a las células a tres niveles:

- alteración de las membranas celulares,
- reacciones de los radicales libres formados durante la peroxidación de lípidos,
- reacciones de los aldehídos y otros productos formados.

➤ *alteración de las membranas celulares:* la peroxidación de lípidos cambia la composición lipídica de la membrana, alterando el contenido de PUFA y generando nuevos productos lipídicos; además causa la formación uniones covalentes entre lípidos o entre lípidos y proteínas. Todo esto tiene como consecuencia la disminución de la fluidez de las membranas así como la desorganización de las mismas, lo que puede llevar a la pérdida de la homeostasis celular, así como a alteraciones al nivel de la traducción celular, del reconocimiento y transporte celular, del mantenimiento del potencial de membrana y del metabolismo celular (55, 44, 54, 37, 86, 84, 4, 6).

Por otra parte, tanto los hidroperóxidos como los aldehídos formados en la PL son hidrofílicos, por lo que se puede alterar la distribución de los lípidos en la membrana. También se puede afectar la función de las proteínas de membrana que requieran de lípidos para su actividad (86, 84, 4). La glucosa-6-fosfatasa, ATPasa, sistema de monooxigenasa de función mixta, UDP-glucuroniltransferasa, etc. son ejemplos de proteínas que requieren lípidos para actuar (7).

También se puede producir la caída del potencial de la membrana y el aumento de la permeabilidad a iones, con la posible ruptura de la membrana y pérdida del contenido de la organela o de la célula (44). Este fenómeno podría explicar la hinchazón y la pérdida de potasio con entrada de sodio y de calcio a las mitocondrias (6).

➤ *reacciones de los radicales libres formados en la peroxidación de lípidos:* muchos radicales altamente reactivos pueden atacar e inactivar enzimas y otros componentes celulares, pudiendo abstraer átomos de hidrógeno de proteínas vecinas de la propia membrana o de

sus grupos sulfhidrilo, dando puentes disulfuro y uniones lípido-proteína o proteína-proteína con graves consecuencias potenciales (44).

➤ *reacciones de los aldehídos y otros productos formados*: los aldehídos reactivos y posiblemente otros compuestos formados en la PL son por sí mismos citotóxicos. Los aldehídos saturados (pentanal, hexanal, etc.) son menos tóxicos que los 2-alquenos y estos a su vez menos tóxicos que los hidroxialquenos, siendo los más tóxicos los 2,4 dialquenos. A su vez, dentro de una misma clase, la toxicidad se incrementa con el número de carbonos, probablemente debido a que el aumento de la lipofilicidad permitiría que se ubique mejor en la membrana, donde estaría más protegido de la acción detoxificante de las enzimas citosólicas, pudiendo promover mejor la inactivación de las enzimas de membrana (85, 88, 37, 54).

Los aldehídos formados son capaces de formar interuniones de proteínas, inactivando muchos compuestos celulares, incluyendo proteínas de membrana y enzimas (34).

Los hidroxialquenos y otros aldehídos son lo bastante poco reactivos como para poder alejarse del sitio donde fueron generados, pudiendo incluso salir de la célula y causar daño en sitios distantes (44, 54, 57).

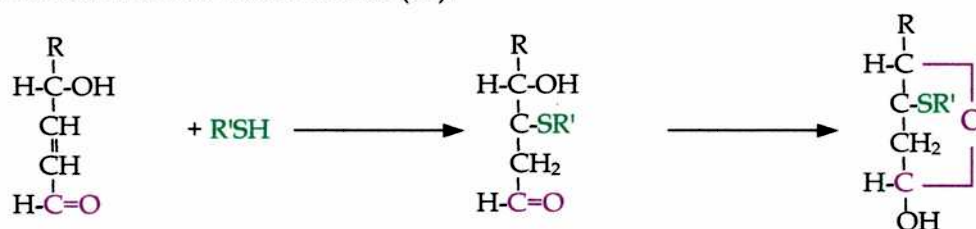
La reacción con grupos sulfhidrilos ha recibido particular atención ya que se ha determinado que la adición de 4-hidroxialquenos a tejidos, células o fracciones celulares lleva a una rápida pérdida de los grupos sulfhidrilo (85).

➤ I.E.VI.- Reacciones de los aldehídos reactivos con proteínas

Muchas de las reacciones de los aldehídos reactivos son de dos tipos: la reacción de Michael (con grupos sulfhidrilos) y la formación de bases de Schiff (con grupos aminos). Ambas clases de reacciones son muy importantes en la acción de los productos de peroxidación sobre las proteínas.

➤ I.E.VI.1.- Reacción de Michael

En este tipo de reacciones se produce la adición de un aldehído α , β -insaturado a un grupo tiol formando un enlace tioeter (85).



El producto obtenido sería un aldehído saturado que tendría un grupo carbonilo libre, por lo cual podría ser detectado por la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina (68, 67).

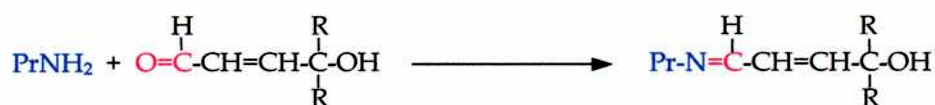
Tanto los 2-alquenes como los 4-hidroxi-alquenes formados en la PL pueden dar este tipo de reacción; la diferencia entre ambos es la velocidad de reacción y la estabilidad del producto formado, siendo las dos mayores en el caso de los 4-hidroxi-alquenes. La mayor estabilidad sería debida a la formación de un hemiacetal cíclico (86).

El HNE puede dar este tipo de reacciones, reaccionando por ejemplo con grupos sulfhidrilo de compuestos de bajo peso molecular y de proteínas (52, 54). Posiblemente los efectos del HNE serían debidos a la reacción de los aldehídos con los grupos sulfhidrilos activos (54). El MDA es mucho menos reactivo que el HNE (86).

La reacción de los aldehídos con grupos sulfhidrilos podría llevar a la alteración del contenido general de grupos sulfhidrilos de la célula, modificando el estado redox de la misma, así como también podría producir cambios en la estructura de enzimas por oxidación o por formación de aductos con los grupos tioles (55, 57, 68, 67).

Una de las características importantes de las reacciones anteriores es que los aductos no serían completamente estables. Estando como aductos, los aldehídos no serían susceptibles al ataque de enzimas detoxificantes que pudieran degradarlos (54). Esto les permitiría llegar a lugares alejados de su formación, donde el aducto se disociaría regenerándose el grupo sulfhidrilo y el aldehído. De esta manera se trasladaría el daño hacia otras regiones. Por ejemplo, los aldehídos unidos a la albúmina sanguínea pueden alcanzar blancos distantes (54, 86).

► I.E.VI.2.- Formación de bases de Schiff



Los compuestos carbonílicos, tales como MDA, HNE, reaccionan con grupos aminos libres en moléculas biológicas tales como aminoácidos, proteínas, aminofosfolípidos, ácidos nucleicos, etc., dando como producto bases de Schiff (86, 52, 54, 68, 67).

Los compuestos como MDA que poseen dos grupos carbonilos pueden dar reacciones de entrecruzamiento con dos moléculas que posean grupos NH_2 , dando bases de Schiff conjugadas fluorescentes (68, 67).

I.F.- ESTRÉS OXIDATIVO/DEFENSAS CELULARES

Estos dos temas están muy relacionados entre sí, por lo que se tratarán conjuntamente.

I.F.I.- ESTRÉS OXIDATIVO

Se denomina estrés oxidativo a la alteración del balance "prooxidante-antioxidante" en favor del prooxidante, con generación de una situación dañina para el organismo (60, 59, 62, 4, 91).

En una situación de estrés oxidativo se pueden dañar toda clase de moléculas, incluyendo proteínas, lípidos, ADN y carbohidratos (59). Por lo tanto, este estrés podría estar involucrado en procesos como daño a membranas, peroxidación de lípidos, oxidación y fragmentación de proteínas, depleción de grupos tioles, incremento de calcio intracelular, daño a carbohidratos, así como en mutagénesis y carcinogénesis (59, 4, 92, 2, 62).

El estrés oxidativo ocurre a menudo como consecuencia de las acciones tóxicas de varias sustancias químicas o de sus metabolitos. El hígado está constantemente expuesto a estrés oxidativo al metabolizar numerosos tóxicos endógenos y exógenos (92, 4).

I.F.II.- DEFENSAS CELULARES

En circunstancias fisiológicas normales la homeostasis celular está constantemente desafiada por sustancias, tanto de origen interno como externo, que inducen estrés, siendo muchas de ellas radicales libres. Debido a esto los organismos han desarrollado defensas celulares como forma de protección (37, 59, 60).

Se denomina antioxidantes a cualquier sustancia que, cuando está presente en baja concentración en comparación con un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato (91, 59).

Los antioxidantes actuarían básicamente de dos maneras: atrapando los radicales libres (previniendo así su acción tóxica sobre las moléculas blanco) o interrumpiendo las reacciones en cadena generadas por los radicales libres (54, 59).

Los componentes de los sistemas de defensa antioxidantes funcionan mejor cuando actúan de forma coordinada con procesos de reparación de moléculas dañadas y alteradas oxidativamente por los radicales libres, de tal manera de mantener la homeostasis celular (60, 37).

Además de la integración de las defensas intracelulares, también es importante la coordinación con antioxidantes en el plasma para suprimir los radicales libres generados en los compartimientos extracelulares (37).

➤ I.F.II.1.- Mecanismos de protección

Los sistemas de defensa son tan variados como los mismos radicales libres. Están formados por sustancias y por enzimas, además de otros elementos (34, 60, 93).

Una de las formas de protección sería la compartimentalización, la cual limita la dispersión de las especies oxidantes. Otra sería la quelación de los metales para evitar su intervención en reacciones tales como la descomposición de peróxidos de lípidos. Los metales son transportados y almacenados unidos a proteínas (por ejemplo, ferritina y transferrina para el hierro, ceruloplasmina para cobre y metalotioneínas para otros metales) (59, 44, 84, 57).

Por otra parte, la célula intenta reparar el daño sufrido en casos de moléculas estables como el ADN. Si la molécula afectada es de poca relevancia o es fácilmente obtenible, como por ejemplo lípidos y proteínas, directamente la reemplaza. En algunos casos el proceso puede ser mixto como en la deacilación de las porciones alteradas de fosfolípidos y reacilación con ácidos grasos no alterados (9, 44).

➤ I.F.II.2.- Componentes de los sistemas de defensa

Como se indicó anteriormente, las defensas están formadas por componentes celulares, enzimáticos y no enzimáticos. A su vez los no enzimáticos se pueden dividir en lipo e hidrosolubles; de acuerdo a esto último será el lugar de la célula donde actúen (60, 37).

Por ejemplo, componentes liposolubles serían vitamina E, carotenos, fenoles, hidroquinonas, ubiquinona, ácido α -lipoico, etc.; en tanto que hidrosolubles serían glutatión, ascorbato, productos del metabolismo de otras sustancias como bilirrubina, ácido úrico, melanina, etc. (54, 44, 6, 91, 60, 93, 66, 88, 57).

Algunos de los componentes enzimáticos son: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa (88, 6, 59)

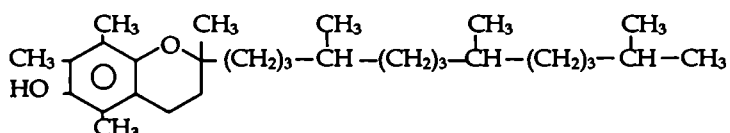
Se describirán brevemente algunas de estas defensas.

► I.F.II.2.1.- Vitamina E/ α -tocoferol

Esta es una de las sustancias empleadas en este Trabajo de Tesis, por lo que se describirá en mayor detalle.

El término genérico de vitamina E se refiere al menos a ocho isómeros estructurales del tocoferol. El α -tocoferol (α T) es el isómero más conocido y el de mayor actividad antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* para lípidos y proteínas (37, 94, 44).

La vitamina E se encuentra en altos niveles en determinados tejidos de mamíferos, tales como hígado, glándulas adrenales, corazón y testículos. Intracelularmente está presente en las membranas de los microsomas y mitocondrias (44, 37).



Como se puede observar de su fórmula, contiene grupos metilo en la vecindad del hidroxilo fenólico del grupo cromano y una cadena lateral tipo isoprenoide que le permite ubicarse en las membranas lipídicas (59, 91).

El grupo hidroxilo de su anillo aromático puede donar hidrógenos a las especies radicalarias como ser $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$, lipoperoxilos, alcoxilos lipídicos, oxígeno singulete y $CCl_3O_2^{\cdot}$. También podría ceder un segundo hidrógeno (44, 95, 69, 37, 60, 6).

Por reacción con un radical libre, el α T se transforma en el radical libre tocoferilo, el cual sería más estable que el radical libre que lo originó. Este radical se puede reducir nuevamente a α T (con tioles o ascorbato) o dimerizarse (con lo que pierde su capacidad antioxidante). El radical tocoferilo formado es soluble en agua, por lo que se traslada el daño de la membrana a un compartimento acuoso (59, 60, 37, 54, 44).

El α T es el terminador de reacciones en cadena más efectivo en las membranas. Reduce los radicales peroxilo a hidroperóxidos, los cuales pueden ser metabolizados por la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos de fosfolípidos, evitando de esa manera la propagación de la PL al evitar la formación de nuevos radicales alquilo (60, 54, 59, 37, 57, 62).

Se calcula que existe una relación 1:1000-2000 de α T a PUFA y la reactividad del α T con los radicales lipoperoxilo es 4-5 órdenes de magnitud mayor que la de éstos con los PUFA. Esto garantiza un buen efecto protector a menos que la cantidad de radicales lipídicos sea tan grande que consuma la existencia de α T (44, 95).

Los animales deficientes en vitamina E son más susceptibles a la PL (54).

Existe una proteína de transferencia (α TTP, α -tocopherol transfer protein), presente en el citosol, la cual se une específicamente al α -tocoferol, aumentando su transferencia entre las membranas celulares (96).

La vitamina E también está presente en sistemas antioxidantes extracelulares, por ejemplo en las LDL (lipoproteína de baja densidad, low-density lipoprotein) (95, 93).

► I.F.II.2.2.- Otras sustancias

Vitamina C o ácido ascórbico: Es un antioxidante soluble en agua presente en el citosol y en los fluidos extracelulares (91, 37, 95). Puede interactuar directamente con $O_2^{\cdot-}$ y $HO^{\cdot}$, así como con varios hidroperóxidos lipídicos (91, 37, 57).

El ácido ascórbico es capaz de regenerar la vitamina E oxidada. Los niveles tisulares de vitamina C son mucho mayores que los de vitamina E (91, 37, 57).

Dado en altas dosis puede actuar como prooxidante, debido a que puede reducir al hierro, el cual a su vez puede formar especies reactivas de oxígeno, inclusive $HO^{\cdot}$, inductoras de la peroxidación de lípidos (91, 37).

Carotenoides: Son antioxidantes liposolubles, pudiendo llegar a lugares de la célula más lipofílicos a los que la vitamina E no podría acceder (44, 60). Protegen contra la PL al atrapar a radicales libres como el peroxilo y otras especies reactivas de oxígeno, notablemente el oxígeno singulete (44, 37, 95, 57, 6, 59, 60).

El β -caroteno protege contra la PL causada por el CCl_4 (37).

Glutación: El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido, γ -glutamil-cisteín-glicina. Es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células, estando presente en virtualmente todos los sistemas celulares de mamíferos (37, 91, 97).

El factor clave de la actividad del GSH es el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el cual puede reaccionar con oxidantes o puede cederles un hidrógeno. Cuando cede un hidrógeno genera $GS^{\cdot}$, el cual se puede dimerizar para dar glutatión oxidado (GSSG), el cual puede ser reducido nuevamente a GSH por la glutatión reductasa dependiente de NADPH o puede ser excretado de la célula (37, 91, 44, 97, 3).

Este compuesto es importante en la regulación del medio redox intracelular y en el mantenimiento en estado reducido de los grupos tioles de proteínas, los cuales a su vez actúan en la recuperación de la vitamina E oxidada. También participa como cofactor de numerosas enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasas y transferasas) (44, 97, 37, 91).

En el caso del CCl_4 , muy poco GSH es consumido *in vivo* para la reducción de los peróxidos de lípidos. El GSH es capaz de reaccionar con los metabolitos reactivos del CCl_4 . Pese a esto, el CCl_4 no causa la depleción del GSH hepático, aunque aumenta levemente la excreción de GSSG (3, 98, 82, 5). El GSH es capaz de disminuir algunos de los efectos tóxicos del CCl_4 ; se cree que actuaría en la recuperación de las células y no en los mecanismos iniciales de su toxicidad (99).

Otras sustancias: existen pigmentos como la melanina que protegen a las células contra radiaciones ultravioletas (59, 60).

► I.F.II.2.3.- Enzimas antioxidantes

Algunas enzimas actuarían como defensas antioxidantes primarias, reaccionando directamente con las moléculas dañinas (por ejemplo, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa), mientras que otras actuarían recuperando las moléculas empleadas en la defensa (recuperación de GSH, producción de NADPH) o reparando el daño causado (fosfolipasa A₂ o proteasas específicas). También son importantes los sistemas de transporte de los conjugados (59, 60, 91, 44). Se describirán muy brevemente algunas de ellas.

Superóxido dismutasa: Esta enzima existe en virtualmente todos los seres vivos aeróbicos. Su principal función es catalizar la reacción de dismutación del radical superóxido en oxígeno y agua oxigenada (37, 57, 2, 44).

Catalasa: Es la mayor defensa antioxidante que cataliza la descomposición del agua oxigenada, generada por la SOD. Comparte esta función con la glutatión peroxidasa (37, 44, 57, 2).

Glutatión peroxidasa: Cataliza la descomposición del H₂O₂ y de los hidroperóxidos orgánicos. Existen formas de glutatión peroxidasa dependiente y no dependiente de selenio, algunas de ellas catalizan la destrucción de hidroperóxidos de lípidos. Se encuentra localizada principalmente en el citosol y en la matriz mitocondrial (37, 44, 57, 60).

Glutatión transferasas: Son un grupo de enzimas capaces de destruir hidroperóxidos pero no H₂O₂. Se encontraron en el citosol y no son dependientes de selenio (44, 37). Destruye, al igual que la peroxidasa, muchos hidroperóxidos orgánicos, formando compuestos tioéteres (conjugados) (59, 91).

El CCl₄ causa una disminución de las actividades de glutatión transferasas (3).

Glutatión reductasa: Reduce el glutatión oxidado a glutatión, usando como equivalentes de reducción NADPH, por lo que es muy importante en la metabolización de xenobióticos. Es una enzima fundamental del ciclo del glutatión, en el cual el glutatión empleado para la reducción de una sustancia es reducido nuevamente a glutatión por esta enzima (44, 59, 6, 60, 91).

Defensas secundarias: serían las enzimas lipolíticas y las proteasas. Se considera que las fosfolipasas serían un mecanismo de protección al eliminar lípidos alterados de las membranas lipídicas. Se sabe que la PL activa a la fosfolipasa A₂ y que la misma prefiere actuar sobre fosfolípidos oxidados (37).

Las enzimas proteolíticas serían protectoras por degradar proteínas oxidadas, impidiendo su acumulación y así el posible daño. Algunas de ellas degradan preferencialmente proteínas oxidadas (37, 57).

I.G.- SULFHIDRILOS PROTEICOS

➤ I.G.I.- Introducción

La cisteína es el único aminoácido presente en las proteínas que contiene un grupo sulfhidrilo libre. La unión de dos cisteínas forma un puente disulfuro, estructura muy importante en el mantenimiento de la estructura espacial de muchas proteínas (100-102).

Muchas enzimas poseen en su centro activo residuos cisteínas que intervienen en el mecanismo de catálisis. Por otra parte, muchos factores de regulación celular utilizan el estado de oxido-reducción de uno o más grupos sulfhidrilos como señales intracelulares (100-103).

Las células poseen mecanismos de protección de los grupos tioles y de reducción de los grupos sulfhidrilos oxidados (104, 105).

➤ I.G.II.- Grupos sulfhidrilos en enzimas

Grupos sulfhidrilos forman parte de los centros activos muchas de enzimas, por ejemplo, poseen grupos sulfhidrilos la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la papaína (una tiolproteasa), la ribonucleótido reductasa, la adenilato ciclasa y enzimas del metabolismo intermedio de los carbohidratos, entre otras (104, 61, 101).

Muchas veces se determina si una enzima o proteína requiere para su actividad de un grupo sulfhidrilo empleando N-etilmaleimida (NEM), la cual alquila grupos sulfhidrilos. Así, la inactivación de una enzima o proteína en presencia de NEM indicaría que la misma necesita al menos un grupo sulfhidrilo en estado reducido para ser activa (106, 107, 104). Por ejemplo, la N-etilmaleimida causa la liberación Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares, resultando en un incremento masivo de calcio independiente del calcio extracelular, por mecanismos que serían dependientes de grupos sulfhidrilos (108).

Existen factores de transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma que son inhibibles por NEM, lo que indicaría que probablemente serían sulfhidrílicos (107).

Algunas enzimas tiólicas son las encargadas de mantener a otras proteínas sulfhidrílicas en estado reducido. Por ejemplo, las tioredoxinas son pequeñas moléculas ubicuas que poseen un par de grupos cisteína que pueden sufrir oxidaciones reversibles. A su vez, las tioredoxinas son mantenidas en estado reducido por la tioredoxina reductasa (105, 58).

➤ I.G.III.- Relación con la estructura espacial de las proteínas

La influencia de los grupos sulfhidrilos y de los puentes disulfuros sobre la estructura espacial de las proteínas ha sido ampliamente estudiada. La secuencia aminoacídica es la que en principio determina el plegamiento de la proteína, muchas veces en el mantenimiento de su conformación final intervienen enlaces disulfuro. Si se desnaturaliza una proteína (por ejemplo la extensamente estudiada ribonucleasa) y se la deja renaturalizar, frecuentemente la misma vuelve a adquirir rápidamente las estructuras secundarias y terciarias de la proteína nativa, con reestablecimiento de los puentes disulfuro (100-103).

La formación de los puentes disulfuro es realizada en el lumen altamente oxidante del retículo endoplásmico. Existen allí enzimas (por ejemplo, proteína disulfuro isomerasa, tiorredoxinas) que favorecen su formación (109-111, 100).

Los puentes disulfuro están presentes en proteínas de secreción y algunas de membrana (por ejemplo receptores), en tanto que las proteínas intracelulares en general tienen pocos puentes disulfuro. Estos enlaces son fundamentales, por ejemplo, en el mantenimiento de la estructura, y por ende de la función, de proteínas tales como las inmunoglobulinas, la insulina, etc. (100, 101, 57).

➤ I.G.IV.- Grupos sulfhidrilos regulados en forma redox

Los grupos sulfhidrilos de proteínas pueden actuar como señales intracelulares, dependientes muchas veces del estado redox celular. En general, esta clase de grupos sulfhidrilos se ha conservado durante la evolución (104).

Por ejemplo, las tirosinas quinasa, varias proteínas G, canales iónicos, la ciclooxigenasa y la ribonucleótido reductasa poseen grupos tioles regulables en forma redox (104, 63). Muchos factores de transcripción poseen residuos cisteína regulables vía redox que deben estar en estado reducido para actuar, por ejemplo Fos y Jun, p53 (104, 112, 113).

El sistema tiol-redox celular estaría muy relacionado con la disponibilidad de equivalentes de reducción de NADH y NADPH, los cuales a su vez están relacionados con el estado energético en el que se encuentre la célula. También son muy importantes para el estado redox celular los niveles de antioxidantes tales como ascorbato y vitamina E, así como de las relaciones de glutatión a glutatión disulfuro (4, 114).

El estado redox de las células se expresa a veces por la relación entre la concentración de equivalentes de oxidación y los de reducción. En este caso la función del GSH sería la de mantener un medio intracelular reductor, necesario para un control estricto del estado redox para el correcto funcionamiento celular (91).

En muchos casos la regulación de óxido-reducción de la célula se produce a través del

glutación. Sin embargo, en el caso del hígado una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos hepáticos no está claramente relacionada con la depleción de GSH (97).

La alteración del estado de oxido-reducción de determinados grupos sulfhidrilos de proteínas dispara la activación de respuestas celulares. Por ejemplo, situaciones de estrés que produzcan la oxidación de tioles de proteínas o la disminución de glutación ocasionan la activación de factores como los de respuesta al calor (heat shock proteins) (104).

La tioredoxina (que, como se indicó anteriormente, es la encargada de la reducción de grupos sulfhidrilos) es normalmente citoplasmática, pero es transportada al núcleo en respuesta a estímulos como ésteres de forbol y radiación UV. Esta enzima es inducida por varios tipos de estrés oxidativos (113).

➤ I.G.V.- Tiolación

Una de las formas de protección que poseen las células contra el estrés oxidativo es el mecanismo denominado tiolación, por el cual se protegen los grupos sulfhidrilos en un estado de estrés oxidativo. De esta manera la célula evita el daño irreversible de enzimas o proteínas sulfhidrúlicas importantes para su funcionamiento (104, 115, 112).

En muchos casos, debido a un estado de estrés oxidativo bajan los niveles de GSH y aumentan los de GSSG. En estas circunstancias, el GSSG reacciona con los grupos sulfhidrilos de ciertas proteínas "tiolándolos". Este proceso inactiva a la proteína de una manera reversible. De esta manera, al oxidar la célula misma sus grupos sulfhidrilos de manera reversible los está protegiendo de la oxidación por otras especies reactivas. En cambio, las oxidaciones de los grupos sulfhidrilos por agentes oxidantes rara vez son reversibles (104, 115, 112).

Una vez que pasa la situación de estrés, la célula posee enzimas (la principal es la glutarreductasa) capaces de revertir la tiolación de las proteínas (112, 115, 104).

Ejemplos de enzimas que son tioladas son: creatina quinasa, anhidrasa carbónica III, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y actina. Todas ellas son abundantes en los hepatocitos de las ratas macho (115).

La tiolación puede ser también un proceso protector contra especies azufradas reactivas. Así, intermediarios reactivos formados por la acción de oxidantes sobre grupos sulfhidrilos de proteínas (como radicales tiilo o ácido sulfénico) pueden ser tiolados, evitando de esta manera que participen en otras reacciones que puedan llevar a la inactivación irreversible de la proteína (115).

La tiolación es también un proceso necesario para el plegado *de novo* y para el

mantenimiento de la conformación de las proteínas (68).

➤ ***I.G.VI.- Grupos tioles blancos de radicales libres***

Las proteínas pueden ser alteradas por sustancias que oxiden o que formen de aductos con sus grupos tioles libres (97, 55, 37). De esta manera pueden ser modificadas moléculas como proteínas G, factores de transcripción, canales iónicos, ciclooxigenasa, ribonucleótido reductasa entre otras (63).

La facilidad con que un determinado grupo sulfhidrilo de una proteína sea atacado dependerá de la secuencia aminoacídica de la proteína de la que forme parte y de cuán expuesto se halle dicho grupo. Así, la combinación de estos dos factores causaría que algunos tioles sean blanco de ataque de radicales libres y otros no (63).

La desaparición de los grupos tioles, por ejemplo de glutatión, por conjugación con los metabolitos de la fase I o por quelación con metales, puede llevar a una disminución de las defensas antioxidantes, lo cual puede estar relacionado con las funciones del calcio (ver más adelante) (4).

Bajo condiciones de estrés por xenobióticos, la glutatión peroxidasa y la glutatión-S-transferasa también disminuirán el GSH disponible, lo cual llevaría a una desestabilización de la arquitectura de membrana (4).

Por otra parte, la oxidación de grupos sulfhidrilos de proteínas incrementa la susceptibilidad a la proteólisis (58).

Relación con la homeostasis del calcio: Varios componentes de los sistemas reguladores de la homeostasis cálcica, por ejemplo: la bomba de calcio del retículo endoplásmico y los canales sensibles a IP_3 (inositol trifosfato) o a rianodina, son proteínas sulfhidrúlicas, las cuales se podrían ver afectadas al alterarse el estado redox de sus grupos sulfhidrilos (varios de los componentes sulfhidrúlicos que están involucrados en la homeostasis cálcica serán considerados más adelante) (104, 116, 106).

También se producirían alteraciones de la homeostasis cálcica por oxidaciones e interuniones de grupos tioles de la membrana de las mitocondrias, lo cual lleva a la formación de poros no específicos que la hacen permeable al calcio (permeabilización transitoria de la membrana). Esto está relacionado con estados patológicos como la isquemia-reperfusión (117).

Muchas veces productos que protegen los grupos tioles (2,3-dimercaptopropanol, ditiotreitól, cisteína o GSH) también protegen del daño, de lo que surge la relación entre grupos tioles y daño a mitocondrias (54).

➤ *I.G.VII.- Grupos sulfhidrilos de proteínas en situaciones fisiológicas y patológicas*

En procesos tales como el envejecimiento o el daño por radicales libres se ha detectado la acumulación de proteínas por formación de complejos de proteínas o proteínas y lípidos, los cuales estarían en parte unidos por puentes disulfuros (118, 67, 105).

Por otra parte, la acumulación de productos de oxidación de cisteína, entre otros, ha sido determinada en proteínas de larga vida media en tejidos especializados como el ojo (68).

Los grupos sulfhidrilos proteicos son muy sensibles al HClO formado durante el estallido respiratorio que se produce, por ejemplo, cuando los macrófagos entran en contacto con bacteria o péptidos quimiotácticos. En algunas enfermedades, por ejemplo enfermedades desmielinizantes, artritis y otras inflamaciones crónicas, se produce la activación y el reclutamiento de macrófagos (119, 68, 67).

La proteína p53, involucrada en la apoptosis, podría ser regulada por alteración de sus grupos tioles. Así, antioxidantes como el glutatión pueden inhibir su activación. Esta proteína puede ser activada por exposición a radiaciones (68).

En situaciones como la isquemia-reperfusión (que se puede producir en un ataque cardíaco o en el transplante de órganos) se produce la oxidación de grupos sulfhidrilos proteicos (también la formación de grupos carbonilos). Aunque la lesión precisa no ha sido establecida, se cree que estarían involucrados transportadores de calcio, los cuales podrían ser inactivados por oxidación de sus grupos sulfhidrilos (68, 67, 120, 121).

El humo de cigarrillo causa la oxidación de grupos sulfhidrilos (también la formación de grupos carbonilos) en proteínas plasmáticas. En este proceso no estarían involucrados radicales alcoxilo y peroxilo de lípidos (122).

Se produce la depleción de grupos sulfhidrilos en otras enfermedades como la pancreatitis inducida en ratas (123). También se ha determinado la oxidación de grupos tioles en la distrofia muscular hereditaria de pollos (97).

I.H.- SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

➤ I.H.I.- Introducción

La información necesaria para la síntesis de todas las proteínas (excepto algunas proteínas mitocondriales) está codificada en el ADN nuclear. En cada célula están activos los genes que establecen las proteínas que han de sintetizarse en esa célula, lo que en definitiva define el tipo celular (124, 125, 100, 102).

El dogma central de la biología molecular establece que el flujo de información genética en una célula normal es:



En el proceso de transcripción los genes del ADN son "copiados" en moléculas de ARN denominadas ARN mensajero. En el proceso de traducción la información codificada en el mARN es "traducida" en una secuencia específica de aminoácidos.

En esta descripción no se tratará el mecanismo de transcripción. Sólo se considerará el proceso de traducción y las moléculas involucradas en el mismo.

➤ I.H.II.- ARNs que intervienen en la síntesis de proteínas

Los ARN que intervienen en la síntesis de proteínas son: ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia (tARN) y ARN ribosomal (rARN). Se hará a continuación una breve descripción de cada uno.

➤ I.H.II.1.- ARN mensajero

Este ARN es denominado mensajero por ser el encargado de llevar la información presente en el ADN del núcleo hacia el citoplasma, donde se realiza la síntesis de proteínas. Los mARN de células eucariotas son muy heterogéneos ya que cada uno codifica para una única proteína (124, 125, 100, 102).

En la transcripción del ADN se forman los denominados transcriptos primarios, los cuales en muchos casos deben sufrir un proceso denominado "maduración", el cual procede según las siguientes etapas (124, 125, 100, 102):

a) *agregado de un casquete, capucha o "cap" en el extremo 5'*: La cadena nascente de ARN se modifica casi de inmediato por formación de una estructura denominada capucha o cap en su extremo 5' (el cual es una 7-metilguanósina (aunque también existen otras

metilaciones en las ribosas de los primeros nucleótidos que dan lugar a distintos tipos de caps)). Este proceso define la iniciación de la traducción eucariota.

b) agregado de una cola de poli A en el extremo 3': casi todos los mRNA poseen en sus extremos 3' colas de poliadenilato (poli A) de 100-200 nucleótidos de longitud.

A medida que se va sintetizando, el mRNA se va condensando con proteínas formando partículas ribonucleoproteicas heterogéneas (hnRNP, heteronuclear ribonucleoprotein particles). Las proteínas que forman las hnRNP son las más abundantes del núcleo de la célula, con excepción de las histonas.

La cola de poli A ayudaría a la exportación del mRNA maduro hacia el citoplasma y a la traducción por ser una señal de reconocimiento para el ribosoma. Se cree que condicionaría la vida media del mRNA en el citoplasma.

c) Corte y empalme: En este proceso (denominado splicing) el transcripto primario es modificado. Se pierden secuencias no codificantes internas (intrones) y se unen las secuencias que se expresan (exones) en el mismo orden que tenían en el gen. Este proceso sería realizado por ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNAs: small nuclear RNAs).

No todos los genes poseen intrones, por ejemplo, los transcriptos primarios de las histonas y de los interferones no los poseen.

d) Corrección del mensajero: En algunos mRNA se produce un proceso de corrección (editing) del ARN (cuya función no se conoce), por el cual se producen cambios, inserciones o deleciones de bases. La apolipoproteína B y el receptor de glutamato sufren este proceso.

El mRNA maduro sale del núcleo a través del poro nuclear hacia el citosol. Allí se asocia a proteínas, formando complejos de ribonucleoproteínas, los que serían transportados por medio del citoesqueleto, evitando así su traducción en lugares inapropiados (126).

➤ I.H.II.2.-ARN de transferencia

La función de los tARN es hacer de nexo entre los aminoácidos y el mRNA. Hay al menos un tipo de tARN por cada uno de los aminoácidos comunes en las proteínas (125, 124, 100, 102).

Los tARN están formados por unos 80 nucleótidos; muchos de ellos modificados. Tienen un diseño común en forma de hoja de trébol. Poseen una secuencia -CCA en el extremo 3' (añadida después de su síntesis) a la cual se une el aminoácido correspondiente.

Cada tARN tiene en el centro de la molécula (en el brazo opuesto al -CCA) una secuencia de tres bases particular a la que se denomina anticodón. Esta secuencia es la que se aparea con 3 bases del mRNA (codón), determinando que el aminoácido cargado en el tARN sea incorporado a la cadena peptídica.

Se forma un aminoacil-tARN (aa-tARN) por unión de un aminoácido a su tARN correspondiente. Este proceso requiere energía y participan aminoaciltransferasas (enzimas muy selectivas, de las que existe al menos una por cada aminoácido), las cuales reconocen al tARN y al aminoácido correspondiente. El aminoácido en el aa-tARN está activado, es decir, tiene la energía necesaria para la formación del enlace peptídico

➤ I.H.II.3.- Ribosomas

Son los complejos moleculares que coordinan las interacciones entre los tARNs, el mARNs y la proteína que se esté sintetizando. Están formados por dos subunidades, una mayor (60S) y una menor (40S). Juntas forman el ribosoma de 80S (125, 100, 102, 124).

La ultraestructura de los ribosomas es muy compleja; tienen asociados 4 ARN: tres en la subunidad mayor: 28S; 5,8S y 5S y el restante (18S) en la menor. Poseen un gran número de proteínas asociadas; 33 (denominadas L₁-L₃₃, large) en la subunidad mayor, y 21 (llamadas: S₁-S₂₁, small) en la menor. Ambas subunidades no tiene proteínas en común.

Los ribosomas 80S de mamíferos poseen un túnel que sería el camino de salida de las proteínas nacientes, el cual se extiende a lo largo de la subunidad mayor desde el lugar donde está ubicada la peptidil transferasa hasta una superficie plana (la cual estaría involucrada en el anclado del ribosoma a la membrana del retículo endoplásmico) (127).

La síntesis de los ribosomas es realizada en el nucleolo. Allí se produce la transcripción, procesamiento y ensamblaje de los ribosomas (100, 128). Los ARN de 18S; 5,8S y 28S se transcriben juntos, formando un transcrito primario de 45S, el cual es metilado en forma específica en aproximadamente 100 sitios, pertenecientes en su mayoría a las secuencias del rARN procesado. Cerca del 80% de estas modificaciones son residuos de O²-metilribosa. Pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs, small nucleolar ribonucleoproteins) actuarían como guías durante el proceso de maduración de los rARN. Luego de la metilación el transcrito de 45S es cortado en lugares específicos, los pre-rARN formados se asocian a las proteínas ribosomales y son nuevamente cortados para formar los rARN maduros. El rARN 5S se sintetiza fuera del nucleolo (100, 102, 129).

➤ I.H.III.- Traducción

En este proceso se “traduce” la información presente en un mARN a una cadena peptídica. Se denomina de esta manera porque el alfabeto de cuatro letras de los ácidos nucleicos se traduce a otro alfabeto totalmente distinto de aminoácidos. La dirección de síntesis es del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal (125, 124, 100, 102).

Se divide la traducción de proteínas en tres etapas: iniciación, elongación, terminación. A continuación se describirá cada una de ellas.

► I.H.III.1.- Iniciación

La iniciación consiste en la formación del denominado “complejo de iniciación”. Este proceso consta de varias etapas y requiere energía. El primer paso es la unión del tARN denominado “iniciador” con la subunidad ribosómica 40S y con el mRNA en presencia de varios factores de iniciación denominados eIF (factor de iniciación eucariótica, eucariotic initiation factor) (125, 124, 102, 130, 100).

En la figura I.H.1 (102) se representa la iniciación de la síntesis de proteínas.

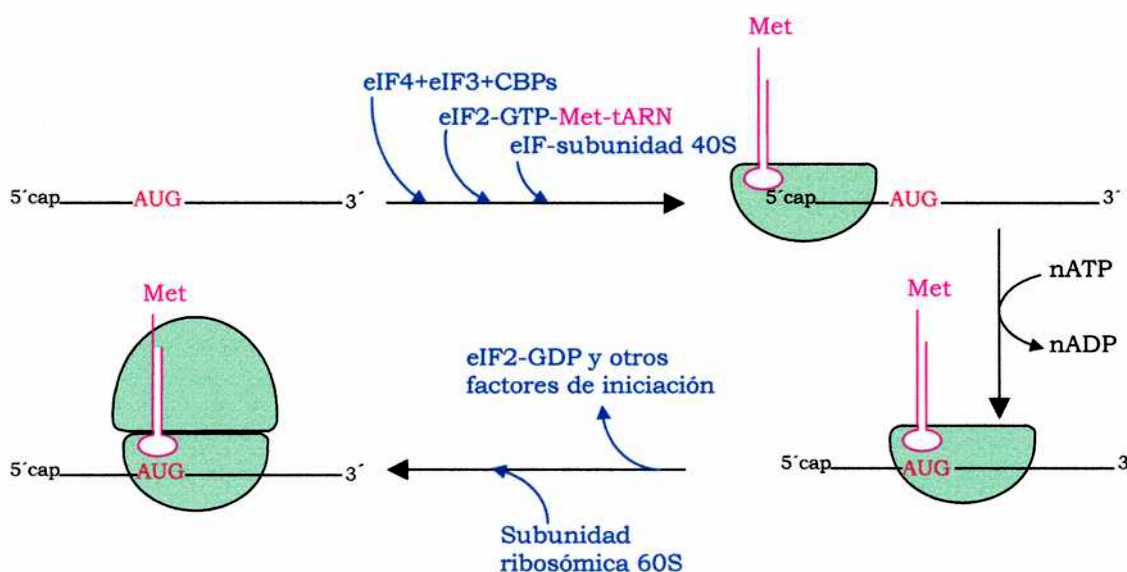


Figura I.H.1: Iniciación de la síntesis proteica

El tARN iniciador forma con el aminoácido metionina el aminoacil-tARN iniciador ($Met-tARN_i$), el cual es distinto al tARN para metionina empleado en la elongación.

Para poder recibir al $Met-tARN_i$ el mRNA debe tener unidas proteínas denominadas proteínas de unión al cap (CBPs, cap binding proteins), las cuales llevan unidos algunos eIFs.

Una vez unida la subunidad 40S se produce el movimiento del conjunto hasta encontrar el codón de iniciación (el AUG más cercano al extremo 5') en un proceso dirigido por la hidrólisis de ATP, luego de lo cual se separan de factores de iniciación y se une la subunidad 60S, formando el complejo de iniciación capaz de iniciar la etapa de elongación.

► I.H.III.2.- Elongación

Los aminoácidos se añaden al extremo carboxílico de la cadena en crecimiento por

reacciones que son similares para todos los aminoácidos. Estas reacciones (representadas en la figura I.H.2 (102)) se producen por ciclos de tres fases e intervienen factores de elongación (eEF, eucariotic elongation factors) (125, 124, 102, 100, 130).

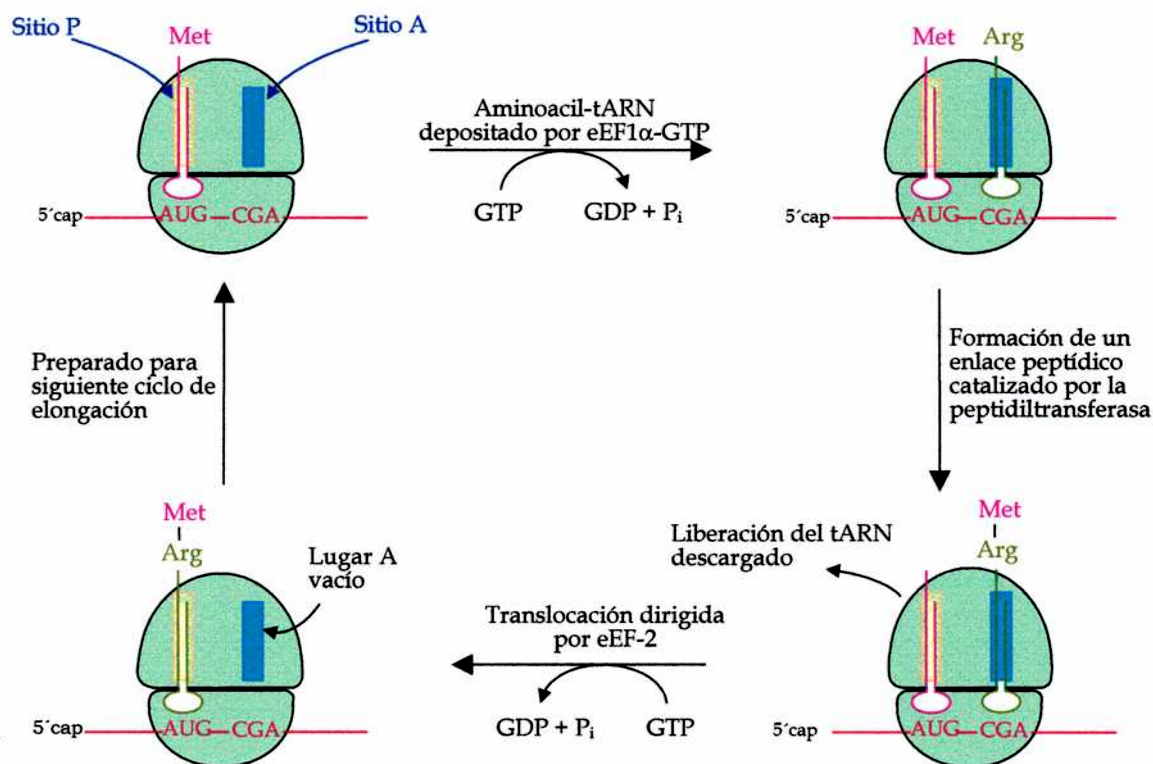


Figura I.H.2: Elongación en la síntesis de proteínas

En los ribosomas hay dos lugares donde pueden unirse los tARN:

- el sitio peptídilo (sitio P)
- el sitio aminoacilo (sitio A).

Los sitios A y P están cercanos, de manera que los tARN que están en ellos se aparean con codones adyacentes en el mRNA. El tARN iniciador se une al lugar P del ribosoma.

En la primera fase de la elongación el aa-tARN cuyo anticodón se corresponda con la secuencia de las tres bases siguientes al AUG se une al sitio A, lo cual es conducido por el factor de elongación eEF1α-GTP.

En la segunda etapa del ciclo de elongación se forma el enlace peptídico. El grupo amino del aa-tARN ubicado en el sitio A desplaza al tARN ubicado en el sitio P (en el caso de la unión del primer aminoácido se desplazaría al tARN_i) uniéndose al carboxilo de dicho aminoácido. Esta reacción es catalizada por una peptidiltransferasa o aminoaciltransferasa, la cual es una enzima fuertemente unida a la subunidad grande del ribosoma. La nueva cadena, con un resto aminoácido más, queda unida al tARN que está en el sitio A. La reacción de transpeptidización usa la energía del aminoacil-tARN ya unido. Así, cada aminoácido lleva la energía de activación para la adición del próximo aminoácido.

En la tercera etapa de la elongación el peptidil-tARN resultante se transloca desde el sitio A hacia el sitio P al mismo tiempo que la molécula de tARN que estaba en el lugar P abandona el ribosoma. Esto prepara al ribosoma para el próximo ciclo de elongación.

Posteriormente un aminoacil-tARN se une al lugar A vacío, iniciándose un nuevo paso de elongación.

En las etapas de iniciación y elongación existen factores que llevan unidos GTP o GDP. El factor con GTP es el que se une al ribosoma y permite el proceso en el que esté involucrado. Al hidrolizarse el GTP se produce la separación del ribosoma del factor unido a GDP. Otros procesos fuera del ribosoma permiten la recuperación de la forma del factor con GTP, necesaria para poder proseguir la síntesis proteica. Los factores eIF2, eEF1 α y eEF2 sufren este proceso.

► I.H.III.3.- Terminación

La terminación ocurre cuando una señal de parada en el mRNA (secuencias de terminación UAA, UGA o UAG) es leída por un único factor proteico de liberación (eRF, eucariotic release factor), causando la liberación de la cadena polipeptídica completa del ribosoma. No existen tARN que lean los codones de terminación (125, 124, 102, 100, 130).

La unión del factor de liberación en el sitio A activa a la aminoacilpeptidiltransferasa para que hidrolice el enlace entre el péptido y el tARN en el lugar P. El aceptor del carboxilo del último aminoácido sería una molécula de agua en vez del grupo amino de un aminoácido. Como lo único que mantiene unida la cadena polipeptídica al ribosoma es el enlace del carboxilo con el tARN, la cadena polipeptídica se libera y abandona el ribosoma, seguida por el tARN y el mRNA. Por último el ribosoma se disocia en sus subunidades.

El eIF3 impide la reasociación de las subunidades ribosómicas en ausencia del complejo de iniciación (es decir, si el mRNA no está presente).

Como el aminoácido inicial es siempre metionina, todas las cadenas sintetizadas tendrían como residuo N-terminal este aminoácido. En algunos casos, cuando no afecta la función de la proteína, la metionina es mantenida; sino, luego de la síntesis de unos pocos aminoácidos es removida por proteólisis.

► I.H.IV.- Lugar de síntesis de las proteínas

Los mensajeros que salen del núcleo son transportados al citosol por medio del citoesqueleto (130, 126). La síntesis de todas las proteínas comienza en ribosomas libres en el citosol. A la cadena de mRNA se van agregando ribosomas, los cuales traducen al mismo

tiempo la información codificada en el mensajero, formando estructuras denominadas polisomas o polirribosomas (125, 124, 102, 100, 130).

Un esquema de la distribución de los ribosomas en la síntesis proteica se muestra en la figura I.H.3 (124).

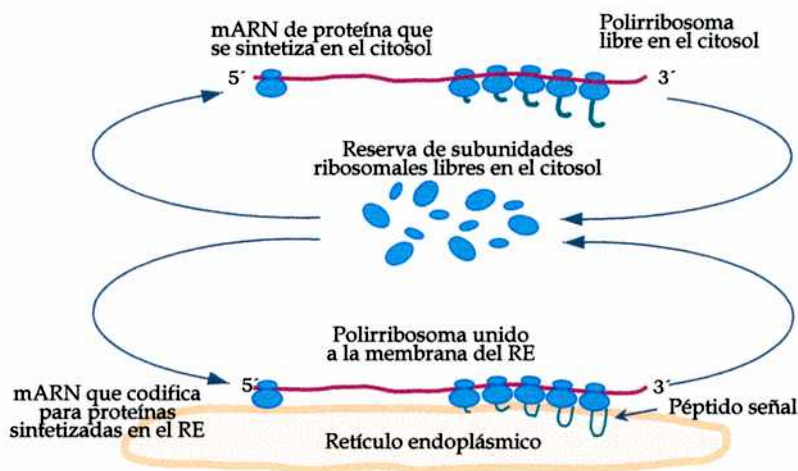


Figura I.H.3: Síntesis de proteínas en polisomas libres y unidos al RE

La secuencia de los primeros aminoácidos de la cadena naciente es la que determina el lugar donde finaliza la síntesis proteica. Si los primeros aminoácidos corresponden a una señal, denominada "secuencia señal", la síntesis pasará a realizarse en el retículo endoplásmico (RE). En cambio, si dicha secuencia no codifica ninguna señal específica, la síntesis continuará y terminará en el citosol (125, 124, 102, 100).

Los ribosomas unidos a membrana y los ribosomas libres son intrínsecamente idénticos. Lo que determina que estén libres o unidos a membrana es la proteína que estén sintetizando en ese momento (130, 102, 100).

En los hepatocitos (sistema celular empleado en este trabajo de tesis) la proporción de ribosomas y polisomas libres es pequeña (un 20% del total). Los demás (80-90%) están unidos a membrana (131).

► I.H.IV.1.- Síntesis de proteínas en el citosol

Las proteínas destinadas al núcleo, al citosol, a las mitocondrias y a los peroxisomas son sintetizadas en el citosol en polisomas libres o asociados al citoesqueleto (125, 124, 102, 12). La información que indica que un determinado mARN se debería transcribir en polisomas unidos al citoesqueleto estaría codificada en los mismos mensajeros (130).

Existirían además mARN unidos a polisomas asociados con el citoesqueleto en una forma no traducible, formando ribonucleoproteínas llamadas prosomas (130).

► I.H.IV.2.- Síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico

Las proteínas de secreción, de membrana (todas las proteínas integrales de membrana, excepto las de las mitocondrias, son sintetizadas allí), lisosomales, proteínas del aparato de Golgi y de compartimentos de transporte intermedio son sintetizadas en polisomas asociados al RE (12, 124, 132, 133, 130).

La síntesis de estas proteínas comienza en el citoplasma y continúa en la membrana del retículo endoplásmico rugoso. Este transporte es del tipo co-traducciona l ya que se produce al mismo tiempo que se esta sintetizando la proteína (30, 124).

Las proteínas a ser sintetizadas en el RE son dirigidas hacia la membrana del mismo por secuencias de 6 a 20 aminoácidos no polares, denominadas secuencia o péptido señal, localizadas en el extremo N-terminal de la proteína precursora (134, 30, 125, 124, 110).

La molécula que reconoce las secuencias señal es una ribonucleoproteína llamada SRP (signal recognition particle) que interactúa con la secuencia señal, disminuye la velocidad de traducción y dirige el conjunto hacia la membrana del RE (134, 125, 110). Allí la SRP se une a un receptor (proteína de anclaje). Esto estimula al ribosoma para que prosiga la síntesis de la cadena polipeptídica y facilita el paso del extremo N-terminal del polipéptido a través de un canal denominado traslocón en la membrana del RER hacia la luz del RER, estos canales estarían ubicados en sitios precisos de la membrana del RE (134, 110, 100).

Una vez que la cadena peptídica naciente se ubica correctamente la SRP se separa del ribosoma y del receptor, usando GTP. El ribosoma queda unido al RE por medio de un receptor propio para ribosomas. El ribosoma se separa del RER una vez finalizada la síntesis de la proteína (134, 110, 100).

Existen también enzimas en el sitio de pasaje que modificarían la cadena naciente: la peptidasa señal (que corta la secuencia señal) y la oligosacariltransferasa (que catalizaría la N-glicosilación en asparagina para formar glucoproteínas). Ambas enzimas parecerían ser esenciales para el proceso de traslocación (134, 100, 30, 132, 124).

También existirían proteínas lumbales residentes que ayudarían al plegado correcto de las proteínas (chaperonas) y facilitarían la degradación de los péptidos mal plegados. Muchas de estas proteínas son inducidas por condiciones de estrés que produzcan la acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas. Existen factores, como el sensible a N-etilmaleimida, que regularían la actividad de estas proteínas (133, 132, 124, 109).

La formación de puentes disulfuro en las proteínas se produciría aún antes que se haya completado su síntesis de la proteína. La proteína disulfuro isomerasa, la cual cataliza reacciones de intercambio tiol/disulfuro, es una de las proteínas que interviene. De acuerdo a la naturaleza del polipéptido y el potencial redox presente promueve la formación del puente disulfuro, la isomerización o la reducción. Su abundancia está en relación directa con el nivel de síntesis de proteínas de excreción. Otras proteínas que pueden llevar a cabo esta

esta tarea son las proteínas tipo tiorredoxina, también presentes en el RE (109, 110).

El medio redox del interior del RE es unas 20 a 100 veces más oxidante que el citosol, de manera tal que se promueve la formación de puentes disulfuro. Para mantener el medio oxidante se liberan al citoplasma desde el RE pequeños tioles como cisteína o glutatión. La excreción de pequeños tioles al citosol podría conectar la formación de puentes disulfuro con las señales redox intra y extracelulares (135, 111).

Otro mecanismo de transporte, el post-traducciona, se produciría después de sintetizada la proteína. Este transporte es independiente de los ribosomas o de las partículas reconocedoras de señales y requiere ATP. Intervendrían proteínas de la membrana del RE y chaperonas citosólicas (por ejemplo, la chaperona Hsp 70) para evitar un plegamiento de la proteína que impidiera su pasaje a través del traslocón (el mismo empleado en el transporte cotraducciona) (134, 110, 132).

El largo de la cadena determina cual es el mecanismo que opera. Las proteínas de más de 70 aminoácidos requieren del transporte co-traducciona (110).

En el RE existiría un “control de calidad” que sólo deja pasar al Golgi las proteínas correctamente plegadas. Las proteínas mal plegadas son ayudadas a obtener la conformación correcta o son sacadas del RE hacia el citosol por medio del transporte retrógrado (132, 133). El transporte retrógrado se realiza a través del traslocón (el mismo del transporte co- y post-traducciona). Una vez transportada la proteína anómala, sería degradada fundamentalmente por el proteosoma citosólico (ver más adelante) (132, 133).

La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE puede llevar a su agregación y precipitación, bloqueando los caminos de secreción. Este sistema operaría en la degradación de proteínas anómalas como la del canal de cloruro en la fibrosis quística, en la cual la mayoría de la proteína es degradada en un compartimento pre-Golgi (132, 133).

➤ I.H.V.- Localización final de las proteínas

La localización de las proteínas en el compartimento celular adecuado es una condición *sine qua non* para la correcta estructura y funcionalidad de cualquier célula (125).

Como se indicó anteriormente, el destino final de una proteína está codificado en la misma secuencia proteica. En el caso de las proteínas que se sintetizan en el citosol, las mismas son dirigidas hacia su ubicación final después de haber sido sintetizadas, es decir, el transporte es post-traducciona (12, 125).

En la figura I.H.4 (125) se muestra un esquema de los lugares de síntesis y las posibles localizaciones finales de las proteínas

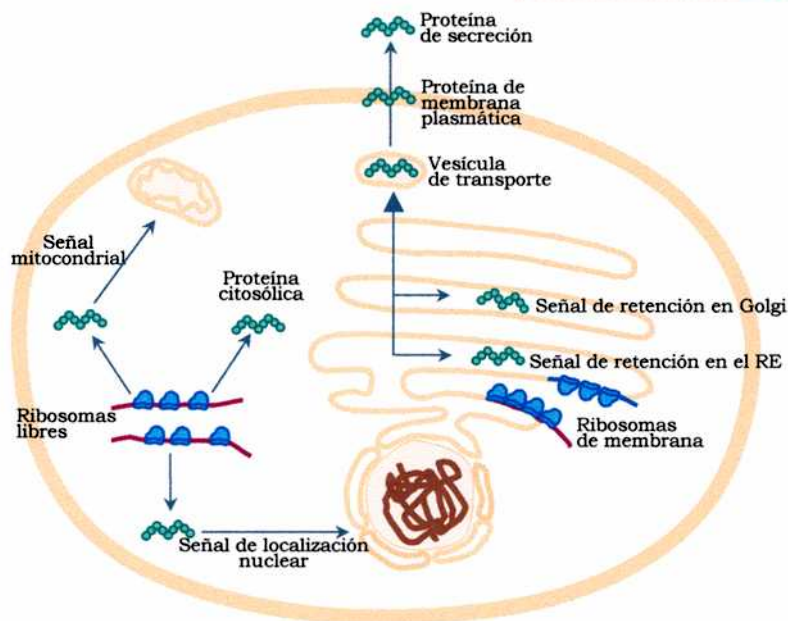


Figura I.H.4: Síntesis y localización de las proteínas celulares

Proteínas nucleares: Si la proteína posee una señal llamada señal de localización nuclear (NSL: nuclear signal localization), la proteína será dirigida hacia el núcleo. Este transporte se considerará más adelante en más detalle.

Proteínas mitocondriales: La mayoría de las proteínas mitocondriales son sintetizadas a partir del ADN nuclear en el citosol. Estas proteínas poseen señales mitocondriales N-terminales de unos 25 aminoácidos de longitud, las cuales son distintas de acuerdo a si la proteína pertenece a la matriz, al espacio intermembrana, o a la membrana externa o interna de la mitocondria. En el citosol estas proteínas interactuarían con chaperonas (por ejemplo, Hsp70) que la mantendrían en forma desplegada. Receptores en la superficie de las mitocondrias reconocerían la secuencia señal y dirigiría a la proteína hacia su destino final en la mitocondria. Durante o después de la translocación se produce el corte de la secuencia señal. La translocación requiere ATP (125, 12, 109).

Proteínas de secreción, de membrana, de lisosomas y de peroxisomas: Las proteínas de secreción, del RE, lisosómicas y de los peroxisomas pasan completamente a través de la membrana del RE hacia la luz del mismo.

Las proteínas integrales de membrana contienen una secuencia hidrofóbica de unos 20 aminoácidos llamada "ancla de membrana" o de "detención de transferencia" que detiene el paso de la cadena en crecimiento a través de la membrana. La secuencia de anclaje determina la forma en que será sintetizada la proteína, lo que a su vez dependerá de cuál es el extremo (amino o carboxilo) que quedará orientado hacia el citoplasma (125, 30).

Las proteínas de membrana, las de secreción vía el aparato de Golgi y las lisosómicas son transportadas hacia su destino final por vesículas revestidas con clatrina, la cual se cree

que actuaría como almacén flexible para promover la formación de la vesícula. Una vesícula se desprende por gemación de su membrana de origen y se funde posteriormente con la membrana diana. Este proceso conserva la orientación de la proteína transmembrana. En el aparato de Golgi las proteínas serían glicosiladas antes de ser exportadas (100, 125).

En el caso de los lisosomas, las proteínas poseen un lugar donde se une un residuo de azúcar particular que hace que estas proteínas sean dirigidas a esa organela (100, 125).

Las proteínas de los peroxisomas poseen en su extremo C-terminal una secuencia SKF (Ser-Lis-Fen) que es la que indica que su destino final son los peroxisomas (124, 12).

Proteínas del retículo endoplásmico: Las proteínas propias del RE poseen una secuencia C-terminal común Lis-Asp-Glu-Leu (KDEL) que indica que el destino final de la proteína es el retículo. Esta secuencia no evita que sean trasladadas esas proteínas al Golgi, sino que permite que sean recuperadas para el RE rápidamente (100, 124, 30).

Proteínas citosólicas: Estas proteínas no tendrán ninguna señal específica, por lo que quedarían en el citosol (12, 125, 104).

➤ I.H.VI.- Transporte nuclear

En la figura I.H.5 (128) se representa el transporte entre el núcleo y el citoplasma.

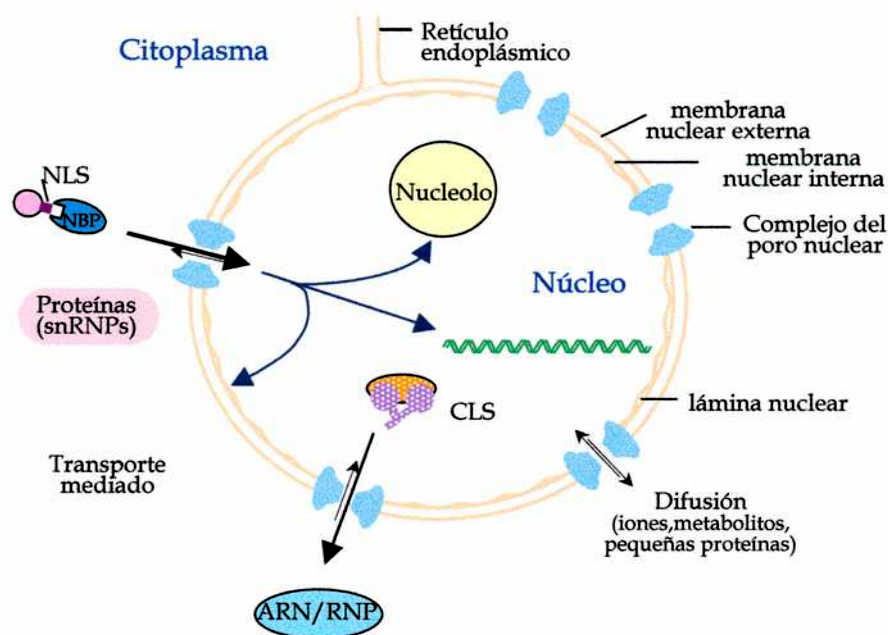


Figura I.H.5: Transporte de sustancias entre el núcleo y el citoplasma

El transporte de macromoléculas al núcleo es diferente del transporte a otras

organelas. La entrada y salida de sustancias del núcleo es continua y se produce a través de estructuras denominadas complejo del poro nuclear (CPN) (128, 136, 137).

En la figura I.H.5 NLS representa señal de reconocimiento nuclear, NBP sería la proteína de unión a NLS (NLS binding protein) y CLS indica señal de localización citoplasmática (cytoplasmic localization signal).

A diferencia de otros transportes, las proteínas pasa a través del CPN con su conformación natural, incluso formando partículas como, por ejemplo, en el caso de la salida de los complejos de ribonucleoproteínas ya ensamblados (136, 137).

Una característica del transporte nuclear es que la importación y la exportación son procesos igualmente importantes. Muchas proteínas necesitan ser importadas al núcleo varias veces: proteínas del nucleolo, Hsp70, el receptor de progesterona y la proteína quinasa dependiente de AMPc entre otras (136- 138).

Se deben exportar además tARN, rARN y mARN, sintetizados en el núcleo pero usados en el citoplasma. También, la formación de partículas como snRNAs (componentes del procesamiento de los mARN) o la biogénesis de los ribosomas implican procesos en el citoplasma, con múltiples cruces de la membrana nuclear (136, 128, 139, 107, 137).

Existen proteínas que se mueven entre el citoplasma y el núcleo, mientras que otras tienden a permanecer en el núcleo por largos períodos. Algunas proteínas de transporte nuclear están establemente asociadas con los poros nucleares (128, 137).

➤ I.H.VI.1.- Núcleo

El núcleo de las células eucariotas está rodeado por una envoltura nuclear compuesta por dos membranas lipídicas (la membrana nuclear interna y la membrana nuclear externa) separadas por el espacio perinuclear. La membrana nuclear externa forma un continuo con la membrana del RE rugoso y el espacio perinuclear se continúa con el lumen del RE (124, 140, 138). Del lado interno de la membrana nuclear interna está la lámina nuclear, que une la membrana nuclear interna con la cromatina (124, 134, 140). Mucho del espacio dentro del núcleo es ocupado por cromatina, la cual está organizada en dominios de eucromatina (laxa) y heterocromatina (compacta) (129).

La membrana nuclear es fundamental en las características del transporte entre el núcleo y el citoplasma. Permite la separación de las actividades nucleares (la replicación de ADN, transcripción y procesamiento de ARN) de las actividades citosólicas (traducción), lo cual posibilita un mayor control de la expresión genética (124, 125).

➤ I.H.VI.2.- Complejo del poro nuclear

El transporte hacia y desde el núcleo se realiza a través del complejo del poro nuclear.

Habría unos 10^3 - 10^6 por núcleo, de masa aproximadamente 10^8 daltons (aproximadamente 30 veces la de un ribosoma) (138, 136, 124).

El CPN está formado por unas 80-100 clases de proteínas diferentes (llamadas nucleoporinas); sólo un pequeño número de ellas han sido caracterizadas. El CPN está asociado con las membranas nucleares interna (MNI) y externa (MNE) y con la lámina nuclear (138, 136, 128).

En la figura I.H.6 (128) se muestra un diagrama de la estructura del CPN.

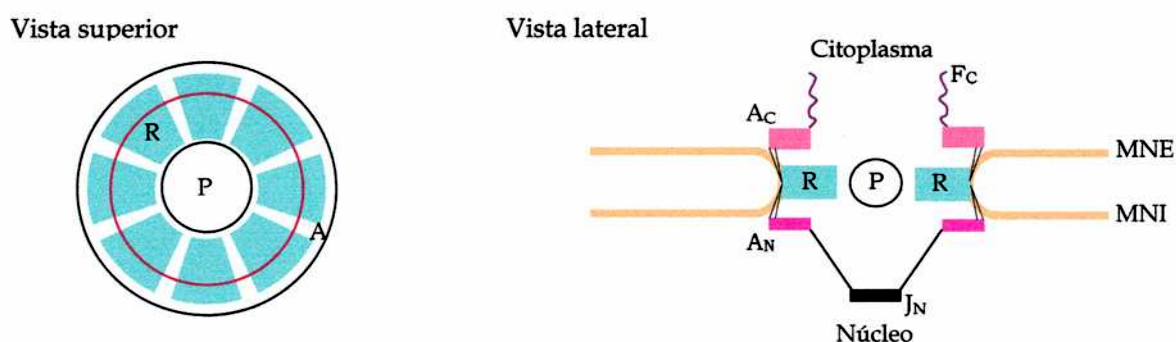


Figura I.H.6: Esquema del complejo del poro nuclear

El poro nuclear (P en la figura) posee simetría octaédrica cuando se lo mira desde el núcleo o el citoplasma. En cambio, es asimétrico en el plano de la membrana nuclear; en dicho plano hay 3 anillos apilados con simetría octaédrica. El anillo central o luminal posee ocho estructuras como rayos de un rueda (R) que rodean un tubo central, estos rayos son probablemente parte del transportador; del lado nuclear (A_N) y del lado citoplasmático (A_C) se ubican componentes anillares que se extienden hacia el centro del poro (124, 128, 139).

Además hacia el citoplasma se extienden ocho fibras (F_C), mientras que hacia el lado nuclear se extienden ocho fibras que forman una estructura de canasta, denominada jaula nuclear (J_N). Las fibras serían el lugar de interacciones tempranas entre elementos transportadores y el poro nuclear (128, 124).

En condiciones normales el CPN presenta un canal de difusión de 9 nm. Por algún estímulo de transporte puede dilatar su estructura central ampliando el canal interno de 9 hasta 26 nm. La apertura es muy específica, sólo permitiría el paso de la molécula que estimuló su apertura. El CPN sería sensible a mecanismos regulatorios (por ej, cambios en las concentraciones de calcio) operantes desde el lumen del retículo endoplásmico. El diámetro de apertura y la velocidad de entrada al núcleo podrían estar regulados por la cantidad de secuencias SLN que posea la proteína a ser transportada (128, 107, 140, 136).

El canal interno de 9 nm permitiría la difusión de iones, metabolitos, y en principio de macromoléculas de aproximadamente 40-60 kDa. Las moléculas de mayor tamaño requieren mecanismos especiales activos de transporte. Sin embargo, al menos en el caso del calcio, el transporte de iones estaría regulado. También el transporte de pequeños ARNs tales como

tARN y pequeñas proteínas como las histonas (≈ 15 kDa) es normalmente activo y mediado por transportadores (136, 128, 140, 139).

➤ I.H.VI.3.- Señales de localización nuclear

Existen varios mecanismos de entrada de proteínas al núcleo. El más conocido es el que implica moléculas que contienen la ya mencionada señal de localización nuclear (NLS), las cuales pueden ser secuencias de aminoácidos básicos continuas o separadas por unos 10 aminoácidos. La NLS puede estar ubicada en cualquier lugar de la proteína, aunque se cree que debe estar en la superficie de la misma (140, 128, 139, 137).

A diferencia de otros mecanismos de transporte hacia organelas, la NLS permanece en la molécula de proteína, probablemente porque en el momento de la división celular sería necesaria la secuencia NLS para reconocer que la proteína es nuclear (136, 140). Proteínas reguladoras de genes, procesadoras de ARN, algunas histonas o enzimas nucleares (ADN y ARN polimerasas contienen NLS (12).

Proteínas que no poseen secuencia NLS podría ser transportadas al núcleo formando un complejo con otra proteína que sí posee la SLN. Este es el caso de las histonas H_1 y H_2B , las cuales posiblemente entrarían activamente al núcleo asociadas a proteínas como la nucleoplasmina que sí posee NLS (128, 136, 137).

Otro mecanismo de entrada es usado por receptores de hormonas (glucocorticoides en rata, andrógenos en humanos, etc). La señal de entrada al núcleo es una secuencia de 255 aminoácidos que queda desenmascarada por la presencia de la hormona adecuada (107).

➤ I.H.VI.4.- Mecanismos de transporte desde y hacia el núcleo

Los mecanismos de entrada y salida del núcleo (representados en la figura I.H.7 (136)) estarían regulados por moléculas transportadoras.

El transporte nuclear tiene una necesidad absoluta de factores citosólicos. Se ha determinado que algunos de ellos son sensibles a N-etilmaleimida (NEM), la cual reacciona alquilando grupos sulfhidrilos. Existen otros factores citosólicos como las chaperonas Hsp 70 y el componente que interactúa con glicoproteínas del CPN (140, 137, 107, 136, 141, 139, 138).

➤ I.H.VI.4.1.- Importación

Como se indicó anteriormente, el principal mecanismo de entrada al núcleo sería vía la secuencia NLS (140, 137)

Este transporte se basa en la existencia de proteínas receptoras (importinas α o carioferina α) que se acoplan a la secuencia NLS, formando un complejo con la proteína (carga); este complejo utiliza una segunda proteína (importina β) para atravesar el poro

nuclear, luego de lo cual es liberado en el interior del núcleo (136, 139, 141, 137).

Este sistema de transporte se basa en que las proteínas transportadoras tengan una alta afinidad por la proteína con secuencia NLS en el citoplasma (para poder unirse a ella) y una baja afinidad en el núcleo (para poder liberarla). Esto se produce por la presencia de la proteína denominada Ran, la cual tiene distintas propiedades de acuerdo a si lleva unido GTP o GDP. La forma Ran-GDP (forma predominante en el citosol) es poco afín por las proteínas transportadoras, por lo que en el citoplasma las proteínas transportadoras se unirían a las proteínas con NLS y las transportarían al núcleo. En el núcleo, la forma principal es la Ran-GTP (muy afín por la proteína transportadora). La unión de Ran-GTP a la importina β hace que tenga poca afinidad por la proteína con secuencia NLS, liberándola en el núcleo (136, 139, 138, 137).

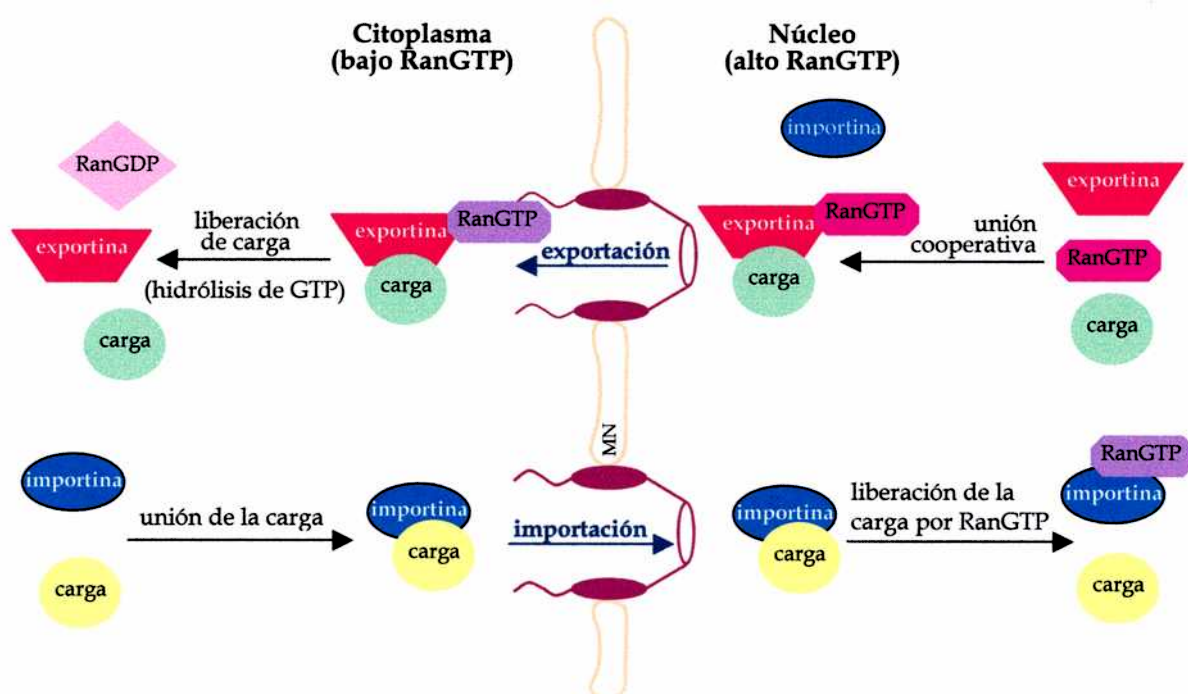


Figura I.H.7: Importación y exportación de moléculas al núcleo

La concentración diferente de Ran-GTP y Ran-GDP en el citoplasma y el núcleo es debida a la presencia de una enzima que transforma Ran-GDP en Ran-GTP (RCC1) y de otra enzima (Ran-GAP) en el citosol que cataliza reacción opuesta (139, 136, 138).

Las proteínas transportadoras deben volver al citoplasma para comenzar un nuevo transporte. Para la salida del núcleo la importina α requeriría un exportador específico, llamado CAS, en tanto que la importina β probablemente sale por sí misma (136, 138).

Habría otras secuencias de reconocimiento para la importación al núcleo, tales como las encontradas en las proteínas de los ribosomas. Estas secuencias serían más grandes y complejas e interactuarían con proteínas de importación, variantes de la importina α (136).

Existen otros transportadores que dependen de factores diferentes, como ser concentración de calcio, ATP, unión al citoesqueleto, GTP, etc.. Aunque se basen en distintos transportadores, el mecanismo general implica la interacción de receptores citoplasmáticos con secuencias presentes en la proteína. La secuencia presente indicaría cuál es el mecanismo involucrado, por ejemplo NLS u otros no conocidos (141, 128, 137).

► I.H.VI.4.2.- Exportación

La exportación de macromoléculas es también un sistema mediado por transportadores. Es rápida y dependiente de energía. Las proteínas que son exportadas del núcleo poseerían secuencias de exportación específicas NES (nuclear exportation signal), formadas por aminoácidos hidrofóbicos ricos en residuos de leucina, capaces de unirse a las nucleoporinas (138, 125, 128, 107, 137).

El mecanismo básico de exportación sería similar al de importación. La presencia de Ran-GTP dentro del núcleo causaría la unión de la sustancia a la proteína exportadora, mientras que la presencia de Ran-GDP en el citoplasma produciría la separación del complejo con liberación de la sustancia transportada en el citoplasma (137, 139, 136).

La mayoría de los caminos de exportación estarían influenciados por Ran. Sin embargo, existirían otros sistemas, como el de la exportación del mRNA de proteínas de choque de calor en respuesta a estrés celular (139, 137).

La salida de ARN del núcleo es un proceso mediado por señales, altamente selectivo y facilitado. El lado nucleoplásmico del poro debe reconocer y exportar múltiples especies de ARN, entre ellas tARN, snARNs, mRNA maduros, dejando las especies de mRNA inmaduro dentro del núcleo. Algunas nucleoporinas son requeridas específicamente para la exportación del ARN del núcleo (125, 107, 128, 137).

► I.H.VI.5.- Forma de regulación del transporte nuclear

La regulación del transporte podría ser de varias maneras: por exposición o enmascaramiento de secuencias NSL, por retención de una proteína nuclear en el citoplasma, por modulación de las NLS (modificaciones postraduccionales de los NLS o de las secuencias que lo flanquean) o por cambios en la maquinaria de transporte (137, 140, 107).

Así, fosforilaciones podrían exponer o esconder secuencias NLS. Alternativamente, otras moléculas pueden enmascarar SLN o anclarla a estructuras del citoplasma, por ejemplo, el citoesqueleto o endomembranas (128, 107, 138, 137).

Muchos factores reguladores de genes están almacenados en el citoplasma en forma inactiva y ante un estímulo adecuado son liberados y traslocados al núcleo rápidamente. Un

ejemplo es la activación del factor de transcripción NF- κ B en condiciones de estrés oxidativo. En condiciones normales este factor está unido en el citosol a otra proteína, la I κ B. Por estrés oxidativo (por ejemplo, tratamiento con H₂O₂, ésteres de forbol) la proteína quinasa C (y otras quinasas) fosforila a I κ B, causando la liberación de NF- κ B, el cual así expone una secuencia NLS que induce su traslado al núcleo, donde activa la transcripción de genes determinados. Se cree que los radicales libres del oxígeno generados podrían actuar directamente sobre I κ B, sin mediar la fosforilación, con el mismo resultado final (128, 137).

Cuando la velocidad de transporte hacia el núcleo disminuye se produce indirectamente una inhibición de la replicación de ADN y defectos en los puntos de control del ciclo celular, debido a concentraciones inapropiadas de moléculas regulatorias en el núcleo comparado con el citoplasma (141, 137).

➤ I.H.VII.- Proteínas nucleares

Se puede dividir a las proteínas nucleares en dos grandes grupos, histonas y no histonas (124, 103, 142).

Las histonas son proteínas básicas pequeñas, entre 10 y 20% de sus aminoácidos son lisina o arginina. Sólo existen 5 clases de histonas: H₁, H₂A, H₂B, H₃ y H₄ (103, 124, 142).

Por ser proteínas básicas se unen fuertemente al ADN formando nucleosomas en los cuales las histonas H₂A, H₂B, H₃ y H₄ se unen entre sí formando un octámero alrededor del cual se enrollan dos vueltas de ADN de 140 pares de bases. La histona H₁ se une al puente de ADN que une los nucleosomas (103, 124, 142).

Las proteínas no histónicas son muy heterogéneas y pueden variar entre las distintas células. Algunas de ellas están asociadas al ADN y al ARN. Entre ellas se incluyen las ARN polimerasas, las ADN polimerasas, diversas proteínas regulatorias, proteínas que forman parte de los ribosomas, proteínas que forman parte del aparato de maduración del mensajero (snRNAs) o de los ribosomas (snoRNPs) (103, 124, 100, 125).

En el procedimiento de fraccionamiento de proteínas nucleares utilizado en este Trabajo de Tesis se separa a las proteínas nucleares empleando soluciones que permiten aislarlas de acuerdo a características fisicoquímicas de las mismas. En la descripción de técnica de fraccionamiento de proteínas nucleares Materiales y Métodos se indican las características generales que tendrían las proteínas de cada una de las fracciones nucleares.

➤ I.H.VIII.- Degradación de proteínas

La degradación de proteínas es fundamental para la vida de los organismos. Podría ser tan importante para la economía de la célula como la síntesis. Las proteínas celulares son recambiadas constantemente, con vidas medias que van desde pocos minutos hasta semanas. La degradación de proteínas es necesaria para la eliminación de proteínas alteradas cuya acumulación podría ser peligrosa para las células y para desechar proteínas reguladoras superfluas (100, 105).

La vida media de una proteína esta determinada en parte por su resto N-terminal. Proteínas con un resto N-terminal Met, Ser, Ala, Tre, Val, Gli o Cis tendrían una mayor vida media que proteínas con otros extremos N-terminales (100, 102).

Existen otras señales, por ejemplo, segmentos ricos en Pro (P), Glu (E), Ser (S) y Tre (T) (secuencia PEST). Proteínas con esta secuencia son degradadas rápidamente; por ejemplo, el citocromo 2E1 posee esta secuencia (100, 47, 48).

Existen distintos mecanismos de degradación de proteínas, por los cuales se podrían dividir a las proteasas en tres categorías:

- *Proteasas que intervienen en eventos específicos*, en los que se generan proteínas maduras de menor tamaño que las moléculas precursoras. Son ejemplos las proteasas que intervienen en el clivado de las secuencias señales de las proteínas de secreción o las que clivan proteínas citosólicas para producir las formas maduras (125, 105).

- *Proteasas que actúan en los lisosomas*, las cuales degradan proteínas que son transportadas a ese lugar específicamente para su degradación. En los lisosomas hay unas 50 enzimas hidrolíticas. Estas proteasas intervienen en la degradación de proteínas de compartimentos intracelulares (tales como mitocondrias o retículo endoplásmico) y externas (las que entran a la célula por endocitosis, pinocitosis o fagocitosis) (105, 125, 100).

- *Proteasas del proteosoma*, complejo citosólico que degrada proteínas. El proteosoma interviene en la degradación general (que convierte una proteína completa en pequeños fragmentos) y en ciertos eventos de procesamiento específicos. Constituye el 1% de las proteínas solubles (143).

➤ I.H.VIII.1.- Proteosoma

El proteosoma interviene en la degradación de proteínas normales o anormales del núcleo y del citosol, así como en la degradación de proteínas anormales del retículo endoplásmico. Varias funciones celulares vitales requieren del proteosoma, como ser, la diferenciación celular, el procesamiento de antígenos, la activación del NF-κB y la remoción de proteínas oxidadas, etc.. La inhibición de la actividad del proteosoma causa la detención de la proteólisis de la mayoría de las proteínas celulares (105, 132, 133, 125, 34, 92, 143).

Existen dos formas de proteosoma: 20S y 26S. La forma 20S es la que contiene la actividad proteolítica. Se forma el complejo 26S por adición al 20S de un grupo de proteínas (19S). Intervienen en dos clases de degradaciones: las dependientes e independientes de ubiquitina y ATP (92, 105, 125, 143).

El 20S tiene la forma de un cilindro hueco, las proteínas del 19S se unirían en uno de los extremos. Cliva las proteínas del lado carboxi de aminoácidos básicos, hidrofóbicos y ácidos. Su pH de trabajo óptimo es entre neutro y débilmente alcalino (105, 125, 143).

Algunas de las actividades proteolíticas del proteosomas son inhibidas por sustancias que reaccionan con grupos tioles (143).

Esta presente en el núcleo y el citosol. Por técnicas inmunológicas se detectó que una parte estaría cerca o directamente sobre la membrana del retículo endoplásmico y de los polisomas de hepatocitos de rata (143).

➤ I.H.VIII.2.- *Marcación de proteínas para su degradación*

En condiciones normales el organismo “marcaría” las proteínas que deben ser degradadas. El principal sistema de marcación es la ubiquitinación, aunque existen otros.

Ubiquitinación: Se adiciona covalentemente la proteína ubiquitina (denominado así porque es ubicua) a grupos lisina de las proteínas a ser degradadas. En general es necesario el agregado de varias moléculas de ubiquitina (poliubiquitinación) a una proteína para que sea degradada (125, 143, 105, 92, 100).

El sistema de ubiquitinación de proteínas tiene 3 componentes (E₁, E₂ y E₃), siendo todos sulfhidrúlicos. Las proteínas a degradar serían determinadas por E₂ y E₃, existen varias clases de cada una, con diferentes criterios para elegir los sustratos a degradar (125, 100).

La ubiquitinación es responsable de la degradación de varias proteínas de vida media corta, apohemoproteínas, proteínas dañadas estructuralmente o aberrantes (43, 125, 143).

Otras formas de marcación para la degradación: La fosforilación de proteínas podría ser otra forma de marcación ya que ciertas proteínas son degradadas más fácilmente cuando están fosforiladas.

La falta de sustrato podría ser la señal de marcación de ciertas enzimas; cuando falta su sustrato (es decir cuando ya no serían necesarias) son degradadas por proteasas intracelulares. Por ejemplo, sustratos y cofactores protegen a enzimas de ser inactivadas por oxidasas de función mixta (118, 144, 121, 119).

Proteínas oxidadas: La oxidación de proteínas por los propias células podría ser una forma de marcación para que las mismas sean degradadas, así, ciertas proteínas con sus grupos sulfhidrilos oxidados son más susceptibles a la degradación (118, 144, 121, 119).

La degradación de las proteínas oxidadas será tratada en el capítulo siguiente.

I.I.- OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

➤ I.I.I.- Introducción

Las proteínas son probablemente el blanco más crítico en el daño por especies reactivas debido a la gran variedad de funciones que realizan, por lo que su alteración puede causar un desequilibrio en las funciones celulares, tanto a corto como a largo plazo. Además, son el componente celular mayoritario después del agua, por lo que existe una alta probabilidad de que sean alteradas por agentes nocivos. Pese a todo esto, la oxidación de proteínas no ha sido tan estudiada como la de lípidos (123, 94, 68, 58).

Las principales características que regulan la oxidación de proteínas en los organismos vivos se resumen en la figura I.I.1 (68), en la cual los caminos en color púrpura indican mecanismos de protección.

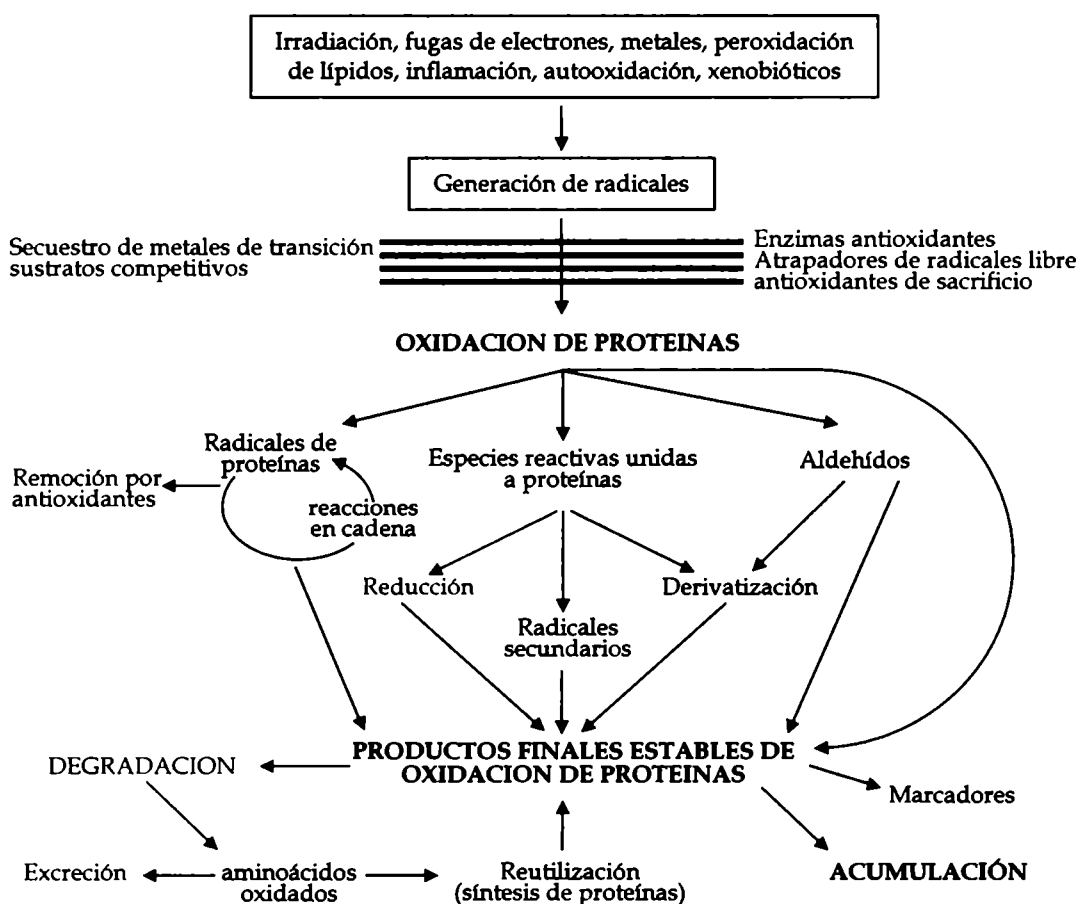


Figura I.I.1: Mecanismo postulado de la oxidación de proteínas *in vivo*

La acción de especies reactivas generadas por diversos procesos (radiaciones, sistemas transportadores de electrones, etc.) conduce en general a la oxidación de las proteínas. Se han determinado diversas modificaciones químicas sobre las proteínas

oxidadas, como ser especies radicalarias, aldehídos, peróxidos, etc.. El grado de daño causado a aminoácidos y/o proteínas por un dado estrés oxidativo depende de muchos factores, entre ellos de la naturaleza y localización relativa de la fuente de oxidante/radical libre, su proximidad a la proteína blanco, así como de la naturaleza y concentración de sustancias y enzimas antioxidantes disponibles (105, 121, 68, 145).

Las proteínas oxidadas son en general degradadas por proteólisis; sólo en algunos casos el organismo cuenta con enzimas específicas para su recuperación. Las proteínas oxidadas pueden también acumularse (68, 145, 105, 58, 67).

La oxidación de proteínas podría estar implicada en la etiología y/o progresión de varios desórdenes fisiológicos y enfermedades (119, 121, 58). Sin embargo, no siempre la formación de radicales libres sobre proteínas es una indicación de daño, algunas enzimas forman radicales libres en su estructura como parte de su mecanismo de acción. Además, la oxidación de proteínas tendría en algunos casos un rol fisiológico, por ejemplo, en la marcación de proteínas para su degradación (119, 68, 67).

➤ I.I.II.- Formación de especies reactivas

Las especies reactivas capaces de interactuar con las proteínas se pueden formar en una gran variedad de situaciones fisiológicas y no fisiológicas. Las fuentes principales están representadas, sin un orden de importancia determinado, en la figura I.I.2 (67).

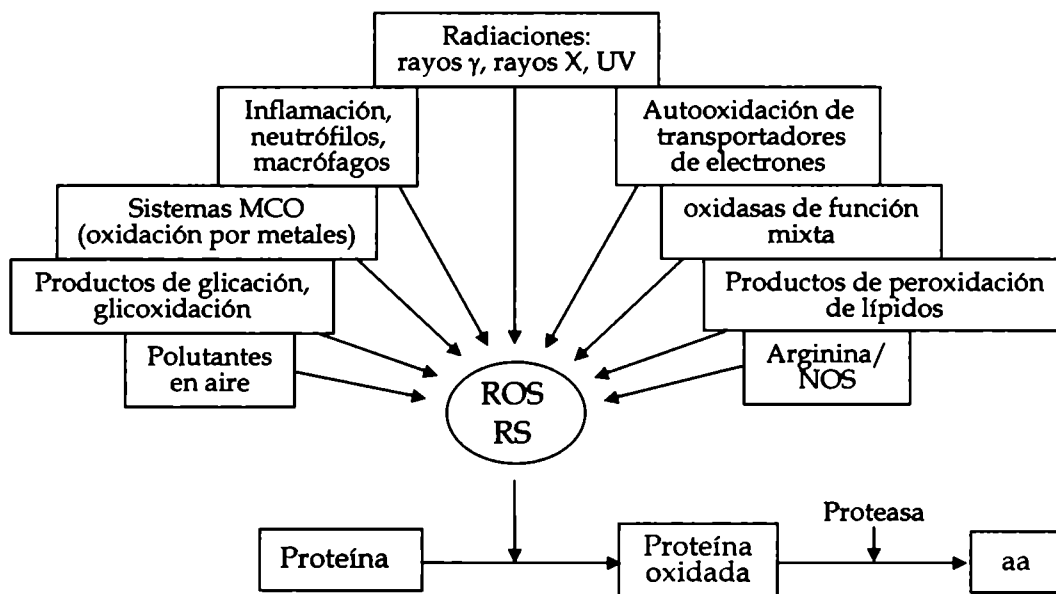


Figura I.I.2: Posibles agentes causantes de la oxidación de proteínas

Se puede dividir las especies reactivas en dos grupos: especies oxigenadas (ROS, reactive oxygen species) y no oxigenadas (RS, reactive species). Las especies oxigenadas pueden ser a su vez radicalarias (radical superóxido, radical hidroxilo, etc.) o no radicalarias

(HClO, H₂O₂, O₃, oxígeno singlete, aldehídos derivados de la peroxidación de lípidos, etc.). Especies no oxigenadas serían: radical tiilo (RS[•]), radical tioperoxilo (RSOO[•]), óxido nítrico (NO[•]), peroxinitrito (ONOO⁻), etc. (144, 145, 67).

➤ I.I.III.- Sistema de oxidación catalizada por metales

Un sistema muy estudiado de oxidación de proteínas es el catalizado por los metales de transición (MCO, metal-catalyzed oxidation), graficado en la figura I.I.3 (67). Se cree la MCO sería importante en condiciones normales, por ejemplo en el envejecimiento (67).

La oxidación de proteínas catalizada por metales depende de la presencia de Fe(II) (o Cu (I)) y H₂O₂. La formación de dichos compuestos puede ser catalizada por muchas flavoproteínas que sirven normalmente como transportadores de electrones en varias reacciones metabólicas: oxidasas de NADPH y NADH, NADPH deshidrogenasas, citocromos P450 reductasas/oxidasas, la xantino oxidasa, etc. (120, 119, 144, 67).

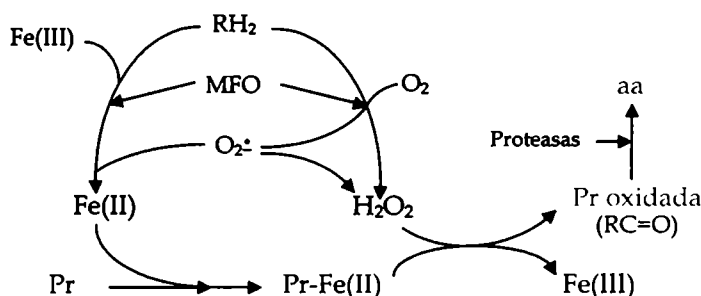


Figura I.I.3: Oxidación de proteínas catalizada por metales por los sistemas de oxidasas de función mixta

Las MCO están limitadas por la disponibilidad del metal. Situaciones que causen la liberación de metales de transición de las biomoléculas a las que están normalmente unidos favorecerán estas reacciones (146).

La principal característica de las MCO es que son reacciones localizadas, sólo se oxidarían los aminoácidos presentes en el entorno del lugar de unión del metal a la proteína. Se cree que el Fe(II) se uniría al sitio de unión de metal a la proteína, luego de lo cual el complejo Fe-proteína reaccionaría con el H₂O₂, generando in situ especies de oxígeno activadas (HO[•], ión ferrilo, ión perferrilo, peroxirradicales), los cuales a su vez reaccionarían con los aminoácidos presentes en su entorno; es decir, estas reacciones sucederían en una "jaula" que las especies reactivas de oxígeno no podrían abandonar (120, 121, 144).

La oxidación catalizada por metales podría tener un rol fisiológico en la regulación metabólica del recambio intracelular de proteínas. Algunas quinasas, deshidrogenasas, sintetasas y otras enzimas están sujetas a inactivaciones sitio-dirigidas por sistemas MCO (118).

➤ I.I.IV.- Oxidaciones de aminoácidos y proteínas

Muchos de los conocimientos actuales de la química de las reacciones de oxidación de aminoácidos y proteínas fueron desarrollados usando como sistema de estudio la radiólisis del agua con rayos γ , en la cual se forman radicales hidroxilo, formándose además el radical superóxido en presencia de oxígeno. La variedad de productos de oxidación generados por polipéptidos y proteínas es mucho mayor que los formados a partir de los aminoácidos aislados (105, 121, 147).

También se utilizó y se sigue utilizando como sistema de estudio los sistemas de oxidación catalizada por metales (148, 121, 119, 120).

➤ I.I.IV.1.- Aminoácidos

En la figura I.I.4 (121) está representado un modelo de los pasos que podrían suceder en la oxidación de aminoácidos por radicales hidroxilo en presencia de oxígeno.

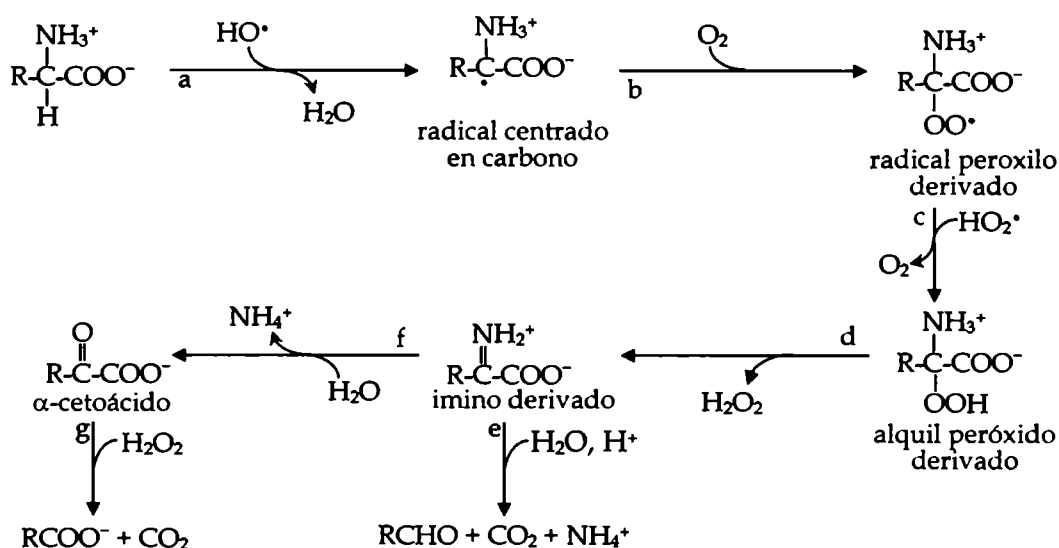
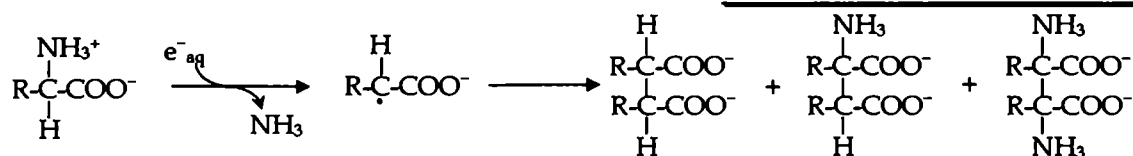


Figura I.I.4: Oxidación de aminoácidos en presencia de oxígeno

La reacción primaria sería la abstracción de un átomo de H del carbono α formándose un radical centrado en carbono (a); al cual se le podría adicionar una molécula de O_2 dando un radical peróxido (b). Después de reacciones sucesivas se formaría un iminoderivado que podría hidrolizarse a un aldehído (e) o dar α -cetoácido (f) (121, 68).

Si no hay oxígeno en el medio de reacción no se podría generar el radical peróxido, por lo que se vería favorecida la deaminación reductiva (pérdida de amoníaco con formación de un radical centrado en el carbono α). La combinación de radicales centrados en carbono formaría derivados mono y diaminodicarboxílicos (121):



La oxidación de la glicina puede explicarse completamente por este mecanismo, sin embargo, cuando el aminoácido es más complejo se producen otras reacciones, por ejemplo, la formación de hidroxiaminoácidos por ataque a las cadenas laterales. Esta última reacción y la formación de derivados cruzados son más importantes cuanto mayor número de carbonos tenga la cadena lateral del aminoácido, probablemente porque existiría mayor número de sitios para el ataque del HO• (121).

En el caso de los aminoácidos aromáticos, el anillo indólico del triptofano y los grupos aromáticos de la tirosina y la fenilalanina son blancos primarios del ataque por radicales de oxígeno producidos durante la radiólisis. La abstracción de hidrógeno y la deaminación son eventos relativamente menores. Los mayores productos de la oxidación serían formilquinurenina en el caso del triptofano; 3, 4, dihidroxifenilalanina (dopa) en el caso de la tirosina; en tanto que la fenilalanina generaría tirosina y varios derivados hidroxilados (121).

Todos los aminoácidos expuestos a foto-oxidación, radicales oxidantes o HOCl produjeron especies RCHO por decarboxilación (68).

No se conocen bien los mecanismos en la oxidación de aminoácidos por metales de transición. Se formarían NH₄⁺, α-cetoácidos, oximas, CO₂ y ácidos carboxílicos con un átomo de carbono menos. La leucina es el único aminoácido para el cual se ha determinado la estequiometría de la reacción, siendo carbonílicos algunos de los compuestos formados (121).

➤ I.I.IV.2.- Proteínas

Las especies reactivas pueden causar alteraciones químicas sobre los residuos aminoacídicos de las proteínas, afectando su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Esto puede llevar a alteraciones de su función con consecuencias graves para la célula en general. En el ítem siguiente se analizarán las alteraciones químicas en proteínas.

➤ I.I.V.- Alteraciones químicas observadas en las proteínas oxidadas

Las alteraciones químicas producidas por especies reactivas en proteínas son de varios tipos. Cuál sea la modificación depende fundamentalmente de la especie agresora, así como de la composición aminoacídica y de la estructura espacial de la proteína (de la accesibilidad a grupos sensibles al daño) (68, 67, 37). Las principales modificaciones

observadas son:

- 1.- fragmentaciones y enlaces cruzados
- 2.- reacción con productos de peroxidación de lípidos
- 3.- glicosilaciones
- 4.- formación de peróxidos de proteínas
- 5.- formación de grupos DOPA
- 6.- nitrosilaciones y nitraciones por peroxinitrito

► I.I.V.1.- *Fragmentaciones y enlaces cruzados*

Muchas de las acciones de los radicales libres sobre las proteínas comenzarían con la abstracción de un átomo de hidrógeno con formación de un radical proteico. El hidrógeno abstraído puede ser de la cadena principal (carbono α) (figura I.I.5) o de los grupos metilos y metilenos de la cadena lateral de alguno de los residuos de aminoácidos (figura I.I.6).

En presencia de oxígeno se favorecen las reacciones de ruptura, en tanto que en su ausencia están favorecidas las reacciones de agregación. El ataque inicial del radical libre podría ser en cualquier lugar de la molécula, posteriormente se producirían reordenamientos intramoleculares y transferencias de hidrógeno o de electrones tendientes a lograr que el electrón impar se ubique en el aminoácido en que tenga menor energía. En presencia de O_2 se interrumpiría el proceso de reordenamiento (58, 149). Los fragmentos formados en presencia de oxígeno se mantendrían unidos por fuerzas no covalentes (uniones hidrofóbicas e iónicas). En cambio, en ausencia de oxígeno se favorece la formación de enlaces covalentes (146, 121, 118, 150, 151).

Las fragmentaciones ocurren aún en ausencia de lípidos, lo que estaría indicando que los que actúan son radicales libres (149).

► I.I.V.1.1.- *Cadena principal*

Primero se considerará el caso en que el hidrógeno se abstrae de la cadena principal de la proteína (figura I.I.5 (67 y 68 con modificaciones)). La formación de las especies graficadas en color azul ha sido determinada experimentalmente.

La reacción inicial sería la abstracción de un átomo de hidrógeno con formación de un radical centrado en el carbono α ($Pr^\bullet$, reacción a), el cual puede dar origen a diferentes reacciones, como entrecruzamientos (reacción b) o formación de radical alquil peroxilo ($PrOO^\bullet$, reacción c). A su vez el radical $PrOO^\bullet$ puede dar origen a hidroperóxidos (d) o a radicales alcoxilo ($PrO^\bullet$) (f, g, i).

Las reacciones que se produzcan pueden culminar en la formación de entrecruzamientos (b), rupturas de cadena (l), formación de iminas cuya hidrólisis resulta en la formación del un α -cetoácido (m) o generación de nuevos radicales alquilo que seguirán

reaccionando (e) (68, 121).

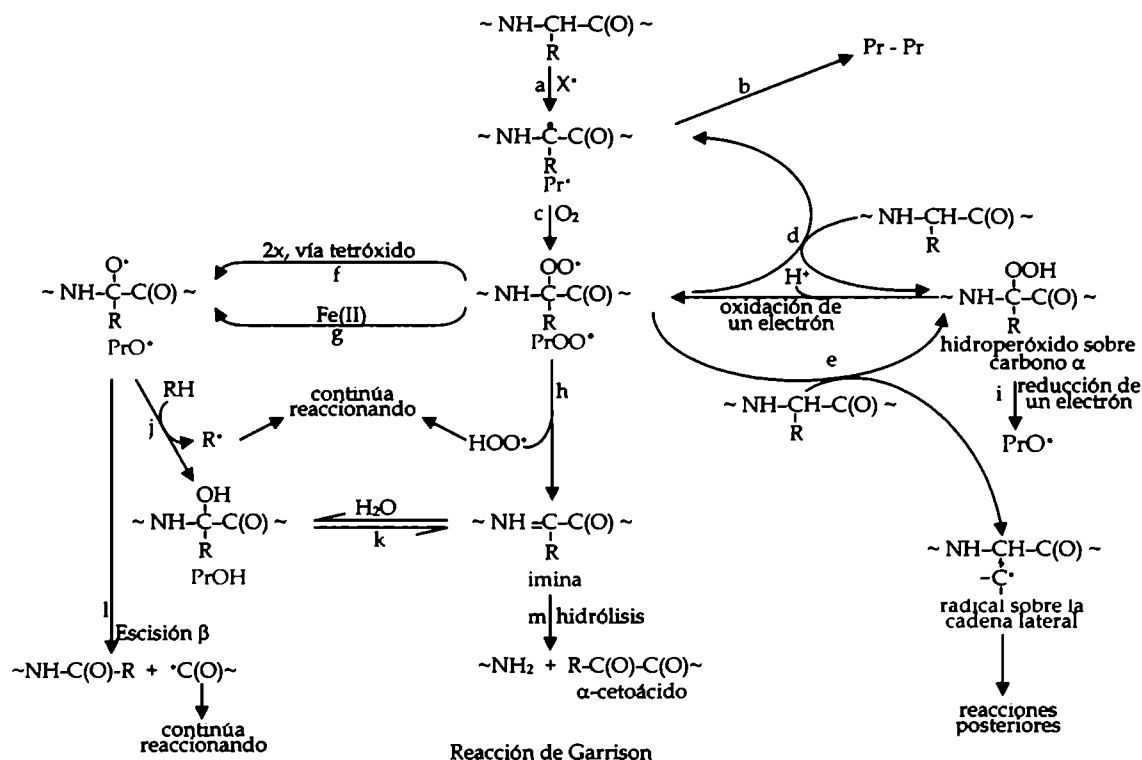
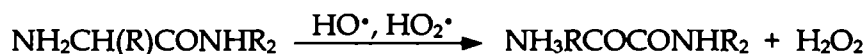


Figura I.I.5: Alteraciones proteicas 1: fragmentaciones y enlaces cruzados en la cadena principal

Las rutas que llevan a la formación del α -cetoácidos son conocidas como "reacción de Garrison", por ser el primero en proponer un camino de fragmentación de proteínas por radicales libres (68, 67, 144, 121, 151).

Por un mecanismo análogo, el aminoácido N-terminal de las proteínas puede sufrir una desaminación oxidativa, liberándose amoníaco y quedando en esa posición un N- α cetoacilderivado (121):



Tanto en la reacción de Garrison como en la desaminación oxidativa se generan grupos carbonilos que pueden ser determinados por la técnica que emplea 2,4-dinitrofenilhidracina (121).

► I.I.V.1.2.- Cadenas laterales

Un esquema de este proceso se representa en la figura I.I.6 (67 y 68 con modificaciones), en la cual las especies marcadas en azul han sido detectadas experimentalmente.

Al igual que en el caso de la cadena principal, la reacción comienza con la formación de un radical alquilo, esta vez sobre la cadena lateral. Nuevamente se forman radicales alquilo

peroxilo (c) y alcoxilo (f, g, h), al igual que radicales alquilo (e), reacciones entrecruzadas (b) e hidroperóxidos (d), aunque involucrando las cadenas laterales de los aminoácidos. También se forman como productos finales compuestos carbonílicos (i, m, n) (118, 68).

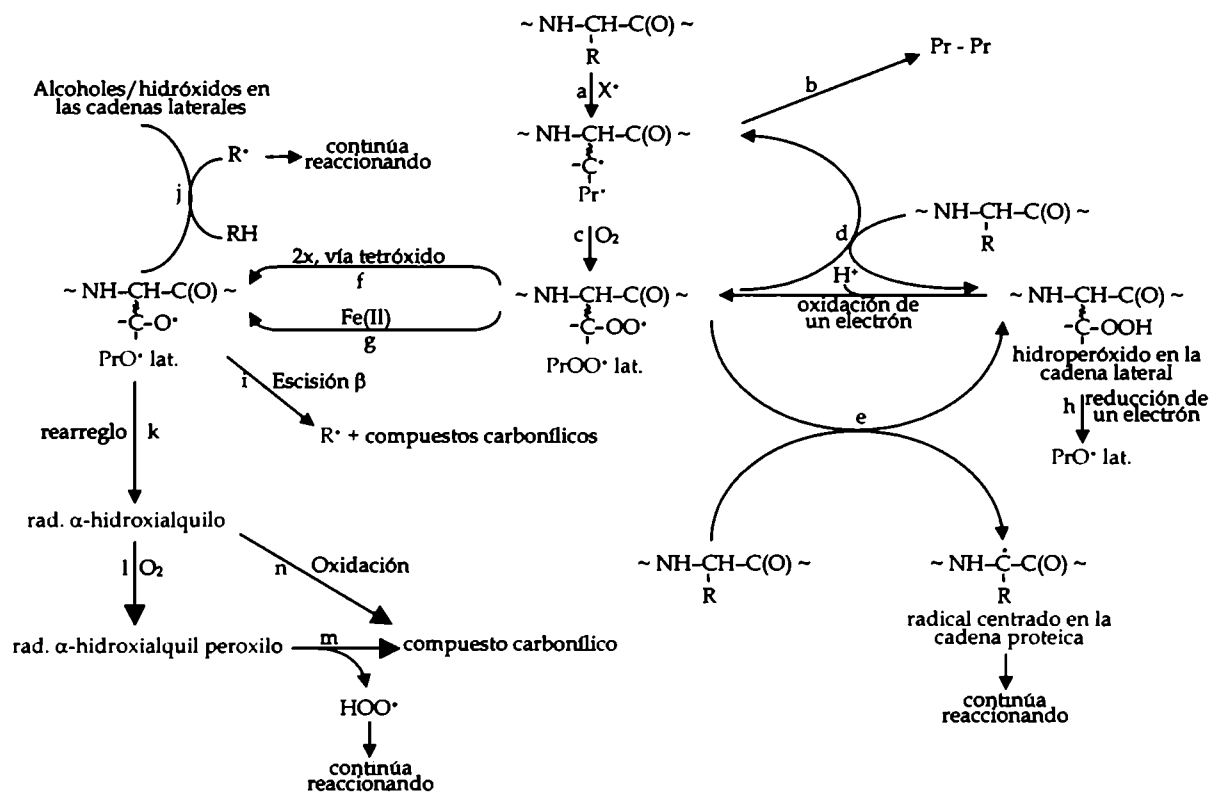


Figura I.I.6: Alteraciones proteicas 1: fragmentaciones y enlaces cruzados en las cadenas laterales

Las uniones covalentes entre proteínas formadas en ambos casos podrían ser vía enlaces disulfuro, ditirosina u otras clases de enlaces carbono-carbono; cualquier radical centrado sobre carbono podría unirse a otro radical sobre carbono, de la misma o de otra molécula proteica (121, 67, 118, 58, 151).

La ruptura de la cadena polipeptídica podría suceder en residuos prolina o glutámico, según se indica en la figura I.I.7 (67).

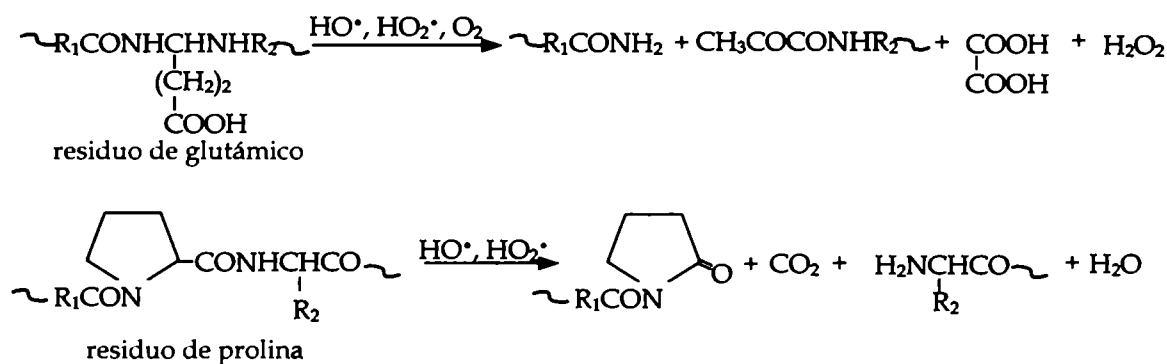


Figura I.I.7: Fragmentación de proteínas en glutámico y prolina

Ha sido sugerido (y demostrado en algunos sistemas) que la ruptura de la cadena lateral se daría preferentemente en prolina (121, 68). El largo de los fragmentos obtenidos en el caso de la albúmina coincide con la ubicación de residuos de prolina. Se forman péptidos con grupos carbonilos (67, 121, 68, 151, 37).

Algunos autores también indican que la ruptura podría ser en glicina, por ejemplo, en la fragmentación de colágeno de piel de ternero por el sistema de xantino oxidasa (68).

► I.I.V.1.3.- *Aminoácidos afectados determinados experimentalmente*

Los residuos de aminoácidos alterados en proteínas por la acción de varios sistemas oxidantes, principalmente HO• y sistemas MCO han sido estudiados, determinándose en muchos de ellos la formación de compuestos carbonílicos; por ejemplo, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina; semialdehído α -aminoadípico a partir de lisina; 2-oxohistidina a partir de histidina, ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina. También se forman compuestos aldehídicos en el caso de leucina, valina. Por otra parte, todas las cadenas laterales no aromáticas sometidas a radicales generarían grupos carbonilos sobre las proteínas (67, 68, 121, 151, 144).

Los radicales de HO• causan también la formación derivados hidroxilados de valina, leucina, lisina, prolina, isoleucina, fenilalanina, tirosina y triptofano (68). Las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y los que contienen azufre son especialmente vulnerables al ataque por radiólisis. El triptofano es el más sensible dando N-formilquinurenina. La fenilalanina además puede producir tirosina; la histidina puede formar aspartato y asparragina (121).

Se forman oxiácidos y cistina a partir de cisteína; hidroperóxido glutámico a partir de glutámico y metionina sulfóxido en el caso de la metionina (67, 68, 121).

En las oxidaciones catalizadas por metales los aminoácidos más afectados son: histidina, arginina, lisina, treonina, prolina, tirosina, metionina y cisteína (144, 118, 151). Se forman compuestos carbonílicos en los cuatro primeros casos, mientras que la cisteína y la tirosina forman puentes disulfuro y ditirosina respectivamente (121, 44). Los aminoácidos aromáticos no se hallan normalmente en el sitio de unión del metal a la proteína por lo que no son buenos blancos de la MCO (121, 144, 146, 118, 151, 37).

La formación de grupos DOPA y de hidroperóxidos se discutirá más adelante.

La oxidación de metionina ha sido estudiada en varios sistemas químicos, por ejemplo, el ozono causa la oxidación de metioninas de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y glicoforina aisladas de eritrocitos humanos (121). El t-butil hidroperóxido oxida solamente a las metioninas expuestas (probablemente por razones estéricas). Se considera que oxidación de metionina en el inhibidor α_1 -antitripsina es importante en la patogénesis del enfisema inducido por fumar (68).

► I.I.V.2.- Reacción con productos de peroxidación de lípidos

Los productos de la peroxidación de lípidos (productos radicalarios y aldehídos reactivos) son capaces de causar daño a las proteínas. Este daño es distinto al causado por otros radicales y sería debido a la unión de componentes lipídicos a las proteínas (68, 58).

Los aldehídos altamente reactivos generados en la peroxidación de lípidos pueden reaccionar formando grupos aldehído y entrecruzamientos entre proteínas. Las reacciones que se producirían serían de dos tipos: la adición de Michael y la formación de bases de Schiff (68, 118, 152, 144, 119).

En la reacción de Michael los aldehídos reactivos reaccionan con grupos sulfhidrilo de cisteína o con grupos amino de lisina o histidina mientras que en la formación de bases de Schiff dichos aldehídos reaccionan con grupos amino de lisina (ver figura I.I.8 (67 con modificaciones)) (152, 153, 67). La importancia relativa de cada reacción depende tanto del aldehído reactivo como de la proteína. Con algunos carbonilos de lípidos la reacción de adición de Michael sería mucho más importante que la formación de bases de Schiff, por ejemplo, el 99% de las reacciones del 4-hidroxinonenal (HNE) sería vía la adición de Michael (la reactividad con los sulfhidrilos es 2-3 órdenes mayor) (68, 52, 86). En el caso de la insulina, la cual no posee grupos sulfhidrico de cisteína, se produce la reacción de Michael con residuos histidina (68, 152, 153).

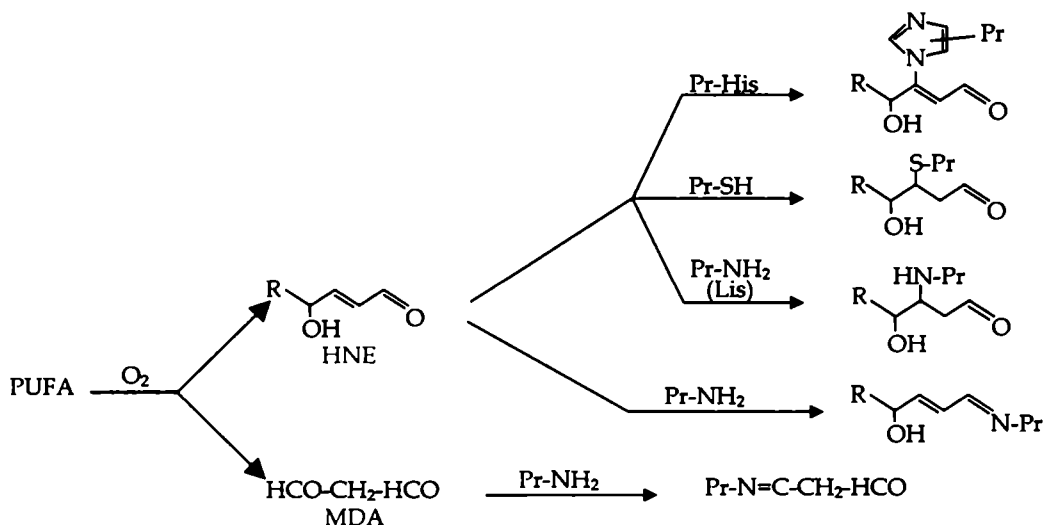


Figura I.I.8: Alteraciones proteicas 2: Reacción de los aldehídos reactivos de la peroxidación de lípidos con proteínas

En algunas de las reacciones (por ejemplo en la reacción de HNE según la reacción de Michael y de malondialdehído en la formación de bases de Schiff) quedarían grupos carbonilos libres, los cuales pueden ser determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se atribuye el 10% del aumento del contenido de grupos carbonilos con la edad de los hepatocitos de rata a estas reacciones de adición (118, 144).

Con dialdehídos o mediante reacciones sucesivas de los aldehídos α,β -insaturados

puede ocurrir la formación de enlaces cruzados entre proteínas por las reacciones de Michael y/o Schiff, según se indica en la figura I.I.9 (68, 58 con modificaciones).

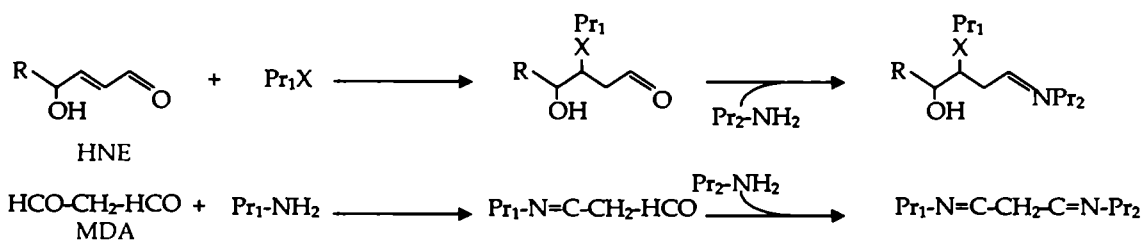


Figura I.I.9: Alteraciones proteicas 2: Formación de enlaces cruzados entre proteínas causados por productos reactivos de la peroxidación de lípidos

La presencia de metales de transición sería muy importante en la relación entre peroxidación de lípidos y daño a proteínas dado que los mismos favorecerían la descomposición de los peróxidos de lípidos en las cercanías de metaloproteínas, formando las especies reactivas que afectarían a aminoácidos cercanos al metal. Por ejemplo, el daño catalizado por metales a membranas no irradiadas parece afectar en forma paralela a lípidos y proteínas, siendo restringido por el α -tocoferol (37, 52).

Existe mucha evidencia de que la PL causa la inactivación de enzimas de membrana. Por ejemplo, el HNE inactiva la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, con formación en el último caso de uniones intra e intermoleculares. La unión de aldehídos reactivos a los residuos de lisina de apo B causa la disminución de su unión al receptor de LDL. Productos de oxidación de lípidos y proteínas pueden formar enlaces cruzados, dando productos fluorescentes que podrían contribuir a la formación de ceroides, lipofuscina y otros pigmentos de la edad encontrados en células. Los radicales producidos en la peroxidación de lípidos también pueden inactivar el inhibidor α_1 -proteínasa por oxidación de la metionina 348 (68, 58).

Se ha determinado por inmunohistoquímica que las modificaciones de las proteínas por HNE ocurren *in vivo*, gran parte de la toxicidad del HNE es atribuida a su reacción con grupos sulfhidrilo (152, 153). Los 4-hidroxiálquenos de la apolipoproteína B modifican los residuos lisina, histidina, serina, tirosina y los dos grupos sulfhidrilo presentes en la molécula (85).

Se cree que la peroxidación de lípidos causada por el estrés oxidativo sería el causante de enfermedades como la aterosclerosis, el mal de Parkinson, Alzheimer, injuria traumática, así como en el envejecimiento. Se produciría el entrecruzado de péptidos o su degradación como consecuencia del estrés oxidativo (60).

➤ I.I.V.3.- Glicosilación

La glicosilación (representada en la figura I.I.10 (67)) es la reacción no enzimática de los azúcares reductores (principalmente fructosa y glucosa) con proteínas.

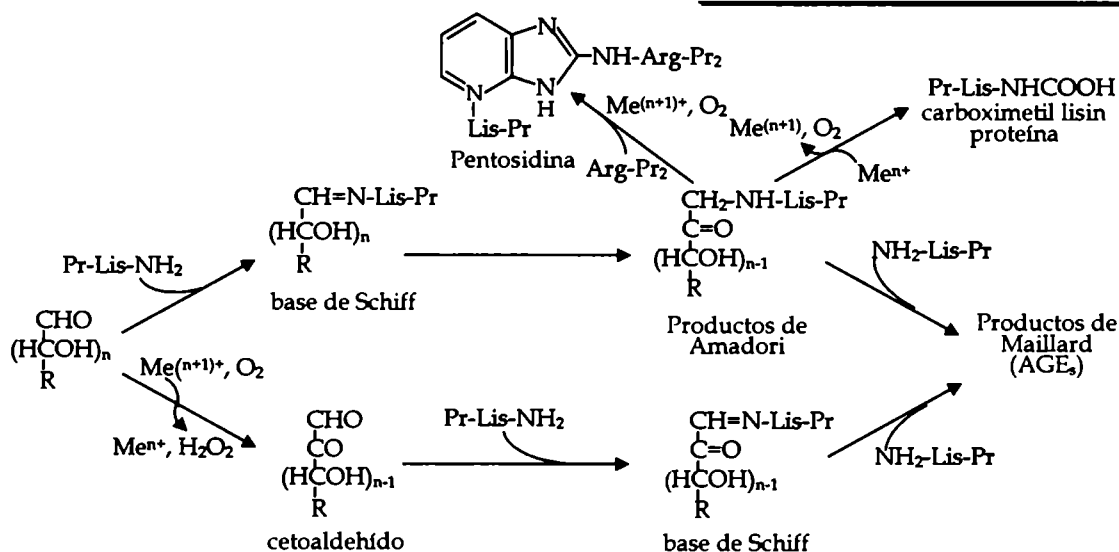


Figura I.I.10: Alteraciones proteicas 3: Glicosilación

El azúcar reductor puede reaccionar con el grupo N-aminoterminal o más comúnmente con grupos ε-amino de lisina de proteínas, dando bases de Schiff, las cuales pueden sufrir un rápido rearrreglo dando cetoadminas relativamente estables (productos de Amadori). Estas cetoadminas se convierten lentamente en derivados poliméricos marrones fluorescentes cuya concentración aumenta con la edad, los productos de Millard, a los cuales se los llama productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, advanced glycosylation end products). No se sabe en que medida la glicación contribuye al aumento del contenido de grupos carbonilos con la edad (118, 144, 67, 146).

La formación de productos AGEs ha sido relacionada con varios desórdenes fisiológicos como la diabetes, la cataratogénesis y el envejecimiento (118, 146).

► I.I.V.4.- Peróxidos de proteínas

Se han detectado en proteínas oxidadas dos especies reactivas que no son de naturaleza radicalaria, una de los cuales son los peróxidos de proteínas (68, 154, 155).

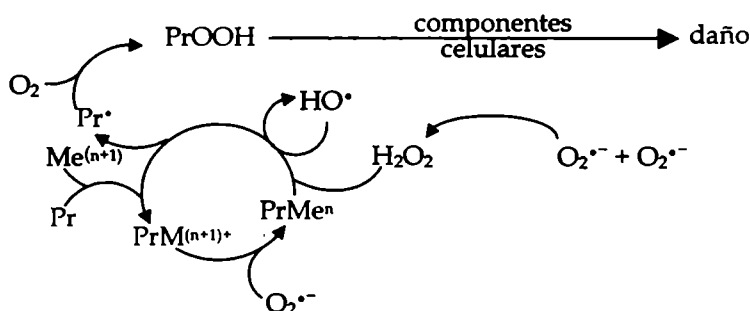


Figura I.I.11: Alteraciones proteicas 4: Formación de peróxidos de proteínas

Los hidropéroxidos de proteínas (figura I.I.11 (155)) se forman por ataque de especies reactivas a proteínas en presencia de oxígeno, probablemente con formación del radical

[illegible]

THE

Journal of Management Inquiry 20(6) 798-814

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1033-1036.

07

[illegible]

© 2000 Blackwell Science Ltd *Journal of Internal Medicine* 247: 111–117

Al igual que los hidroperóxidos, los DOPA son generados por una gran variedad de sistemas productores de radicales libres como ser radiaciones, la reacción de Fenton, la xantino oxidasa o leucocitos activados. El grupo DOPA parecería ser el principal reductor generado por los radicales hidroxilo (64, 146, 156).

Las especies reductoras se forman principalmente sobre tirosina, y en menor proporción en los otros aminoácidos aromáticos como triptofano o fenilalanina (en los que habría una hidroxilación con formación de especies similares a DOPA). La ditirosina, aunque se forma en estas condiciones, no es la especie reductora (146, 156).

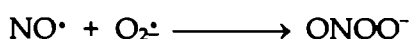
Los grupos DOPA unidos a proteína pueden perder varios electrones, dando productos (o-quinonas) que también son reductores (146, 64). Estas especies reductoras son capaces de reducir metales de transición unidos a proteínas, lo que contribuiría de por sí al estrés oxidativo (64, 68, 154).

Los grupos reductores son más estables que los peróxidos de proteínas, pudiendo permanecer reactivos por varias semanas. Esta estabilidad permitiría que difundan de organela en organela, en contraste con radicales transientes o con los relativamente fijos hidroperóxidos de lípido (146).

Se ha determinado que los grupos DOPA o TOPA (trihidroxifenilalanina) están presentes en el sitio activo de ciertas enzimas y donan equivalentes de reducción. Además están presentes en proteínas de adhesión y estructurales, en reacciones de interunión; en el pelo (relacionado con la melanogénesis). Por otra parte, el DOPA libre es un compuesto fisiológicamente importante (154, 64).

► I.I.V.6.- *Modificación de proteínas por peroxinitrito*

El óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) es formado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS = nitric oxide synthase) a partir de arginina. Se ha encontrado al $\text{NO}^\bullet$ en una gran variedad de células; actúa como vasodilatador, neurotransmisor e inhibidor de la agregación de plaquetas. Por otra parte, el $\text{NO}^\bullet$ puede reaccionar con el radical superóxido a una velocidad controlada por la velocidad de difusión formando el peroxinitrito (ONOO^-) altamente tóxico (145).



El óxido nítrico puede reaccionar directamente con grupos sulfhidrilos, grupos amino y metales presentes en proteínas para producir derivados S-nitroso, N-nitroso y Fe-nitroso (146, 145). Se sabe que la actividad biológica de algunas proteínas es modificada por la acción del óxido nítrico (146).

El peroxinitrito puede causar la nitración de tirosina y triptofano y la oxidación de residuos de cisteína y metionina (145).

➤ ***I.I.VI.- Determinación de alteraciones en proteínas***

Una única especie reactiva puede causar en una proteína una o varias de las modificaciones recién indicadas. Algunas de estas modificaciones son buenas marcadoras de que una proteína ha estado sometida a alguna clase de agresión. Son buenos marcadores la formación de grupos carbonilos y la reducción del contenido de grupos sulfhidrilo, siendo la primera la más utilizada (68, 67).

➤ ***I.I.VI.1.- Formación de grupos carbonilos***

El contenido de grupos carbonilos en proteínas es muy utilizado debido a que ha probado ser una medida valiosa del daño oxidativo a proteínas asociado a situaciones como estrés oxidativo, ciertos desórdenes fisiológicos o enfermedades y el envejecimiento (68, 67, 145, 120, 122). Otra razón muy importante para utilizar este índice es que existen métodos sensibles para la detección y cuantificación de los grupos carbonilos formados. Muchas de las reacciones indicadas en el ítem anterior tienen como consecuencia la formación de grupos carbonilos en las proteínas (145, 67).

Se pueden generar grupos carbonilos en las proteínas por oxidación directa de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos. Por ejemplo, se ha determinado la formación de compuestos carbonílicos en proteínas por acción de radiaciones ionizantes, ozono y sistemas MCO. En algunos casos se han caracterizado los compuestos carbonílicos formados: semialdehído α -aminoadípico a partir de lisina; semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina; 2-amino-3-cetobutírico sobre la treonina y 2-oxohistidina a partir de la histidina (144, 67, 145, 121).

Otra forma de generación de grupos carbonilos por la acción de especies reactivas es por ruptura de la cadena principal proteica de acuerdo a la reacción de Garrison, quedando sobre la cadena correspondiente al amino terminal un N- α -cetoacilderivado (121, 67, 145, 68). También se produce la ruptura de la cadena polipeptídica principal por ataque a las cadenas laterales de glutámico y prolina, formándose de grupos carbonilos en sus extremos (145, 67).

El grupo sulfhidrilo de la cisteína y los grupos amino de lisina e imidazol de histidina podrían reaccionar con aldehídos α,β -insaturados y malondialdehído (productos de la peroxidación de lípidos) para dar compuestos de adición tipo Michael con un grupo carbonilo libre (145, 67, 152, 154).

Los grupos amino de lisina e imidazol de histidina podrían reaccionar con malondialdehído (formado en la peroxidación de lípidos) dando bases de Schiff con un grupo carbonilo libre (152, 145, 67).

La reacción de aldehídos de azúcares con grupos amino libre (por ejemplo de lisina) puede llevar a la formación de cetoaminas (glicoxilación de proteínas) (145, 152).

➤ I.I.VI.2.- Disminución del contenido de grupos sulfhidrilos

La cisteína es uno de los residuos de aminoácido más fácilmente oxidables, pudiendo sufrir reacciones reversibles de oxidación/reducción. La oxidación/reducción de grupos sulfhidrilos de muchas proteínas constituye un mecanismo de regulación celular, cualquier evento que contribuya a desequilibrar dicho sistema puede tener graves consecuencias para el funcionamiento celular. Por ejemplo, la oxidación de grupos sulfhidrilo incrementa la susceptibilidad a la proteólisis (58, 157).

Al igual que en el caso de los grupos carbonilos, la disminución del contenido de grupos sulfhidrilo puede deberse a varias causas:

Se ha determinado la oxidación de los grupos sulfhidrilo a disulfuros y otras especies oxidadas (por ejemplo oxiácidos) como uno de los primeros eventos en la oxidación de proteínas mediada por radicales libres; la relación de disulfuro a material oxigenado depende del ambiente en el que se desarrolle la reacción (68). Por ejemplo, el H_2O_2 causa un consumo preferencial de tioles en las lentes cristalina *in vitro*, mientras otros aminoácidos presentan pocos cambios (68).

Productos de la peroxidación de lípidos (aldehídos) pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo de residuos cisteína por la reacción de adición de Michael (118, 68).

Los hidroperóxidos de proteínas podrían reaccionar con grupos sulfhidrilos de la misma o de otra proteína (155).

Se ha detectado la S-tiolación reversible (por reacción por ejemplo con glutatión oxidado) en proteínas expuestas a radicales libres (68). La explosión respiratoria de los monocitos humanos resulta en una S-tiolación rápida y reversible de muchas proteínas citosólicas (68). Por lo tanto, tioles biológicos como GSH y cisteína pueden influenciar la inactivación de proteínas inducida por oxidantes ya sea por reacción directa con los radicales libres, o indirectamente formando uniones reversibles con tioles de las proteínas (normalmente libres). La tiolación es también un proceso necesario en el plegado *de novo* y en el mantenimiento de la conformación de proteínas (68, 112, 115, 104).

➤ I.I.VII.- Protección y reparación de proteínas

Para prevenir el daño causado por radicales libres los sistemas biológicos contienen defensas antioxidantes que incluyen pequeños compuestos no proteináceos, que pueden ser dadoras de electrones o de átomos de hidrógeno. Entre ellos está el α -tocoferol, la forma más activa de la vitamina E, el cual es el mejor agente protector de lípidos y proteínas (58, 94).

En lo que respecta a los organismos como un todo, algunas proteínas plasmáticas podrían actuar como antioxidantes de sacrificio, se oxidarían ellas antes que otras moléculas y serían removidas rápidamente de la circulación. Se ha comprobado la formación de

peróxidos de proteína sobre albúmina de suero en muchos sistemas *in vitro*, por lo que tal modificación podrían darse también *in vivo*, protegiendo de esa manera a otras moléculas. La apo B de las LDL es susceptible de peroxidación, pudiendo ser la responsable del potencial antioxidante que poseen las LDL. Se cree que la bilirrubina también actuaría como agente fisiológico antioxidante (158).

En algunos casos las células tratan de recuperar las proteínas dañadas o los péptidos defectuosos y restaurar así su función (105).

Muchas de las inactivaciones de las enzimas se producen por desplegamientos de las mismas (68, 64). Varias proteínas de shock o de estrés, tanto en sus formas constitutivas como inducibles, son capaces de ayudar a la recuperación de la estructura terciaria de las proteínas oxidadas. Durante el estrés oxidativo se inducen varias de estas proteínas, no está claro si su acción protectora es a través de su capacidad de restablecer la estructura espacial de las proteínas (105, 68).

Existen enzimas capaces de reparar modificaciones covalentes en la estructura primaria; uno de los mecanismos más comunes es la reducción de los enlaces disulfuro oxidados, por ejemplo, mediante el sistema de tioredoxina/tiorredoxina reductasa (107). Otro sistema es la disulfuro isomerasa, la cual tiene actividad de chaperona (ayuda al plegamiento de proteínas después de su síntesis) o facilita reacciones de intercambio de disulfuro con sustratos proteicos inactivos (105, 68, 58).

La oxidación de residuos de metionina puede ser revertida; si la oxidación es leve son suficientes moléculas como el Trolox, en tanto que si la oxidación es más intensa es necesaria la enzima metionina sulfóxido reductasa. Esta última podría ser muy importante en la protección contra el estrés oxidativo (157, 105, 58, 68, 154).

El homogenato de hígado de rata es capaz de catalizar la destrucción de los peróxidos de proteína a pH neutro. Cofactores como el glutatión no parecerían tener un efecto importante en condiciones fisiológicas (154).

➤ I.I.VIII.- Degradación de proteínas oxidadas

Las células serían capaces de degradar selectivamente las proteínas oxidadas y/o dañadas. La degradación selectiva de las proteínas dañadas permitiría evitar su acumulación y limitaría la extensión del daño durante un estrés oxidativo moderado, actuando como una segunda línea de defensa antioxidante contra los radicales libres y agentes oxidantes que amenacen la integridad celular (105, 120).

La depleción de reductantes celulares (NADH, GSH) está a menudo asociada a un aumento de la proteólisis, probablemente porque habría una disminución de la reparación del daño (58).

En la figura I.I.13 (105) están representados los mecanismos principales que regularían la degradación de proteínas oxidadas.

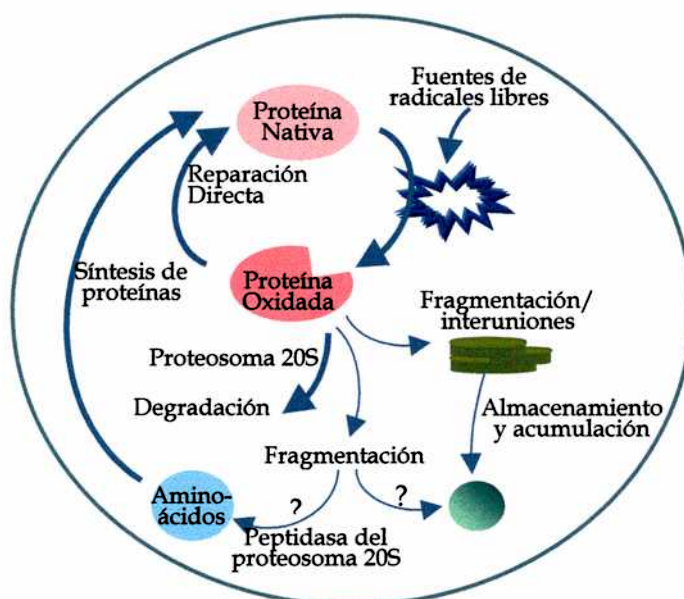


Figura I.I.13: Degradación de proteínas oxidadas

Una característica muy importante de las proteínas oxidadas es que pueden acumularse formando productos que podrían ser parte del problema de la oxidación de proteínas, contribuyendo a ciertos estados de enfermedad y envejecimiento (105, 92).

Se ha sugerido que un aumento en la degradación de proteínas oxidadas podría ser una función normal de los sistemas de proteólisis intracelulares, en tanto que la inhabilidad para degradar proteínas muy oxidadas (con la consiguiente acumulación) puede llevar a estados de enfermedad y envejecimiento (92).

► I.I.VIII.1.- *Sistemas de degradación de proteínas oxidadas*

El proteosoma 20S sería el principal sistema de degradación de proteínas oxidadas; se ha determinado que el 70-80% de las proteínas oxidadas son removidas selectivamente por dicho complejo (92, 105). Este sistema no requiere ATP (de hecho dicha degradación está levemente inhibida en presencia de ATP) ni que las proteínas esten ubiquitinadas. Si se inmunoprecipita el complejo 20S se inhibe casi completamente la proteólisis de proteínas oxidadas inducida por H_2O_2 en extractos libres de célula de Clon 9 de hígado o células de eritroleucemia K562 de humano (105, 92).

Algunas proteínas oxidadas requieren ATP para poder ser degradadas, se cree que el ATP sería necesario para la activación del sustrato; por ejemplo, para su despliegue. Algunas proteínas requieren del complejo 26S para su degradación, por ejemplo, las proteínas fotooxidadas de las lentes oculares (causantes de la formación de cataratas) (105).

Existen muy pocos estudios sobre el destino de las proteínas de membrana oxidadas. Se cree que las que poseen un dominio hidrofílico podrían ser degradadas por proteasas hidrosolubles citoplasmáticas o de la organela correspondiente (en o cerca de la superficie de la membrana). Podrían existir también proteasas de membrana integrales o unidas a la membrana (105).

Ha sido demostrada la existencia de una proteasa que degrada proteínas oxidadas en retículo endoplásmico, la cual es sensible a las condiciones de oxidación/degradación. En mitocondrias por tratamiento con agentes generadores de radicales libres o por el transporte normal de electrones se produce un aumento de la proteólisis (105). También ha sido determinada la presencia del proteosoma en el núcleo (143).

No se sabe mucho acerca de la degradación de las proteínas extracelulares oxidadas, las cuales deben ser endocitadas y transportadas al citosol o a los lisosomas para su degradación, siendo normalmente la endocitosis el paso limitante (105, 159, 64).

Los macrófagos y las células sinusoidales hepáticas poseen receptores que detectan las proteínas extracelulares oxidadas. Se han identificado dos clases de receptores, uno para los aductos con malondialdehído en las LDL y el otro para los aductos con glucosa; estos últimos estarían relacionados con la endocitosis de productos finales avanzados de la glicosilación (AGE) formados *in vivo*, también reconocerían un número de conjugados aldehídos alifáticos-proteínas sintetizados (por ejemplo albúmina modificada con MDA y también con formaldehído, glicolaldehído, gliceraldehído o propionaldehído, pero no por aldehídos aromáticos) (118, 105, 85, 60).

No se conocen los factores que regulan la actividad de las proteasas multicatalíticas y de otras proteasas que degradan las proteínas oxidadas (105, 92).

► I.I.VIII.2.- Factores que afectan la proteólisis de proteínas

La oxidación de unos pocos aminoácidos de una proteína la hace más susceptible a la proteólisis (105, 92, 64). Esto se debería fundamentalmente a la alteración de la proteína y no a la modificación de los sistemas de degradación (92). Las proteínas oxidadas son más hidrofóbicas. Se cree que la oxidación produce la exposición de residuos hidrofóbicos ocultos por la estructura terciaria y cuaternaria (105, 92, 147, 90, 37).

Inicialmente, cuanto más oxidada esté una proteína más susceptible sería a la proteólisis; llegado un punto esto se revierte y es más resistente a la proteólisis al aumentar el estado de oxidación de la proteína. Esto sería debido a que las proteínas muy oxidadas estarían muy entrelazadas por enlaces covalentes formando agregados que serían sustratos pobres para el proteosoma (105, 159, 92).

➤ I.I.IX.- Acumulación de proteínas oxidadas

La acumulación de proteínas oxidadas podría deberse a que la velocidad de formación de proteínas oxidadas es mayor que la velocidad de degradación o a que los productos oxidados están tan alterados que las proteasas no son capaces de degradarlos. Se formarían agregados de proteínas y/o proteínas y lípidos, en los cuales las proteínas podrían estar unidas covalentemente (por puentes disulfuro y otros tipos de enlaces) o no covalentemente (105, 67, 118). Una causa de acumulación de proteínas carboniladas (ya sea por una sustancia tóxica o durante el envejecimiento) podría ser el daño a las proteasas encargadas de degradarlas, con lo que disminuiría la capacidad de las células de degradar las proteínas oxidadas. Se ha observado la disminución de la actividad de proteasas neutras con el envejecimiento en varios tejidos de varias especies, incluyendo la humana (90).

La acumulación de proteínas alteradas podría ser dañina por poseer especies reactivas capaces de alterar a otras biomoléculas o por impedir el funcionamiento de un determinado órgano (por ejemplo, la cataratogénesis en las lentes oculares) (58, 154, 144, 64).

Sin embargo, la acumulación de proteínas alteradas en otros casos podría ser una forma de protección, una manera de “aislar” productos que de otra forma podrían resultar tóxicos para la célula. Se acumularían como macromoléculas en el sistema vacuolar (endosomas, lisosomas, etc.) (58, 154, 144, 64).

➤ I.I.X.- Oxidación de proteínas en situaciones fisiológicas y patológicas

La formación de proteínas alteradas ha sido determinada en muchas situaciones celulares, tanto normales como patológicas. Las alteraciones químicas que se han detectado se corresponderían con los mecanismos indicados anteriormente; en muchos casos se ha empleado la detección de la formación de carbonilos como indicador de la alteración.

Niveles bajos pero detectables de proteínas oxidadas están presentes en las células normales saludables. Se asocia un aumento de la oxidación con una disminución de la actividad específica y con la alteración de la labilidad al calor de las enzimas (160).

Se formarían proteínas oxidadas en situaciones normales como la apoptosis, o durante el “estallido respiratorio” de macrófagos y neutrófilos, los cuales generarían especies reactivas de oxígeno y HClO para atacar a bacteria. Este mismo mecanismo sería causante de enfermedades desmielinizantes, artritis y otras inflamaciones crónicas (68, 119, 120).

También se oxidarían proteínas en la marcación para su recambio y en la degradación de las mitocondrias durante la maduración de los reticulocitos (119, 68, 67)

Se ha detectado la formación de proteínas oxidadas en el envejecimiento, la cual se

cree que estaría involucrado en el mismo. Así, se ha determinado un aumento del contenido de grupos carbonilos en proteínas al aumentar la edad del donante en fibroblastos humanos, lentes oculares humanas (existe un aumento pequeño pero significativo del contenido de grupos carbonilos), en hepatocitos de ratas, en eritrocitos al aumentar la edad del eritrocito. En enfermedades relacionadas con la vejez como el síndrome de Werner o la progeria, el contenido de proteínas oxidadas de los fibroblastos es similar al de una persona normal de 70-80 años (67, 120, 58, 68).

En proteínas de larga duración de tejidos especializados como el ojo se ha determinado la acumulación de productos de oxidación (como dopa, ditirosina, hidróxidos de valina, leucina, cisteína y metionina) así como la formación de grupos carbonilos). También existe en los animales viejos una acumulación de "pigmentos de la edad" como lipofuscina (68).

La exposición de animales o cultivos celulares a situaciones de estrés oxidativo lleva a un incremento del nivel de grupos carbonilos; por ejemplo, en hepatocitos y pulmones de ratas sometidas a hipoxia, en hígado de ratones expuestos a etanol, etc. (67, 144).

Se ha determinado el aumento de grupos carbonilo de proteínas en la enfermedad de Alzheimer (también de malondialdehído). En la aterosclerosis (donde estarían involucradas las LDL) aldehídos y lípidos oxidados causarían reacciones de fragmentación, interuniones y modificación de residuos de aminoácidos (histidina, lisina, prolina). No se ha diferenciado entre la contribución de la oxidación directa de la proteína y la proveniente de la peroxidación de lípidos (68, 58, 120, 154, 66).

El humo de cigarrillo causa la formación de grupos carbonilos y la oxidación de grupos sulfhidrilo de proteínas plasmáticas. Lo mismo sucede en la distrofia muscular hereditaria en pollos (122, 97).

En la pancreatitis inducida en ratas por infusión con taurocolato al 5% se produce una depleción de grupos sulfhidrilo (123).

I.J.- HOMEOSTASIS CÁLCICA

➤ I.J.I.- Introducción

La regulación de la concentración intracelular de calcio es fundamental para muchos procesos metabólicos y funcionales, por lo que en condiciones fisiológicas normales existe un estricto control de los niveles de calcio intracelulares. El calcio actúa como mensajero intracelular en una amplia gama de respuestas celulares, entre las que se puede destacar la activación de enzimas, la secreción de hormonas, la proliferación celular, la motilidad de células musculares, etc. (161, 124, 2, 162).

La alteración de la homeostasis cálcica puede causar injuria celular irreversible en células y tejidos por activación de mecanismos citotóxicos. El aumento de calcio intracelular podría estar involucrado tanto en la apoptosis como en la necrosis químicamente inducida (163, 4, 2).

La homeostasis cálcica puede verse alterada en muchas situaciones, por ejemplo, en la acción de muchos xenobióticos citotóxicos (cianuro, metales, solventes, pesticidas), el estrés oxidativo, la toxicidad de radicales libres de oxígeno, etc.. Sin embargo, sólo en unos pocos casos existe una conexión identificada entre la toxicidad de una sustancia química o un evento de estrés oxidativo y el cambio en la concentración de calcio (163, 4).

La alteración del contenido de calcio no siempre es sinónimo de muerte celular. Algunas formas de insulto subtóxico causarían incrementos de calcio que activarían sistemas celulares, los que serían protectores de por sí o por ser responsables de la inactivación o eliminación de la sustancia tóxica (4). Así, incrementos de calcio pueden activar a genes como c-fos y c-myc, (asociados con la división celular), así como de hsp 70 (108, 162).

➤ I.J.II.- Niveles intracelulares de calcio

La concentración de calcio en el citosol de cualquier célula no estimulada es entre 0,05 y 0,2 μM ; aún cuando la célula esté activada por el influjo de calcio, su concentración no supera 0,6 μM . Los niveles extracelulares de calcio son cuatro órdenes de magnitud superior (aproximadamente 1,3 mM). Esta diferencia de concentraciones, así como el sentido de la polarización de la membrana plasmática (interior más negativo que el exterior) genera un gradiente electroquímico que hace que exista una tendencia permanente del calcio extracelular de entrar a la célula (124, 163, 1, 69).

La célula utiliza la diferencia de concentraciones de calcio entre el exterior y el interior como sistema de señalización; una señal adecuada permite el ingreso de calcio a la

célula, el cual genera una respuesta secundaria (124, 102).

Los sistemas que median el aumento del calcio citosólico son (163, 4, 1, 3, 124, 162, 69):

- .- receptores hormonales en la membrana plasmática,
- .- receptores presentes en el retículo endoplásmico y en el núcleo que responden a segundos mensajeros como IP_3 (inositol 1,4,5- trifosfato),
- .- estímulos que causan la liberación del calcio de proteínas que lo unen en el citosol,
- .- sistemas acoplados con la entrada de protones o sodio a la mitocondria.

Los sistemas que permiten la disminución de la concentración de calcio en el citosol son (163, 4, 1, 124):

- .- Ca^{++} - ATPasa de la membrana plasmática,
- .- Ca^{++} - ATPasa del retículo endoplásmico,
- .- proteínas citosólicas que se unen al calcio (calmodulina, calsecuestrina, calreticulina),
- .- Ca^{++} - ATPasa mitocondrial (situada en la membrana interna mitocondrial).

En la figura I.J.1 (163) se representan estos sistemas.

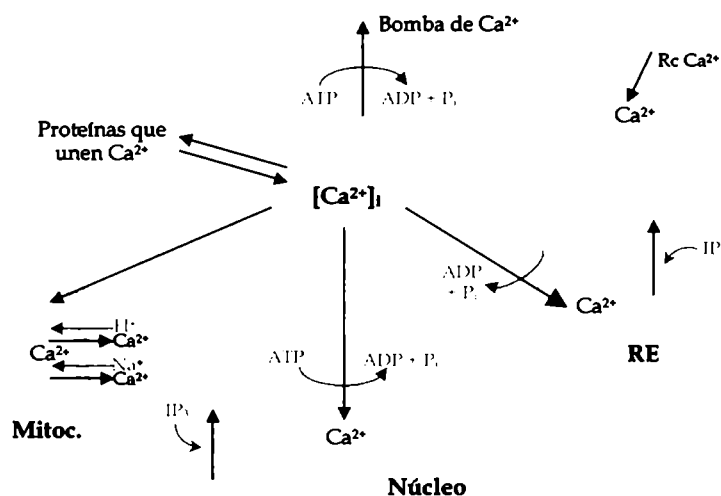


Figura I.J.1: Regulación de la homeostasis cálcica

Los mecanismos de regulación de la homeostasis cálcica de células musculares y nerviosas no son considerados aquí.

Los principales sistemas de entrada de calcio al citosol serían los canales presentes en la membrana plasmática y del RE, los cuales poseen receptores asociados que regulan su apertura. Frente a un determinado estímulo permiten el pasaje de calcio hacia el citosol, aumentando dramáticamente la concentración de calcio en ese lugar, lo que resulta en la activación de mecanismos celulares sensibles a calcio (124, 102, 3, 69).

Se considera que los principales sistemas de disminución de la concentración de

calcio citosólico son las bombas de calcio de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico (ATPasas ya que para sacar el calcio del citosol utilizan la energía de la hidrólisis del ATP) (124, 102).

Cuando la célula está dañada y no puede extraer calcio del citosol en forma eficiente, la concentración de este ion puede alcanzar niveles peligrosos (mayores de 10^{-5} M). En estas circunstancias comienza a actuar la Ca^{++} - ATPasa mitocondrial, la cual tiene baja afinidad pero gran capacidad para transportar calcio (124, 3, 69, 108, 114).

➤ I.J.III.- Lugares intracelulares de almacenamiento de calcio

Retículo endoplásmico: El retículo endoplásmico es el principal lugar de almacenamiento intracelular de calcio en condiciones fisiológicas normales; funciona como una reserva de calcio importante y fácilmente utilizable. Existiría una alta concentración de proteínas de unión de calcio en el lumen del RE que permitirían su almacenamiento (163, 124, 3, 114).

El RE se carga de calcio por medio de la calcio ATPasa o bomba de calcio y se vacía de calcio por dos canales operados por ligandos, uno sensible a IP_3 y el otro sensible a calcio, al alcaloide rianodina y tal vez a la ADP-ribosa cíclica. Todos estos transportadores han sido también descritos en la membrana nuclear. La bomba de calcio del RE tiene una alta afinidad y una baja capacidad de transporte de calcio (108, 114, 161).

Mitocondrias: Las mitocondrias son capaces de almacenar calcio en grandes cantidades mediante la Ca^{++} - ATPasa mitocondrial, la cual utiliza la energía del gradiente electroquímico de protones generado en la fosforilación oxidativa para transportar el calcio desde citosol hacia la mitocondria, donde es almacenado en forma de fosfatos complejos. Sin embargo, los transportadores de calcio de las mitocondrias son de baja afinidad, por lo que, como se ha indicado anteriormente, sólo se produce el almacenamiento de calcio en las mitocondrias cuando los niveles de calcio citosólico aumentan muy por encima de los niveles normales. Este almacenamiento sería un sistema de seguridad para las células dañadas. Si el calcio citosólico sigue aumentando, llega un punto en que no puede seguir protegiendo a la célula y se produce la injuria celular (79, 163, 3, 162, 124, 69, 108, 114).

Los niveles altos de calcio afectan a las mitocondrias. El potencial de membrana disminuye en forma proporcional a la cantidad de calcio acumulado, lo cual finalmente puede llevar a la depleción de ATP. Esto hace aún más comprometida la alteración de la homeostasis cálcica ya que se suma la falta de energía que podría ayudar a compensar dicha sobrecarga (163).

Núcleos: Existen muchos indicios de que los núcleos serían capaces de regular su

concentración interna de calcio. Estudios recientes han determinado que los núcleos poseen un sistema de toma de calcio que es responsable de la acumulación intranuclear de calcio y que el calcio del núcleo puede ser liberado en respuesta a mensajeros intracelulares; han sido determinados en la membrana nuclear los mismos canales de calcio descritos para la membrana del retículo endoplásmico (161, 163, 162).

➤ I.J.IV.- Mecanismos de regulación de concentración de calcio intracelular

Distintas señales hormonales causan un aumento del calcio citosólico, principalmente vía el mecanismo que utiliza inositol 1,4,5- trifosfato como segundo mensajero, el cual sería el principal sistema regulador de la liberación al citosol de calcio en el hígado (106).

Como se puede ver en el gráfico I.J.2 (163 con modificaciones), la unión de un agonista a su receptor (Rc) estimula una serie de mecanismos que culminan con la formación de dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-trifosfato y el diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a receptores específicos y estimula la liberación de calcio de lugares de almacenamiento no mitocondriales (retículo endoplásmico, núcleo), mientras que el diacilglicerol es un potente activador de la proteína quinasa C (que fosforila en serina o treonina), regulando de esta manera la actividad de varias proteínas de la célula blanco, por ejemplo, proteínas que causan la activación de la transcripción de genes (163, 106, 109, 124).

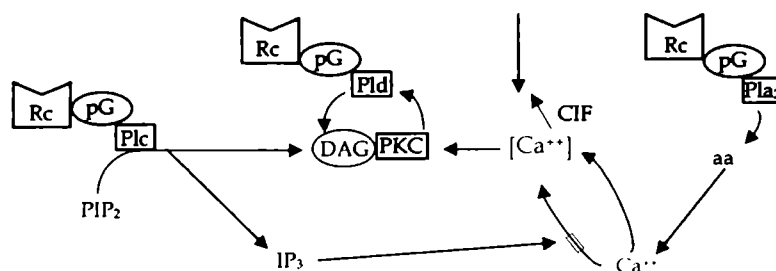


Figura I.J.2: Regulación del calcio citosólico por señales hormonales

Tanto los canales activados por IP₃ como los activados por rianodina están regulados por retroalimentación positiva (el calcio liberado puede unirse a ellos causando la liberación de más calcio), provocando que el aumento de calcio citosólico ocurra de una manera repentina, una respuesta de todo o nada (124).

El calcio es un regulador de la permeabilidad de la membrana plasmática. La movilización de calcio de lugares de almacenamiento intracelulares muchas veces va seguida de un aumento de la entrada de calcio a la célula, posiblemente vía la liberación o fosforilación de un factor de entrada de calcio recientemente identificado (CIF, calcium influx factor). Esto permitiría explicar que eventos reversibles tempranos de la injuria compartan

características comunes con los efectos producidos por la unión de factores de crecimiento/hormonas con receptores, en ambos casos se produce la proliferación, regeneración y diferenciación celular (164, 162).

La respuesta inicial de aumento de calcio finalizaría por dos mecanismos: el IP_3 es rápidamente desfosforilado (y así inactivado) mediante fosfatasa específicas y el calcio del citosol es rápidamente bombeado, principalmente fuera de la célula (124).

➤ I.J.V.- Sistemas celulares afectados por el aumento de calcio intracelular

El calcio activa varias enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Gran parte del daño causado por el aumento de calcio podría ser explicado por la activación de fosfolipasas (A_2 y C), proteasas activadas por calcio y por alteración de componentes del citoesqueleto (162, 163).

Proteasas activadas por calcio: El calcio activa varias proteasas cuyo pH óptimo es neutro (calpaínas), localizadas principalmente en el compartimento soluble citosólico. Este sistema proteolítico tendría un papel crítico en el proceso de toxicidad general ya podrían, por ejemplo, liberar metales unidos a proteínas, degradar específicamente una gran variedad de factores de transcripción, etc.. Si se inhiben las proteasas se previene o reduce la extensión de la proteólisis y la muerte celular inducida por aumento de calcio (112, 163, 3, 14).

Fosfolipasas: Varias fosfolipasas son dependientes de calcio y tienen importantes roles fisiológicos, por ejemplo, la fosfolipasa C antes indicada (163).

Otro grupo de fosfolipasas dependientes de calcio son las llamadas fosfolipasas A_2 , capaces de liberar los ácidos grasos de las membranas peroxidadas, participando así en la detoxificación de hidroperóxidos de fosfolípidos (163, 4).

La activación desmedida de las fosfolipasas A_2 puede producir una extensa ruptura de membranas y generar metabolitos tóxicos. Se ha detectado la activación de la fosfolipasa A_2 dependiente de calcio en la isquemia-reperfusión del corazón, la anoxia, etc.. La activación de la fosfolipasa A_2 ha sido asociada con la citotoxicidad del CCl_4 (163, 4).

Endonucleasas: La actividad de endonucleasa está asociada al clivaje de la cromatina. La ruptura de cadenas simples de ADN en células expuestas a estrés oxidativo así como a la acción tóxica de algunas drogas anticancerígenas serían debidas a la acción de una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio presente en el núcleo hepático (163, 4).

Citoesqueleto: Muchas de las proteínas que se unen con el citoesqueleto requieren calcio para poder interactuar con el mismo (163).

El calcio juega un papel preponderante en la aparición de protrusiones transitorias

(llamadas blebs) en la membrana plasmática en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en la aparición de pseudópodos en la activación de plaquetas (163). La formación de blebs ha sido también determinada en condiciones patológicas como el estrés oxidativo causado por diamida, menadiona o CCl_4 (163).

Inhibiendo el mecanismo de proteólisis iniciado por calcio se puede inhibir la formación de blebs en la membrana plasmática causada por agentes tóxicos, por lo que se cree que proteínas del citoesqueleto o proteínas que anclan al citoesqueleto serían degradadas por las proteasas dependientes de calcio (163, 4).

Las calpaínas actúan como mediadoras de señales por calcio y pueden activar o modificar a otras proteínas, incluidas las del citoesqueleto y proteínas quinasas. La activación de proteasas dependientes de calcio contribuye a la desestabilización del citoesqueleto, activación de fosfolipasas, pudiendo también inactivar la Ca^{++} -ATPasa de la membrana plasmática (162).

➤ I.J.VI.- Relación entre el calcio citosólico y los tioles proteicos

Muchas de las proteínas que componen los sistemas de regulación de calcio son sulfhidrúlicas, por lo que la alteración de un grupo pequeño pero crítico de tioles podría causar un daño irreversible a la célula al alterar su capacidad de regulación de la concentración de calcio intracelular. Esta alteración va acompañada de un aumento del calcio citosólico capaz de activar sistemas proteolíticos y de hidrólisis de fosfolípidos (106, 116).

Tanto la bomba como los canales de calcio del retículo endoplásmico son proteínas sulfhidrúlicas. La bomba de calcio funciona cuando sus grupos sulfhidrilos están reducidos, en tanto que los canales de calcio operan cuando sus grupos tiólicos están en estado oxidado. Por lo tanto, ambos responderían al estado redox celular, siendo muy dependientes de la disponibilidad de equivalentes de reducción NADH y NADPH (114, 106, 116).

Las concentraciones altas de calcio en las mitocondrias estimulan la formación de poros no específicos en la membrana interna mitocondrial, en lo cual estaría involucrada la oxidación de grupos tioles de proteínas. Sustancias que causan la formación de especies reactivas de oxígeno, por ejemplo diamida, también causan la formación de este tipo de poros (117).

I.K.- EFECTOS DEL TETRACLORURO DE CARBONO

En el capítulo correspondiente a las características generales del CCl_4 se describieron sus propiedades y las formas de activación del mismo. En esta sección se reseñan los efectos que el tóxico causa sobre los seres vivos.

I.K.I.- EFECTOS DEL CCl_4 EN ORGANISMOS

En esta parte se consideran brevemente los efectos producidos por el CCl_4 sobre los seres vivos, sin describir las alteraciones bioquímicas que llevan a ellos.

➤ I.K.I.1.- Patologías que produce el CCl_4

El efecto principal del CCl_4 es en el hígado, siendo la patología que produce diferente de acuerdo a si la exposición es aguda o crónica (14, 79, 11).

➤ I.K.I.1.1.- Efecto agudo

Necrosis hepática: El CCl_4 causa la muerte de los hepatocitos, principalmente los de la zona centrolobulillar (pese a que la mayor concentración es a nivel portal), debido a que allí se encuentran los componentes críticos para su biotransformación (14, 70). Algunos de los mecanismos por los cuales el CCl_4 podría producir la muerte celular serán tratados más adelante.

Hígado graso: El CCl_4 causa la acumulación de lípidos en el hígado, en lo cual intervendrían varios factores, cada uno en una medida y secuencia distinta (14, 79).

Así, este tóxico causa una disminución en la secreción de lipoproteínas que se correlaciona con la acumulación de triglicéridos. La inhibición de la síntesis de la apoproteína no sería la causante de este efecto, sino que la unión covalente de metabolitos reactivos del CCl_4 a la apolipoproteína impediría de alguna manera el proceso de secreción. Los lípidos extrahepáticos no tendrían un papel preponderante en la formación de hígado graso (14, 79, 165).

➤ I.K.I.1.2.- Efecto crónico

Cirrosis hepática: El CCl_4 aplicado en forma repetida produce cirrosis hepática, por lo que se lo utiliza como modelo de esta patología. La misma sería producida por una repetida

necrosis hepática, la cual produciría un desbalance entre la síntesis/deposición y degradación del colágeno, a favor de lo primero (14, 17, 166).

Cáncer hepático: Ha sido determinado que el CCl_4 es carcinogénico para algunas especies; dentro de una misma especie (por ejemplo rata, ratón) puede serlo para unas cepas pero no para otras (14, 11). Se cree que este tóxico actuaría como un carcinógeno no genotóxico (11).

➤ I.K.I.2.- Efectos observados en la intoxicación por CCl_4 en humanos

Los efectos del CCl_4 en humanos son fundamentalmente hepáticos, aunque también se han reportado efectos en riñones y sistema nervioso central (14, 11). La depresión del sistema nervioso central es el síntoma más evidente, pero rara vez es la causa de muerte (11).

Cuando el uso del CCl_4 en el hogar y en la industria aún era común, la exposición por inhalación resultó en un considerable número de muertes; sin embargo, las concentraciones causantes de muerte normalmente no fueron estimadas (11).

Las interacciones en el ámbito laboral con otras sustancias son importantes, personas que trabajan al mismo tiempo con alcoholes o que son alcohólicas resultan ser mucho más susceptibles a la intoxicación por CCl_4 . Se han reportado muertes debidas a la interacción isopropanol- CCl_4 , así como accidentes con extinguidores con CCl_4 en los que sólo resultaron afectados los trabajadores consumidores habituales de alcohol (11, 53, 167).

Se han informado tres casos en humanos de desarrollo de cáncer hepático luego de varios años de exposición a CCl_4 (14, 11).

Tanto al IARC (International Agency for Research on Cancer) como la EPA (Environmental Protection Agency, USA) lo consideran un probable carcinógeno en humanos (14, 11). Como se indicó anteriormente, la legislación argentina lo considera un probable carcinógeno (71).

I.K.II.- CARACTERÍSTICAS DEL DAÑO CAUSADO POR CCl₄

En esta sección se analizan las alteraciones bioquímicas que podrían ser causantes de la toxicidad del CCl₄.

I.K.II.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA INTOXICACIÓN POR CCl₄

En este apartado se consideran las características generales de la intoxicación por CCl₄, sin detenerse en los aspectos bioquímicos que las puedan causar, los cuales serán considerados posteriormente.

➤ I.K.II.1.1.- Posibles causas de la necrosis hepática producida por el CCl₄

El propósito de este Trabajo de Tesis fue el de estudiar algunos de los eventos tempranos en la intoxicación por CCl₄ asociados con proteínas que pudieran llevar a la muerte celular.

La muerte celular por CCl₄ sería causada por una secuencia de eventos característicos de esta intoxicación. En el gráfico I.K.1 (14) se describen las características generales de la intoxicación por CCl₄, teniendo en cuenta los posibles lugares de daño subcelulares y las consecuencias que los mismos podrían tener.

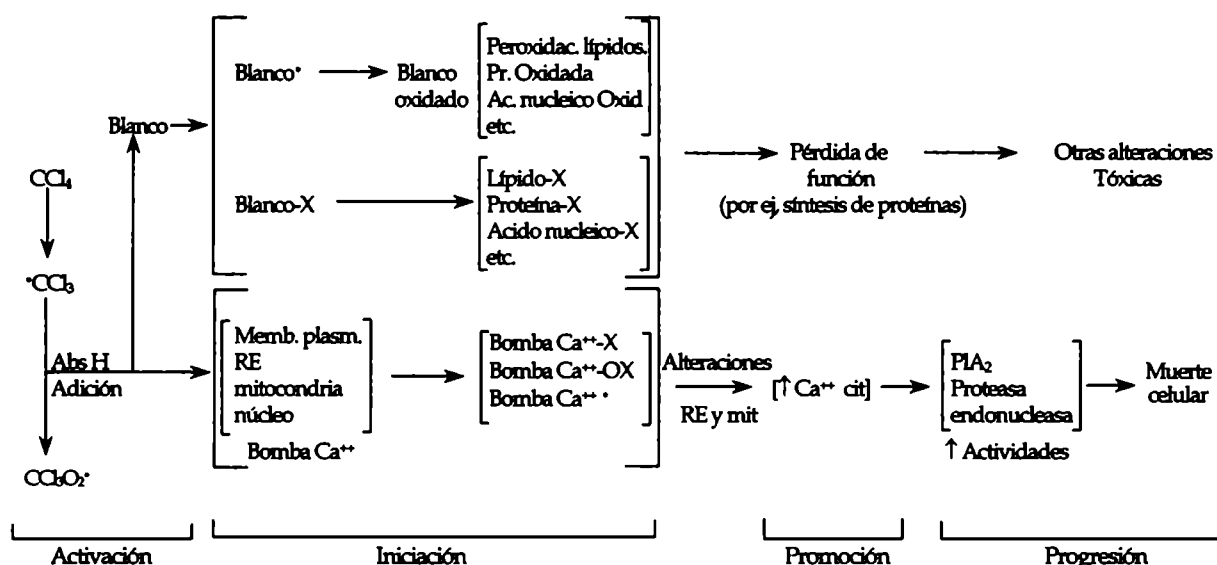


Figura I.K.1: Posibles causas de la necrosis hepática producida por el CCl₄

En líneas generales, el CCl₄ sería activado a sus metabolitos reactivos, los cuales por reacciones químicas producirían una serie de eventos que causarían alteraciones en las funciones celulares, pudiendo culminar en la muerte de la célula. Así, se ha determinado que el CCl₄ causa la alteración de la síntesis de proteínas, la peroxidación de lípidos y el aumento del calcio citosólico. Se considera que este último efecto sería el causante de la muerte celular.

(14, 11, 69, 6).

A continuación se describen en más detalle algunos de los efectos del CCl₄.

➤ *I.K.II.1.2.- Secuencia temporal*

Como se indicó anteriormente, una de las características que permiten el uso del CCl₄ como sistema modelo es el hecho de que la secuencia temporal de eventos en la intoxicación es conocida. La muerte de los hepatocitos no es rápida, de hecho las células tardan varias horas en morir (3, 6).

El primer lugar donde se detectan alteraciones es en el retículo endoplásmico de las células hepáticas, observándose la dilatación de las membranas tanto del RE liso como del rugoso. En el retículo endoplásmico rugoso ya a los 10 minutos de intoxicación se observa la separación y disociación de los polisomas asociados, siendo ambas máximas a los 40 minutos de intoxicación. Se produce al mismo tiempo la alteración de la síntesis de proteínas.

A las 2 horas de intoxicación comienzan a acumularse triglicéridos en los hepatocitos (3, 14, 70).

Los efectos observados en el RE se van incrementando con el tiempo (3). A las 3 h de intoxicación, la estructura del RE está muy afectada. Se observa además la dilatación del aparato de Golgi (3, 14). A ese tiempo se empiezan a detectar perturbaciones en la membrana perinuclear de algunas células, con dilataciones similares a las observadas en el RE. Las mitocondrias y los peroxisomas aparecen normales. A las 3-4 h la membrana plasmática comienza a perder selectividad, con lo cual se produce la entrada de calcio; las mitocondrias comienzan a acumular calcio, sin observarse que las mismas estén alteradas (14, 79, 3).

A las 6 horas de la administración del CCl₄ se puede determinar una intensa alteración de los hepatocitos ubicados en la zona centrolobulillar. Se evidencia la disrupción de la membrana plasmática y una severa acumulación de calcio intracelular. Se produce la activación de los lisosomas. A ese tiempo la mayoría de la unión covalente y de la peroxidación de lípidos ya ocurrió; varios hepatocitos han muerto o van a morir irremediablemente (14, 69, 6, 3, 79).

Siguen incrementándose los efectos producidos en núcleos, RE, y Golgi. Las alteraciones observadas en los núcleos ya no son sólo en la membrana perinuclear sino también en los poros y en el contenido nuclear (3, 79, 14).

La separación de los polisomas de la membrana del RE es más intensa a las 6 horas, presentando pocas zonas con ribosomas unidos (14).

Esta alteración progresiva de distintas organelas ha sido denominada "propagación

de daño" (77).

A las 10-12 h de intoxicación los efectos ya mencionados en núcleos, ER y Golgi siguen aumentando. Además comienzan a estar afectadas las mitocondrias, las cuales aparecen dilatadas y con las crestas mitocondriales rotas. A las 12 horas la fosforilación oxidativa mitocondrial está completamente desacoplada; pese a esto las mitocondrias continúan acumulando calcio en forma dependiente de ATP (3, 79).

A las 24 horas las alteraciones involucran a toda la célula, siendo máxima la necrosis (14, 3).

Si la dosis de CCl_4 no fue mortal, a las 72 h se observa la recuperación del hígado, habiendo procedido la regeneración de los hepatocitos de una manera altamente orquestada (69).

► I.K.II.1.2.1.- Etapas en la intoxicación por CCl_4

Se definen dos etapas en la intoxicación por CCl_4 en función de las alteraciones recién indicadas y de la posibilidad de recuperación de las células dañadas: una etapa temprana y una tardía. En la etapa temprana, si de alguna manera se interrumpe la exposición al tóxico las células tarde o temprano se recuperan. La etapa tardía es posterior al denominado "punto de no retorno" a partir del cual la célula no se puede recuperar pese a que se retire la causa del daño, produciéndose irremediablemente la muerte celular. Este es un concepto general, aplicable a muchas sustancias tóxicas (14, 3).

Etapa temprana: En el caso del CCl_4 esta etapa incluye la biotransformación a $\cdot\text{CCl}_3$, su pasaje a $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$, las interacciones covalente y los procesos de peroxidación de lípidos. En esta etapa la mayor parte de los efectos ocurren en el retículo endoplásmico debido a su mayor concentración de citocromo P450 y a que los metabolitos reactivos por su alta reactividad reaccionarían en las inmediaciones del lugar en el que se generaron. Esta etapa se extiende hasta aproximadamente las 6 horas de intoxicación (1, 3).

Etapa tardía: Se inicia esta etapa con la perturbación de la homeostasis cálcica y la disminución significativa o la cesación de la peroxidación lipídica y de las interacciones covalentes (1, 3).

La etapa tardía es similar a la causada por varias sustancias tóxicas, por ejemplo, paracetamol, bromobenceno, diquat, aloxano, vanadato, cloroformo, etc. Otras alteraciones fisiológicas llevan también a una muerte celular con características similares, por ejemplo, por anoxia, isquemia o daños virales en células hepáticas (1).

I.K.III.- ALTERACIONES BIOQUÍMICAS CAUSADAS POR EL CCl_4

Se tratan en este apartado las alteraciones bioquímicas que se consideran asociadas al daño causado por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

I.K.III.1.- UNIÓN COVALENTE

➤ I.K.III.1.1.- Introducción

La unión covalente (UC) de metabolitos reactivos de muchos xenobióticos (por ejemplo bromobenceno y acetaminofeno en roedores) a macromoléculas ha sido indicada como causante de muerte celular. Al mismo tiempo se considera que la UC podría tener un rol protector al secuestrar o inactivar electrófilos reactivos y por alertar a la célula de la presencia de un exceso de electrófilos. Se acepta actualmente que la UC podría intervenir directamente en las funciones de algunas proteínas y en la alteración de la antigenicidad de otras (72, 168).

En el caso del CCl_4 se ha determinado la unión covalente a lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y piridin nucleótidos (73, 10, 168, 54). Esta unión ocurre muy temprano en la intoxicación por CCl_4 , pudiendo detectarse la unión de derivados del CCl_4 a lípidos y proteínas hepáticas a los 5 minutos. La unión a lípidos es mayor que a proteínas (10, 14, 55).

El metabolito reactivo del CCl_4 que causaría la unión covalente es el $\cdot\text{CCl}_3$, en tanto que $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ causaría predominantemente peroxidación de lípidos. Esto se deduciría del hecho de que en muy bajas concentraciones de oxígeno (en las cuales se forma casi exclusivamente $\cdot\text{CCl}_3$) se favorece la UC y se inhibe la peroxidación de lípidos (80, 14, 54, 55).

La UC sería un componente importante de los mecanismos de toxicidad del CCl_4 ; así, participaría en la inhibición del citocromo P450, en la destrucción de la glucosa 6-fosfatasa y en la inhibición de la secreción de lipoproteínas (10, 54, 65, 3).

➤ I.K.III.1.2.- Unión covalente a lípidos

La unión de los metabolitos reactivos del CCl_4 a lípidos se da preferentemente a los del retículo endoplásmico (más a lípidos del liso que del rugoso) (73, 10). En una menor medida se produce la UC a lípidos mitocondriales (1/4 a 1/7 menor) (10, 14). También se produce la UC a lípidos nucleares (169, 10).

Se ha determinado la UC a triglicéridos, ácidos grasos, ésteres de colesterol y fosfolípidos, siendo más importante la unión a estos últimos (fundamentalmente a

fosfatidilcolina). Los blancos principales entre los ácidos grasos poliinsaturados serían los ácidos araquidónico y linolénico (10).

La UC a lípidos sería sobre sus dobles ligaduras, pudiendo ser seguida de uniones con moléculas vecinas. La UC modificaría la polaridad de las moléculas (el grupo $\cdot\text{CCl}_3$ o un Cl causaría un aumento de la polaridad), alterando así la estructura de las membranas (124, 10).

➤ I.K.III.1.3.- Unión covalente a proteínas

Los metabolitos reactivos del CCl_4 se unen covalentemente a proteínas del retículo endoplásmico liso y rugoso, así como a proteínas de las mitocondrias (77) y del núcleo (169, 170). En el caso de las proteínas nucleares se ha determinado la unión a proteínas solubles, de la membrana nuclear y a ribonucleoproteínas ácidas e histonas (169, 11, 170).

También ha sido demostrada la unión a proteínas ribosomales, tanto de ribosomas unidos al RE como de ribosomas libres, siendo la marca mayor en el primer caso (73).

Se cree que la unión a proteínas se podría producir a través del grupo amino ϵ de la lisina o a la cisteína o metionina de proteínas (10).

➤ I.K.III.1.4.- Unión covalente a ácidos nucleicos

Se ha podido detectar una UC pequeña pero significativa a ADN de ratón y de rata (menor en rata), tanto *in vivo* como *in vitro* (10, 169, 73, 170).

Por otra parte, el $\cdot\text{CCl}_3$ interactúa con las cuatro bases de ADN en distintos sistemas de ensayo, principalmente con G y A, dando más de 20 aductos (10, 169, 171-174).

➤ I.K.III.1.5.- Unión covalente a nucleótidos

Se ha determinado la unión covalente a nucleótidos, exclusivamente a los de piridina reducido (NADH o NADPH), lo cual podría tener relación con la rápida depleción del NADPH en la intoxicación por CCl_4 (14).

I.K.III.2.- PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS**➤ I.K.III.2.1.- Introducción**

Los metabolitos reactivos del CCl_4 son capaces de causar la peroxidación de lípidos hepáticos (44, 55, 70).

Se oxidarían los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) produciéndose peróxidos e hidroperóxidos de lípidos, sus radicales respectivos y los productos de sus degradaciones como ser 4-hidroxinonenal y malondialdehído (3, 80).

La peroxidación de lípidos, al igual que la unión covalente, ocurre temprano en la intoxicación por CCl_4 ; se observa a los 5 minutos o menos, alcanzando su valor máximo a los 15 minutos (11, 7).

Se considera que el principal iniciador de la peroxidación de lípidos es el radical $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$ debido a que para que ocurra la peroxidación de lípidos es necesaria la presencia de oxígeno. La baja presión de oxígeno de la región centrolobulillar favorecería la peroxidación de lípidos al favorecer la activación del CCl_4 . Por otra parte, el oxígeno es necesario para la etapa de propagación de la peroxidación de lípidos, por lo que la peroxidación máxima sería un compromiso entre la activación del CCl_4 y la propagación de la peroxidación (14, 42, 79, 80).

La peroxidación de lípidos por CCl_4 se produce tanto *in vivo* como *in vitro*, lo cual ha sido determinado por distintas técnicas: producción de malondialdehído, formación de dienos conjugados con absorción característica a 233 nm o generación de etano-pentano (74, 54, 69).

Varios de los efectos causados por el CCl_4 en enzimas han sido reproducidos por productos de la peroxidación de lípidos (44).

La concentración de HNE en suero está significativamente aumentada en ratas intoxicadas por CCl_4 (88).

La unión covalente produciría daño en las cercanías del lugar donde se generan los metabolitos reactivos, en tanto que la PL produce sustancias tóxicas como el 4-hidroxialquenal y otros aldehídos, capaces de alejarse y producir la acción tóxica en regiones distantes (14).

➤ I.K.III.2.2.- Peroxidación de lípidos en el retículo endoplásmico

El CCl_4 causa la peroxidación de lípidos del RE, siendo su efecto similar en el liso y en el rugoso (73, 175, 176, 3).

Como consecuencia de la peroxidación de lípidos causada por el CCl_4 se producen hidroxialquenos como el 4-hidroxinonenal y se observa una pérdida de ácidos linoleico, oleico y araquidónico (69, 10, 73, 85).

➤ I.K.III.2.3.- Peroxidación de lípidos en núcleos

Los metabolitos reactivos del CCl_4 producen la peroxidación de los lípidos nucleares, principalmente de fosfolípidos y colesterol (14, 74, 176).

Este efecto podría afectar la regulación de procesos nucleares. Además, se formarían productos de oxidación del colesterol semejantes a algunas hormonas, los cuales podrían estar relacionados con la susceptibilidad a cáncer de ciertas especies. (14).

➤ I.K.III.2.4.- Peroxidación de lípidos en mitocondrias

No se ha detectado peroxidación de los lípidos mitocondriales dentro de las seis primeras horas de intoxicación *in vivo*, pese a que, como ya se ha mencionado, en dicha organela se produce la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos. Sí se ha determinado la disminución del contenido de ácido araquidónico a las 24 h de intoxicación (77, 76, 3).

➤ I.K.III.2.5.- Peroxidación de lípidos por NADPH en sistemas *in vitro*

Muchos estudios indican que el oxígeno unido al hierro formando el complejo iónico perferriilo en ciertos citocromos puede servir como sitio de reacción primario para la iniciación de la peroxidación de lípidos dependiente de NADPH (37, 41, 91).

Los sistemas microsomales *in vitro* en presencia de NADPH y oxígeno tienden a peroxidarse, aún en ausencia de prooxidantes. Este efecto del NADPH es despreciable a baja presión de oxígeno. Se produciría la formación de MDA (7, 49).

También se produce la peroxidación de lípidos causada por el NADPH en núcleos (176).

I.K.III.3.- EFECTO DEL CCl₄ SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

➤ **I.K.III.3.1.- Introducción**

El CCl₄ afecta la síntesis de proteínas. Se han detectado alteraciones morfológicas en la maquinaria de síntesis proteica y la disminución de la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas sintetizadas durante la intoxicación (131, 14).

➤ **I.K.III.3.2.- Alteraciones morfológicas**

En la intoxicación por CCl₄ se observa el despegue de los polisomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico y la ruptura de los polisomas (tanto de los polisomas libres como de los que estaban unidos a la membrana del RE). Como se indicó anteriormente, la proporción de ribosomas y polisomas libres en las células hepáticas es muy pequeña (un 20% del total). El resto de los polisomas están unidos a la membrana del RE (131).

Las células más afectadas son las de la zona centrolobulillar, lo que se corresponde con que sea la zona hepática donde se produce la activación del CCl₄ (131, 69).

El efecto es muy rápido, se empieza a observar la degranulación del retículo endoplásmico rugoso a los 10 minutos de intoxicación. A los 40 minutos casi todos los polisomas están en forma de ribosomas libres (177, 79, 7, 69, 178, 179).

Los antioxidantes no previenen la ruptura de los polisomas (10, 178).

➤ **I.K.III.3.3.- Alteración de la incorporación de un aminoácido a proteínas**

Las alteraciones morfológicas recién indicadas se corresponden con un descenso de la actividad de síntesis proteica (14).

En sistemas *in vitro* se ha determinado que microsomas y ribosomas de ratas intoxicadas con CCl₄ mostraban una marcada disminución de la capacidad de incorporación de aminoácidos marcados a proteínas con respecto a los controles (180, 131, 181, 69).

El efecto del CCl₄ sobre la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas es similar *in vivo* y en sistemas de síntesis proteica *in vitro* (sistemas reconstituidos y cortes de hígado) (182, 131, 10). Así, se ha observado una disminución en la incorporación de un aminoácido *in vivo* a proteínas hepáticas y a proteínas plasmáticas sintetizadas en el hígado (por ejemplo a albúmina y fibrinógeno) (69, 182).

El CCl₄ causa alteraciones en la incorporación de leucina marcada a las proteínas microsomales, mitocondriales y citosólicas de hígado de rata (77). En todos los casos el efecto

es mayor a la hora de intoxicación, siendo más importante en el caso de las proteínas microsomales. A las dos horas se observa un comienzo de recuperación de la incorporación en el caso de las proteínas microsomales pero no en el de las citosólicas y mitocondriales (77).

La incorporación del aminoácido a las proteínas mitocondriales se recupera a las 6 horas de intoxicación, en tanto que la incorporación a las citosólicas y a las microsomales no se recupera totalmente en ese tiempo (77).

➤ I.K.III.3.4.- Efecto del CCl_4 sobre componentes de la maquinaria de síntesis proteica

Por ser la síntesis de proteínas un sistema complejo, las alteraciones causadas por el CCl_4 podrían suceder en varias de sus múltiples etapas. Se ha estudiado el efecto del CCl_4 sobre muchas de dichas etapas.

Así, el CCl_4 no altera la entrada de aminoácidos al hígado, la reserva de aminoácidos del hígado ni la liberación de proteínas a la sangre. Tampoco se ven dañados en la intoxicación por CCl_4 los sistemas de activación y de transferencia de aminoácidos (182).

En la intoxicación por CCl_4 no resultan afectados los contenidos de ARN y ADN, así como tampoco se produce la alteración de la actividad de ARNasa o de la ADN polimerasa (177, 182). No se detectó unión a ARN ribosomal *in vivo* en ratas (178). El daño al ADN parecería no estar involucrado en el efecto sobre la síntesis de proteínas (183).

En lo referente al mensajero, el CCl_4 no causa la alteración de los niveles del mismo ni de su síntesis (182, 177). No se encontraron diferencias en la metilación de los poli(A)⁺mARN ni en los tARN (180). Estas fracciones parecerían ser funcionales de acuerdo a los experimentos de translación *in vitro* de los mARN, lo que sugiere un cap normal del mARN y una actividad normal de los factores que soportan la síntesis proteica (180).

Se ha determinado la unión covalente de metabolitos reactivos del CCl_4 a proteínas de ribosomas libres y unidos (73).

Temprano en la intoxicación por CCl_4 se produce una importante reducción de la metilación al nivel de la 2'-O-ribose del ARN ribosomal, lo cual llevaría a una disminución de la capacidad sintética de los ribosomas aislados (180, 69). La disminución de la metilación del rARN no parecería ser causada por una disminución de la metilación nucleolar del pre-rARN ni en la maduración subsecuente (180, 69). Se produce una restauración parcial de la funcionabilidad de los ribosomas alterados por el CCl_4 cuando se los incuba en un medio que permita que sean metilados (180, 69). Se ha sugerido que el aumento transitorio del calcio causado por CCl_4 podría activar demetilases o proteasas que destruyeran metilasas (69).

I.K.III.4.- OTROS EFECTOS DEL CCl_4 SOBRE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

➤ **I.K.III.4.1.- Introducción**

El CCl_4 tiene, además del ya indicado de alteración de la síntesis proteica, otros efectos sobre las proteínas, los cuales se indican a continuación.

➤ **I.K.III.4.2.- Alteración de la variedad de proteínas sintetizadas**

En la intoxicación por CCl_4 se producen importantes cambios en la variedad de proteínas celulares (184); en el caso de algunas proteínas se produce un aumento en la cantidad mientras que se produce una disminución en el caso de otras. También se ha detectado la formación de proteínas distintas de las normalmente presente. Sorpresivamente no existen importantes cambios en las proteínas del retículo endoplásmico, aunque hay que tener en cuenta que en el tipo de ensayo realizado no es posible detectar los citocromos P450 (184).

➤ **I.K.III.4.3.- Efectos del CCl_4 sobre aminoácidos**

En sistemas *in vitro* se ha determinado que se produce la unión covalente de productos del CCl_4 a muchos aminoácidos (pero no a todos), siendo la marca más intensa sobre cisteína, tirosina y triptófano (10, 185). Se afectan aminoácidos críticos para la célula, lo que podría resultar en la alteración de las actividades de varias enzimas, por ej. grupos tioles de varias enzimas: fosfogliceraldehído deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa; residuos de serina de varias proteasas tal como quimotripsina; residuos de histidina y tirosina de pepsina, colinesterasa. También se produce la oxidación de la metionina (10).

En sistemas químicos en los que el CCl_4 fue activado con peróxido de benzoílo y empleando el mismo CCl_4 como solvente, se ha determinado la alteración de los aminoácidos fenilalanina, tirosina, prolina, hidroxiprolina (14, 186- 189). Se estudió también el efecto del CCl_4 sobre el triptófano, pero no empleando peróxido de benzoílo porque lo descompone (83).

En todos los casos se detectaron alteraciones de los aminoácidos ensayados, con formación de iminoderivados en algunos de ellos. La mayoría de las reacciones podrían haberse originado por abstracción de un hidrógeno, seguida de oxidación y/o ruptura (14).

I.K.III.5.- EFECTO DE CCl_4 SOBRE LA HOMEOSTASIS CÁLCICA

➤ I.K.III.5.1.- Introducción

Existe amplia evidencia de que en la intoxicación por CCl_4 se produce la alteración de la homeostasis cálcica. Se considera que alteraciones funcionales producidas durante la etapa temprana de la intoxicación podrían llevar a los desarreglos de la homeostasis cálcica de la etapa tardía, los cuales serían causantes de la muerte celular (11, 79, 6, 1, 14, 65).

Al poco tiempo de intoxicación se produce un aumento transitorio de los niveles de calcio citosólico, el cual se debería a una redistribución del calcio intracelular. Se recuperan rápidamente los niveles normales, los que se mantienen hasta la etapa tardía, en la cual se produce un aumento paulatino pero muy importante del calcio, siendo la acumulación de calcio mucho mayor que en la primera etapa (69, 79, 72). A las 12 horas de intoxicación la cantidad total de calcio en el hígado es tres veces la de un hígado normal, en tanto que a las 24 h es 15 veces mayor, luego de lo cual comienzan a recuperarse los niveles normales (164).

➤ I.K.III.5.2.- Alteración de los niveles intracelulares de calcio

Como ya ha sido indicado, uno de los primeros lugares afectados en la intoxicación por CCl_4 es el retículo endoplásmico. Los metabolitos reactivos del CCl_4 causan la inhibición de la bomba de calcio del retículo endoplásmico, disminuyendo su capacidad para secuestrar calcio (1, 14, 69). La bomba de captación de calcio y el sistema de activación del CCl_4 están cerca uno del otro en la membrana del RE (116).

La inhibición de la bomba de calcio ya se manifiesta a los 3 minutos de intoxicación, estando severamente inhibida a los 30 minutos (164).

También se ven afectados en la intoxicación por CCl_4 los canales de calcio del retículo endoplásmico dependientes de IP_3 y de rianodina, lo cual lleva a una liberación de calcio hacia el citosol (106, 11).

En esta etapa la bomba de calcio de la membrana plasmática y la de la mitocondria no son afectadas. La bomba de calcio de la membrana plasmática se ve afectada en las etapas tardías, mientras que la de la mitocondria no se afecta en las primeras 24 h de intoxicación (79, 164). Las mitocondrias son capaces de acumular calcio en forma dependiente de ATP ya que en ese momento no están afectadas (164, 79, 72, 69). Cuando la ATPasa de la membrana plasmática no puede excluir el calcio en la etapa tardía y la capacidad de toma de calcio por las mitocondrias no es suficiente para compensarlo comienza a haber un aumento del calcio citosólico (69).

El calcio que se va acumulando en la mitocondria termina afectando su

funcionamiento, inhibiendo la fosforilación oxidativa mitocondrial; la consiguiente falta de energía causaría que la mitocondria no pudiera acumular más calcio, produciéndose un aumento muy importante del calcio citosólico. En los últimos estadios de la intoxicación se produce la liberación de calcio por las mitocondrias (3).

➤ ***I.K.III.5.3.- Posible relación con sulfhidrilos proteicos***

Como se indicó anteriormente, tanto la bomba de calcio como los canales de calcio del retículo endoplásmico son proteínas sulfhidrúlicas de membrana. La bomba de calcio está activada cuando sus grupos sulfhidrilo están reducidos en tanto que se produce la apertura de los canales de calcio cuando sus grupos sulfhidrilo están oxidados (3, 114, 106, 116).

Ha sido sugerido que los metabolitos reactivos del CCl_4 podrían causar la oxidación de los grupos tioles de las proteínas, lo que causaría la inhibición de la bomba de calcio y la apertura de los canales de calcio, causando un aumento del calcio en el citoplasma (14, 106).

En el caso de las mitocondrias, como antes se indicó, la bomba de calcio pese a ser sulfhidrúlica no se ve afectada en la intoxicación por CCl_4 , lo que coincide con que las mitocondrias sean funcionales en la toma de calcio hasta tarde en la intoxicación (3).

Se sabe que sustancias que protegen grupos tioles como el tetraacetato de ditioneitol (el cual genera ditioneitol *in vivo*) son buenas protectoras en la intoxicación por CCl_4 (190).

Por otra parte, compuestos sulfhidrúlicos como glutatión, cistamina, dietilditioncarbamato protegerían contra una dosis letal de CCl_4 (7).

➤ ***I.K.III.5.4.- Producción de daño por alteración de la homeostasis cálcica***

El aumento de calcio citoplasmático produciría procesos degradativos de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos que podrían ser responsables de la muerte celular (3, 14, 69).

Se sabe que los metabolitos reactivos del CCl_4 activan a la fosfolipasa A_2 , lo cual sería crítico para la toxicidad del CCl_4 (79, 54). También es activada por los metabolitos del CCl_4 la fosfolipasa C (79), la cual juega un papel importante en el control de la división y la proliferación celular así como en muchas otras funciones celulares (85). Tanto la fosfolipasa A_2 como la C participarían, entre otras cosas, en la degradación irreversible de la membrana plasmática, lo que explicaría la pérdida de la selectividad de la membrana plasmática hacia el calcio pese a no estar afectada su bomba de calcio. El que la fosfolipasa A_2 esté involucrada en la degeneración de la membrana plasmática se correlaciona con que la pérdida de su

funcionalidad se corresponda con el aumento de los lisofosfátidos (productos de la acción de la fosfolipasa A₂) y no con la peroxidación de lípidos (que sucedería previamente) (79).

Como se indicó anteriormente, la acumulación de calcio es dañina para la mitocondria, provoca el desacople de la fosforilación oxidativa, causando así la disminución del ATP y la muerte celular. Esto podría causar una falla energética, que llevaría a la necrosis hepática. También cooperaría la liberación de enzimas lisosomales (3).

Se observan también alteraciones en los niveles y distribución intracelular de la calmodulina, por lo que parte del daño causado por el CCl₄ podría ser debido a ella (6, 11). Muchas activaciones celulares son mediadas por calmodulina. Agentes farmacológicos que se unen a la calmodulina (trifluorperazina e imipramina) previenen la necrosis 6 y 10 horas después de la intoxicación (6, 14).

En la intoxicación por CCl₄ se observa el "blebbing" de la membrana del hepatocito, el cual podría deberse a alteraciones en la concentración de calcio. También se podría ver alterado el transporte intracelular y la salida de sustancias del hepatocito (69).

Agentes quelantes de calcio (sulfato de alizarina sódica, calcio y arsenazo III), anticalmodulina, bloqueantes de canales de calcio, así como inhibidores de la fosfolipasa A₂ (quinacrina y clorpromazina) o de proteasas (PMSF y tosilclorometilcetona) resultaron ser eficientes protectores contra la necrosis causada por el CCl₄ (3, 14).

I.K.III.6.- OTROS EFECTOS

En la intoxicación por CCl₄ también se produce la inducción de la expresión de protooncogenes como c-fos y c-jun, jun B, jun D y p53 entre otros, en patrones semejantes a los obtenidos después de una hepatectomía parcial. Estas inducciones podrían estar relacionadas con la regeneración hepática o con el posible desarrollo de cáncer (14, 191).

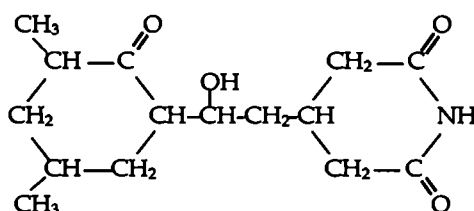
Se observan en la intoxicación por CCl₄ alteraciones de las comunicaciones intercelulares. Así, ha sido determinado el bloqueo reversible de los nexus intercelulares (lo cual ya se observa a los 10 minutos de intoxicación), lo que aislaría los hepatocitos afectados de sus vecinos sanos. No habría una alteración semejante de las uniones fuertes (69, 79).

I.L.- MISCELÁNEAS

Se indican aquí brevemente algunas de las características de los sistemas y sustancias empleados en este Trabajo de Tesis, considerando, de ser posible, su relación con el CCl₄.

➤ I.L.I.-Cicloheximida

La cicloheximida (CHX) es un antibiótico obtenido del *Streptomyces griseus*, capaz de inhibir la síntesis de proteínas en sistemas libres de células, células en cultivo y animales enteros (192, 193).



La CHX inhibe la actividad de la aminoaciltransferasa de la subunidad ribosomal 60S (la cual es rápidamente inactivada a través de sus grupos sulfhidrilos), por lo que se inhibe la traslocación de los ribosomas a lo largo del mensajero, se estabilizan los complejos polisomales, previniéndose la ruptura de los polisomas. La CHX no induce la ruptura del mRNA ni la separación de los ribosomas (194, 192, 193, 124, 100).

En lo que respecta a su efecto en la intoxicación por CCl₄, la CHX previene parcialmente la ruptura de los polisomas causada por el CCl₄ (179).

La CHX no altera la llegada del CCl₄ al hígado, ni las actividades del citocromo P450 o a la citocromo P450 reductasa. Tampoco modifica la destrucción de citocromo P450 causada por el CCl₄. No se ve alterada la peroxidación de lípidos causada por el CCl₄ ni la unión covalente a proteínas y lípidos, lo que indicaría que no se vería afectada la activación del CCl₄ (195, 194).

➤ I.L.II.- Radiación Ultravioleta

La luz ultravioleta (UV) es una radiación electromagnética no ionizante que corresponde al rango de longitudes de onda entre 100 nm a 400 nm (196, 197).

La UV se clasifica a menudo en: UVA: 315-400 nm; UVB: 280-315 nm y UVC: 100-280 nm, aunque otras longitudes de onda son también utilizadas (196, 197).

Las reacciones que la luz UV pueda causar sobre una molécula dependen de la estructura química de la misma, de la longitud de onda de luz UV empleada y de las

condiciones en que ocurra la reacción. La sustancia inicialmente absorbe un fotón, generándose un estado excitado que decae generalmente a especies reactivas o radicales libres (197, 196).

En este Trabajo de Tesis se utiliza la luz ultravioleta de 254 nm, longitud correspondiente a luz UVC, por lo que sólo se indicarán los efectos debidos a esta radiación.

➤ I.L.II.1.- Luz UVC

La luz UVC es capaz de causar alteraciones sobre el ADN, produce la ruptura de las cadenas de ADN, mutaciones (transiciones, transversiones, cambios dobles de bases, cambios del marco de lectura), así como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas, formación de dímeros de timina o citosina y de timina-citosina. Es además capaz de activar genes de mamíferos, por ejemplo, el que codifica para metalotioneínas, así como los de virus, causando en este último caso una evolución más rápida de la enfermedad (198, 199, 196).

Las proteínas absorben en el rango de longitudes de onda correspondiente a la luz UVC, pese a lo cual no se ha estudiado mucho el efecto de dicha radiación sobre las mismas (196, 197, 199).

Las capas de células muertas de la piel humana absorben la luz UVC de tal manera que sólo el 1% de la radiación UVC puede penetrar la epidermis (196, 197).

La radiación UVC es absorbida en la estratósfera por la capa de ozono, por lo cual no llega a la superficie terrestre (199, 197).

Se produce radiación UVC en muchos procesos industriales, con el consiguiente riesgo de exposición de los trabajadores. Las posibles fuentes de UVC artificiales incluirían: soldadura eléctrica de arco de plasma; el curado y secado de tintas, resinas, plásticos y pinturas; impresión, artes gráficas y copiado (usando procesos fotográficos); fotografía; fotograbado; lámparas empleadas en medicina; trabajo científico de laboratorio; curtido. También se produce luz UVC (por lo que se utilizan filtros que impiden su emisión) en lámparas de iluminación fluorescente y de escritorio y otras iluminaciones que incorporen lámparas de tungsteno halógenas (196, 197).

Las lámparas germicidas emiten el 95% de la luz que irradian a una longitud de onda de 254 nm, correspondiente, como se indicó anteriormente, a la radiación UVC (196, 197).

Como ha sido mencionado anteriormente, la luz ultravioleta C es capaz de activar al CCl_4 al radical $\cdot\text{CCl}_3$, con generación del radical $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ si hay oxígeno presente (80, 81).

➤ **I.L.III.- Albúmina de huevo**

La albúmina de huevo u ovoalbúmina es una proteína de estructura química bien conocida. Es un monómero de peso molecular de 45.000 (determinado por métodos físicos), con una composición aminoacídica común. Su grupo N-terminal está bloqueado por un grupo acetilo. Tiene un único grupo oligosacárido, formado por dos N-acetil-glucosamina y cuatro manosas, con un número variable de residuos de los mismos azúcares unido a una asparragina (200-202).

Posee cuatro residuos de cisteína y un puente disulfuro, supuestamente entre la Cis-73 y la Cis-120, aunque podría existir un intercambio con la Cis-382 (200, 201).

La albúmina de huevo ha sido empleada en el estudio del efecto de HOCl/OCl⁻ (formados durante la estimulación de neutrófilos) y de los radicales libres HO[•] y de HO[•]/O₂[•] sobre proteínas (202, 147).

La albúmina de huevo posee asociados ácidos grasos libres, los cuales pueden ser removidos con la técnica indicada en Materiales y Métodos (203, 204).

➤ **I.L.IV.- α-Tocoferol**

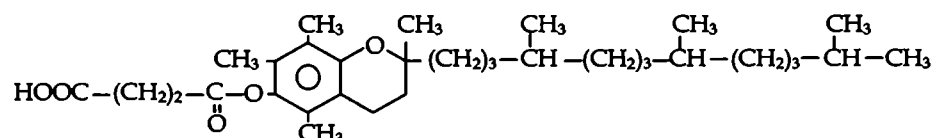
Los efectos generales del α-tocoferol se describieron en el capítulo correspondiente a defensas celulares, aquí sólo se describen los relacionados con el CCl₄.

El α-tocoferol es capaz de inhibir parcialmente la necrosis causada por el CCl₄. La suplementación con vitamina E es protectora en la intoxicación por CCl₄ (6). Este antioxidante es capaz de atrapar los radicales CCl₃O₂[•] eficientemente, así como de evitar el ataque de los metabolitos reactivos del CCl₄ sobre la citosina (14, 204).

El α-tocoferol tiene un efecto protector parcial sobre la alteración de la síntesis proteica causada por el CCl₄ o el CBrCl₃ (183).

➤ **I.L.V.- Hemisuccinato de α-tocoferol**

El hemisuccinato de α-tocoferol (sαT) es un derivado del α-tocoferol en el cual el hidroxilo del anillo aromático está esterificado con ácido succínico.



Este derivado del αT es más hidrosoluble que el αT, lo que le permitiría llegar más fácilmente a las membranas celulares. La distribución celular del sαT y del αT sería distinta

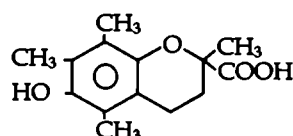
(205).

El α T no tiene capacidad antioxidante por sí misma, sino que debe ser clivada por esterasas celulares para poder dar α T. El principal lugar de hidrólisis del succinato de α T sería en los microsomas (205).

El α T es mejor protector contra los efectos hepatotóxicos del CCl_4 que el mismo α T; no se conoce la razón de esta mayor efectividad (205).

➤ I.L.VI.- Trolox

El Trolox (ácido 2-carboxi-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilmcromano) es un análogo sintético del α -tocoferol, en el cual la cadena poliprénica ha sido reemplazada por un grupo carboxilo, haciéndolo más hidrosoluble que el α T (59, 65, 94).

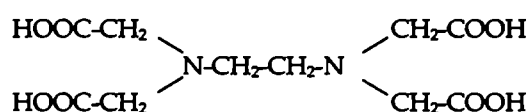


El Trolox es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos causada por el NADPH. Por otra parte, este antioxidante es capaz de inhibir reacciones en cadena en proteínas (41, 94).

El Trolox, al igual que el α -tocoferol, es capaz de inhibir el ataque de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la citosina, siendo la efectividad de ambos antioxidantes similar (204).

➤ I.L.VII.- EDTA

El EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) es un complejante de metales, por ejemplo hierro.



El EDTA es capaz de inhibir *in vitro* la peroxidación de lípidos causada por el NADPH (206, 7, 41, 49).

También es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 *in vitro* (206, 7, 41).

II.- OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo de Tesis fue el de estudiar algunos de los posibles efectos del CCl_4 y de sus metabolitos reactivos sobre las proteínas.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Verificar si en la intoxicación por CCl_4 se afecta la incorporación de un aminoácido marcado (leucina) a proteínas nucleares, comparándolo con el efecto del CCl_4 sobre las proteínas microsomales hepáticas totales. La alteración en la incorporación de un aminoácido a proteínas podría, por ejemplo, llevar a una alteración de las funciones nucleares regulatorias de la actividad celular.

De determinarse lo anterior, comprobar si lo mismo sucede en las distintas fracciones proteicas nucleares.

2.- Verificar en un sistema químico modelo de generación de $\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ si estos radicales son capaces de oxidar a una proteína, la albúmina de huevo, determinando dicha oxidación por la formación de grupos carbonilos en la misma.

Estudiar si este proceso guarda relación con los lípidos presentes naturalmente en la albúmina nativa, lo cual permitiría inferir si los metabolitos reactivos del CCl_4 podrían actuar directamente o si sería necesaria la presencia de lípidos.

Mediante el uso de distintas atmósferas (nitrógeno y aire) determinar la contribución de cada uno de los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Analizar si la formación de grupos carbonilos en las proteínas es prevenible por antioxidantes.

Estudiar utilizando un quelante de metales, el EDTA, si los mismos podrían contribuir a la formación de grupos carbonilos por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

3.- Determinar en sistemas enzimáticos de activación del CCl_4 si los radicales libres generados por el tóxico son capaces de formar grupos carbonilos en proteínas.

Se utilizarán distintas fracciones subcelulares como sistema de activación: microsomas, fracciones nucleares, mitocondriales y citosol. Esto permitiría determinar qué fracciones subcelulares podrían estar afectadas vía este mecanismo y poder estudiar el mecanismo de formación de dichos grupos carbonilos.

De dar positiva alguna de ellas se estudiaría la acción de antioxidantes y distintas

atmósferas por las razones indicadas en el punto anterior.

Se analizaría además el efecto del EDTA como inhibidor de la peroxidación de lípidos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4

4.- Determinar si el tóxico puede causar la formación de grupos carbonilos *in vivo*, utilizando ratas macho Sprague-Dawley, lo que permitiría verificar que dicha alteración química de las proteínas podría ser un mecanismo de la toxicidad del CCl_4 .

5.- Verificar en los sistemas químicos de generación de $\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ a partir de CCl_4 , si dichos radicales libres conducen a una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas.

De ser así, se estudiaría el fenómeno de la manera indicada para el estudio de los grupos carbonilos en el sistema químico.

6.- Utilizando el sistema químico con albúmina de huevo y cisteína, determinar la posible formación de productos volátiles, estudiándose los mismos por cromatografía gaseosa. De esta manera se podría evidenciar si aminoácidos o proteínas son capaces de ceder átomos de hidrógeno o de realizar reacciones de ruptura.

De resultar positiva la acción sobre la albúmina de huevo, se estudiaría el efecto de antioxidantes sobre la formación de compuestos volátiles.

7.- Estudiar si ocurren alteraciones en el contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas de distintas fracciones subcelulares. La alteración del contenido de grupos sulfhidrilos en dichas proteínas podrían ser causante, por ejemplo, de la pérdida de actividad de proteínas celulares, por ejemplo, las bombas de calcio.

De dar positiva alguna de ellas se estudiaría el efecto de distintas atmósferas, antioxidantes y EDTA sobre la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas por las razones antes dichas.

III.- MATERIALES **Y MÉTODOS**

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Básicamente, dos clases de estudios fueron realizadas en este Trabajo de Tesis:

- incorporación de un aminoácido marcado a proteínas
- determinación de alteraciones químicas en proteínas.

Algunos de estos estudios tienen técnicas en común, por lo Materiales y Métodos fue dividido en tres partes:

III.A.- Materiales y Métodos Generales

III.B.- Técnicas empleadas en el estudio del efecto del CCl₄ sobre la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas

III.C.- Técnicas empleadas en el estudio de alteraciones químicas causadas por el CCl₄ en proteínas y aminoácidos.

A continuación se desarrollan los temas indicados.

III.A.- MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

III-A.I.- MATERIALES

➤ III.A.I.1.- Sustancias químicas

El CCl₄, de bajo contenido de azufre, utilizado en los experimentos fue adquirido en la firma Mallinckrodt (USA). El CBrCl₃ (triclorobromometano) fue provisto por Aldrich (USA).

La L-[¹⁴C(U)]-Leucina, con actividad específica 351,6 mCi/mmol, fue provista por New England Nuclear (USA).

Las siguientes sustancias fueron adquiridas en Sigma Chemical Company (USA): α-tocoferol, albúmina de huevo, DL-isocitrato de sodio tipo I, EDTA (ácido etilendiamino

tetraacético, sal disódica), Folin & Ciocalteu, guanidina (clorhidrato de aminometanoamidina), hemisuccinato de α -tocoferol, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico), PPO (2,5-difeniloxazol), sacarosa, sal sódica de NADP⁺ (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada), Tris ((hidroximetil) aminometano).

Fueron compradas a la firma Aldrich (USA) las sustancias siguientes: Trolox (ácido 2-carboxi-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)).

Fue obtenido en Riedel-deHaën: 2,4-dinitrofenilhidracina.

Todos los demás productos químicos empleados fueron de la mejor calidad disponible.

➤ III.A.I.2.- Equipamiento

Los equipos empleados fueron los siguientes:

- .- Baño termostático Dubnoff con agitador.
- .- Centrífuga Damon modelo B-20A. International Equipment Company (IEC).
- .- Centrífuga de mesada modelo 350T. RB. Rolco.
- .- Contador de centelleo líquido RackBeta 1214. Pharmacia Wallac O.Y. Finlandia.
- .- Cromatógrafo Hewlett Packard, modelo HP 5890, Serie II, con detector de ionización de llama.
- .- Desintegrador modelo Omni-Mixer. Servall, USA.
- .- Espectrofotómetro de simple haz Gilford 240.
- .- Estufa BS 2648 Chadwell Heath Essex. Baird Tatlock London Ltd. (England).
- .- Fotocolorímetro Klett-Summerson. Klett M. F. G. Company. USA.
- .- Guillotina Harvard.
- .- Homogeneizador de teflón/vidrio tipo Potter-Evehjem.
- .- Jeringa para gases de 250 μ l Hamilton 1725 N, punta 5. Alltech, USA.
- .- Lámpara UVC Cole-Parmer 9815, de longitud de onda 254 nm e intensidad 100 W.
- .- Microcentrífuga Centra-M centrifuge. International Equipment Company (ICE).
- .- Ultracentrífuga Beckman modelo L.
- .- Ultracentrífuga Beckman modelo LS-75.
- .- Vortex super mixer 1291. Lab Line Instruments. Inc. Mel Rose Park Ill. USA.

➤ **III.A.I.3.- Animales**

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley exocriadas.

Los animales fueron criados en condiciones controladas:

- .- temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,
- .- humedad relativa de 45-65%,
- .- régimen de iluminación de 12 h (con luz desde las 6 hasta las 18 h).

Se utilizaron animales de peso entre 220 y 240 g para los experimentos de incorporación de un aminoácido marcado (serie III.B), debido al empleo de sustancias radioactivas.

En los experimentos de determinación del contenido de grupos carbonilos y sulfhidrilos (serie III.C) los animales usados pesaron entre 240 y 300 g.

En todos los casos los animales fueron ayunados, con libre acceso al agua, 12-14h antes del tratamiento en los experimentos *in vivo* o antes del sacrificio en los experimentos *in vitro*.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación en todos los casos.

III.A.II.- MÉTODOS

➤ **III.A.II.1.- Obtención de fracciones subcelulares**

Las técnicas de aislamiento de fracciones subcelulares empleadas en este Trabajo de Tesis se indican a continuación.

Los procesos se llevaron a cabo en frío en todos los casos ($2-4^{\circ}\text{C}$).

➤ **III.A.II.1.1.- Obtención de núcleos altamente purificados**

Los núcleos fueron obtenidos de acuerdo a la técnica de Viviani y col. (207). Luego del tratamiento correspondiente se sacrificaron los animales, se les extrajeron los hígados y a cada uno se le aplicó la técnica que se indica a continuación, la cual está representada en la figura III.1.

El hígado entero se extrae rápidamente y se lava dos veces con STKM 0,25 M. TKM es una solución de Tris 50 mM, KCl 2,5 mM y MgCl_2 5 mM llevada a pH 7,5 con HCl. STKM es una solución de sacarosa de la concentración indicada en TKM.

El hígado extraído se homogeneiza en un volumen de STKM 0,25 M correspondiente

a 3 veces su peso. El homogenato se filtra simultáneamente a través de dos capas de gasa y una tela de nylon (100 mesh).

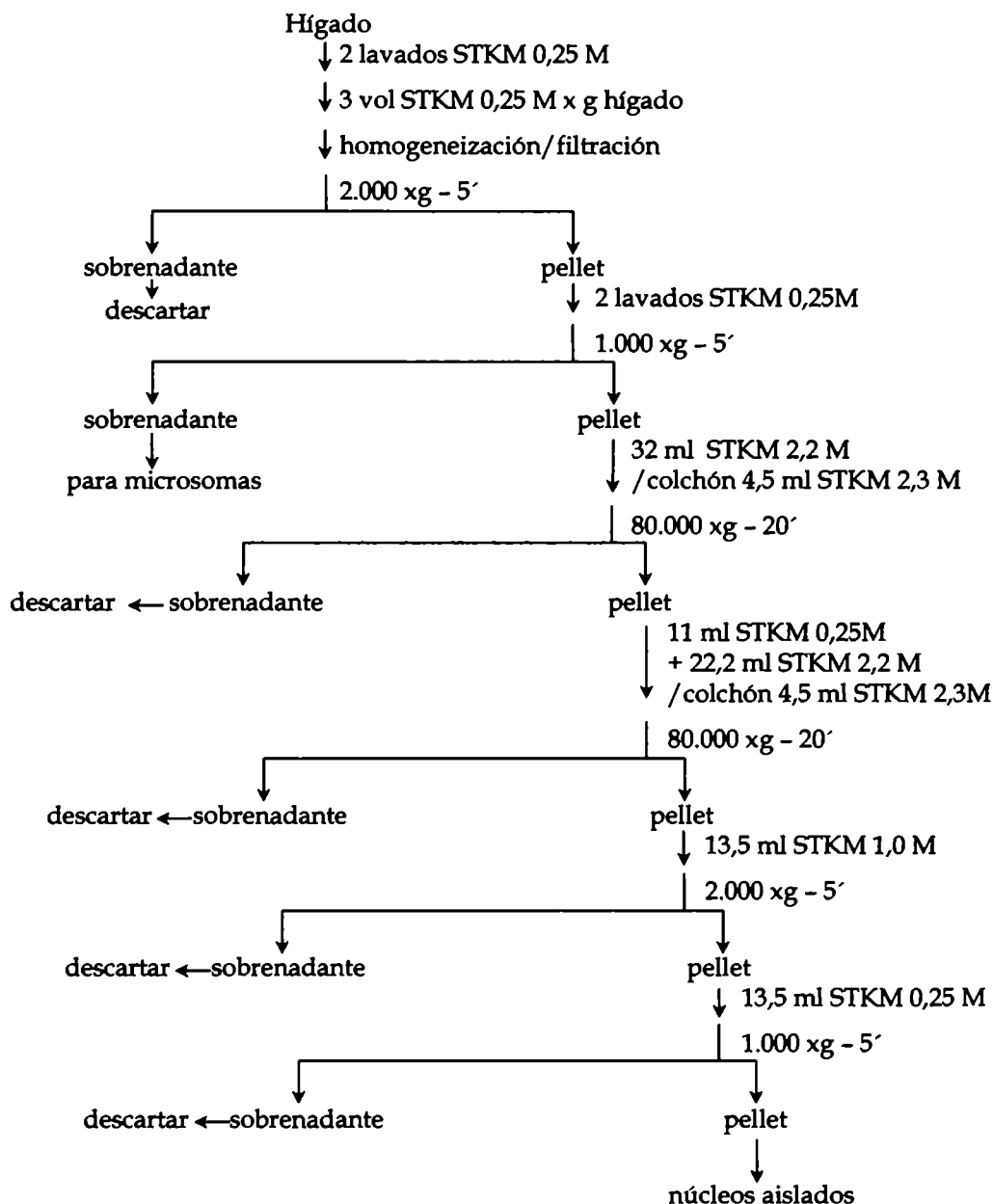


Figura III.1: Técnica de aislamiento de núcleos

El filtrado se centrifuga a 2.000 xg durante 20 minutos en tubos de polipropileno. El sobrenadante se reserva (de ser necesario) para el aislamiento de microsomas. El pellet obtenido se lava dos veces con 36 ml de STKM 0,25 M por resuspensión y centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos.

El pellet resultante se resuspende en 32 ml de STKM 2,2 M y se deposita sobre un colchón de STKM 2,3 M (ultracentrifugación en gradiente discontinuo). Se ultracentrifuga durante 20 minutos a 80.000 xg, se decanta el sobrenadante y se limpia el interior del tubo

con una gasa. El pellet se lava suavemente con 4,5 ml de STKM 0,25 M (cuidando de no resuspenderlo) y se limpia el tubo nuevamente con una gasa.

Se resuspende el pellet con 11 ml de STKM 0,25 M, se lo mezcla con 22,5 ml de STKM 2,2 M y se homogeneiza. El homogeneizado obtenido se vuelca sobre un colchón de 4,5 ml de STKM 2,3 M y se centrifuga nuevamente a 80.000 xg durante 20 minutos. Se descarta el sobrenadante y se limpia el tubo como se indicó anteriormente.

El pellet obtenido se resuspende en 13,5 ml de STKM 1,0 M, se centrifuga a 2.000 xg durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante.

Se resuspende el pellet en 13,5 ml de STKM 0,25 M y se centrifuga a 1000 xg durante 5 minutos.

El pellet resultante son los núcleos altamente purificados. La pureza e integridad de los núcleos obtenidos por esta técnica han sido comprobadas por microscopía de contraste de fase (para determinar posibles contaminaciones con retículo endoplásmico) y con marcadores enzimáticos (láctico deshidrogenasa para citosol e isocítrico deshidrogenasa para mitocondrias) (169).

► III.A.II.1.2.- Obtención de microsomas

Para la obtención de los microsomas (fracción subcelular que corresponde al retículo endoplásmico (124)) se usó la técnica de de Castro y col. (76), la cual es diferente de acuerdo a si se aíslan o no los núcleos al mismo tiempo.

Un esquema de los procedimientos seguidos se indica en la figura III.2.

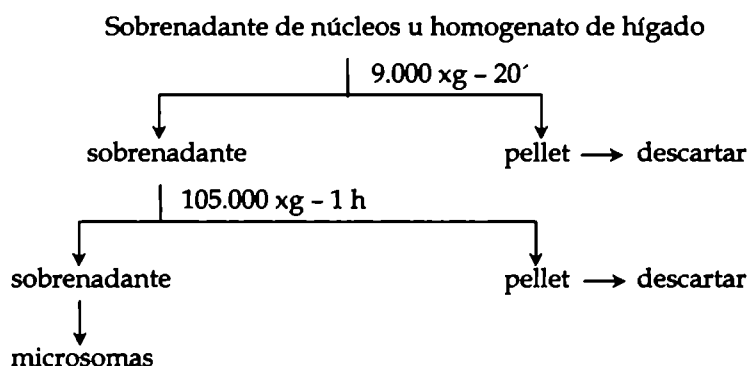


Figura III.2: Técnica de aislamiento de microsomas

La técnica empleada para la aislación de la fracción microsomal en el caso de obtenerse simultáneamente núcleos y microsomas fue la siguiente: el sobrenadante de la centrifugación a 2.000 xg (indicado en la técnica de núcleos como reservado para ser empleado en la aislación de la fracción microsomal) se centrifuga durante 20 minutos a 9.000

xg. Se toma el sobrenadante resultante con una jeringa, se lo introduce en tubos de ultracentrifugación adecuados y se lo centrifuga a 105.000 xg durante una hora. El pellet obtenido corresponde a la fracción microsomal.

En los experimentos donde no fue necesario el aislamiento simultáneo de los núcleos se utilizó la técnica siguiente: el hígado se homogeneiza en una solución de KCl 0,15 M (4 ml de KCl por gramo de hígado). El homogenato se centrifuga 20 minutos a 9.000 xg y el sobrenadante obtenido es ultracentrifugado de la manera indicada anteriormente.

► **III.A.II.1.3.- Obtención de fracción mitocondrial**

La fracción mitocondrial fue obtenida siguiendo la técnica de Sacchi y col. con modificaciones (208, 76, 77).

La técnica empleada (representada en la figura III.3) fue la siguiente: 8 g de hígado se homogeneizan con 32 ml de buffer sacarosa 0,25 M, Tris 2 mM, pH 7,6. El homogenato obtenido se centrifuga durante 15 minutos a 800 xg y se descarta el precipitado.

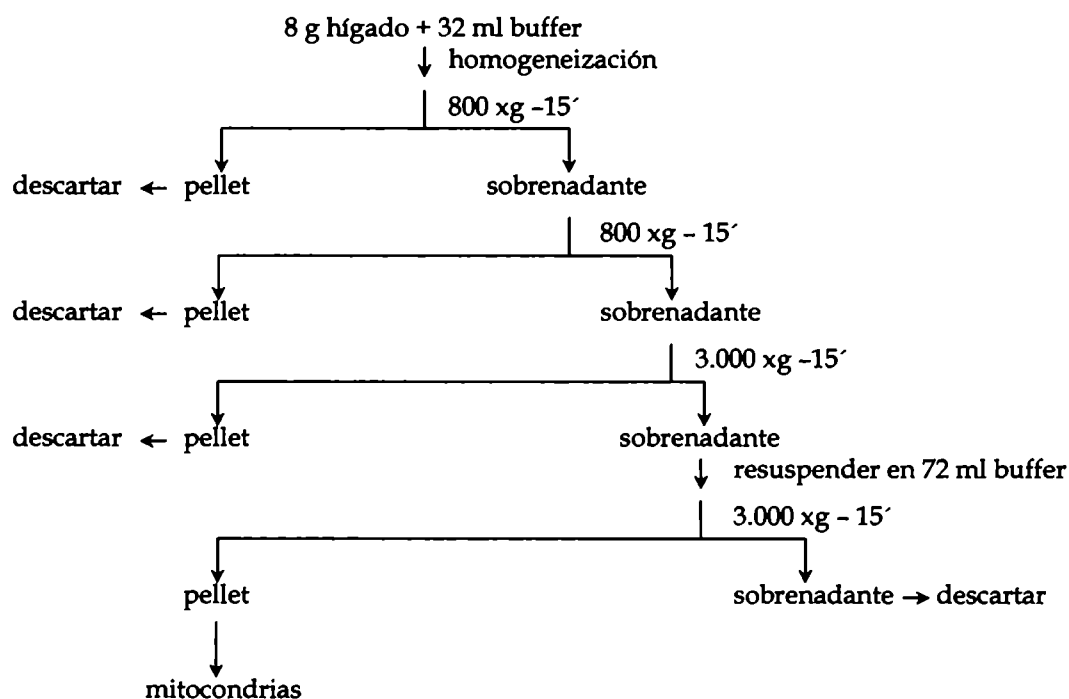


Figura III.3: Técnica de aislamiento de mitocondrias

El sobrenadante se centrifuga nuevamente a 800 xg durante 15 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se centrifuga a 3.000 xg durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante.

El pellet obtenido se resuspende en 72 ml del buffer de homogeneización y se

centrifuga a 3.000 xg durante 15 minutos.

El pellet resultante corresponde a la fracción mitocondrial purificada, la cual se ha establecido por microscopía electrónica y por la actividad de citocromo c reductasa (enzima marcadora de retículo endoplásmico) que puede tener una contaminación con retículo endoplásmico del 2% (76, 77).

➤ **III.A.II.1.4.- Obtención de fracción citosólica**

La fracción citosólica fue obtenida de acuerdo a la técnica de Masana y col. con modificaciones (209).

Un esquema de la técnica seguida es representado en la figura III.4.

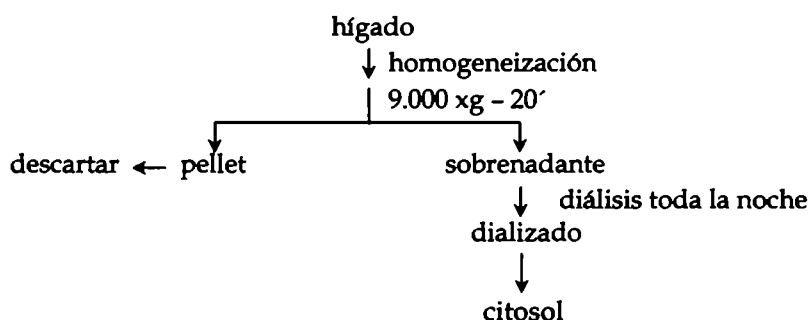


Figura III.4: Técnica de obtención de la fracción citosólica

La técnica usada es la siguiente: se sigue la técnica de aislación de microsomas sin obtención simultánea de núcleos hasta la ultracentrifugación.

El sobrenadante de la ultracentrifugación es dializado durante la noche en frío contra 2 l de buffer sacarosa 0,25 M, Tris 20 mM, pH 7,4. El dializado corresponde a la fracción citosólica.

➤ **III.A.II.2.- Determinación de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada por la técnica de Lowry (210), la cual utiliza el reactivo para fenoles de Folin & Ciocalteu.

La técnica empleada (representada en la tabla III.1) fue la siguiente: se toma un volumen de la muestra cuyas proteínas se quiere determinar y se lleva a un mililitro con

agua. El blanco correspondiente se realiza empleando un mililitro de agua.

Se le agregan a todos los tubos 4 ml de una solución formada por la mezcla de dos reactivos (solución C):

.- 50 ml del reactivo A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1N

.- 1 ml del reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5% en tartrato de sodio y potasio 1% (esta solución se prepara en el momento en que se va a usar).

Se esperan 10 minutos.

A cada tubo se le agrega 0,4 ml de una dilución 1 : 3 del reactivo de Folin & Ciocalteu. Se esperan 30 minutos.

	Blanco	Muestra
Muestra a ensayar	—	x ml
Agua destilada	1 ml	(1-x) ml
Solución C	4 ml	4 ml
Esperar 10 minutos		
Reactivo de Folin & Ciocalteu (1:3)	0,4 ml	0,4 ml
Esperar 30' - leer con filtro rojo en fotolorímetro		

Tabla III.1: Determinación de proteínas

La solución resultante se mide en un fotolorímetro con filtro rojo.

La concentración de proteínas se obtuvo a partir de una curva de calibración realizada en las mismas condiciones usando como proteína albúmina de huevo.

➤ III.A.II.3.- Estadística

Los test se realizaron usando el programa de computación Graph Pad Software (211).

El análisis estadístico se realizó utilizando el test de t desapareado o el test de t desapareado alternativo (test de Welch).

Ambos tests asumen que cada valor es independiente de los demás y que las poblaciones se distribuyen normalmente. Se empleó el test de t cuando las desviaciones estándar fueron similares en tanto que se empleó el test de Welch cuando las desviaciones estándar fueron diferentes.

En ambos casos el valor de p corresponde a un intervalo de confianza del 95%.

III.B.- TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL CCL₄ SOBRE LA INCORPORACIÓN DE UN AMINOÁCIDO MARCADO A PROTEÍNAS

En esta serie de experimentos se analizó el efecto del CCL₄ sobre la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas nucleares y microsomales hepáticas de rata *in vivo*.

Como aminoácido marcado se utilizó leucina radioactiva.

➤ III.B.I.- Dosis empleadas

Las dosis empleadas en los experimentos de incorporación de un aminoácido marcado a proteínas se indican a continuación.

.- **CCL₄:** El CCL₄ fue administrado intraperitonealmente (ip) como una solución al 20% (v/v) en aceite de oliva, en una dosis de 5 ml/kg (correspondiente a 1 ml CCL₄/kg rata). A los animales control se les aplicó aceite de oliva. Esta es una dosis clásica en la investigación de la toxicidad del CCL₄ (178, 77).

.- **Leucina:** La solución de leucina empleada fue preparada en solución fisiológica a partir de L-[¹⁴C(U)]-Leucina y leucina sin marcar, de manera tal de obtener una solución de actividad específica 30,3 mCi/mmol, de radioactividad 13,6 µCi/ml.

La solución de leucina (¹⁴C-Leu) así obtenida fue administrada ip en una dosis de 68,2 µCi/kg, la cual ha sido empleada en otros experimentos (77).

.- **Cicloheximida:** La cicloheximida fue administrada ip en una dosis de 1 mg/kg en solución fisiológica. A los animales control se les administró solución salina.

Esta dosis de cicloheximida es usualmente empleada (179).

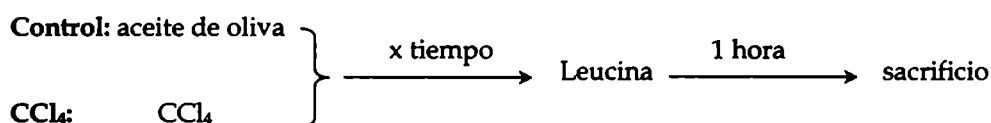
➤ III.B.II.- Tratamientos

Los tratamientos aplicados a los animales en el estudio del efecto del CCL₄ en la incorporación de un aminoácido marcado (leucina) a las proteínas nucleares y microsomales totales y a distintas fracciones proteicas nucleares se indican en esta sección.

► III.B.II.1.- Proteínas nucleares y microsomales totales

El esquema de administración de las sustancias a ensayar se representa a continuación, donde x representa el tiempo de intoxicación con CCl_4 previo a la aplicación de leucina marcada. Las dosis aplicadas son las recién indicadas.

Se aplicó primero el aceite de oliva (ratas control) o el CCl_4 y luego a distintos tiempos (1, 2 y 4 horas) se les administró la leucina marcada a todos los animales.



A la hora de aplicada la leucina se sacrificaron los animales, se les extrajeron los hígados, se aislaron los núcleos y los microsomas. A continuación se aislaron las proteínas totales de dichas fracciones, a las cuales se les determinó la radioactividad incorporada.

La cantidad de leucina total incorporada en las proteínas se calculó teniendo en cuenta la actividad específica de la solución de leucina empleada y la cantidad de radioactividad determinada en cada fracción proteica.

► III.B.II.2.- Fracciones proteicas nucleares

Se empleó el mismo esquema de tratamiento que en el caso de las proteínas totales, salvo que los tiempos de intoxicación fueron de 1 y 2 horas.

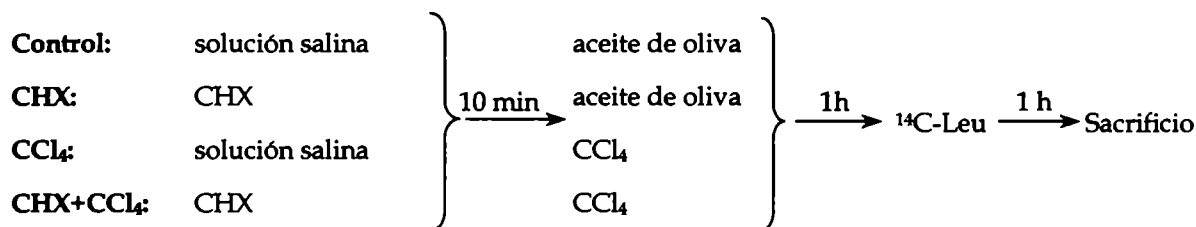
Después de sacrificar las ratas se aislaron los núcleos, se fraccionaron las proteínas nucleares con la técnica indicada más adelante, se determinó la radioactividad presente en cada una de las fracciones y se calculó la cantidad de leucina incorporada a cada una de ellas.

► III.B.II.3.- Pretratamiento con cicloheximida

La forma de administración de las distintas sustancias se indica en el esquema indicado en la página siguiente, donde la cicloheximida esta representada por CHX.

Las dosis empleadas son las indicadas anteriormente.

Los animales control recibieron solución salina, 10 minutos después aceite de oliva y 1 hora después la solución de leucina radioactiva.



Los animales correspondientes al grupo de la cicloheximida fueron tratados primero con ella, 10 minutos después recibieron aceite de oliva y una hora después el radioactivo.

Los animales del grupo del CCl₄ recibieron primero solución salina, 10 minutos después CCl₄ y una hora después la leucina marcada.

El grupo mezcla (CHX + CCl₄) recibió primero la CHX, a los 10 minutos el CCl₄ y una hora después la solución radioactiva.

Los animales fueron sacrificados una hora después de haber recibido la solución de leucina radioactiva, se extrajeron los hígados, se aislaron los núcleos y los microsomas, de los cuales se aislaron las proteínas totales. Se determinó la radioactividad incorporada a dichas proteínas y en función de ese valor se calculó la cantidad de leucina incorporada a cada una de ellas.

➤ **III.B.III.- Aislación de proteínas totales**

En la aislación de proteínas totales todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente, la técnica empleada fue la siguiente (170):

Los pellet de núcleos o de microsomas se resuspenden en 1 ml de STKM 0,25 M.

El resuspendido se trata con 6 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 10% (p/v) para precipitar las proteínas. Se deja reposar 10 minutos y se centrifuga 10 minutos a 3.000 xg.

Se decanta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 5 ml TCA 5%. Se calienta durante 30 minutos a 80-90 °C para eliminar los ácidos nucleicos, luego de lo cual se centrifuga a 3.000 xg durante 10 minutos. Todas las centrifugaciones siguientes se realizan en las mismas condiciones.

Se lava el precipitado 3 veces por resuspensión y centrifugación con 5 ml de TCA 5% (p/v) cada vez.

A continuación, para eliminar los lípidos y secar las proteínas, se lava por resuspensión y centrifugación sucesivamente con 5 ml de las siguientes soluciones:

- .- etanol : éter etílico : cloroformo (2:2:1),
- .- acetona,

.- éter etílico.

Las proteínas así obtenidas se secan en estufa toda la noche a 40 °C y a continuación se les determina la radioactividad incorporada.

➤ III.B.IV.- Fraccionamiento de proteínas nucleares

Para el fraccionamiento de las proteínas nucleares se usó la técnica de Steele y Busch con modificaciones (142, 170), la cual parte de núcleos aislados y procede según se describe a continuación (figura III.5).

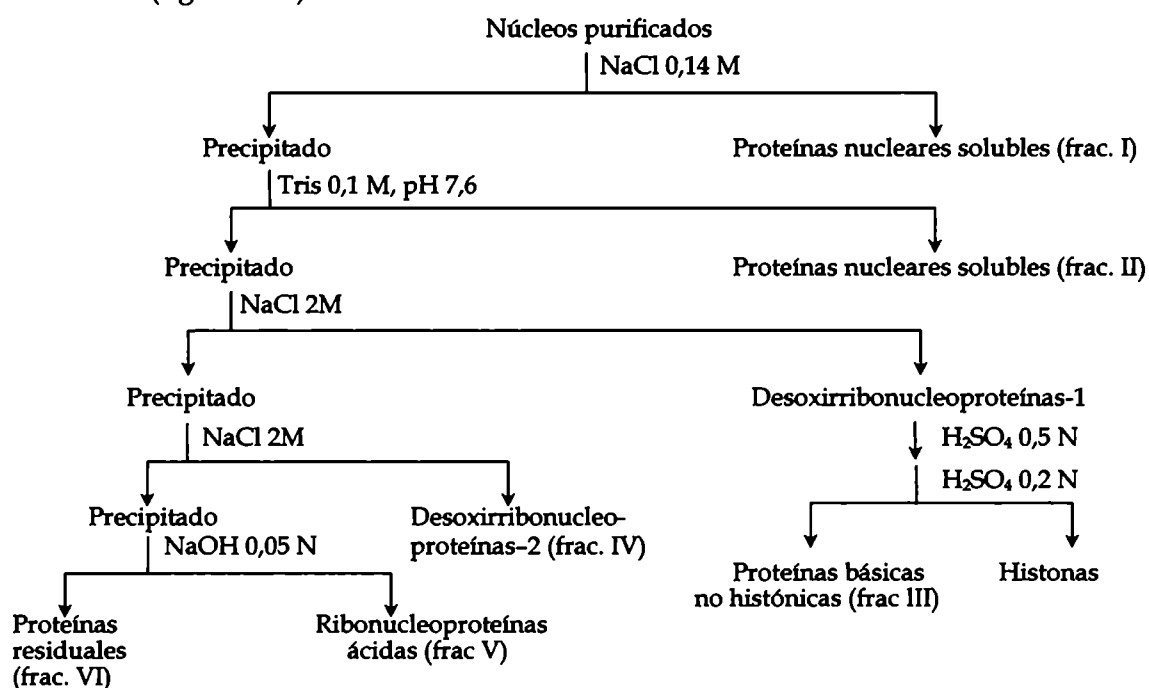


Figura III.5: Fraccionamiento de proteínas nucleares

Los núcleos se extraen dos veces con 3 ml de NaCl 0,14 M, cada vez se homogeneiza y agita con una barrita magnética durante 20 minutos y se centrifuga a 6.000 xg durante 10 minutos; los sobrenadantes de estas dos centrifugaciones se reúnen, formando la fracción I (proteínas nucleares solubles).

El precipitado se homogeneiza con 2,2 ml de Tris 0,1 M pH 7,6, se agita durante 20 minutos y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante constituye la fracción II (proteínas nucleares solubles).

El precipitado de la última centrifugación se desintegra con 6,5 ml de NaCl 2 M y una gota de octanol (para evitar la formación de espuma) durante 20 segundos en un desintegrador (indicado en el punto III.A.I.2). A continuación se centrifuga a 25.000 xg

durante 1 hora. El sobrenadante se separa y guarda a -40°C . Este sobrenadante corresponde a las desoxirribonucleoproteínas-1, proteínas básicas ligadas al ADN, de las cuales se obtienen las histonas y la fracción III.

El precipitado se extrae con 1,6 ml de NaCl 2 M durante toda la noche por agitación con la ayuda de una barrita magnética, luego de lo cual se centrifuga una hora a 16.000 xg. Se reserva el sobrenadante y el precipitado se vuelve a extraer durante una hora con igual volumen de NaCl 2 M, centrifugándose posteriormente a 16.000 xg durante una hora. El precipitado se reserva. El sobrenadante se reúne con el reservado de la centrifugación anterior y se vuelve a centrifugar a 16.000 xg durante 20 minutos. El precipitado se descarta. El sobrenadante corresponde a las desoxirribonucleoproteínas-2 (fracción IV), proteínas ácidas (no histonas) ligadas al ADN.

El precipitado reservado de la segunda extracción con NaCl 2M está formado por las fracciones V y VI. Para separar ambas fracciones el precipitado se homogeneiza suavemente durante 2 minutos con 2,2 ml de NaOH 0,05 N y a continuación se centrifuga a 20.000 xg durante 20 minutos.

El precipitado obtenido se extrae otras dos veces con igual volumen de NaOH 0,05 N, agitando con una barrita magnética durante 20 minutos y centrifugando 20 minutos a 20.000 xg cada vez. Los sobrenadantes se reúnen, formando la fracción V, en la cual se determina el contenido de proteínas por el método de Folin y luego se la lleva a pH 6. La fracción V son ribonucleoproteínas ácidas, proteínas ácidas no histónicas no ligadas ADN.

El precipitado de las extracciones con NaOH 0,05 N corresponde a la fracción VI, la cual está formada por proteínas residuales.

Del sobrenadante que se reservó a -40°C (las desoxirribonucleoproteínas-1) se aíslan las histonas y la fracción III de la siguiente manera: el extracto de NaCl 2 M se enfría a 4°C y se trata con 0,35 ml H_2SO_4 10N (de manera tal de obtener una concentración final de H_2SO_4 0,5 N). Se centrifuga a 20.000 xg durante 20 minutos, se reserva el sobrenadante, y el precipitado se extrae 2 veces más por homogeneización con H_2SO_4 0,2 N, centrifugándose cada vez en las mismas condiciones anteriores. Se combinan los dos sobrenadantes con el reservado, formando la fracción de correspondiente a las histonas.

El precipitado corresponde a la fracción III y está formado por proteínas básicas no histónicas.

Las proteínas presentes en todas las fracciones se determinan con la técnica de Lowry.

Una vez determinado el contenido de proteínas se procede a la aislación de las mismas por precipitación con TCA. Dada la poca cantidad de proteínas que posee cada fracción, para favorecer la precipitación se le agrega a cada una un peso conocido de albúmina de huevo (aproximadamente 15 mg).

Las histonas se precipitan usando el volumen de TCA 100% necesario para que la concentración final de TCA sea del 20%.

Las demás fracciones se precipitan con TCA 60% de tal manera de obtener una concentración final de TCA del 15%.

Las fracciones proteicas precipitadas se lavan 3 veces con 6 ml de TCA 10% por resuspensión y centrifugación a 3.000 xg durante 10 minutos cada vez.

A continuación se lavan sucesivamente de la misma manera con las siguientes soluciones:

- .- etanol : eter etílico : cloroformo (2:2:1),
- .- acetona,
- .- eter.

Posteriormente se secan en estufa toda la noche y se determina la radioactividad incorporada en cada una de ellas.

➤ III.B.V.- Determinación de radioactividad en proteínas

La técnica de Díaz Gómez y col. empleada (170), se describe a continuación.

Se pesa en un vial de centelleo menos de 10 mg de proteína seca y se la trata con 1 ml de ácido fórmico concentrado para disolverla (de ser necesario se calienta a 37 °C).

Se le agregan 5 ml de una mezcla de butil cellosolve al 48% en tolueno y 15 ml de PPO (2,5-difeniloxazol) al 8% en tolueno/butil cellosolve (3:1).

La radioactividad se cuenta en un contador de centelleo líquido, restándosele el valor de un blanco apropiado.

La cantidad de leucina incorporada a las proteínas nucleares totales se calcula teniendo en cuenta la cantidad de proteína aislada pesada para determinar la radioactividad y el valor de radioactividad medido.

En el caso de la determinación de la incorporación de leucina a las fracciones proteicas nucleares se debe considerar la cantidad de proteína en la fracción determinada por la técnica de Folin, los miligramos de albúmina de huevo agregados a esa fracción para favorecer la precipitación, la cantidad de proteína pesada para la determinación de la radioactividad y la radioactividad medida para el cálculo de los moles de leucina incorporados en cada fracción proteica nuclear.

III.C.- TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE ALTERACIONES QUÍMICAS CAUSADAS POR EL CCl_4 EN PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

En esta serie de experimentos se analizó si los metabolitos reactivos del CCl_4 eran capaces de formar grupos carbonilos o alterar el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas. Además se estudió la formación de productos volátiles y las características de este fenómeno.

Se divide este tema en cuatro grupos:

III.C.1.- Sistemas químicos (proteínas, aminoácidos, compuestos volátiles).

III.C.2.- Sistemas *in vitro* (distintas fracciones subcelulares).

III.C.3.- Sistema *in vivo* (únicamente en el caso de los grupos carbonilos).

III.C.4.- Técnicas de determinación de grupos carbonilos y grupos sulfhidrilos.

A continuación se indican las técnicas empleadas en cada grupo de experimentos.

III.C.I.- SISTEMAS QUÍMICOS

➤ III.C.I.1.- Activación del CCl_4 en un sistema químico

El CCl_4 es activado a sus metabolitos reactivos por la luz ultravioleta C (81), por lo que se desarrolló en el laboratorio un sistema para irradiar la solución a ensayar con luz ultravioleta C (UVC) (204).

La lámpara de luz ultravioleta C utilizada (indicada en el punto III.A.I.2) corresponde a una longitud de onda de 254 nm e intensidad 100 W. Se determinó que la intensidad de la luz emitida a 15 mm de la lámpara era de 3400 mW/cm².

La técnica empleada fue la siguiente: la solución a irradiar se coloca en una celda de cuarzo de 3 ml, la cual se cierra herméticamente con un sistema especialmente diseñado que sella la cubeta con un tapón de silicona. Para la irradiación se coloca la celda en forma horizontal, ubicando por encima de ella la lámpara de UVC, de tal forma que la superficie a irradiar quede a 15 mm de la superficie de la lámpara.

En todos los casos las soluciones se irradiaron durante 6 minutos.

Luego de la irradiación se determinó el contenido de grupos carbonilos o el contenido de grupos sulfhidrilos según correspondiera.

► III.C.I.1.1.- Sistema químico empleado para proteínas

En estos ensayos se utilizó albúmina de huevo o albúmina de huevo delipidada, (preparada como se indica más adelante) en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8.

Se utilizó la técnica de irradiación recién indicada; en cada caso se irradió 1 ml de la solución a ensayar.

A continuación se indica un esquema de la forma de preparación de las soluciones a irradiar en el caso de la determinación de la alteración de grupos carbonilos y sulfhidrilos causada por el CCl_4 o sus metabolitos reactivos en albúmina de huevo nativa o delipidada, en atmósfera de aire o de nitrógeno.

	Control	CCl_4
albúmina nativa o delipidada (4 mg/ml)	1,0 ml	1,0 ml
etanol	5 μl	—
CCl_4 0,4 M	—	5 μl

Tabla III.2: Sistema químico empleado para proteínas

En todos los casos la concentración final de CCl_4 en las soluciones a irradiar fue 2 mM, para lo cual se agregaron 5 μl de una solución de CCl_4 0,4 M en etanol. A los controles se les agregó 5 μl de etanol.

El agregado de las soluciones de CCl_4 o de etanol se hizo una vez que el sistema estaba cerrado. En el caso de trabajar en atmósfera de nitrógeno el agregado fue posterior al burbujeo con nitrógeno.

La atmósfera de nitrógeno se obtuvo burbujeando durante 5 minutos nitrógeno (libre de oxígeno) en la celda de irradiación correspondiente.

En el estudio de los efectos del α -tocoferol 1 mM, Trolox 1mM y EDTA 3mM sobre las alteraciones de grupos carbonilos o grupos sulfhidrilos inducidas por los metabolitos reactivos del CCl_4 los esquemas de preparación de las soluciones fueron diferentes.

En el caso del ensayo de α -tocoferol (αT) y Trolox, las soluciones que se emplearon fueron de concentración 0,2 M en etanol, de tal manera de obtener una concentración final 1 mM en el sistema de irradiación.

Las soluciones mezclas (preparadas en etanol) fueron:

.- $\alpha\text{T} + \text{CCl}_4$: αT 0,2 M, CCl_4 0,4 M

.- Trolox + CCl_4 : Trolox 0,2 M, CCl_4 0,4 M

La preparación de las soluciones fue la que se indica a continuación.

	Control	CCl ₄	αT o Trolox	CCl ₄ + (αT o Trolox)
albúmina (4 mg/ ml)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
etanol	5 μl	—	—	—
CCl ₄	—	5 μl	—	—
αT o Trolox	—	—	5 μl	—
CCl ₄ + (αT o Trolox)	—	—	—	5 μl

Tabla III.3: Sistema químico empleado para proteínas en presencia de α-tocoferol o Trolox

En el caso del EDTA, debido a su baja solubilidad en el medio de irradiación, la preparación de las soluciones fue diferente. Se usó una solución de albúmina en el mismo buffer más concentrada (5 mg/ml) y el EDTA se preparó en el mismo buffer en una concentración 15 mM.

A continuación se indica el esquema de preparación de las soluciones a irradiar empleado.

	Control	CCl ₄	EDTA	CCl ₄ +EDTA
albúmina 5g/ ml	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml
buffer	0,2 ml	0,2 ml	—	—
EDTA 15 mM	—	—	0,2 ml	0,2 ml
etanol	5 μl	—	5 μl	—
CCl ₄ 0,4 M	—	5 μl	—	5 μl

Tabla III.4: Sistema químico empleado para proteínas en presencia EDTA

En todos los casos a las soluciones irradiadas se le determinó el contenido de grupos carbonilos o de grupos sulfhidrilos según correspondiera.

➤ III.C.I.1.2. - Sistema químico empleado para aminoácidos

A continuación se indican los sistemas para la irradiación de aminoácidos empleados.

Grupos carbonilos

El efecto del CCl₄ sobre la formación de grupos carbonilos sobre aminoácidos se ensayó en medio aerobio. Se emplearon los 20 aminoácidos normalmente presentes en las

proteínas de las células eucariotas: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, cisteína, metionina, aspártico, glutámico, asparragina, glutamina, lisina, arginina e histidina.

Se usaron soluciones de 4 mg/ml de los aminoácidos (aa) en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, las cuales fueron irradiadas o no según se indique. La forma de preparación de las soluciones a irradiar fue la siguiente.

	aa	aa + CCl ₄
aminoácido (4 mg/ml)	1,0 ml	1,0 ml
etanol	5 µl	—
CCl ₄ 0,4 M	—	5 µl

Tabla III.5: Sistema químico empleado para aminoácidos

Los carbonilos formados se midieron con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina indicada más adelante.

Grupos sulfhidrilos

El estudio del efecto del CCl₄ y de sus metabolitos reactivos sobre el contenido de grupos sulfhidrilos se realizó únicamente sobre el aminoácido cisteína por ser el único que posee un grupo sulfhidrilo libre.

Las condiciones de irradiación son las mismas que las indicadas para el resto de los aminoácidos. Luego de la irradiación se determinó el contenido de grupos sulfhidrilos por la técnica indicada más adelante.

➤ III.C.I.2.- Preparación de albúmina delipidada

La albúmina de huevo delipidada fue preparada de acuerdo a la técnica de Chen (203), la cual se indica a continuación.

500 mg de albúmina de huevo se disuelven en 5 ml de agua destilada y se mezclan con 500 mg de carbón activado (Norit A), el cual fue lavado previamente con agua destilada, filtrado a través de un embudo de Buchner y dejado secar toda la noche a temperatura ambiente.

La solución de albúmina mezclada con el carbón activado se lleva a pH 3 usando HCl

0,2 N y se agita con un agitador magnético durante 1 hora en baño de hielo.

Posteriormente se remueve el carbón activado por centrifugación a 20.000 xg durante 20 minutos a 2°C. La solución sobrenadante se lleva a pH 7 usando NaOH 0,2 N y se liofiliza.

La albúmina así preparada es esencialmente libre de lípidos, de acuerdo a lo determinado por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (204).

➤ III.C.I.3.- Estudio del efecto de la luz UVC sobre el glutatión oxidado

Para el estudio del efecto de la luz ultravioleta sobre el glutatión oxidado se empleó un sistema químico similar al empleado para los aminoácidos.

Se utilizó una solución de glutatión oxidado de 4 mg/ml en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, ensayándose en atmósfera de aire o de nitrógeno, según se indique.

A las soluciones resultantes de la acción de la luz UVC se les determinó el contenido de grupos sulfhidrilos.

➤ III.C.I.4.- Estudio de formación de productos volátiles por CCl₄

En este caso se estudió la posible formación de compuestos volátiles por efecto de los metabolitos reactivos del CCl₄ sobre dos tipos de sustancias: la proteína albúmina de huevo nativa y el aminoácido cisteína.

Los compuestos volátiles formados se analizaron por cromatografía gaseosa.

➤ III.C.I.4.1.- Albúmina

Se utilizaron soluciones de albúmina de huevo nativa de 16 mg/ml en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8.

Se estudió el efecto del Trolox 1 mM sobre la formación de productos volátiles.

El CCl₄ (5 µl) se agregó puro a las soluciones a irradiar para evitar las posibles interferencias del etanol en los cromatogramas.

El Trolox se agregó como una solución 50 mM en el buffer de incubación.

Un esquema general de la preparación de las soluciones a irradiar se indica a

continuación:

	Control	CCl ₄	Trolox	CCl ₄ +Trolox
albúmina (16 mg/ml)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
CCl ₄ puro	—	5 µl	—	5 µl
Trolox 50 mM	—	—	20 µl	20 µl

Tabla III.6: Sistema químico empleado para la determinación de compuestos volátiles formados por el CCl₄ sobre la albúmina de huevo en presencia de Trolox

A las soluciones resultantes de la irradiación se les agregó 0,35 ml de solución saturada de NaCl, y se las mantuvo a 37 °C al menos durante media hora. Los vapores fueron analizados por cromatografía gaseosa como se indica más adelante.

► III.C.I.4.2.- Cisteína

Se utilizó una solución de cisteína (4 mg/ml en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl₄ 2 mM. Se procedió de la misma manera que en el caso de la determinación de la formación de productos volátiles a partir de la albúmina de huevo.

► III.C.I.4.3.- Análisis cromatográfico de los productos volátiles

Los vapores de las muestras obtenidas de la irradiación y posterior tratamiento con NaCl, fueron analizados en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama en las siguientes condiciones:

- .- modo de inyección: sin división de flujos ("splitless"), tiempo de purga de 0,2 min;
- .-columna: sílica fundida recubierta con PoraPLOT Q; 25 m x 0,53 mm diámetro interno, espesor del film 20 µm;
- .- flujo de gases: nitrógeno (carrier), 7,9 ml/min,
hidrógeno: 34 ml/min,
aire: 275 ml/min,
nitrógeno: 23 ml/min;
- .- volumen de inyección: 100 µl (empleando la jeringa para gases indicada en III.A);
- .- temperatura del inyector: 150 °C;
- .- temperatura del detector: 200 °C;

- temperatura de la columna: 105 °C durante 4,5 minutos, luego incrementando con una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 140 °C, a 140 °C durante 2,8 minutos, a continuación incrementando con una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 160 °C

III.C.II.- SISTEMAS IN VITRO

En esta serie de experimentos se usaron fracciones subcelulares obtenidas de acuerdo a las técnicas indicadas en Materiales y Métodos Generales (III.A).

En cada caso las fracciones subcelulares se incubaron en medios adecuados. Se ensayaron de esta manera microsomas, núcleos, mitocondrias y citosol. Todas las fracciones subcelulares, salvo el citosol, contienen sistemas para la metabolización del CCl_4 a sus metabolitos reactivos.

En estos experimentos las proteínas blanco de ataque serían las mismas proteínas de la fracción subcelular.

El CCl_4 fue activado a sus metabolitos reactivos por los sistemas metabolizantes presentes en cada fracción subcelular (salvo en el caso del citosol). Para que se pueda producir dicha activación es necesaria la presencia de NADPH como cofactor del sistema de metabolización. Por esta razón se utilizó en las incubaciones de las fracciones subcelulares sistema generador de NADPH, con el cual se produce NADPH en forma continua. Este sistema generador está formado por isocitrato, NADP^+ (fosfato de nicotinamida dinucleótido) y la enzima isocitrato deshidrogenasa (las concentraciones empleadas se indican en cada incubación).

➤ III.C.II.1.- Incubación de microsomas

Se siguió la siguiente técnica de incubación (176): los microsomas aislados fueron resuspendidos en buffer Tris 0,15 M, KH_2PO_4 1 mM, pH 7,4, de tal manera que la concentración final de proteína en el medio de incubación fuera de aproximadamente 4 mg proteína/ml incubado.

El volumen final del medio de incubación fue de 3 ml. Este medio contenía (concentraciones finales): MgCl_2 0,15 M, y podía contener o no (según se indique en cada grupo) sistema generador de NADPH: isocitrato de sodio 3,62 mM, NADP^+ 0,45 mM,

isocítrico deshidrogenasa (ICDH): 0,17 UE/ml y/o CCl₄ 2 mM.

El esquema de preparación de las mezclas a incubar se indica a continuación.

	Control	CCl ₄	NADPH	CCl ₄ +NADPH
microsomas	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
buffer	1,7 ml	1,7 ml	1,4 ml	1,4 ml
MgCl ₂ 1,5 M	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato./NADP ⁺	—	—	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato deshidrogenasa	—	—	10 µl	10 µl
etanol	5 µl	—	5 µl	—
CCl ₄ 1,2 M	—	5 µl	—	5 µl

Tabla III.7: Sistema de incubación de microsomas

Se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación en viales de vidrio sellados con septum de neopreno y tapa de aluminio. La reacción fue interrumpida colocando los viales en un baño de agua-hielo.

El CCl₄ se agregó como 5µl de una solución 1,2 M después de sellados los viales.

En este sistema se ensayo además el efecto de una atmósfera de nitrógeno, burbujeando la solución durante 5 minutos con nitrógeno libre de oxígeno antes del agregado de CCl₄ o etanol.

En el estudio del efecto de distintas sustancias, α-tocoferol 1 mM, hemisuccinato de α-tocoferol 1 mM, Trolox C 1 mM, y EDTA 3 mM, la preparación de los medios de incubación fue diferente de acuerdo a la solubilidad de las mismas. Estos sistemas se indicarán más adelante.

Se determinaron luego de las incubaciones los contenidos de grupos carbonilos o de grupos sulfhidrilos de las proteínas según correspondiera con las técnicas indicadas más adelante.

➤ III.C.II.2.- Incubación de núcleos

En este caso la técnica seguida fue la siguiente (176): los núcleos aislados fueron resuspendidos en Tris 0,15 M, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,4, de manera tal de obtener una

concentración final de 8 mg de proteína/ml de incubado.

Se empleó el siguiente esquema de preparación de las soluciones a incubar:

	Control	CCl ₄	NADPH	CCl ₄ +NADPH
núcleos	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
buffer	0,7 ml	0,7 ml	0,4 ml	0,4 ml
MgCl ₂ 1,5 M	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato/NADP ⁺	—	—	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato deshidrogenasa	—	—	10 µl	10 µl
etanol	5 µl	—	5 µl	—
CCl ₄ 1,2 M	—	5 µl	—	5 µl

Tabla III.8: Sistema de incubación de núcleos

Se usó el mismo buffer como medio de incubación, con una concentración de MgCl₂ final 0,15 M. El sistema generador de NADPH (presente cuando se indique) fue similar al empleado en la incubación de los microsomas. El volumen final de incubación fue de 3 ml.

En el caso de determinación de grupos carbonilos se utilizó CCl₄ o CBrCl₃

Para el CCl₄ se siguió el sistema de incubación recién indicado, con una concentración final de 2 mM de CCl₄, incubándose durante 0,5, 1 ó 3 horas a 37°C con agitación. Se emplearon viales de vidrio sellados con septum de neopreno y tapa de aluminio. La reacción fue interrumpida colocando los viales en un baño de agua-hielo.

En el caso del CBrCl₃ 2 mM el esquema de preparación es el mismo que para CCl₄ 2 mM. Cuando se utilizó CBrCl₃ puro, se agregaron 7µl a los 3 ml de incubación.

Para la determinación de grupos sulfhidrilos se utilizó CCl₄ 2mM, preparándose las mezclas de incubación de la misma manera que para carbonilos con CCl₄. Los tiempos de incubación en este caso fueron 1 y 3 h.

Luego de las incubaciones se determinó el contenido de grupos carbonilos o de grupos sulfhidrilos según correspondiera.

➤ III.C.II.3.- Incubación de mitocondrias

En el caso de las mitocondrias (76, 77), el medio de incubación fue diferente al de los microsomas; estando formado en este caso por: Tris 0,3 M, pH 7,4, MgCl_2 5 mM, isocitrato de sodio 8 mM, NADP^+ 0,33 mM, isocitrato deshidrogenasa: 0,36 UE/ml de incubado.

La preparación de las mezclas a incubar fue la siguiente:

	Control	CCl_4	NADPH	$\text{CCl}_4 + \text{NADPH}$
mitocondrias	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
buffer	1,7 ml	1,7 ml	1,4 ml	1,4 ml
MgCl_2 5 mM	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato./ NADP^+	—	—	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato deshidrogenasa	—	—	45 μl	45 μl
etanol	5 μl	—	5 μl	—
CCl_4 1,2 M	—	5 μl	—	5 μl

Tabla III.9: Sistema de incubación de mitocondrias

Las mitocondrias se resuspendieron en el buffer de incubación de tal manera de tener una concentración de 5 mg proteína/ml incubado. El volumen final de incubación fue 3 ml.

Se incubó a 37°C durante 1 en viales de vidrio sellados con septum de neopreno y tapa de aluminio. La reacción fue interrumpida colocando los viales en un baño de agua-hielo.

Los grupos carbonilos o los grupos sulfhidrilos de las proteínas según correspondiera, fueron posteriormente determinados.

➤ III.C.II.4.- Incubación de fracción citosólica

Los ensayos sobre el citosol se realizaron de acuerdo a la siguiente técnica (209): se incubaron 0,2 ml de citosol por ml de incubado en un medio de incubación similar al de los microsomas, es decir: Tris 0,15 M, KH_2PO_4 1 mM, pH 7,4, MgCl_2 0,15 M; en presencia o no de sistema generador de NADPH (isocitrato de sodio 3,62 mM, NADP^+ 0,45 mM, 0,17 UE/ml de isocitrato deshidrogenasa) y/o CCl_4 2mM. El volumen final de incubación fue de 3 ml (10, 44).

Se incubó a 37°C durante 1 hora en viales de vidrio sellados con septum de neopreno y tapa de aluminio. La reacción fue interrumpida colocando los viales en un baño de agua-hielo.

El esquema de preparación de las soluciones a incubar empleado fue el siguiente:

	Control	CCl ₄	NADPH	CCl ₄ +NADPH
citosol	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
buffer	2,1 ml	2,1 ml	1,8 ml	1,8 ml
MgCl ₂ 1,5 M	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato/NADP ⁺	—	—	0,3 ml	0,3 ml
isocitrato deshidrogenasa	—	—	10 µl	10 µl
etanol	5 µl	—	5 µl	—
CCl ₄ 1,2 M	—	5 µl	—	5 µl

Tabla III.10: Sistema de incubación de fracción citosólica

El contenido de grupos carbonilos o de grupos sulfhidrilos de las proteínas y de grupos sulfhidrilos en sustancias no proteicas fue determinado a continuación.

➤ **III.C.II.5.- Incubaciones de microsomas con distintas sustancias**

A continuación se indican los sistemas empleados, donde las concentraciones de los buffers, del MgCl₂ del sistema generador de NADPH (isocitrato de sodio (isoc.), NADP⁺ y isocitrato deshidrogenasa (ICDH)) fueron similares a las usadas para microsomas, variando únicamente las cantidades de buffer para permitir el agregado de las sustancias a ensayar.

En todos los casos luego de las incubaciones se determinó el contenido de grupos carbonilos o de grupos sulfhidrilos según correspondiera.

Las sustancias que se ensayaron con este sistema fueron: α-tocoferol, hemisuccinato de α-tocoferol 1 mM, Trolox 1 mM, EDTA 3 mM. Debido a la distinta solubilidad de estas sustancias en el medio de incubación se emplearon volúmenes distintos de las mismas.

El sistema básico de incubación (sin considerar los volúmenes de buffer ni de sustancias (D) a agregar) fue el siguiente:

Los volúmenes de sustancias a ensayar agregados fueron:

- .- α-tocoferol 0,6 M en etanol: 5µl.
- .- hemisuccinato de α-tocoferol 3,33 mM en buffer: 0,9 ml.
- .- Trolox 10 mM en buffer: 0,3 ml.
- .- EDTA 15 mM en buffer: 0,6 ml.

MATERIALES Y MÉTODOS

	Control	D	CCl ₄	CCl ₄ +D	NADPH	NADPH +D	CCl ₄ + NADPH	CCl ₄ +D+ NADPH
microsomias	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
MgCl ₂	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
isoc./NADP ⁺	—	—	—	—	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
ICDH	—	—	—	—	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
etanol	5 µl	5 µl	—	—	5 µl	5 µl	—	—
CCl ₄	—	—	5 µl	5 µl	—	—	5 µl	5 µl

Tabla III.11: Sistema de incubación de microsomas con distintas sustancias

En todos los casos se completó el volumen de la mezcla de incubación a 3 ml mediante el agregado de buffer de incubación.

III.C.III.- SISTEMA IN VIVO

En este grupo de experimentos se determinó el contenido de grupos carbonilos de proteínas hepáticas microsomales y nucleares de ratas intoxicadas con CCl₄.

➤ III.C.III.1.- Tratamientos

A los animales control se les administró ip aceite de oliva, en tanto que al grupo con CCl₄ se les aplicó CCl₄ ip en la dosis indicada en Procedimientos Generales (una solución al 20% (v/v) en aceite de oliva, 5 ml/kg).

En el caso de la determinación en microsomas, los animales fueron sacrificados media, una, dos y tres horas después de haber recibido el CCl₄ o el aceite de oliva, se les extrajo el hígado y se obtuvieron los microsomas. El pellet de microsomas fue resuspendido en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8, de tal manera de obtener una concentración aproximada de 4 mg de proteína/ml, y se determinó el contenido de grupos carbonilos en las proteínas microsomales.

Cuando se determinó el contenido de grupos carbonilos en las proteínas nucleares, los animales fueron sacrificados una, dos, tres y seis horas después de haber recibido el CCl₄ o el aceite de oliva, se les extrajeron los hígados y se aislaron los núcleos. La fracción nuclear fue resuspendida en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8 para obtener una concentración de 8 mg de proteína/ml y se les determinó el contenido de grupos carbonilos a las proteínas.

III.C.IV.- MEDICIÓN DE GRUPOS CARBONILOS Y GRUPOS SULFHIDRILOS

➤ III.C.IV.1.-Determinación de grupos carbonilos

Los grupos carbonilos se midieron usando la técnica de Levine y col. (212). La técnica empleada fue diferente de acuerdo a si se trataba de proteínas o aminoácidos. A continuación se indica la técnica seguida en cada caso.

➤ III.C.IV.1.1.- Medición de grupos carbonilos en proteínas

En el caso de las proteínas nucleares es necesaria la preparación previa de las muestras, la cual se indicará más adelante.

El volumen de solución o suspensión correspondiente a 1 mg de proteína se precipita con igual volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se espera 10 minutos y se centrifuga 3 minutos a 15.000 xg.

El precipitado se hace reaccionar con 0,5 ml de 2,4-dinitrofenilhidracina 10 mM en HCl 2 M durante una hora agitando cada 10-15 minutos. El blanco respectivo se hace usando HCl 2 M en lugar de 2,4-dinitrofenilhidracina.

Se reprecipita con 0,5 ml de TCA 20%, y el precipitado se lava 3 veces con 1 ml de etanol-acetato de etilo (1:1) cada vez. El precipitado obtenido se redissuelve en solución de guanidina 6M, 20 mM en KH_2PO_4 , ajustada a pH 2,3 con ácido trifluoroacético.

En el caso de ensayarse la albúmina y los aminoácidos, para disolver la hidrazona formada se disuelve calentándola 30 minutos a 37°C. En el caso de las proteínas microsomales, nucleares, mitocondriales y citosólicas se deja agitando toda la noche a baja temperatura. En ambos casos se centrifuga 10 minutos a 15.000 xg, utilizando el sobrenadante para la medición.

La hidrazona formada se determina por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 370 nm; los nmoles de carbonilos/mg de proteína se calculan considerando un coeficiente de absorción de 22.000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

➤ III.C.IV.1.1.1.- Preparación de las muestras de proteínas nucleares

En el caso de la determinación de grupos carbonilos en las proteínas nucleares es necesario eliminar previamente los ácidos nucleicos, ya que cuando están presentes en gran cantidad pueden interferir (212).

La técnica empleada fue la siguiente: 3 ml de la resuspensión de núcleos se tratan con 0,34 ml de sulfato de estreptomina al 10% en HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) 50 mM, pH 7,2; se lo deja a temperatura ambiente durante 15

minutos, se centrifuga a 11.000 xg durante 10 minutos y el precipitado se descarta. En el sobrenadante se determina el contenido de grupos carbonilos con la técnica recién indicada.

La eliminación de los ácidos nucleicos es eficaz si la relación de absorbancias a 280 nm y 260 nm es mayor que 1.

➤ *III.C.IV.1.2.- Medición de grupos carbonilos en aminoácidos*

Se utilizó la técnica de Levine y col. (212). Un volumen de 0,3 ml de las soluciones de los aminoácidos se mezclan con 0,9 ml de una solución de guanidina preparada de la manera siguiente: 9 volúmenes de guanidina 8 M, KH_2PO_4 26,7 mM, pH 6,35 + 0,5 volúmenes 2,4 dinitrofenilhidracina 10 mM + 0,5 volúmenes de HCl 2M.

Se deja reaccionar la mezcla 1 hora a temperatura ambiente y se miden las hidrazonas formadas en las mismas condiciones que las proteínas.

➤ *III.C.IV.2.- Técnica de determinación de grupos sulfhidrilos*

Se utilizó la técnica de Ellman con modificaciones (213, 214, 215).

La parte inicial de la técnica a seguir depende de si el material sobre los que se determinan los grupos sulfhidrilos es soluble (cisteína, albúmina de huevo, glutatión oxidado) o no (proteínas de las fracciones subcelulares).

➤ *III.C.IV.2.1.- Sustancias solubles*

Un volumen de solución cuyos grupos sulfhidrilos se quiere determinar se lleva a 0,5 ml con buffer Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, pH 7,4.

A los 0,5 ml anteriores se le agregan 0,5 ml de Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, DTNB (ácido ditiobis-(2-nitrobenzoico)) 0,2mM, pH 8,6. El blanco de cada punto se hace con 0,5 ml de Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 8,6.

Se deja reposar 30 minutos y se lee en un espectrofotómetro a 412 nm contra un blanco formado por igual volumen de Tris 0,1M, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, pH 7,4 y Tris 0,1 M, EDTA 5mM, pH 8,6.

Los nmoles de sulfhidrilos/mg proteína se calculan considerando un coeficiente de absorción molar de $13.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

➤ ***III.C.IV.2.2.-Proteínas insolubles***

0,25 ml de la solución a la cual se le quiere determinar el contenido de grupos sulfhidrilos se precipita con 0,5 ml de TCA 5%, EDTA 5 mM. Se deja reposar 10 minutos y se centrifuga a 15.000 xg durante 3 minutos.

El precipitado se lava 2 veces con 0,5 ml de TCA 5%, EDTA 5 mM, se espera 10 minutos y se centrifuga a 13.500 xg cada vez. El precipitado se resuspende en 1,5 ml de Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, pH 7,4. A 0,5 ml de cada resuspendido se le agrega igual volumen de Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, DTNB 0,2 mM, pH 8,6.

De cada muestra se hace un blanco mezclando 0,5 ml del resuspendido con igual volumen de Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 8,6.

A partir de este punto la técnica coincide con la de sustancias solubles.

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis han sido divididos en tres partes:

- IV.A.- Estudio del efecto del CCl_4 sobre la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas hepáticas de rata.
- IV.B.- Estudio del efecto del CCl_4 sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas.
- IV.C.- Estudio del efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas.

IV.A.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL CCl_4 SOBRE LA INCORPORACIÓN DE UN AMINOÁCIDO MARCADO A PROTEÍNAS HEPÁTICAS DE RATA

Como se ha indicado en la Introducción de este Trabajo de Tesis, el CCl_4 causa en los hepatocitos la alteración de la maquinaria de síntesis proteica a nivel de los ribosomas.

Había sido determinado previamente que el CCl_4 altera la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas microsomales, ribosomales y citosólicas hepáticas de rata.

En esta serie de experimentos se quiso estudiar el efecto del CCl_4 sobre la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas nucleares totales y a distintas fracciones proteicas nucleares hepáticas de rata.

Se eligió como aminoácido marcado la leucina radioactiva ya que es un aminoácido presente en toda clase de proteínas.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, las cuales son susceptibles a la acción tóxica del CCl_4 .

También se estudió el efecto de la cicloheximida, un conocido inhibidor de la síntesis proteica, para determinar si la inhibición de la síntesis proteica al nivel de los ribosomas podía verse reflejada como una alteración en la incorporación de un aminoácido a las proteínas nucleares.

Además, como ha sido indicado en la Introducción, se sabe que la cicloheximida evita la disociación de los ribosomas causada por el CCl_4 .

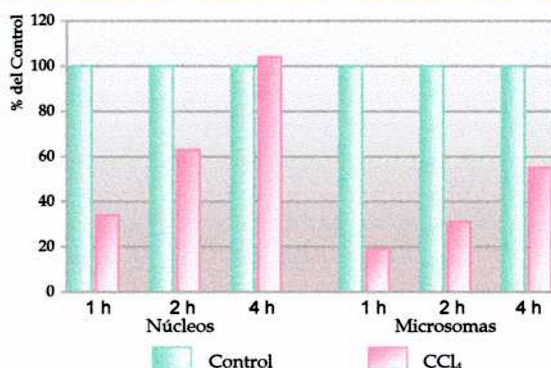
En todos los casos los procedimientos seguidos son los indicados en Materiales y Métodos.

➤ IV.A.1.- Incorporación de ^{14}C -Leucina a las proteínas nucleares y microsomales totales de hígado de rata a distintos tiempos de intoxicación

En este experimento se quiso determinar si los metabolitos tóxicos del CCl_4 eran capaces de alterar la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas nucleares totales hepáticas de rata. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente.

Tabla IV.A.1: Incorporación de ^{14}C -Leucina a las proteínas nucleares y microsomales totales de hígado de rata a distintos tiempos de intoxicación

Tratamiento ^a	Núcleos		Microsomas	
	pmol Leu/mg prot	% Control	pmol Leu/mg prot	% Control
1 hora				
Control	16,0 ± 0,8	100	46,7 ± 4,0	100
CCl_4	5,5 ± 0,9 ^b	34	8,7 ± 0,9 ^b	19
2 horas				
Control	21,1 ± 2,2	100,0	54,8 ± 3,5	100
CCl_4	13,2 ± 1,8 ^c	62	17,2 ± 1,8 ^b	31
4 horas				
Control	24,6 ± 3,3	100	59,0 ± 4,3	100
CCl_4	25,6 ± 2,4 ^d	104	32,4 ± 2,0 ^b	55



^a Se administró ip CCl_4 a las ratas tratadas y aceite de oliva a las ratas control. 1, 2 ó 4 h después se les aplicó ^{14}C -Leu a todas las ratas. A la hora se sacrificaron los animales, se les extrajeron los hígados, se aislaron los núcleos y microsomas, se obtuvieron las proteínas totales, a las cuales se les determinó la radioactividad incorporada. Las dosis y procedimientos usados son los indicados en Materiales y Métodos. Se usaron 3 animales por grupo.

^b $p < 0,001$.

^c $p < 0,01$.

^d $p > 0,05$.

El efecto del CCl_4 sobre la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas microsomales ya había sido determinado previamente, en este experimento se realizó como control.

De los resultados obtenidos se observa que el CCl_4 a la hora de intoxicación causó la disminución de la incorporación de leucina marcada, tanto a las proteínas nucleares como a las microsomales, siendo el efecto más importante para estas últimas. En ambos casos a las dos horas se observó una recuperación parcial de la capacidad de incorporación del aminoácido marcado a las proteínas. A las 4 horas de intoxicación se había recuperado

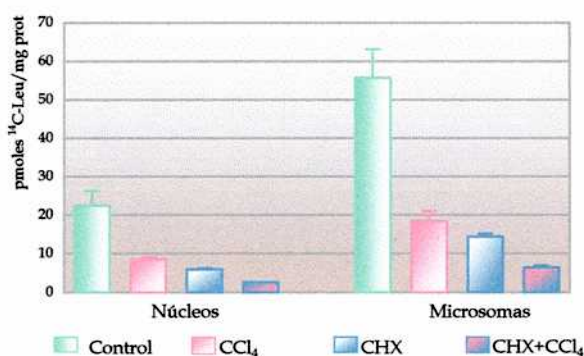
totalmente la capacidad de incorporar leucina marcada a las proteínas nucleares, mientras que no se había recuperado totalmente la capacidad de incorporación a las microsomales.

➤ **IV.A.2.- Efecto del pretratamiento con cicloheximida sobre la incorporación de ^{14}C -Leucina a proteínas nucleares y microsomales totales de ratas intoxicadas con CCl_4**

En este experimento se quiso determinar si realmente un efecto producido al nivel de la síntesis de proteínas podía verse reflejado en la alteración de la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas nucleares hepáticas de rata, como se determinó que sucede en el caso del CCl_4 . Para esto se utilizó cicloheximida, la cual se sabe que impide la síntesis proteica al nivel de los ribosomas. Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla.

Tabla IV.A.2: Efecto del pretratamiento con cicloheximida sobre la incorporación de ^{14}C -Leucina a proteínas nucleares y microsomales totales de ratas intoxicadas con CCl_4

Tratamiento ^a (^{14}C -Leu en todos los casos)	Núcleos		Microsomos	
	pmol Leu/mg prot	% Control	pmol Leu/mg prot	% Control
Control (Ctl)	22,5 ± 3,7	100	55,7 ± 7,4	100
CCl_4	8,5 ± 0,5 ^{b,d}	37	18,4 ± 2,6 ^{b,e}	33
CHX	5,9 ± 0,3 ^c	26	14,4 ± 0,7 ^c	26
CHX + CCl_4	2,6 ± 0,0 ^{b,c}	11	6,4 ± 0,5 ^{b,c}	11



^a Se aplicó la cicloheximida (CHX) y 10 minutos después el CCl_4 , se esperó 1 h y se administró la leucina marcada a todos los animales; a la hora se sacrificaron, se les extrajeron los hígados, se separaron los núcleos y los microsomas, se aislaron las proteínas, se les determinó la radioactividad. Las dosis y tratamientos se indican en Materiales y Métodos. Se usaron tres animales por grupo.

Núcleos:

^b $p < 0,01$: CCl_4 vs CHX; CHX+ CCl_4 vs (CHX o CCl_4).

^c $p < 0,02$: CHX vs Ctl; CHX+ CCl_4 vs Ctl.

^d $p < 0,05$, CCl_4 vs Ctl.

Microsomos:

^b $p < 0,01$: CCl_4 vs Ctl; CHX+ CCl_4 vs Ctl o CCl_4 .

^c $p < 0,02$: CHX vs Ctl; CHX+ CCl_4 vs CHX.

^e $p > 0,05$: CCl_4 vs CHX.

De los datos se puede observar que la cicloheximida inhibió de una manera similar la incorporación de la ^{14}C -Leu a las proteínas nucleares y a las microsomales

El CCl_4 inhibe la incorporación del aminoácido marcado en menor grado que la CHX en ambas fracciones subcelulares. Por otra parte se observa que el efecto de la mezcla del CCl_4 con la CHX es mayor que el efecto del CCl_4 o de la CHX solos.

➤ IV.A.3.- Efecto del CCl₄ sobre la incorporación de ¹⁴C-Leucina en fracciones proteicas nucleares de rata a la hora y a las dos horas de intoxicación

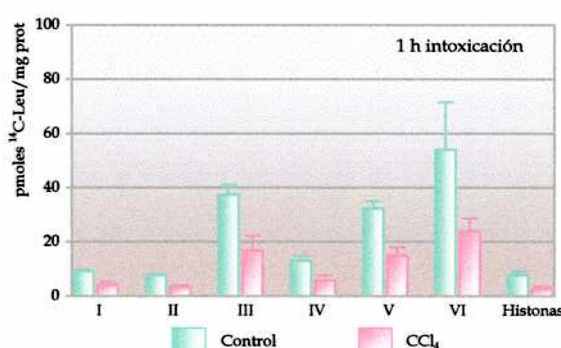
Se analizó el efecto del CCl₄ sobre la incorporación de un aminoácido marcado a distintas fracciones proteicas nucleares hepáticas para determinar si alguna resultaba particularmente afectada. Se separaron las proteínas nucleares en 7 fracciones de distintas características químicas (histonas y 6 fracciones no histónicas) de ratas intoxicadas con CCl₄ durante una o dos horas. Se analizó la radioactividad incorporada a cada una de ellas. A continuación se indican los resultados obtenidos.

➤ IV.A.3a.- 1 hora de intoxicación

En la tabla siguiente se muestran los resultados obtenidos de la aislación de distintas fracciones proteicas nucleares de rata a la hora de intoxicación con CCl₄.

Tabla IV.A.3a: Efecto del CCl₄ sobre la incorporación de ¹⁴C-Leucina en fracciones proteicas nucleares de rata a la hora de intoxicación

Fracción proteica nuclear 1 h intoxicación	Control pmol Leu/mg prot	CCl ₄ pmol Leu/mg prot	% Control
I	9,0 ± 0,6	4,1 ± 1,0 ^c	46
II	7,7 ± 0,3	3,3 ± 0,6 ^b	43
III	37,4 ± 3,7	16,7 ± 5,3 ^c	45
IV	13,0 ± 1,8	5,6 ± 1,9 ^c	43
V	32,3 ± 2,7	14,9 ± 2,9 ^c	46
VI	54,1 ± 17,4	23,8 ± 4,8 ^d	44
Histonas	7,7 ± 1,3	2,6 ± 0,9 ^c	34



^a Se aplicó ip. CCl₄ (aceite de oliva al control); a la hora se administró ¹⁴C-Leu a todos los animales. Una hora después se sacrificaron las ratas, se les extrajeron los hígados, se aislaron los núcleos y se obtuvieron las distintas fracciones proteicas nucleares, analizándose la cantidad de leucina marcada incorporada a cada una de ellas. Las dosis fueron las indicadas en Materiales y Métodos. Se usaron 3 animales por grupo.

^b p < 0,001.

^c p < 0,01.

^d p < 0,02.

Se puede observar que hubo incorporación del aminoácido marcado a todas las fracciones proteicas nucleares.

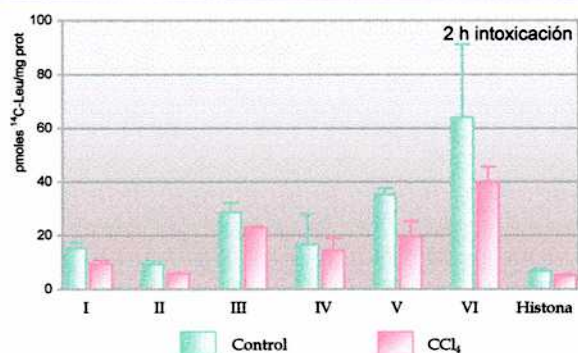
Al igual que en el caso de las proteínas nucleares totales, se observó una disminución en la incorporación de la leucina marcada a las distintas fracciones proteicas en los animales intoxicados con CCl_4 . El nivel de disminución dependió de cual fuera la fracción proteica, siendo el efecto del CCl_4 similar para las fracciones no histónicas y mayor para las histonas.

► IV.A.3b.- 2 horas de intoxicación

En la tabla siguiente se observa el efecto del CCl_4 sobre la incorporación de un aminoácido marcado a distintas proteínas nucleares a las dos horas de intoxicación.

Tabla IV.A.3b: Efecto del CCl_4 sobre la incorporación de ^{14}C -Leucina en fracciones proteicas nucleares de rata a las dos horas de intoxicación

Fracción proteica nuclear 2 h intoxicación	Control pmol Leu/mg prot	CCl_4 pmol Leu/mg prot	% Control
I	15,3 $\pm$ 2,1	9,5 $\pm$ 1,2 ^b	62
II	9,3 $\pm$ 1,2	5,9 $\pm$ 0,2 ^c	63
III	28,7 $\pm$ 3,5	23,0 $\pm$ 0,3 ^d	80
IV	16,6 $\pm$ 11,2	14,4 $\pm$ 4,6 ^d	86
V	35,3 $\pm$ 2,3	19,5 $\pm$ 5,8 ^b	55
VI	64,1 $\pm$ 27,1	39,8 $\pm$ 5,8 ^d	62
Histonas	6,7 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 0,4 ^c	78



^a Se aplicó ip. CCl_4 (aceite de oliva al control); a las dos horas se administró ^{14}C -Leu a todas las ratas. Una hora después se sacrificaron los animales, se les extrajeron los hígados, se aislaron los núcleos y se obtuvieron las distintas fracciones proteicas nucleares, a las cuales se les determinó la cantidad de leucina marcada incorporada. Las dosis fueron las indicadas en Materiales y Métodos. Se usaron 3 animales por grupo.

^b $p < 0,02$.

^c $p < 0,05$.

^d $p > 0,05$.

A las 2 horas de intoxicación hubo una recuperación parcial de la incorporación del aminoácido marcado a todas las fracciones proteicas. El grado de recuperación fue función de cual fuera la fracción proteica.

La recuperación parcial a las dos horas de intoxicación coincide con el resultado obtenido en la incorporación del aminoácido marcado a las proteínas nucleares totales.

IV.B.- EFECTO DE LOS METABOLITOS REACTIVOS DEL CCl₄ SOBRE LA FORMACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS EN PROTEÍNAS

El CCl₄ ejerce su acción tóxica debido a que forma radicales libres capaces de alterar moléculas biológicas.

Como se indicó en la Introducción, muchos radicales libres son capaces de causar la oxidación de proteínas, generando grupos carbonilos sobre las mismas.

En esta serie de experimentos se quiso determinar si los radicales libres generados por activación del CCl₄ serían capaces de generar grupos carbonilos en proteínas.

Para estudiar esta posibilidad se utilizaron distintos sistemas.

IV.B.I.- Sistemas químicos, estudiando el efecto del CCl₄ (activado a sus metabolitos reactivos con luz UVC) sobre albúmina de huevo y aminoácidos.

IV.B.II.- Sistemas *in vitro*, utilizando distintas fracciones subcelulares.

IV.B.III.- *in vivo*, determinando el efecto del CCl₄ sobre proteínas microsomales y nucleares.

A continuación se indican los resultados obtenidos en cada uno de estos sistemas.

III.B.I.- SISTEMAS QUÍMICOS

En todos los experimentos de esta serie el CCl₄ fue activado a sus metabolitos reactivos por medio de luz ultravioleta C (UVC), para lo cual se irradiaron durante 6 minutos las soluciones en el sistema especialmente diseñado indicado en Materiales y Métodos.

Se utilizaron dos clases de moléculas blanco: la proteína albúmina de huevo y distintos aminoácidos.

En el caso de la albúmina, se realizaron distintos experimentos:

Se estudió el efecto de cada uno de los radicales libres generados por el CCl₄.

Se determinaron los efectos de distintos antioxidantes (α -tocoferol y Trolox) y del EDTA sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl₄ en la albúmina de huevo.

Se comparó el efecto del CCl₄ y sus metabolitos reactivos sobre la albúmina de huevo nativa y delipidada.

En el caso de los aminoácidos, se estudiaron los 20 aminoácidos presentes normalmente en las células eucariotas.

En todos los casos se usaron los procedimientos indicados en Materiales y Métodos.

Se indican a continuación los resultados obtenidos con los sistemas químicos.

IV.B.I.1.- PROTEÍNAS

En esta serie de experimentos se estudió el efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas.

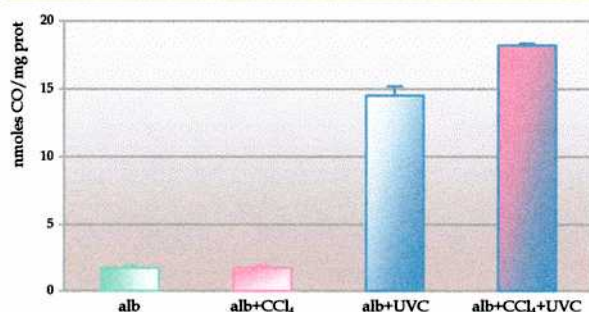
➤ IV.B.I.1.1.- Efecto del CCl_4 y de la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa en medio aerobio

Lo primero que se estudió fue si el CCl_4 o sus metabolitos reactivos eran capaces de causar la formación de grupos carbonilos sobre la albúmina de huevo nativa.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.I.1.1: Efecto del CCl_4 y de la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa en medio aerobio

Experimento ^a	UVC	nmoles CO/mg prot	% del Control
alb	-	1,73 ± 0,15	100
alb + CCl_4	-	1,72 ± 0,18 ^b	99
alb	+	14,50 ± 0,68 ^c	838
alb + CCl_4	+	18,19 ± 0,15 ^c	1051



^a Soluciones de albúmina nativa (alb) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

alb+ CCl_4 vs alb.

^c $p < 0,001$:

alb+UVC vs alb o alb+ CCl_4 .

alb+ CCl_4 +UVC vs alb, alb+ CCl_4 o alb+UVC.

De los resultados obtenidos se puede observar que el CCl_4 por sí mismo no fue capaz de causar la formación de grupos carbonilos en la albúmina de huevo nativa.

La acción de la luz ultravioleta C sobre la albúmina de huevo nativa causó un considerable aumento del contenido de grupos carbonilos.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 produjeron un aumento del contenido de grupos carbonilos de la albúmina de huevo nativa.

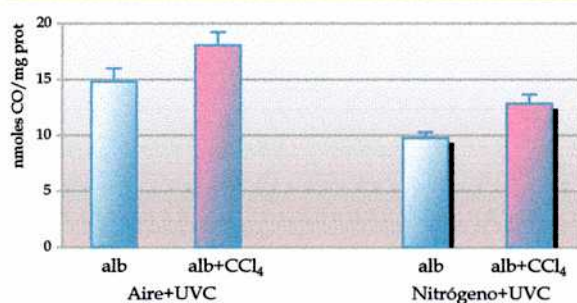
➤ **IV.B.I.1.2.- Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa en atmósfera de nitrógeno**

Para estudiar el efecto de cada uno de los radicales libres generados en la activación del CCl_4 se realizó el estudio de la formación de grupos carbonilos en atmósfera de nitrógeno. Como se indicó anteriormente, en esta atmósfera se forma únicamente el radical $\cdot\text{CCl}_3$, en tanto que en aire se forman ambos radicales libres, pero predominantemente $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.I.1.2: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa en atmósfera de nitrógeno

Experimento ^a	Nitrógeno	nmoles CO/mg prot	% del Control
alb	-	14,81 ± 1,17	100
alb + CCl_4	-	18,05 ± 1,18 ^b	122
alb	+	9,76 ± 0,52 ^b	66
alb + CCl_4	+	12,83 ± 0,81 ^b	87



^a Soluciones de albúmina de huevo nativa (alb) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM fueron irradiadas con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de aire o de nitrógeno. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.
^b $p < 0,001$ para todas las comparaciones posibles.

Los resultados obtenidos indican que la luz ultravioleta C por sí misma fue capaz de formar grupos carbonilos en la albúmina de huevo en ambas atmósferas, la formación de los grupos carbonilo fue mayor en medio aerobio que en medio anaerobio.

En lo que respecta al CCl_4 , se puede observar de los resultados que los dos radicales libres generados por el CCl_4 ($\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) tuvieron la capacidad de generar grupos carbonilo en las proteínas. El efecto de ambos radicales libres sería similar.

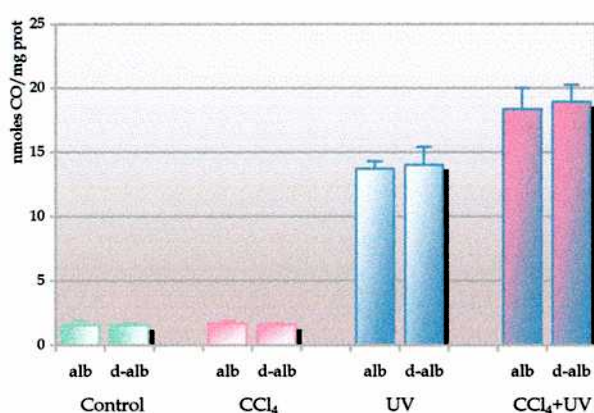
➤ **IV.B.I.1.3.- Formación de grupos carbonilos debida al CCl₄ y la luz UVC en albúmina de huevo y albúmina de huevo delipidada**

La albúmina de huevo nativa tiene lípidos asociados. Se quiso determinar si estos lípidos podrían contribuir de alguna manera a la formación de grupos carbonilo causada por los metabolitos reactivos del CCl₄ y por la luz ultravioleta C.

Se comparó el efecto del CCl₄ sobre ambas albúminas, los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla B.I.1.3: Formación de grupos carbonilos debida al CCl₄ y la luz UVC en albúmina de huevo y albúmina de huevo delipidada

Experimento ^a	UV	nmoles CO/mg prot	% del Control
alb	-	1,57 ± 0,32	100
d-alb	-	1,57 ± 0,08 ^b	100
alb + CCl ₄	-	1,69 ± 0,18 ^b	108
d-alb + CCl ₄	-	1,62 ± 0,07 ^b	103
alb	+	13,72 ± 0,56 ^c	874
d-alb	+	14,02 ± 1,39 ^{b,c}	893
alb + CCl ₄	+	18,35 ± 1,65 ^c	1169
d-alb + CCl ₄	+	18,92 ± 1,32 ^{b,c}	1205



^a Soluciones de albúmina nativa (alb) y de albúmina delipidada (d-alb) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl₄ 2 mM fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

cualquier comparación entre grupos no irradiados.
d-alb+UVC vs alb+UVC.
d-alb+CCl₄+UVC vs alb+CCl₄+UVC.

^c $p < 0,001$:

cualquier comparación entre un grupo irradiado y uno sin irradiar.
alb+CCl₄+UVC vs alb+UVC o d-alb+UVC.
d-alb+CCl₄+UVC vs alb+UVC o d-alb+UVC.

Se pudo determinar que el CCl₄ como tal no generó grupos carbonilo sobre ninguna de las dos albúminas.

Tanto los metabolitos reactivos como la luz UVC fueron capaces de generar grupos carbonilos sobre la albúmina nativa y sobre la albúmina delipidada en la misma proporción, por lo que en los experimentos siguientes se utilizó albúmina nativa.

➤ **IV.B.I.1.4.- Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl_4 y luz ultravioleta C en albúmina de huevo**

Se ensayó en el sistema químico el efecto del α -tocoferol 1 mM (α T) sobre la formación de grupos carbonilos debida a los metabolitos reactivos del CCl_4 en la albúmina de huevo nativa.

Se estudió el efecto del α -tocoferol dado que es el antioxidante presente en mayor abundancia en los organismos y a que se sabe que puede prevenir, al menos en parte, el efecto dañino de los radicales libres en algunos sistemas.

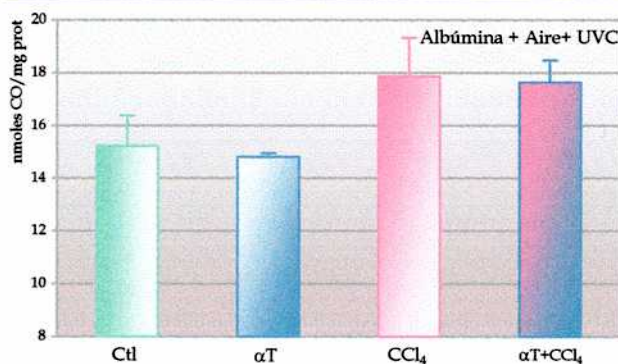
Se estudió el efecto del α -tocoferol en atmósfera aerobia y anaerobia.

➤ **IV.B.I.1.4a.- Efecto del α -tocoferol 1 mM en atmósfera aerobia**

A continuación se indican los resultados obtenidos en esta atmósfera.

Tabla IV.B.I.1.4a: Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl_4 y luz ultravioleta C en albúmina de huevo en medio aerobio

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	15,22 $\pm$ 1,15	100
α T	14,80 $\pm$ 0,14 ^b	97
CCl_4	17,87 $\pm$ 1,46 ^{c,d}	117
α T + CCl_4	17,64 $\pm$ 0,85 ^{b,d}	116



^a Soluciones de albúmina nativa (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl_4 2 mM y/o α -tocoferol 1 mM (α T) según se indique, fueron irradiadas con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de aire. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

α T vs Ctl.

α T+ CCl_4 vs CCl_4 .

^c $p < 0,01$:

CCl_4 vs Ctl.

^d $p < 0,05$:

CCl_4 vs α T.

CCl_4 + α T vs Ctl o α T.

Se puede inferir de los resultados obtenidos que el α -tocoferol no fue capaz de evitar la formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo nativa causada por la luz UVC.

El α -tocoferol tampoco fue capaz de evitar la formación de grupos carbonilos en la albúmina de huevo causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Esto podría ser debido a la baja solubilidad del α -tocoferol en el medio acuoso empleado.

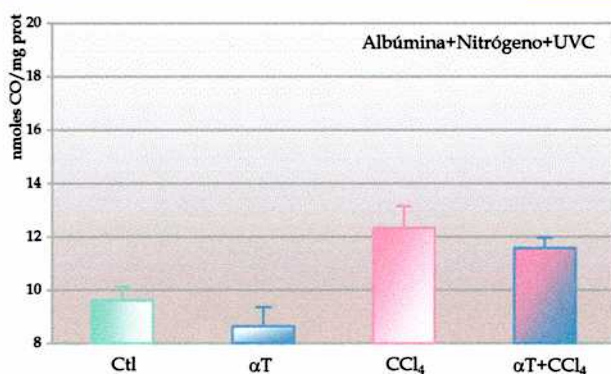
► IV.B.I.1.4b.- Efecto del α -tocoferol 1 mM en atmósfera anaerobia

Se quiso determinar en este caso el efecto del α -tocoferol sobre la formación de grupos carbonilo causada por el radical triclorometilo, para lo cual se empleó una atmósfera de nitrógeno, en la que, como se indicó anteriormente, se forma únicamente dicho radical.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla IV.B.I.1.4b: Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre la formación de carbonilos inducida por CCl_4 y luz ultravioleta C en albúmina de huevo en medio anaerobio

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	9,61 $\pm$ 0,50	100
α T	8,64 $\pm$ 0,71 ^b	90
CCl_4	12,33 $\pm$ 0,81 ^d	128
α T + CCl_4	11,57 $\pm$ 0,39 ^{b,c,d}	120



^a Soluciones de albúmina nativa (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl_4 2 mM y/o α -tocoferol 1 mM (α T) según se indique, fueron irradiadas con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de nitrógeno. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

α T vs Ctl.

α T+ CCl_4 vs CCl_4 .

^c $p < 0,01$:

α T+ CCl_4 vs Ctl.

^d $p < 0,001$:

CCl_4 vs Ctl o α T.

α T+ CCl_4 vs α T.

Al igual que en atmósfera aerobia, el α T no demostró ser capaz de inhibir la formación de grupos carbonilos inducida por la luz UVC en atmósfera de nitrógeno.

Tampoco demostró ser el α T en esta atmósfera capaz de evitar la formación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Como se indicó anteriormente, esto podría ser debido a la baja solubilidad del α T en el medio acuoso empleado en el ensayo.

➤ **IV.B.I.1.5.- Efecto del Trolox 1mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl₄ y UVC en albúmina de huevo**

El α -tocoferol no resultó ser capaz de inhibir la formación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl₄.

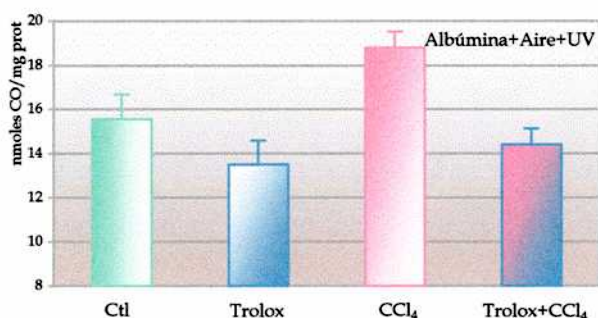
Para comprobar si la falta de efecto podría ser debida a la baja solubilidad del α -tocoferol en el medio acuoso empleado se estudió el posible efecto del Trolox, el cual es un análogo del α -tocoferol al que le falta la cadena isoprénica, lo cual lo hace hidrosoluble. Se realizaron experimentos en atmósfera de aire y de nitrógeno.

➤ **IV.B.I.1.5a.- Efecto del Trolox 1 mM en atmósfera aerobia**

En este experimento se utilizó una atmósfera de aire. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla IV.B.I.1.5a: Efecto del Trolox 1mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl₄ y UVC en albúmina de huevo en medio aerobio

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	15,55 $\pm$ 1,12	100
Trolox	13,50 $\pm$ 1,08 ^b	87
CCl ₄	18,80 $\pm$ 0,73 ^{c,d}	121
Trolox + CCl ₄	14,40 $\pm$ 0,72 ^{c,e}	93



^a Soluciones de albúmina nativa (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl₄ 2 mM y/o Trolox 1 mM según de indique, fueron irradiados con luz ultravioleta durante 6 minutos en atmósfera de aire. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p < 0,05$:

Trolox vs Ctl.

^c $p < 0,001$:

CCl₄ vs Trolox.

Trolox + CCl₄ vs CCl₄.

^d $p < 0,01$:

CCl₄ vs Ctl.

^e $p > 0,05$:

Trolox+CCl₄ vs Ctl o Trolox.

Se puede observar que el Trolox fue capaz de inhibir en parte el efecto de la luz ultravioleta C en atmósfera de aire.

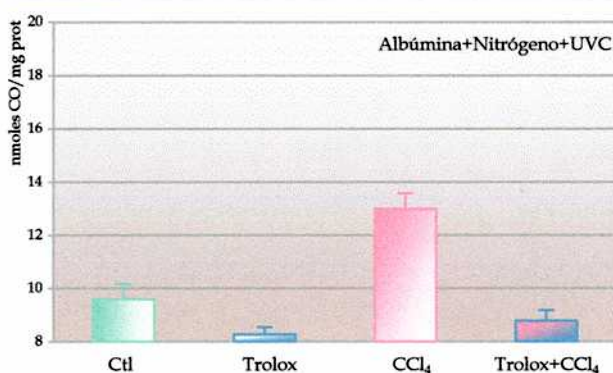
El Trolox fue capaz de inhibir totalmente la formación de grupos carbonilos causada por los radicales libres del CCl₄ en medio aerobio.

► IV.B.I.1.5b.- Efecto del Trolox 1 mM en atmósfera anaerobia

Por las mismas razones que en el experimento anterior, se estudió el efecto del Trolox, pero en este caso en atmósfera anaerobia para determinar el efecto de este antioxidante sobre la acción del $\cdot\text{CCl}_3$. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.B.I.1.5b: Efecto del Trolox 1mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl_4 y UVC en albúmina de huevo en medio anaerobio

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	9,59 ± 0,56	100
Trolox	8,27 ± 0,27 ^b	86
CCl_4	12,98 ± 0,52 ^c	135
Trolox + CCl_4	8,78 ± 0,59 ^{c,d}	92



^a Soluciones de albúmina nativa (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl_4 2 mM y/o Trolox 1 mM según se indique, fueron irradiados con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de nitrógeno. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p < 0,05$:

Trolox vs Ctl.

^c $p < 0,001$:

CCl_4 vs Ctl o Trolox.

Trolox + CCl_4 vs CCl_4 .

^d $p > 0,05$:

Trolox + CCl_4 vs Ctl o Trolox.

Se puede observar que el Trolox afectó en baja proporción la formación de grupos carbonilos por la luz UVC en medio anaerobio, de una forma similar a la observada en atmósfera de aire.

En cambio, de los resultados obtenidos se puede inferir que el Trolox fue capaz de inhibir totalmente el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la formación de carbonilos en la albúmina de huevo en atmósfera de nitrógeno, siendo el efecto similar al producido en atmósfera de aire.

➤ **IV.B.I.1.6.- Efecto del EDTA 3mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl₄ y UVC en albúmina de huevo**

El EDTA es un quelante de metales y, específicamente en el caso del CCl₄, es capaz de inhibir la activación del tóxico por metales y la peroxidación de lípidos causada por sus metabolitos reactivos.

Por estas capacidades del EDTA es que se estudió su efecto sobre la formación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl₄.

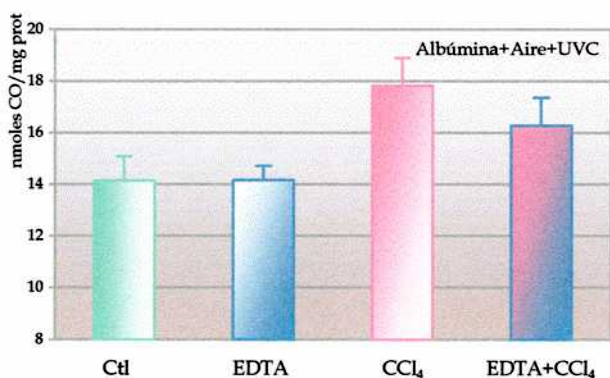
Los resultados obtenidos tratando la albúmina con luz UVC en presencia o no de CCl₄ y/o EDTA en atmósfera de aire y de nitrógeno se indican a continuación

➤ **IV.B.I.1.6a.- Efecto del EDTA 3 mM en atmósfera aerobia**

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto del EDTA en atmósfera aerobia son los siguientes:

Tabla IV.B.I.1.6a: Efecto del EDTA 3mM sobre la formación de carbonilos inducida por CCl₄ y UVC en albúmina de huevo en medio aerobio

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	14,14 ± 0,94	100
EDTA	14,17 ± 0,54 ^b	100
CCl ₄	17,81 ± 1,08 ^c	126
EDTA + CCl ₄	16,28 ± 1,08 ^{c,d}	115



^a Soluciones de albúmina nativa (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl₄ 2 mM y/o EDTA 3 mM según se indique, fueron irradiadas con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de aire. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

EDTA vs Ctl.

^c $p < 0,001$:

CCl₄ vs Ctl o EDTA.

EDTA+CCl₄ vs Ctl o EDTA.

^d $p < 0,01$:

EDTA+CCl₄ vs CCl₄.

Se puede observar que el EDTA no afectó la formación de grupos carbonilos en la albúmina de huevo nativa debida a la luz UVC en medio aerobio.

La formación de carbonilos debida a los metabolitos reactivos del CCl₄ en medio aerobio fue afectada, aunque en bajo grado, por la presencia de EDTA.

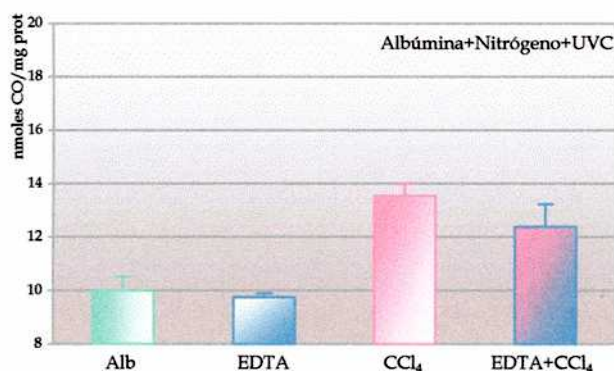
► IV.B.I.1.6b.- Efecto del EDTA 3 mM en atmósfera anaerobia

En este caso se quiso estudiar el efecto del EDTA sobre la formación de grupos carbonilos causada por el $\cdot\text{CCl}_3$, empleándose, al igual que en otros experimentos, una atmósfera de nitrógeno.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.I.1.6b: Efecto del EDTA 3mM sobre la formación de grupos carbonilos inducida por CCl_4 y UVC en albúmina de huevo en medio anaerobio

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	10,00 ± 0,49	100
EDTA	9,75 ± 0,34 ^b	98
CCl_4	13,53 ± 0,22 ^c	135
EDTA + CCl_4	12,38 ± 0,44 ^{c,d}	124



^a Soluciones de albúmina (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl_4 2 mM y/o EDTA 3 mM según se indique, fueron irradiadas con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de nitrógeno. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

EDTA vs Ctl.

^c $p < 0,001$:

CCl_4 vs Ctl o EDTA.

EDTA+ CCl_4 vs Ctl o EDTA.

^d $p < 0,01$:

EDTA+ CCl_4 vs CCl_4 .

Al igual que en atmósfera de aire, se puede observar que el EDTA no afectó la formación de carbonilos debida a la luz UVC en medio anaerobio.

La formación de carbonilos debida al $\cdot\text{CCl}_3$ fue afectada, aunque en bajo grado, por la presencia de EDTA en atmósfera anaerobia.

IV.B.I.II.- AMINOÁCIDOS

Dado que los metabolitos reactivos del CCl_4 fueron capaces de formar grupos carbonilos en proteínas, se quiso determinar si algún aminoácido en particular resultaba afectado, para lo cual se utilizó el sistema "in vitro" en el que el CCl_4 es activado con luz ultravioleta C (de 254 nm).

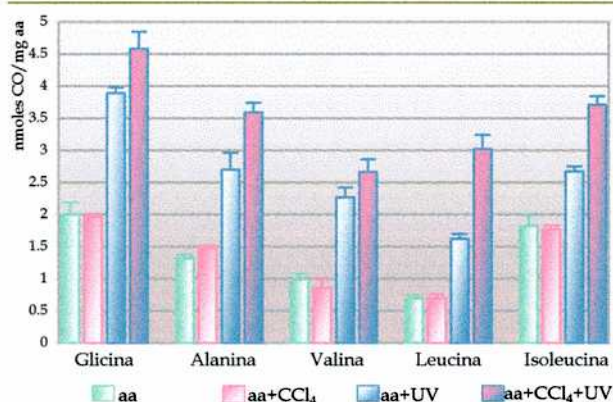
Se ensayaron los 20 aminoácidos normalmente presentes en las células eucariotas.

➤ IV.B.I.II.1.- Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina

Se estudió el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 y de la luz ultravioleta C sobre los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina. Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.B.I.II.1: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina

Experimento ^a	aa		aa+ CCl_4		aa+UV		aa+ CCl_4 +UV	
	nmol CO/mg prot	% Ctl	nmol CO/mg prot	% Ctl	nmol CO/mg prot	% Ctl	nmol CO/mg prot	% Ctl
Glicina	2,00 ± 0,19	100	1,97 ± 0,04 ^b	99	3,89 ± 0,09 ^c	195	4,58 ± 0,27 ^c	229
Alanina	1,32 ± 0,05	100	1,48 ± 0,04 ^b	112	2,70 ± 0,26 ^c	205	3,59 ± 0,15 ^c	272
Valina	0,99 ± 0,09	100	0,86 ± 0,15 ^b	87	2,27 ± 0,15 ^c	229	2,66 ± 0,20 ^c	269
Leucina	0,69 ± 0,05	100	0,70 ± 0,09 ^b	101	1,62 ± 0,08 ^c	234	3,02 ± 0,22 ^c	438
Isoleucina	1,82 ± 0,16	100	1,77 ± 0,06 ^b	97	2,67 ± 0,08 ^c	147	3,71 ± 0,13 ^c	204



^a Soluciones de aminoácido (aa) (glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. El contenido de grupos carbonilos (CO) fue determinado usando la técnica de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

aa+ CCl_4 vs aa.

^c $p < 0,01$:

aa+UV vs aa o aa+ CCl_4 .

aa+ CCl_4 +UV vs aa, aa+ CCl_4 o aa+UV.

De los resultados obtenidos se puede observar que todos los aminoácidos de este

grupo fueron afectados tanto por los metabolitos reactivos del CCl_4 como por la luz UVC, pero no por el CCl_4 . El aminoácido más afectado por los metabolitos reactivos del CCl_4 fue la leucina.

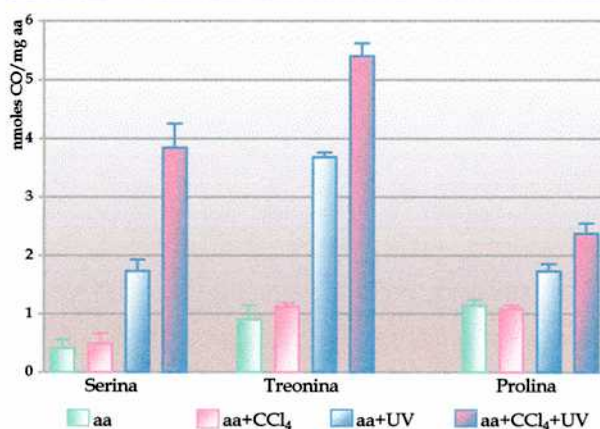
➤ IV.B.I.II.2.- Efecto del CCl_4 y de la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos serina, treonina y prolina

Se estudió el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 y la luz ultravioleta C sobre los aminoácidos hidroxilados serina, treonina y prolina.

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.B.I.II.2: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos serina, treonina y prolina

Experimento ^a	aa		aa+ CCl_4		aa+UV		aa+ CCl_4 +UV	
	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl
Serina	0,41 ± 0,14	100	0,49 ± 0,17 ^b	120	1,73 ± 0,20 ^c	422	3,84 ± 0,42 ^c	937
Treonina	0,90 ± 0,24	100	1,12 ± 0,06 ^b	124	3,68 ± 0,08 ^c	409	5,40 ± 0,22 ^c	600
Prolina	1,14 ± 0,10	100	1,08 ± 0,06 ^b	95	1,73 ± 0,13 ^c	152	2,38 ± 0,17 ^c	209



^a Soluciones de aminoácido (aa) (serina, treonina o prolina) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

aa+ CCl_4 vs aa.

^c $p < 0,01$:

aa+UV vs aa o aa+ CCl_4 .

aa+ CCl_4 +UV vs aa, aa+ CCl_4 o aa+UV.

El CCl_4 por sí mismo no fue capaz de generar grupos carbonilos en ninguno de los tres aminoácidos. En cambio, sí fueron afectados por la luz ultravioleta y por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

El aminoácido más afectado de este grupo por los radicales libres del CCl_4 fue la serina. En cambio, el aminoácido más afectado por la luz UVC fue la treonina.

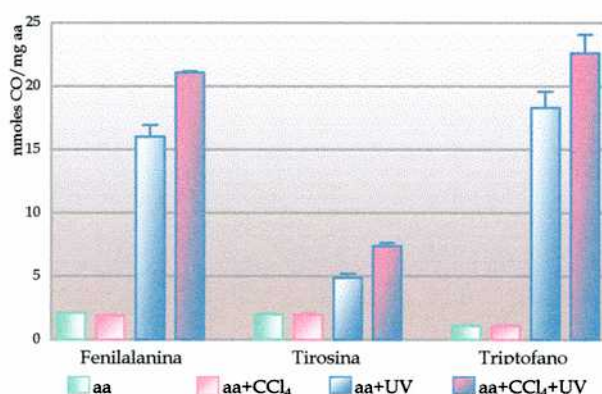
➤ IV.B.I.II.3.- Efecto del CCl₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptofano

Se ensayó sobre los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano el efecto de los metabolitos reactivos del CCl₄ y de la luz ultravioleta C sobre la formación de grupos carbonilos.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.I.II.3: Efecto del CCl₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptofano

Experimento ^a	aa		aa+CCl ₄		aa+UV		aa+CCl ₄ +UV	
	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl
Fenilalanina	2,10 ± 0,03	100	1,89 ± 0,08 ^b	90	16,02 ± 0,93 ^c	727	21,07 ± 0,12 ^c	1003
Tirosina	2,00 ± 0,05	100	1,96 ± 0,10 ^b	98	4,88 ± 0,31 ^c	244	7,37 ± 0,24 ^c	369
Triptofano	1,09 ± 0,00	100	1,10 ± 0,05 ^b	101	18,31 ± 1,27 ^c	1680	22,58 ± 1,47 ^c	2072



^a Soluciones de aminoácido (aa) (fenilalanina, tirosina o triptofano) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl₄ 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

aa+CCl₄ vs aa.

^c $p < 0,01$:

aa+UV vs aa o aa+CCl₄.

aa+CCl₄+UV vs aa, aa+CCl₄ o aa+UV.

Ninguno de los tres aminoácidos fue afectado por el CCl₄ solo.

En cambio, los tres fueron afectados por la luz UVC, siendo muy importante el efecto en el caso del triptofano y la fenilalanina.

Se produjo un aumento en el contenido de grupos carbonilos por la acción de los metabolitos reactivos del CCl₄ en todos los casos.

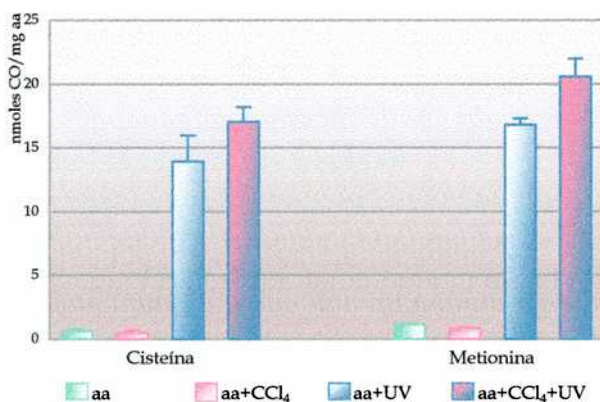
➤ IV.B.I.II.4.- Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos cisteína y metionina

Se estudió el efecto del CCl_4 activado a sus metabolitos reactivos y de la luz ultravioleta C sobre los aminoácidos azufrados cisteína y metionina.

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.B.I.II.4: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos cisteína y metionina

Experimento ^a	aa		aa+ CCl_4		aa+UV		aa+ CCl_4 +UV	
	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl
Cisteína	0,60 ± 0,15	100	0,50 ± 0,20 ^b	83	13,93 ± 2,05 ^c	2320	17,01 ± 1,17 ^c	2835
Metionina	1,14 ± 0,08	100	0,83 ± 0,06 ^b	73	16,79 ± 0,51 ^c	1473	20,58 ± 1,40 ^c	1805



^a Soluciones de aminoácido (aa) (cisteína o metionina) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

aa+ CCl_4 vs aa.

^c $p < 0,01$:

aa+UV vs aa o aa+ CCl_4 .

aa+ CCl_4 +UV vs aa, aa+ CCl_4 o aa+UV.

El CCl_4 por sí mismo no causó efecto sobre la formación de grupos carbonilos ni en la cisteína ni en la metionina.

La luz UVC causó un efecto muy importante sobre ambos aminoácidos.

Para estos aminoácidos también fue muy importante el efecto de formación de grupos carbonilos causado por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

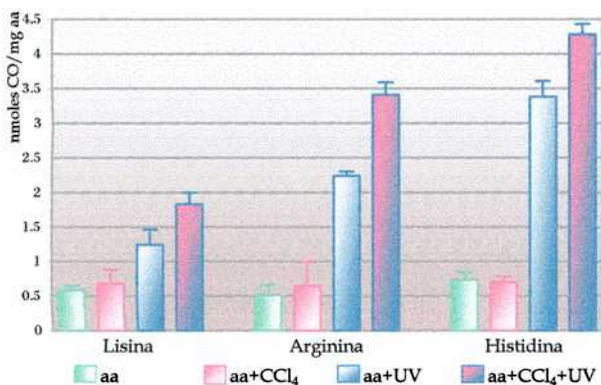
➤ IV.B.I.II.5.- Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos lisina, arginina e histidina

El efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 y la luz UVC sobre los aminoácidos aminados lisina, arginina e histidina fue estudiado en este caso.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.B.I.II.5: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos lisina, arginina e histidina

Experimento ^a	aa		aa+ CCl_4		aa+UV		aa+ CCl_4 +UV	
	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl
Lisina	0,58 ± 0,06	100	0,68 ± 0,17 ^b	117	1,24 ± 0,22 ^c	214	1,83 ± 0,17 ^c	316
Arginina	0,51 ± 0,15	100	0,64 ± 0,35 ^b	126	2,24 ± 0,06 ^c	439	3,41 ± 0,18 ^c	669
Histidina	0,73 ± 0,11	100	0,70 ± 0,08 ^b	96	3,38 ± 0,23 ^c	463	4,28 ± 0,15 ^c	586



^a Soluciones de aminoácido (aa) (lisina, arginina o histidina) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

aa+ CCl_4 vs aa.

^c $p < 0,01$:

aa+UV vs aa o aa+ CCl_4 .

aa+ CCl_4 +UV vs aa, aa+ CCl_4 o aa+UV.

Estos aminoácidos con grupos amino en su estructura no fueron afectados por el CCl_4 como tal.

Todos fueron afectados por la luz ultravioleta C, la lisina en menor grado que la arginina y la histidina.

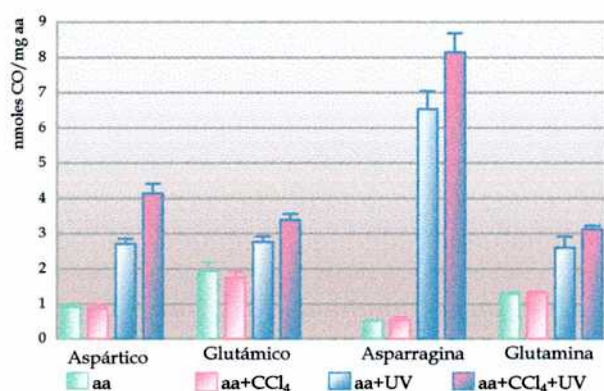
También fueron afectados por los metabolitos reactivos del CCl_4 ; en este caso el aminoácido más afectado fue la arginina.

➤ IV.B.I.II.6.- Efecto del CCl₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos aspártico, glutámico, asparragina y glutamina

Se estudió la acción del CCl₄ y de la luz ultravioleta sobre los aminoácidos aspártico, glutámico, asparragina y glutamina, siendo los resultados obtenidos indicados a continuación.

Tabla IV.B.I.II.6: Efecto del CCl₄ y la luz UVC sobre la formación de grupos carbonilos en los aminoácidos aspártico, glutámico, asparragina y glutamina

Experimento ^a	aa		aa+CCl ₄		aa+UV		aa+CCl ₄ +UV	
	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl	nmoles CO/mg prot	% Ctl
Aspártico	0,92 ± 0,06	100	0,87 ± 0,09 ^b	95	2,71 ± 0,14 ^c	295	4,14 ± 0,27 ^c	450
Glutámico	1,93 ± 0,26	100	1,75 ± 0,18 ^b	91	2,76 ± 0,16 ^c	143	3,39 ± 0,17 ^c	176
Asparragina	0,52 ± 0,03	100	0,56 ± 0,08 ^b	108	6,53 ± 0,51 ^c	1256	8,14 ± 0,54 ^c	1564
Glutamina	1,29 ± 0,04	100	1,33 ± 0,13 ^b	103	2,60 ± 0,31 ^c	202	3,12 ± 0,10 ^c	242



^a Soluciones de aminoácido (aa) (aspártico, glutámico, asparragina o glutamina) (4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl₄ 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados usando 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b p > 0,05:

aa+CCl₄ vs aa.

^c p < 0,01:

aa+UV vs aa o aa+CCl₄.

aa+CCl₄+UV vs aa, aa+CCl₄ o aa+UV.

El CCl₄ por sí mismo no fue capaz de causar la alteración del contenido de grupos carbonilos de ninguno de estos aminoácidos.

La luz UVC afectó a todos los aminoácidos aquí ensayados, siendo particularmente importante el efecto sobre la asparragina.

Los metabolitos reactivos del CCl₄ también afectaron a todos los aminoácidos, siendo nuevamente más importante el efecto en el caso de la asparragina.

IV.B.II.- SISTEMAS IN VITRO

Se estudió la posible formación de grupos carbonilos en proteínas de distintas fracciones subcelulares de ratas macho Sprague-Dawley: microsomas, núcleos, mitocondrias y citosol. En estos casos, los sistemas activadores serían los que estarían o no presentes en cada fracción subcelular (todas las fracciones subcelulares, salvo el citosol, poseen sistemas de activación del CCl_4). Las proteínas blanco de ataque serían las mismas proteínas presentes en cada fracción subcelular.

Se realizaron dos clases de estudios:

IV.B.II.1.- Sobre las distintas fracciones subcelulares.

IV.B.II.2.- La acción de distintas sustancias en el caso de los microsomas.

En todos los casos se incubaron las distintas fracciones subcelulares en un medio adecuado para cada una de ellas y se analizó la formación de grupos carbonilos sobre las propias proteínas de las organelas. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

En el caso de los microsomas se estudió el efecto de una atmósfera de nitrógeno sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl_4 en proteínas microsomales.

También para los microsomas se determinó el efecto de distintas sustancias: α -tocoferol, hemisuccinato de α -tocoferol, Trolox y EDTA sobre la formación de grupos carbonilos debidas al CCl_4 . En cada experimento se indican los motivos de estudio de cada una de ellas.

IV.B.II.1.- DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES

En esta serie de experimentos se ensayó el efecto del CCl_4 y sus metabolitos reactivos sobre las proteínas de distintas fracciones subcelulares.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

➤ IV.C.II.1.1.- Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas microsomales hepáticas de rata

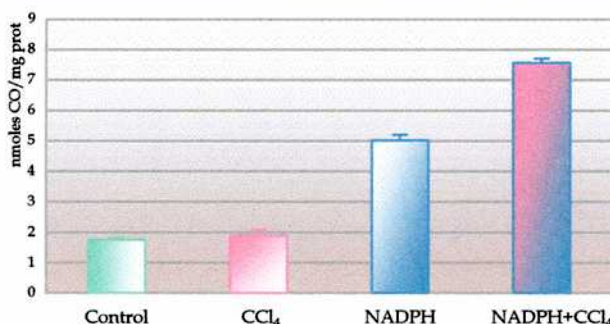
Para la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos es necesaria la presencia de NADPH, ya que este cofactor es requerido para la reducción del CCl_4 . Por esta razón se lo emplea en los sistemas de incubación.

El NADPH por sí mismo es capaz de causar alteraciones en las propiedades que se estén estudiando, por lo cual siempre se realiza el control correspondiente.

Los resultados obtenidos son los indicados a continuación.

Tabla IV.B.II.1.1: Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas microsomales hepáticas de rata

Tratamiento ^a	nmoles CO/ mg prot	% del Control
Control (Ctl)	1,76 ± 0,05	100
CCl_4	1,88 ± 0,19 ^b	107
NADPH	5,02 ± 0,18 ^c	285
NADPH + CCl_4	7,57 ± 0,14 ^c	430



^a Microsomas hepáticos de rata (3,7 mg proteínas/ml de incubado) fueron incubados 1 hora a 37°C en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl_4 2 mM según se indique. El contenido de grupos carbonilos (CO) fue determinado con la técnica de 2,4 dinitrofenilhidracina. Se usaron cinco muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

CCl_4 vs Ctl.

^c $p < 0,001$:

NADPH vs Ctl o CCl_4 .

NADPH + CCl_4 vs Ctl, CCl_4 o NADPH.

El CCl_4 por sí mismo no fue capaz de generar grupos carbonilos en las proteínas microsomales hepáticas de rata.

En cambio, el NADPH per se fue capaz de causar la formación de grupos carbonilos en las proteínas hepáticas de rata. Esto era esperado ya que se sabe que el NADPH puede producir otros efectos, como por ejemplo la peroxidación de lípidos, en sistemas *in vitro* de incubación de microsomas.

Respecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 , se puede observar que los mismos generaron grupos carbonilos en proteínas microsomales hepáticas de rata.

Estos resultados serán considerados más adelante al analizar el efecto de distintas sustancias sobre la formación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 en proteínas microsomales hepáticas de rata.

➤ **IV.B.II.1.2.- Efecto del CCl_4 y del CBrCl_3 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas nucleares hepáticas de rata**

Se estudió en un sistema *in vitro* el posible efecto del CCl_4 y del CBrCl_3 sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas nucleares hepáticas de rata Sprague-Dawley.

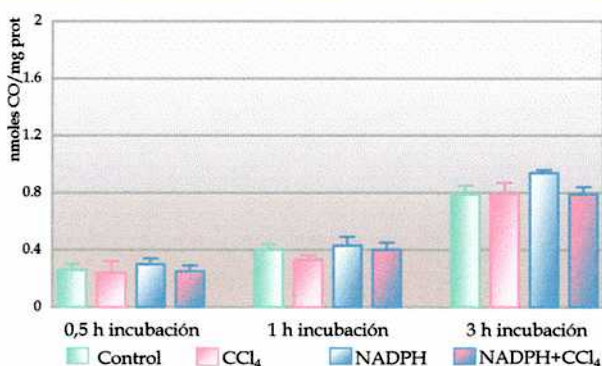
Los resultados obtenidos se indican a continuación.

➤ **IV.B.II.1.2a.- Efecto del CCl_4**

En el ensayo del efecto del CCl_4 los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.B.II.1.2a: Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en las proteínas nucleares hepáticas de rata

Experimento ^a	0,5 h incub. nmoles CO/ mg prot	1 h incub nmoles CO/ mg prot	3 h incub nmoles CO/ mg prot
Control (Ctl)	0.26 ± 0.04	0.40 ± 0.05	0.79 ± 0.06
CCl_4	0.24 ± 0.08 ^b	0.33 ± 0.03 ^b	0.79 ± 0.08 ^b
NADPH	0.30 ± 0.04 ^b	0.43 ± 0.06 ^{b,c}	0.94 ± 0.02 ^{b,c}
CCl_4 + NADPH	0.25 ± 0.04 ^b	0.40 ± 0.05 ^b	0.79 ± 0.05 ^{b,c}



^a Las mezclas de incubación conteniendo núcleos (8 mg prot/ml) en presencia de sistema generador de NADPH y/o CCl_4 2mM de acuerdo a lo que se indique, fueron incubadas a 37 °C durante el tiempo indicado. El contenido de grupos carbonilos fue determinado con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

0,5h incub: cualquier comparación posible.

1h incub: toda comparación salvo NADPH vs CCl_4 .

3h incub: CCl_4 vs Ctl; NADPH+ CCl_4 vs Ctl o CCl_4 .

^c $p < 0,05$:

1h incub: NADPH vs CCl_4 .

3h incub: NADPH vs Ctl o CCl_4 ;

NADPH+ CCl_4 vs NADPH

De los resultados obtenidos se puede observar que ni el CCl_4 ni sus metabolitos reactivos fueron capaces de causar la formación de grupos carbonilos en las proteínas nucleares en forma detectable, pese a que se sabe que el CCl_4 puede ser activado a sus metabolitos reactivos en los núcleos hepáticos de rata.

El NADPH fue capaz de causar la formación de grupos carbonilos en las proteínas nucleares a las 3 horas de incubación.

➤ IV.B.II.1.2b.- Efecto del CBrCl₃

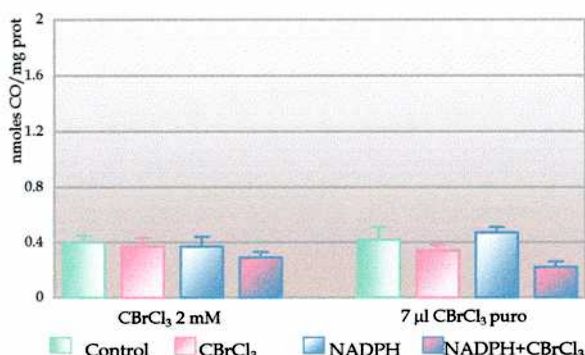
Debido a los resultados negativos obtenidos con el CCl₄ y dado que se sabe que los núcleos poseen sistemas de activación para el CCl₄ (aunque en mucha menor proporción que los microsomas), se ensayó una sustancia que posee menor energía de activación que el CCl₄, el CBrCl₃. Este último al activarse forma los mismos metabolitos reactivos que el CCl₄.

Se empleó en el ensayo el mismo sistema de incubación *in vitro* para núcleos empleado para el CCl₄, indicado en Materiales y Métodos, usándose distintas concentraciones de CBrCl₃. El tiempo de incubación elegido fue de una hora.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.II.1.2b: Efecto del CBrCl₃ *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas nucleares hepáticas de rata

Experimento ^a	2 mM CBrCl ₃ nmoles CO/ mg prot	CBrCl ₃ (7μl) nmoles CO/ mg prot
Control (Ctl)	0.40 ± 0.05	0.42 ± 0.09
CBrCl ₃	0.37 ± 0.06 ^b	0.34 ± 0.04 ^b
NADPH	0.37 ± 0.07 ^b	0.47 ± 0.04 ^{b,c}
CBrCl ₃ + NADPH	0.29 ± 0.04 ^{b,c}	0.22 ± 0.04 ^c



^a Las mezclas de incubación conteniendo núcleos (8 mg prot/ml) en presencia de sistema generador de NADPH y/o CBrCl₃ 2 mM o 7 μl CBrCl₃, de acuerdo a lo que se indique, fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora. El contenido de grupos carbonilos (CO) fue determinado con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

En ambos casos: CBrCl₃ vs Ctl; NADPH vs Ctl.
CBrCl₃ 2 mM: NADPH vs CBrCl₃;
NADPH+CBrCl₃ vs CBrCl₃ o NADPH.

^c $p < 0,03$:

En ambos casos: NADPH+CBrCl₃ vs Ctl.
CBrCl₃ 7 μl: NADPH vs CBrCl₃;
NADPH+CBrCl₃ vs CBrCl₃ o NADPH.

De los resultados obtenidos se puede observar que el CBrCl₃ por sí mismo no fue capaz de alterar el contenido de grupos carbonilos de las proteínas nucleares hepáticas.

El CBrCl₃ activado a sus metabolitos reactivos no solo no causó un aumento en el contenido de grupos carbonilos sino que de hecho produjo una disminución del contenido de grupos carbonilos de las proteínas nucleares.

➤ IV.B.II.1.3.- Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata

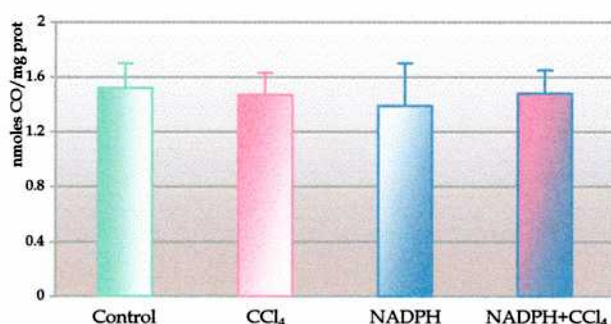
En este caso se estudió si los metabolitos reactivos del CCl_4 eran capaces de generar grupos carbonilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata. Se eligió nuevamente como tiempo de incubación 1 hora.

Se sabe que las mitocondrias son capaces de activar al CCl_4 a sus metabolitos reactivos. Esta activación puede ser enzimática, vía citocromo P450, o no enzimática.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla IV.B.II.1.3: Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% de Control
Control	1,52 ± 0,18	100
CCl_4	1,39 ± 0,31 ^b	91
NADPH	1,47 ± 0,16 ^b	97
NADPH + CCl_4	1,48 ± 0,17 ^b	97



^a Las mezclas de incubación onteniendo mitocondrias (5 mg proteínas/ml) fueron incubadas 1 hora a 37°C en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl_4 2 mM. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$ en todos los casos.

En el caso del CCl_4 , ni per se ni vía sus metabolitos reactivos, fue capaz de alterar el contenido de grupos carbonilos en las proteínas mitocondriales hepáticas de rata en un sistema *in vitro*.

Tampoco se pudo detectar una alteración del contenido de grupos carbonilos de las proteínas mitocondriales debida a la presencia de NADPH.

➤ IV.B.II.1.4.- Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas citosólicas hepáticas de rata

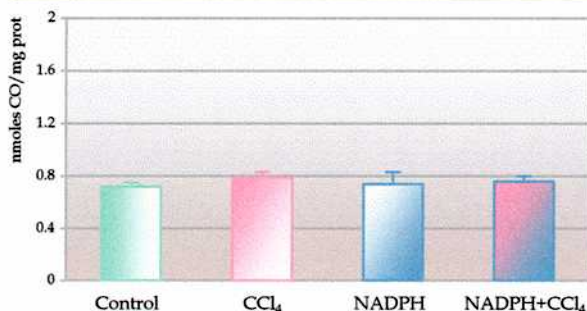
Se analizó el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre las proteínas citosólicas hepáticas de rata. Nuevamente el tiempo de incubación elegido fue de una hora.

Es sabido que el citosol no es capaz de activar al CCl_4 a sus metabolitos reactivos, sin embargo, se quiso completar el estudio del efecto del CCl_4 sobre distintas fracciones celulares.

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.B.II.1.4: Efecto del CCl_4 *in vitro* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas citosólicas hepáticas de rata

Experimento ^a	nmoles CO/mg prot	% de Control
Control	0,72 ± 0,03	100
CCl_4	0,79 ± 0,04 ^b	110
NADPH	0,74 ± 0,09 ^b	103
NADPH + CCl_4	0,76 ± 0,04 ^b	106



^a Las mezclas de incubación conteniendo citosol (0,6 ml de citosol/incubación) fueron incubadas 1 hora a 37°C en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl_4 2 mM según se indique. Los grupos carbonilos fueron determinados con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$ en todos los casos.

No se pudieron detectar alteraciones en el contenido de grupos carbonilos en las proteínas citosólicas causadas por el NADPH.

Tampoco se detectaron alteraciones en el contenido de grupos carbonilos en las proteínas citosólicas en el caso del CCl_4 solo o activado a sus metabolitos reactivos.

IV.B.II.2.- ESTUDIO SOBRE MICROSOMAS

Dado que se había determinado que los metabolitos reactivos del CCl_4 y el NADPH eran capaces de oxidar las proteínas microsomales hepáticas de rata en un sistema *in vitro* con formación de grupos carbonilos, se quiso estudiar, al menos en parte, las características de estas oxidaciones.

Se emplearon distintas formas de estudio. Para ensayar el efecto de cada uno de los metabolitos reactivos del CCl_4 se emplearon dos atmósferas distintas; como se indicó anteriormente, en atmósfera de nitrógeno se forma únicamente el radical $\cdot\text{CCl}_3$, en tanto que en aire se forman $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ y $\cdot\text{CCl}_3$, principalmente el primero.

Se ensayaron distintos antioxidantes: un antioxidante presente normalmente en los organismo, el α -tocoferol, un derivado del mismo, el hemisuccinato de α -tocoferol (más hidrosoluble que el α -tocoferol), y por último el Trolox, el cual, como se indicó anteriormente, es un análogo hidrosoluble del α -tocoferol.

Para estudiar la posible contribución de la peroxidación de lípidos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 o por el NADPH, se empleó EDTA, el cual en una concentración 3 mM inhibe la peroxidación de lípidos causada por dichas sustancias.

El sistema de incubación *in vitro* aquí empleado es el mismo usado en la determinación de la formación de grupos carbonilos por los metabolitos reactivos del CCl_4 en la fracción microsomal. En todos los casos se incubó a 37°C durante una hora. En las tablas se indican las sustancias presentes en cada uno de los frascos de incubación.

Los resultados obtenidos en cada uno de los sistemas se indican a continuación.

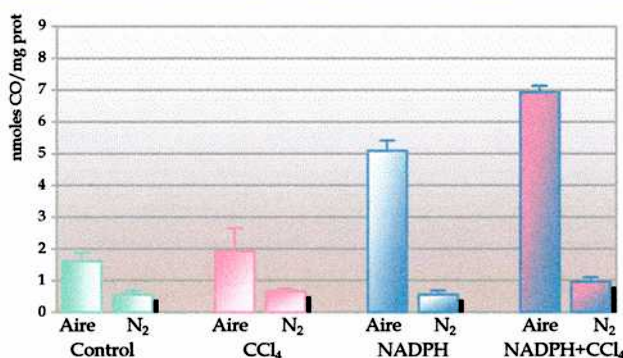
➤ IV.B.II.2.1.- Efecto del CCl_4 sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas microsomales en atmósfera de aire y de nitrógeno

Como recién se indicó, el objetivo de este experimento fue tratar de analizar las contribuciones de cada uno de los radicales libres generados por el CCl_4 en la oxidación de proteínas.

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.B.II.2.1: Efecto del CCl₄ sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas microsomales en atmósfera de aire y de nitrógeno

Experimento ^a	Nitrógeno	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	1,61 ± 0,25	100
Control	+	0,56 ± 0,11 ^b	35
CCl ₄	-	1,92 ± 0,72 ^{b,c}	119
CCl ₄	+	0,66 ± 0,07 ^{b,c}	41
NADPH	-	5,08 ± 0,32 ^b	316
NADPH	+	0,56 ± 0,13 ^{b,c}	35
NADPH+ CCl ₄	-	6,98 ± 0,21 ^b	434
NADPH + CCl ₄	+	0,96 ± 0,14 ^b	60



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (4,7 mg proteínas/ml) fueron incubadas 1 hora a 37 °C en atmósfera de aire o de N₂, en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl₄ 2 mM según se indique. El contenido de grupos carbonilos (CO) fue determinado con la técnica de 2,4 dinitrofenilhidracina. Fueron utilizadas cuatro muestras por grupo.

^b p < 0,001:
cualquier comparación entre un grupo en N₂ y otro en aire.

NADPH vs Ctl o CCl₄.

NADPH+CCl₄ vs Ctl, CCl₄ o NADPH.

NADPH+CCl₄+N₂ vs (Ctl, CCl₄ o NADPH)+N₂.

^c p > 0,05:

CCl₄ vs Ctl.

CCl₄+N₂ vs Ctl+N₂.

NADPH+N₂ vs (Ctl o CCl₄)+N₂.

De los resultados obtenidos se puede observar que en atmósfera de nitrógeno disminuye el contenido de grupos carbonilos en las proteínas del grupo control y del tratado únicamente con CCl₄.

Por otra parte, se inhibe totalmente la formación de grupos carbonilos causada por el NADPH.

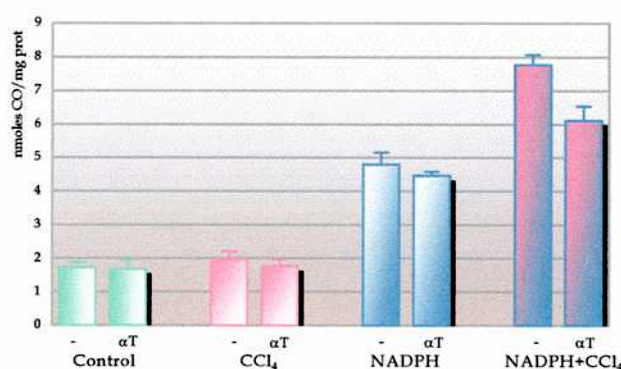
En el caso de los metabolitos reactivos del CCl₄, la atmósfera de nitrógeno no fue capaz de prevenir en forma completa la oxidación de proteínas causada por el CCl₄ en esta atmósfera.

➤ IV.B.II.2.2.- Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl_4 en proteínas microsomales

En este experimento se estudió el efecto del α -tocoferol sobre la generación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 en proteínas microsomales hepáticas de rata. A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.II.2.2: Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl_4 en proteínas microsomales

Experimento ^a	α T	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	1,72 $\pm$ 0,16	100
Control	+	1,68 $\pm$ 0,28 ^b	98
CCl_4	-	1,97 $\pm$ 0,22 ^b	115
CCl_4	+	1,76 $\pm$ 0,19 ^b	102
NADPH	-	4,79 $\pm$ 0,36 ^c	279
NADPH	+	4,46 $\pm$ 0,12 ^{b,c}	259
NADPH + CCl_4	-	7,77 $\pm$ 0,30 ^c	452
NADPH + CCl_4	+	6,13 $\pm$ 0,42 ^c	356



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml), fueron incubadas 1 hora a 37°C en presencia o no de CCl_4 2 mM, sistema generador de NADPH y/o α -tocoferol 1mM (α T), según se indique. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

Ctl+ α T vs Ctl, CCl_4 vs Ctl o Ctl+ α T.
 CCl_4 + α T vs Ctl, Ctl+ α T o CCl_4 .
 NADPH+ α T vs NADPH.

^c $p < 0,01$:

NADPH vs Ctl, Ctl+ α T, CCl_4 , CCl_4 + α T.
 NADPH+ α T vs Ctl, Ctl+ α T, CCl_4 o CCl_4 + α T.
 NADPH+ CCl_4 vs cualquier otro grupo.
 NADPH+ CCl_4 + α T vs cualquier otro grupo.

No hubo alteración en el contenido de grupos carbonilos en las proteínas del control y del CCl_4 solo por la presencia de α -tocoferol en el medio de incubación.

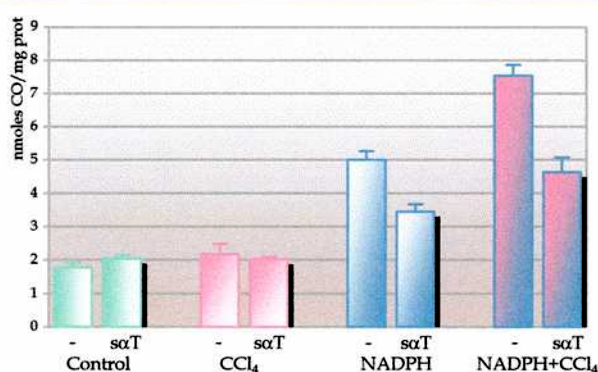
El α -tocoferol no fue capaz de inhibir la formación de carbonilos causada por el NADPH, pero sí fue capaz de inhibir en parte la formación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

➤ IV.B.II.2.3.- Efecto del hemisuccinato de α -tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl_4 en proteínas microsomales

Con el objeto de estudiar si el bajo efecto del α T podría ser debido a su poca solubilidad en el sistema acuoso de incubación, se estudió el efecto del hemisuccinato de α -tocoferol (α T) (un derivado del α T al cual el grupo succinato lo hace más hidrosoluble), sobre la formación de grupos carbonilos en las proteínas microsomales hepáticas *in vitro* por la acción del CCl_4 . Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.B.II.2.3: Efecto del hemisuccinato de α -tocoferol 1 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl_4 en proteínas microsomales

Experimento ^a	α T	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	1,78 $\pm$ 0,13	100
Control	+	2,04 $\pm$ 0,10 ^b	115
CCl_4	-	2,07 $\pm$ 0,31 ^b	116
CCl_4	+	2,02 $\pm$ 0,07 ^b	114
NADPH	-	5,00 $\pm$ 0,26 ^c	281
NADPH	+	3,45 $\pm$ 0,22 ^c	194
NADPH + CCl_4	-	7,54 $\pm$ 0,33 ^c	424
NADPH + CCl_4	+	4,63 $\pm$ 0,45 ^{b,c}	260



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml), fueron incubadas 1 hora a 37°C en presencia o no de CCl_4 2 mM, sistema generador de NADPH y/o hemisuccinato de α -tocoferol 1mM (α T), según se indique. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

Ctl+ α T vs Ctl; CCl_4 vs Ctl o Ctl+ α T.

CCl_4 + α T vs Ctl, Ctl+ α T o CCl_4 .

NADPH+ CCl_4 + α T vs NADPH.

^c $p < 0,01$:

NADPH vs Ctl, Ctl+ α T, CCl_4 o CCl_4 + α T.

NADPH+ α T vs cualquier otro grupo.

NADPH+ CCl_4 vs cualquier otro grupo.

NADPH+ CCl_4 + α T vs Ctl, Ctl+ α T, CCl_4 , CCl_4 + α T,

NADPH+ α T.

El α T, al igual que el α T, no alteró el contenido de CO del control y CCl_4 .

A diferencia del α T, el α T fue capaz de inhibir parcialmente la acción del NADPH.

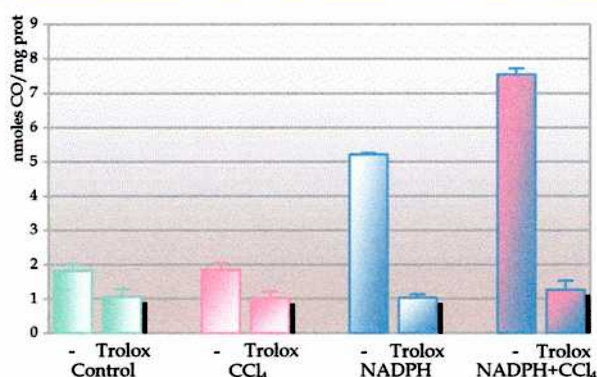
En el caso de los metabolitos reactivos del CCl_4 , el efecto del α T fue mayor que el del α T, aunque no fue total.

➤ IV.B.II.2.4.- Efecto del Trolox 1 mM sobre la formación de carbonilos causada por el CCl₄ sobre proteínas microsomales

Se estudio el efecto del Trolox, análogo hidrosoluble del α-tocoferol, sobre los grupos carbonilos formados por los metabolitos reactivos del CCl₄ en proteínas microsomales hepáticas en un sistema *in vitro*. Se indican a continuación los resultados obtenidos.

Tabla IV.B.II.2.4: Efecto del Trolox 1 mM sobre la formación de carbonilos causada por el CCl₄ sobre proteínas microsomales

Experimento ^a	Trolox	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	1,82 ± 0,19	100
Control	+	1,05 ± 0,23 ^b	53
CCl ₄	-	1,84 ± 0,20 ^{b,d}	94
CCl ₄	+	1,01 ± 0,20 ^{b,c}	56
NADPH	-	5,22 ± 0,04 ^c	294
NADPH	+	1,03 ± 0,10 ^{c,d}	46
NADPH + CCl ₄	-	7,54 ± 0,18 ^c	430
NADPH + CCl ₄	+	1,26 ± 0,27 ^{c,d}	69



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml de incubado), fueron incubadas 1 hora a 37°C en presencia o no de CCl₄ 2 mM, sistema generador de NADPH y/o Trolox 1 mM, según se indique. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p < 0,03$:

(Ctl o CCl₄)+Trolox vs Ctl; CCl₄ vs Ctl+Trolox.

^c $p < 0,01$:

CCl₄+Trolox vs CCl₄.

NADPH vs cualquier otro grupo.

NADPH+Trolox vs Ctl, CCl₄ o NADPH.

NADPH+CCl₄ vs cualquier otro grupo.

^d $p > 0,05$:

cualquier comparación entre grupos con Trolox.

CCl₄ vs Ctl.

NADPH+CCl₄+Trolox vs Ctl o CCl₄.

El Trolox disminuyó el contenido de grupos carbonilos de las proteínas microsomales del control y del tratado sólo con CCl₄.

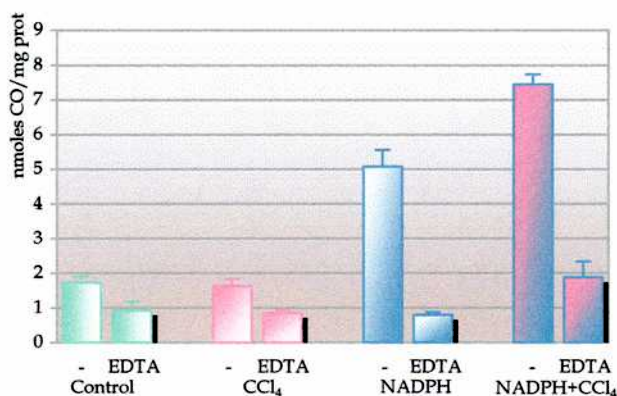
Este antioxidante hidrosoluble fue capaz de inhibir totalmente la formación de grupos carbonilos causada por tanto por el NADPH como por los metabolitos reactivos del CCl₄.

➤ IV.B.II.2.5.- Efecto del EDTA 3 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl₄ en proteínas microsomales

Se analizó la contribución de la peroxidación de lípidos a la formación de grupos carbonilos por los metabolitos reactivos del CCl₄ en proteínas microsomales hepáticas de rata *in vitro* mediante el empleo de EDTA. Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.B.II.2.5: Efecto del EDTA 3 mM sobre la formación de grupos carbonilos causada por el CCl₄ en proteínas microsomales

Experimento ^a	EDTA	nmoles CO/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	1,73 ± 0,17	100
Control	+	0,92 ± 0,25 ^b	53
CCl ₄	-	1,62 ± 0,21 ^{c,d}	94
CCl ₄	+	0,85 ± 0,08 ^{b,d}	47
NADPH	-	5,08 ± 0,47 ^b	294
NADPH	+	0,79 ± 0,26 ^{b,d}	46
NADPH + CCl ₄	-	7,44 ± 0,29 ^b	430
NADPH + CCl ₄	+	1,88 ± 0,45 ^{b,c,d}	109



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml), en presencia o no de CCl₄ 2 mM, sistema generador de NADPH y/o EDTA 3 mM, según se indique, fueron incubadas 1 hora a 37°C. Los grupos carbonilos (CO) fueron determinados con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b p < 0,01:

Ctl+EDTA vs Ctl, CCl₄+EDTA vs Ctl o CCl₄,
NADPH vs cualquier otro grupo.
NADPH+EDTA vs Ctl o CCl₄.
NADPH+CCl₄ vs cualquier otro grupos.
NADPH+CCl₄+EDTA vs NADPH+EDTA.

^c p < 0,04:

CCl₄ vs Ctl+EDTA.
NADPH+CCl₄+EDTA vs (Ctl o CCl₄)+EDTA.

^d p > 0,05:

CCl₄ vs Ctl; CCl₄+EDTA vs Ctl+EDTA.
NADPH+EDTA vs (Ctl o CCl₄)+EDTA.
NADPH+CCl₄+EDTA vs Ctl o CCl₄.

El EDTA causó la disminución de los grupos carbonilos de los grupos control y CCl₄.

Esta sustancia fue capaz de inhibir totalmente la formación de grupos carbonilos causada por el NADPH en las proteínas microsomales.

En el caso de los metabolitos reactivos del CCl₄, el EDTA sólo fue capaz de inhibir parcialmente la acción formadora de grupos carbonilos de los metabolitos reactivos del CCl₄.

IV.B.III.- SISTEMAS IN VIVO

En estos experimentos se estudió el efecto del CCl_4 *in vivo* sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas microsomales y nucleares hepáticas de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley.

Se determinó dicho efecto a distintos tiempos de intoxicación. En todos los casos se realizó un control, administrando a los animales aceite de oliva.

Después del tiempo de intoxicación se sacrificaron los animales y se procedió según se indica en Materiales y Métodos.

A continuación se indican los resultados obtenidos para cada fracción subcelular.

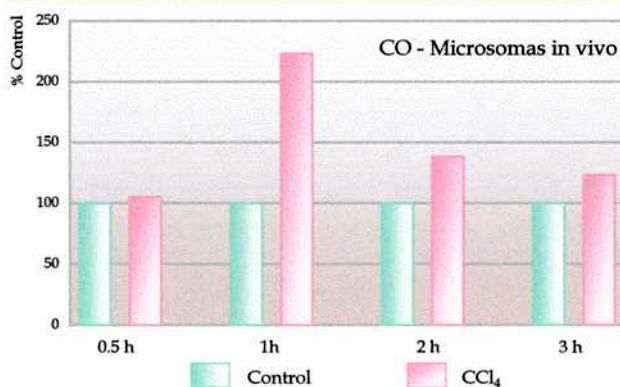
➤ IV.B.III.1.- Efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos carbonilos *in vivo* en proteínas microsomales hepáticas de rata

En este caso el efecto estudiado fue el del CCl_4 sobre las proteínas microsomales hepáticas.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.B.III.1: Efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos carbonilos *in vivo* en proteínas microsomales hepáticas de rata

Tratamiento ^a	Control nmoles CO/mg prot	CCl_4 nmoles CO/mg prot	% del Control
0,5 h	1,49 ± 0,92	1,57 ± 0,74 ^b	105
1 h	2,15 ± 0,99	4,79 ± 2,85 ^c	223
2 h	0,88 ± 0,34	1,21 ± 0,26 ^c	138
3 h	1,86 ± 0,35	2,30 ± 1,55 ^b	124



^a Se administró el CCl_4 ip como una solución al 20 % en aceite de oliva (5 ml/kg). Los controles recibieron una cantidad equivalente de aceite de oliva. Los animales fueron sacrificados 0,5, 1, 2 y 3 horas después de la administración del CCl_4 , se les extrajeron los hígados, se aislaron las proteínas microsomales y se les determinó el contenido de carbonilos (CO) usando la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. Fueron usados ocho animales por grupo.

^b $p > 0,05$.

^c $p < 0,05$.

Se puede observar que el CCl_4 fue capaz de aumentar la concentración de grupos

carbonilos en proteínas microsomales hepáticas en un organismo vivo.

El efecto del CCl_4 fue transitorio, ya que se revertió a las 3 h de intoxicación.

Los niveles de grupos carbonilos de las proteínas microsomales de los grupos control *in vivo* fueron del orden de los detectados en el sistema de incubación de microsomas indicado anteriormente.

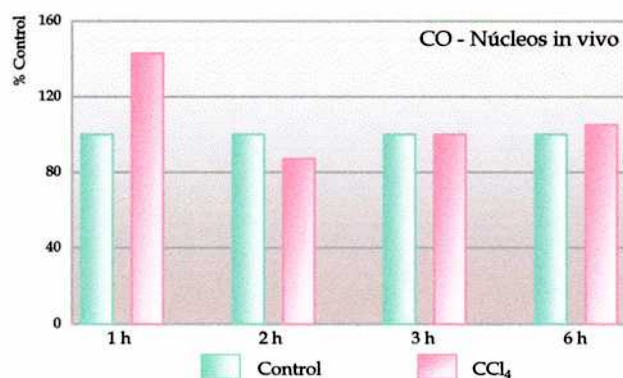
➤ IV.B.III.2.- Grupos carbonilos presentes en proteínas nucleares hepáticas de rata a distintos tiempos de intoxicación con CCl_4

Se estudió el efecto del CCl_4 a distintos tiempos de intoxicación sobre el contenido de grupos carbonilos en proteínas nucleares hepáticas de ratas macho Sprague-Dawley.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.B.III.2: Grupos carbonilos presentes en proteínas nucleares hepáticas de rata a distintos tiempos de intoxicación con CCl_4

Tratamiento ^a	Control	CCl_4	% del Control
	nmoles CO/mg prot	nmoles CO/mg prot	
1 h	0,30 ± 0,14	0,43 ± 0,06 ^b	143
2 h	0,31 ± 0,03	0,27 ± 0,05 ^b	87
3 h	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,06 ^b	100
6 h	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,01 ^b	105



^a El CCl_4 fue aplicado ip como una solución al 20% (v/v) en aceite de oliva (5 ml/kg). Los controles recibieron una cantidad equivalente de aceite de oliva. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados en la tabla, se extrajeron sus hígados, se aislaron las proteínas nucleares, se eliminaron los ácidos nucleicos, asociados y se determinó el contenido de carbonilos (CO) en las mismas usando la técnica de 2,4 dinitrofenilhidracina. Se usaron tres animales por grupo.

^b $p > 0,05$.

De lo indicado en la tabla se puede inferir que el CCl_4 no fue capaz de causar la formación de carbonilos en proteínas nucleares hepáticas de rata en forma detectable con la técnica empleada en ninguno de los tiempos de intoxicación ensayados.

El contenido de grupos carbonilos detectado en las proteínas nucleares *in vivo* es del mismo orden del determinado en las incubaciones de núcleos indicadas anteriormente.

IV.C.- EFECTO DE LOS METABOLITOS REACTIVOS DEL CCl_4 SOBRE EL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILOS DE PROTEÍNAS

Como se ha indicado en la Introducción, los metabolitos reactivos del CCl_4 son capaces de afectar la actividad de enzimas sulfhidrúlicas.

En esta serie de experimentos se quiso determinar si los metabolitos reactivos del CCl_4 podían causar una alteración del contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas, lo cual permitiría explicar, al menos en parte, las alteraciones de las actividades enzimáticas antes indicadas.

Para el estudio de la posible alteración del contenido de grupos sulfhidrilos fueron utilizados dos tipos de sistemas:

IV.C.I.- Sistemas químicos, utilizando como sistema de activación del CCl_4 luz ultravioleta C y como moléculas blanco albúmina de huevo y el aminoácido cisteína. En este sistema también se estudió la formación de productos volátiles por acción de CCl_4 sobre la albúmina de huevo y la cisteína.

IV.C.II.- Sistemas *in vitro*, ensayando distintas fracciones subcelulares.

Se indican a continuación los resultados obtenidos en dichos sistemas.

III.C.I.- SISTEMAS QUÍMICOS

En estos sistemas el CCl_4 fue activado a sus metabolitos reactivos ($\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) con luz ultravioleta C. Se utilizaron como blanco de ataque sustancias puras: proteínas (albúmina de huevo nativa o albúmina de huevo delipidada) y el aminoácido cisteína. En cada caso se determinó el contenido de grupos sulfhidrilos con la técnica de Ellman.

Para tratar de determinar el efecto de cada uno de los metabolitos reactivos del CCl_4 se utilizó una atmósfera de aire (donde se forman ambos metabolitos, principalmente $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) y una atmósfera de nitrógeno (donde se forma únicamente $\cdot\text{CCl}_3$).

Se estudió la formación de productos volátiles por la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la cisteína y la albúmina de huevo, en este último caso se cuantificó el efecto de un antioxidante (Trolox) sobre la formación de dichos productos volátiles.

Para corroborar uno de los resultados obtenidos se ensayó el efecto de la UVC en atmósfera de aire y de nitrógeno sobre el puente disulfuro del glutatión oxidado.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

IV.C.I.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILOS

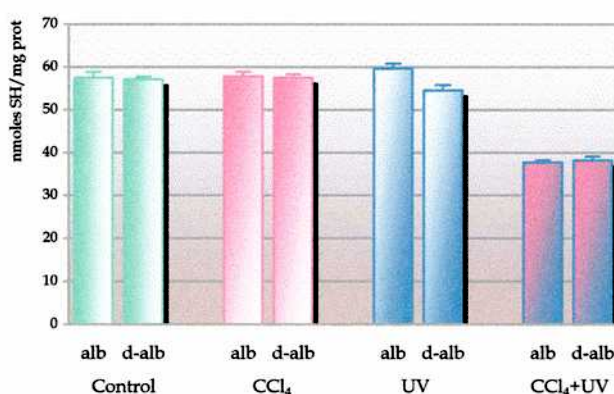
En esta serie de experimentos se estudió el efecto del CCl_4 y sus metabolitos reactivos sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de distintas moléculas.

➤ IV.C.I.1.1.- Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de albúmina de huevo nativa y albúmina de huevo delipidada

Lo primero que se quiso determinar fue si los metabolitos reactivos del CCl_4 serían capaces de alterar el contenido grupos sulfhidrilos de proteínas. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.C.I.1.1: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de albúmina de huevo nativa y albúmina de huevo delipidada

Experimento ^a	UVC	nmoles SH/mg prot	% del Control
alb	-	57,5 ± 1,3	100
d-alb	-	57,1 ± 0,6 ^b	99
alb + CCl_4	-	57,8 ± 1,1 ^b	101
d-alb + CCl_4	-	57,5 ± 0,8 ^b	100
alb	+	59,6 ± 1,2 ^c	104
d-alb	+	54,5 ± 1,3 ^c	95
alb + CCl_4	+	37,7 ± 0,5 ^c	66
d-alb + CCl_4	+	38,2 ± 0,9 ^{b,c}	66



^a Soluciones de albúmina de huevo nativa (alb) y albúmina de huevo delipidada (d-alb) (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con el reactivo de Ellman, mediante la técnica para sustancias solubles. Fueron usadas 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

cualquier comparación entre grupos sin irradiar.
d-alb+ CCl_4 +UV vs alb+ CCl_4 +UV.

^c $p < 0,05$:

cualquier comparación grupo irradiado y otro sin irradiar.

cualquier comparación entre grupos irradiados excepto d-alb+ CCl_4 +UV vs alb+ CCl_4 +UV.

Como se mencionó anteriormente, se usó albúmina de huevo nativa y delipidada para determinar el efecto del CCl_4 y de sus metabolitos reactivos sobre los grupos sulfhidrilos de proteínas.

De los resultados obtenidos se observa que el CCl_4 por sí mismo (es decir, sin ser activado a sus metabolitos reactivos) no fue capaz de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas ensayadas.

En el caso de la luz ultravioleta C, la misma alteró muy levemente el contenido de grupos sulfhidrilos de ambas proteínas, en el caso de la albúmina nativa lo incrementó, mientras que en el caso de la albúmina delipidada causó la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 fueron capaces de reducir significativamente el contenido de grupos sulfhidrilos en ambos tipos de albúmina, el nivel de reducción fue similar para ambas proteínas.

➤ *IV.C.I.1.2.- Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre los grupos sulfhidrilos de albúmina de huevo bajo atmósfera de aire o nitrógeno*

Dado que en el experimento anterior se había determinado que los metabolitos reactivos del CCl_4 eran capaces de disminuir el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas, se quiso estudiar la contribución de cada radical libre del tóxico, para lo cual soluciones de albúmina de huevo delipidada en una atmósfera de aire o de nitrógeno fueron expuestas a luz UVC en presencia de CCl_4 según se indique.

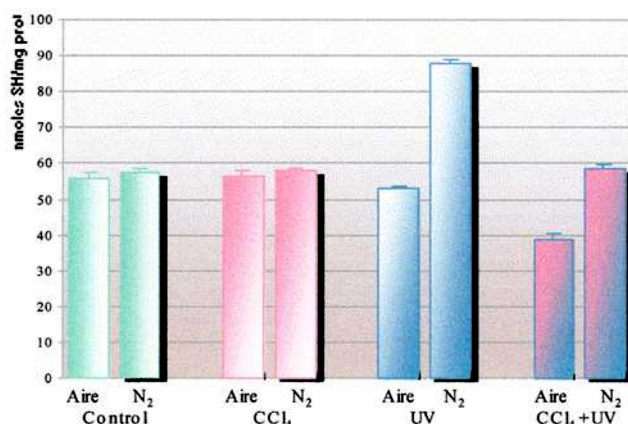
Se empleó albúmina de huevo delipidada por ser la más alterada por la luz UVC, pese a que igualmente se afectó poco.

Ha sido antes mencionado que por activación del CCl_4 en atmósfera de aire se forman los radicales $\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ (principalmente $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$), en tanto que en atmósfera de nitrógeno se forma únicamente el radical $\cdot\text{CCl}_3$.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.C.I.1.2: Efecto del CCl_4 y la luz UVC sobre los grupos sulfhidrilos de albúmina de huevo bajo atmósfera de aire o nitrógeno

Experimento ^a	Nitrógeno	nmoles SH/mg prot	% del Control
d-alb (Ctl)	-	55,9 ± 1,3	100
d-alb	+	57,6 ± 0,7 ^b	100
d-alb + CCl_4	-	56,6 ± 1,2 ^b	101
d-alb + CCl_4	+	58,0 ± 0,5 ^b	101
d-alb + UV	-	52,8 ± 0,8 ^c	94
d-alb + UV	+	87,9 ± 1,0 ^c	153
d-alb + CCl_4 + UV	-	38,9 ± 1,4 ^c	70
d-alb + CCl_4 + UV	+	58,7 ± 1,1 ^{b,c}	102



^a Soluciones de albúmina de huevo delipidada (d-alb) (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de CCl_4 2 mM, fueron irradiadas cuando se indica con luz UVC durante 6 minutos en atmósfera de aire o de nitrógeno según se indique. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con el reactivo de Ellman, con la técnica para sustancias solubles. Fueron usadas 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

cualquier comparación entre grupos sin irradiar.
d-alb+ CCl_4 +UV+N₂ vs d-alb+N₂ o d-alb+ CCl_4 +N₂.

^c $p < 0,01$:

cualquier comparación de d-alb+UV, d-alb+UV+N₂ o d-alb+ CCl_4 +UV con cualquier otro grupo.
d-alb+ CCl_4 +UV+N₂ vs d-alb, d-alb+UV.

El CCl_4 per se no fue capaz de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos en ninguno de los dos ambientes.

Se determinó que la luz ultravioleta C fue capaz de aumentar muy significativamente el contenido de grupos sulfhidrilos en albúmina de huevo delipidada en atmósfera de nitrógeno, en tanto que en atmósfera de aire sólo disminuyó levemente el contenido de grupos sulfhidrilos.

En atmósfera de aire se determinó que los metabolitos reactivos del CCl_4 eran capaces de causar la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos.

En atmósfera de nitrógeno se observó una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos respecto de la albúmina delipidada irradiada en atmósfera de nitrógeno, lo que podría indicar que en este sistema el $\cdot\text{CCl}_3$ es capaz de reducir el contenido de grupos sulfhidrilos. Sin embargo, debido a la formación de grupos sulfhidrilos por acción de la luz ultravioleta no se pudo determinar la contribución exacta de cada radical libre del CCl_4 .

➤ **IV.C.I.1.3.- Efecto de la luz ultravioleta C sobre el contenido de grupos sulfhidrilos del glutatión oxidado en atmósfera de aire y de nitrógeno**

En el experimento anterior se determinó que la luz ultravioleta C causaba el aumento del contenido de grupos sulfhidrilos en la albúmina de huevo delipidada en atmósfera de nitrógeno.

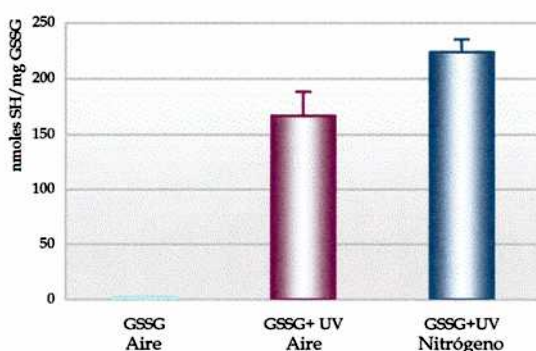
Se quiso determinar si la causa de este aumento podría ser la apertura del puente disulfuro que la albúmina de huevo posee mediante el uso de una molécula sencilla que tuviera un puente disulfuro. Se eligió para el ensayo al glutatión oxidado, el cual posee dichas características.

En el sistema de irradiación empleado para la albúmina de huevo se irradió al glutatión oxidado con luz ultravioleta C en atmósfera de aire y en atmósfera de nitrógeno.

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.C.I.1.3: Efecto de la luz ultravioleta C sobre el contenido de grupos sulfhidrilos del glutatión oxidado en atmósfera de aire y de nitrógeno

Experimento ^a	Nitrógeno	nmoles SH/mg prot	% del Control
GSSG	-	2,2 ± 0,40	100
GSSG + UV	-	166,9 ± 21,6 ^b	7.484
GSSG + UV	+	223,7 ± 11,7 ^{b,c}	10.031



^a Soluciones de glutatión oxidado (GSSG) (4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8) fueron irradiadas cuando se indica con luz ultravioleta C durante 6 minutos en atmósfera de aire o de nitrógeno según se indique. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con el reactivo de Ellman, con la técnica para sustancias solubles. Fueron usadas 4 muestras por grupo.

^b $p < 0,001$:

GSSG+UV vs GSSG; GSSG+UV+N₂ vs GSSG.

^c $p < 0,02$:

GSSG+UV+N₂ vs GSSG+UV.

Se puede observar de los resultados obtenidos que la luz ultravioleta C fue capaz de aumentar el contenido de grupos sulfhidrilos, probablemente por causar la apertura del puente disulfuro del glutatión.

El efecto de formación de grupos sulfhidrilos fue mayor en atmósfera de nitrógeno.

➤ **IV.C.I.1.4.- Efecto del CCl₄ y la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína**

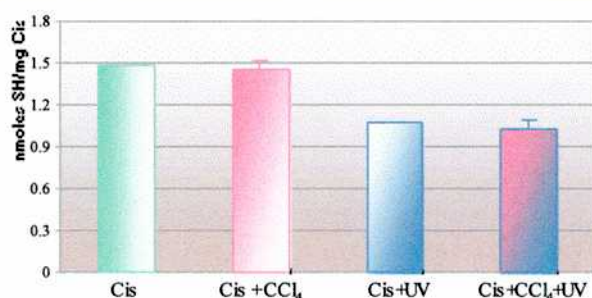
Dado que los grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas provienen del aminoácido cisteína, se quiso determinar en un sistema químico el efecto de los metabolitos reactivos del CCl₄ sobre dicho aminoácido.

Se empleó el sistema químico indicado anteriormente para albúmina, en el cual el CCl₄ se activó a sus metabolitos reactivos con luz ultravioleta C.

Se indican a continuación los resultados obtenidos.

Tabla IV.C.I.1.4: Efecto del CCl₄ y la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína

Experimento ^a	UVC	nmoles SH/mg Cis	% del Control
Cis	-	1,49 ± 0,00	100
Cis + CCl ₄	-	1,45 ± 0,06 ^b	97
Cis	+	1,07 ± 0,01 ^c	72
Cis + CCl ₄	+	1,03 ± 0,06 ^{b,c}	69



^a Soluciones de cisteína (Cis) (4mg/ml en buffer fosfato de sodio 50mM, pH 7,8) en presencia o no de CCl₄ 2 mM cuando se indica, fueron irradiadas con luz ultravioleta C durante 6 minutos. Los grupos sulfhidrilos fueron determinados con la técnica Ellman para sustancias solubles. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

Cis+CCl₄ vs Cis; Cis+CCl₄+UV vs Cis+UV.

^c $p < 0,001$:

Cis+UV vs Cis o Cis+CCl₄.

Cis+CCl₄+UV vs Cis o Cis+CCl₄.

Los resultados obtenidos muestran que la luz ultravioleta C causó una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína.

En el caso del CCl₄, se observa que ni él mismo ni sus metabolitos reactivos fueron capaces de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína en forma detectable con la técnica empleada.

IV.C.I.2.- ESTUDIO DE PRODUCTOS VOLÁTILES GENERADOS

Se quiso estudiar en estos experimentos la posibilidad de formación de compuestos volátiles por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la albúmina de huevo y el aminoácido cisteína.

Además se quiso determinar si un antioxidante, el Trolox, era capaz de inhibir el efecto de formación de productos volátiles por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la albúmina de huevo.

➤ IV.C.I.2.1.- Formación de compuestos volátiles por acción de los metabolitos del CCl_4 sobre albúmina de huevo. Efecto del Trolox 1 mM

En este sistema se estudió si los metabolitos reactivos del CCl_4 eran capaces de generar compuestos volátiles por actuar sobre la albúmina de huevo nativa.

Soluciones de albúmina fueron irradiadas en las condiciones usuales. Luego de la irradiación se procedió según se indica en Materiales y Métodos, analizándose los vapores obtenidos por cromatografía gaseosa con detector de llama.

Se analizó además el efecto del Trolox sobre la formación de los compuestos volátiles.

➤ IV.C.I.2.1a: Determinación de compuestos volátiles formados

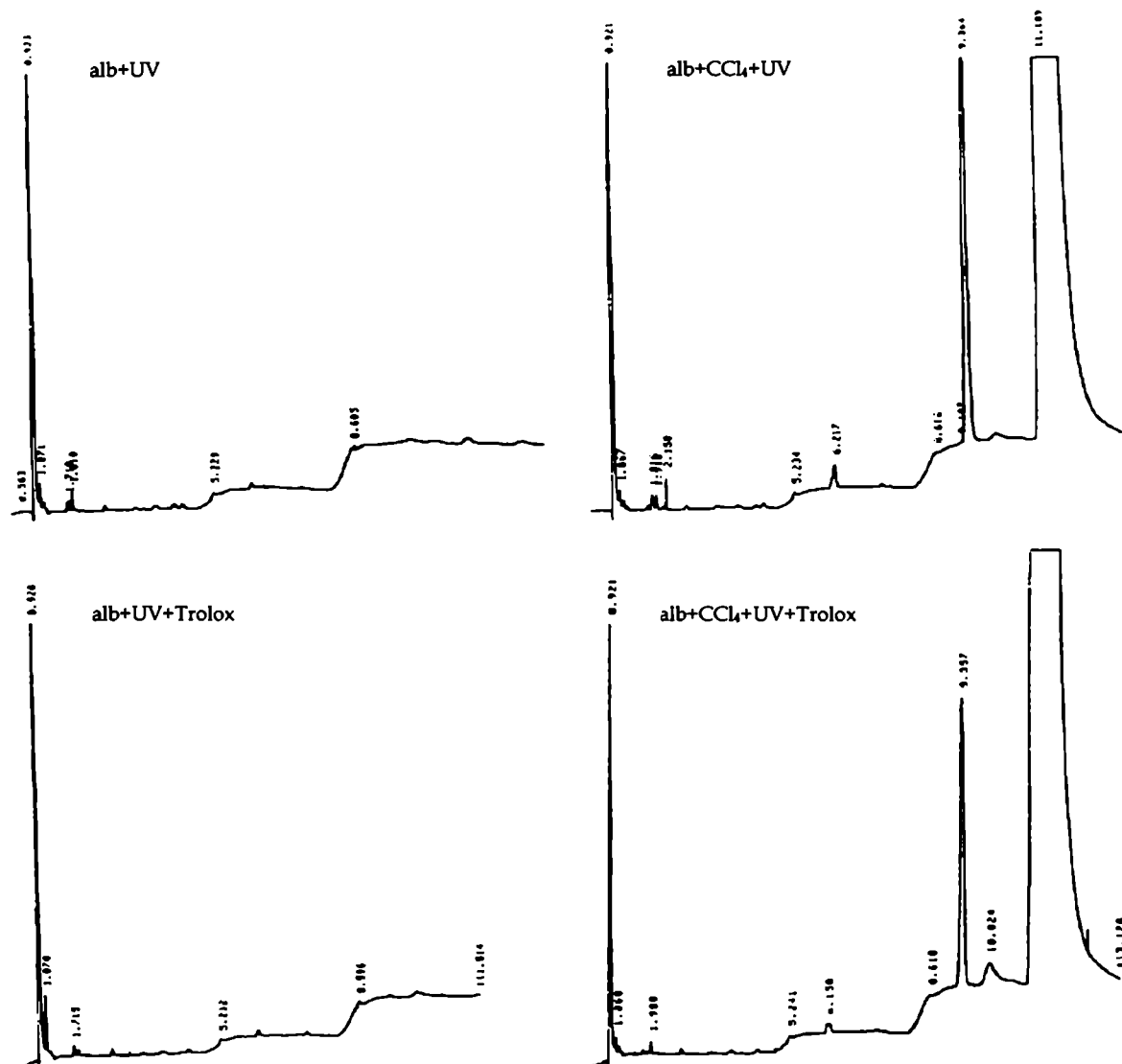
Se estudiaron por cromatografía gaseosa los compuestos formados por la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la albúmina de huevo nativa.

Para poder caracterizar mejor los productos formados se utilizó una rampa de temperatura.

Los tiempos de retención (t_R) de los productos formados fueron comparados con tiempos de retención de productos que se esperaba se generaran por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la albúmina.

Los resultados se indican a continuación.

Figura IV.C.I.2.1.a: Compuestos volátiles formados por acción del CCl_4 sobre albúmina de huevo. Efecto del Trolox 1 mM



Soluciones de albúmina de huevo nativa (alb, 16 mg/ml en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de 5 μl de CCl_4 puro y/o Trolox 1 mM, fueron irradiadas durante 6 minutos con luz ultravioleta C en cubetas selladas, luego de lo cual se dejó llegar al equilibrio a 37 °C durante media hora en presencia NaCl y los vapores resultantes se analizaron por cromatografía gaseosa-detector de llama, temperatura de la columna programada (4,5 minutos a 105 °C, luego una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 140 °C, 2,8 minutos a esa temperatura y a continuación una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 160 °C).

Se observa de los cromatogramas que la luz ultravioleta C no generó ningún producto volátil.

El tiempo de retención del pico correspondiente a CCl_4 fue de aproximadamente 11 minutos.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 causaron la aparición de 3 picos:

- 1,9, muy pequeño, cuya naturaleza no se pudo determinar.
- 6,2, el cual se comporta cromatográficamente de la misma manera que H_2CCl_2 .
- 9,3, el que podría ser HCCl_3 por su comportamiento cromatográfico.

El pico de área más importante fue el correspondiente al tiempo de retención de 9,3 minutos, supuestamente HCCl_3 .

En el mismo sistema se analizó el efecto del Trolox 1 mM.

Se puede observar del cromatograma que el Trolox por sí mismo no causa la aparición de ningún pico cuantificable.

Cuando el Trolox esta presente durante la formación de los metabolitos reactivos del CCl_4 causa una disminución del área de los picos generados por el CCl_4 .

El pico que aparece a 10,024 minutos en el cromatograma de alb+ CCl_4 +UV+Trolox sería una impureza, probablemente debida a los tapones utilizados para tapar las cubetas.

Debido a que parecería que el Trolox fue capaz de disminuir la formación de productos volátiles causada por el CCl_4 se quiso cuantificar tanto los efectos del CCl_4 como los del Trolox.

➤ IV.C.I.2.1b.- Cuantificación del efecto del Trolox sobre los productos volátiles formados por el CCl_4 .

Se cuantificó la formación de compuestos volátiles a partir de albúmina de huevo nativa en presencia de CCl_4 y/o Trolox 1mM.

Las condiciones empleadas son las mismas que las de la determinación de formación de compuestos volátiles por la acción del CCl_4 sobre la albúmina de huevo nativa.

La cuantificación se realizó considerando el área de cada uno de los picos, de acuerdo a lo indicado por el registrador del aparato, y realizándoles los correspondientes cálculos estadísticos.

Los resultados son los siguientes.

Tabla IV.C.I.2.1b: Cuantificación del efecto del Trolox sobre los productos volátiles formados por el CCl_4

Experimento ^a	Trolox	$t_R \approx 1,9$		$t_R \approx 6,2$		$t_R \approx 9,3$	
		Area	%	Area	%	Area	%
alb	–		–				
alb + CCl_4	–	912 ± 115	100	2351 ± 406		52.848 ± 3.451	100
alb	+			–			
alb + CCl_4	+	655 ± 75 ^b	72	–	–	37.148 ± 7.141 ^b	70

Soluciones de albúmina de huevo nativa (alb, 16 mg/ml en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8), en presencia o no de 5 µl de CCl_4 puro y/o Trolox 1 mM, fueron irradiadas durante 6 minutos con luz ultravioleta C en cubetas selladas, luego de lo cual se dejó llegar al equilibrio a 37 °C durante media hora en presencia NaCl y los vapores resultantes se analizaron por cromatografía gaseosa-detector de llama, temperatura de la columna programada (4,5 minutos a 105 °C, luego una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 140 °C, 2,8 minutos a esa temperatura y a continuación una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 160 °C). Se usaron 3 muestras por grupo.

^b $p < 0,03$.

De los resultados indicados en la tabla se puede inferir que el CCl_4 causaría la aparición de 3 picos, cuya posible naturaleza se indicó anteriormente.

Se pudo determinar que el área del pico correspondiente a un tiempo de retención 9,3 minutos fue reducida por la presencia del Trolox.

En el caso del pico a 6,2 minutos, el mismo se superpuso con un pico pequeño presente en todas las muestras a aproximadamente 6,1 minutos, pero por la forma de los picos no se pudo cuantificar la acción del Trolox sobre el pico de 6,2 minutos.

El área del pico de tiempo de retención 1,9 minutos también fue reducida significativamente por la presencia de Trolox en el medio de reacción.

Las áreas de los picos de tiempo de retención 9,3 y 1,9 fueron reducidas por el Trolox en una proporción similar.

➤ IV.C.I.2.2.- Formación de productos volátiles por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre el aminoácido cisteína

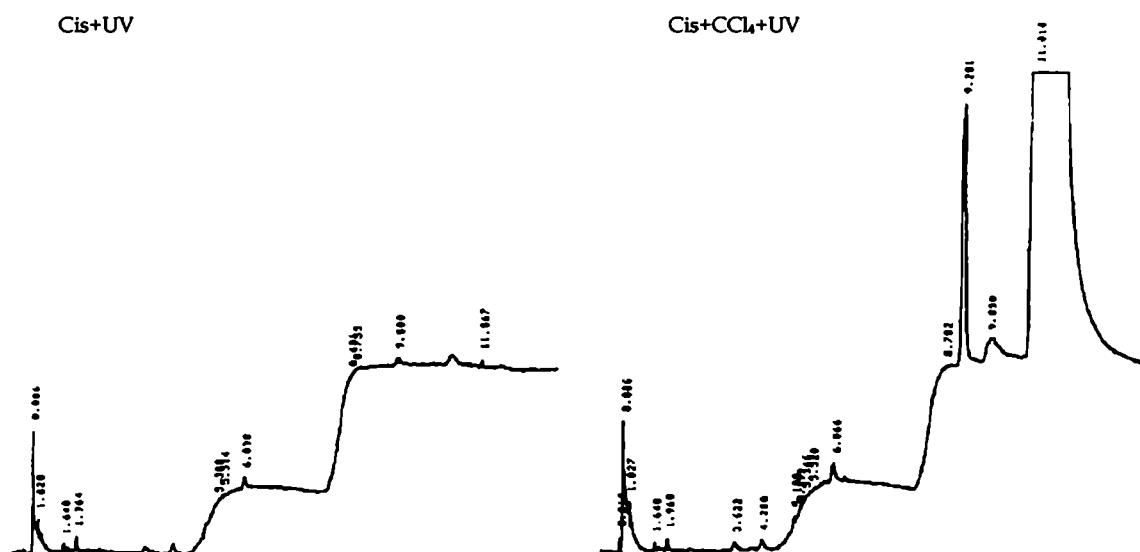
Dado que se había determinado la formación de probablemente HCCl_3 por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre albúmina de huevo nativa, se quiso estudiar el posible origen del HCCl_3 .

Así, el HCCl_3 podría originarse por la abstracción de un hidrogeno por el $\cdot\text{CCl}_3$ formado en la activación del CCl_4 . El residuo del aminoácido cisteína posee el hidrógeno proteico que más fácilmente puede ser cedido, por lo que se estudió la formación de productos volátiles por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre el aminoácido

cisteína.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Figura IV.C.I.2.2: Formación de productos volátiles por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre el aminoácido cisteína



Soluciones de cisteína (4 mg/ml en buffer fosfato 50 mM), fueron irradiadas en presencia o no de 5 μl de CCl_4 en una cubeta sellada. Posteriormente se mantuvo a 37 °C durante 30 minutos en presencia de NaCl y los vapores resultantes se analizaron por cromatografía gaseosa con detector de llama, con columna a temperatura programada (4,5 minutos a 105 °C, luego una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 140 °C, 2,8 minutos a esa temperatura, a continuación una rampa de velocidad 50 °C/min hasta 160 °C).

Se puede ver en los cromatogramas que el CCl_4 en presencia de cisteína es capaz de causar la aparición de un pico a un tiempo de retención aproximadamente 9,2, el cual podría corresponder a cloroformo por el tiempo de retención. Es decir, el comportamiento de la cisteína sería similar al de la albúmina.

Por lo tanto, se podría formar también cloroformo por acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre la cisteína.

IV.C.II.- SISTEMAS IN VITRO

En estos sistemas se estudió el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre los grupos sulfhidrilos de proteínas de distintas fracciones subcelulares (microsomas, núcleos, mitocondrias y citosol) *in vitro*.

Se dividió el estudio en dos partes:

IV.C.II.1.- Estudio del efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas de distintas fracciones subcelulares.

IV.C.II.2.- Estudio del efecto de distintas condiciones y sustancias sobre la alteración de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales causada por el CCl_4 .

Los resultados obtenidos con cada uno de los sistemas se indican a continuación.

IV.C.II.1.- DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES

En estos sistemas se estudió el posible efecto del CCl_4 y sus metabolitos reactivos sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas de las distintas fracciones subcelulares.

Las fracciones subcelulares fueron incubadas en los medios adecuados indicados en Materiales y Métodos, determinándose a continuación el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas de cada fracción subcelular por la técnica de Ellman para proteínas.

Como se indicó anteriormente, las distintas fracciones subcelulares, a excepción del citosol, son capaces de activar al CCl_4 a sus metabolitos reactivos. Las proteínas blanco de ataque serían las mismas proteínas de cada fracción subcelular.

Para la activación del CCl_4 es necesaria la presencia de NADPH como cofactor, dado que es dador de los electrones necesarios para la reducción del tóxico.

Debido a que el NADPH puede tener por sí mismo algún efecto sobre el contenido de grupos sulfhidrilo de proteínas, en todos los casos se realizó el control correspondiente.

A continuación se indican los resultados obtenidos para las distintas fracciones subcelulares.

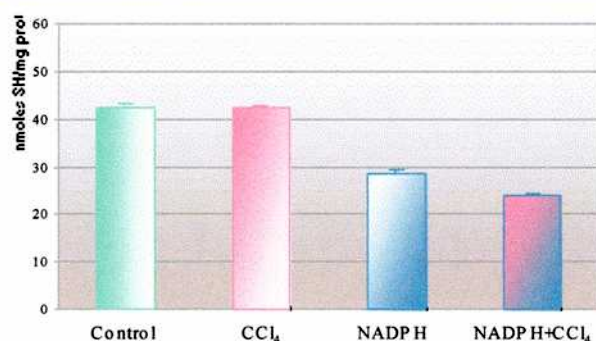
➤ IV.C.II.1.1.- Estudio del efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales hepáticas de rata *in vitro*

Se estudió el efecto de los metabolitos del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales hepáticas de rata en un sistema *in vitro*.

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.C.II.1.1: Estudio del efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales hepáticas de rata *in vitro*

Tratamiento ^a	nmoles SH/ mg prot	% del Control
Control (Ctl)	42,4 ± 0,7	100
CCl_4	41,8 ± 1,1 ^b	98
NADPH	28,4 ± 0,5 ^c	67
NADPH + CCl_4	23,8 ± 0,6 ^c	56



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas hepáticos de rata (3,7 mg proteínas/ml incubado) fueron incubadas 1 hora a 37 °C, en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl_4 2 mM según se indique. El contenido de grupos sulfhidrilos (SH) fue determinado con la técnica de Ellman para proteínas. Fueron utilizadas cinco muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

CCl_4 vs Ctl.

^c $p < 0,001$:

NADPH vs Ctl o CCl_4 .

NADPH+ CCl_4 vs Ctl, NADPH o CCl_4 .

De los resultados obtenidos se puede inferir que el CCl_4 por sí mismo, es decir, sin ser activado a sus metabolitos reactivos, no fue capaz de causar la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales hepáticas de rata *in vitro*.

Se puede observar además que el NADPH per se fue capaz de reducir el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 fueron capaces de reducir el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales hepáticas de rata *in vitro* por encima de la disminución causada por el NADPH.

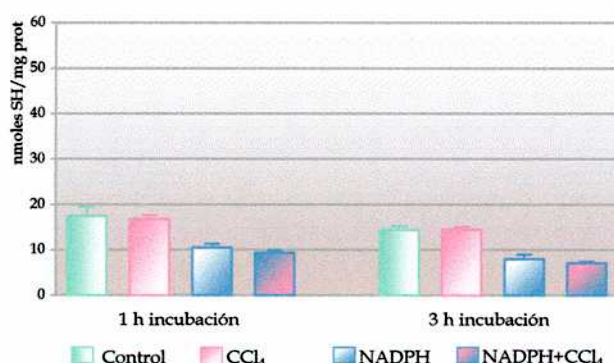
➤ IV.C.II.1.2.- Estudio del efecto del CCl₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas nucleares hepáticas de rata *in vitro*

Se estudió el efecto de los metabolitos reactivos del CCl₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas nucleares incubando núcleos hepáticos de rata 1 y 3 h en un sistema *in vitro* adecuado para núcleos.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.C.II.1.2: Estudio del efecto del CCl₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas nucleares hepáticas de rata *in vitro*

Experimento ^a	1 h incubación		3 h incubación	
	nmoles SH/ mg prot	% Ctl	nmoles SH/ mg prot	% Ctl
Control (Ctl)	17,5 ± 1,9	100	14,4 ± 0,8	100
CCl ₄	16,8 ± 0,8 ^b	96	14,4 ± 0,6 ^b	100
NADPH	10,5 ± 0,8 ^c	60	8,0 ± 1,0 ^c	55
NADPH + CCl ₄	9,3 ± 0,6 ^{b,c}	53	7,4 ± 0,3 ^{b,c}	51



^a Las mezclas de incubación contenían núcleos hepáticos de rata (8 mg proteína/ml de incubado) en presencia de sistema generador de NADPH y/o CCl₄ 2 mM según se indique fueron incubados a 37°C durante 1 ó 3 h. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con la técnica de Ellman para proteínas. Se utilizaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

1 y 3 h incubación: CCl₄ vs Ctl;
NADPH+CCl₄ vs NADPH.

^c $p < 0,001$:

1 y 3 h incubación: NADPH vs Ctl o CCl₄;
NADPH+CCl₄ vs Ctl o CCl₄.

Se puede observar de los resultados que el CCl₄ por sí mismo no fue capaz de alterar significativamente el contenido de grupos sulfhidrilos en las proteínas nucleares en ninguno de los dos horarios.

En cambio, el NADPH fue capaz de disminuir significativamente el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas nucleares a la hora y a las 3 horas de incubación.

Los metabolitos reactivos del CCl₄ no fueron capaces de causar una disminución significativa del contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas nucleares hepáticas.

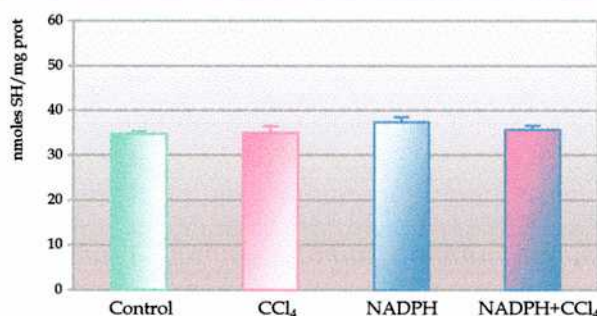
➤ **IV.C.II.1.3- Estudio del efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata *in vitro***

En este caso se estudió el efecto *in vitro* de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.C.II.1.3: Estudio del efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas mitocondriales hepáticas de rata *in vitro*

Experimento ^a	nmoles SH/ mg prot	% del Control
Control (Ctl)	34,8 ± 0,6	100
CCl_4	37,4 ± 1,5 ^b	107
NADPH	35,0 ± 1,1 ^b	100
NADPH + CCl_4	35,7 ± 0,9 ^b	103



^a Las mezclas de incubación conteniendo fracción mitocondrial (5,0 mg proteínas/ml de incubado) fueron incubadas 1 hora a 37°C en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl_4 2 mM según se indique. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con la técnica de Ellman para proteínas. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$ en todos los casos.

De los resultados obtenidos se puede concluir que ni el CCl_4 ni sus metabolitos reactivos fueron capaces de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos en las proteínas mitocondriales hepáticas de rata a la hora de incubación.

A diferencia de lo observado en núcleos, el NADPH no fue capaz de causar la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas mitocondriales.

➤ IV.C.II.1.4.- Estudio del efecto del CCl₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en sustancias proteicas y no proteicas citosólicas *in vitro*

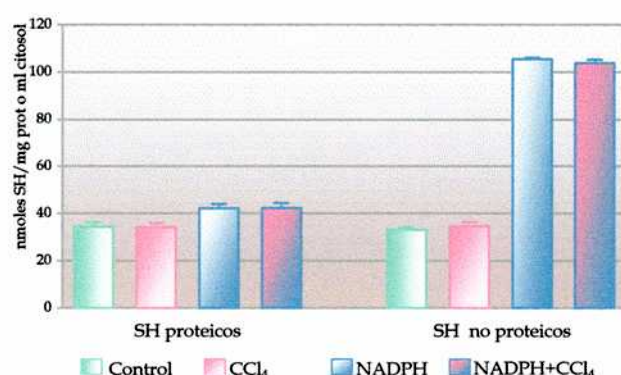
En este caso se quiso investigar la posible alteración del contenido de grupos sulfhidrilos en sustancias proteicas y no proteicas citosólicas hepáticas de rata inducido por el CCl₄, incubando citosol de rata en un sistema *in vitro*.

Se sabe que en el citosol no habría activación del CCl₄ a sus metabolitos reactivos, sin embargo se hizo este ensayo para completar la determinación del efecto en las principales fracciones subcelulares de los hepatocitos en los referente a la posible alteración del contenido de grupos sulfhidrilos.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.C.II.1.4: Estudio del efecto del CCl₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos en sustancias proteicas y no proteicas citosólicas *in vitro*

Experimento ^a	SH proteicos		SH solubles	
	nmoles SH/mg prot	% Ctl	nmoles SH/ml citosol	% Ctl
Control (Ctl)	34,3 ± 0,8	100	33,1 ± 2,0	100
CCl ₄	34,0 ± 1,7 ^b	102	34,6 ± 1,8 ^b	105
NADPH	42,1 ± 0,5 ^c	126	105,5 ± 1,8 ^c	319
NADPH + CCl ₄	42,2 ± 1,4 ^{b,c}	127	103,8 ± 2,2 ^{b,c}	314



^a Las mezclas de incubación conteniendo fracción citosólica (0,2 ml citosol/incubación) en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl₄ fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C. Los grupos sulfhidrilos fueron determinados con la técnica de Ellman. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b p > 0,05:

SH proteicos y no proteicos:
CCl₄ vs Ctl; NADPH+CCl₄ vs NADPH.

^c p < 0,001:

SH proteicos y no proteicos:
NADPH vs Ctl o CCl₄;
NADPH+CCl₄ vs Ctl o CCl₄.

El NADPH causó un aumento muy importante del contenido de grupos sulfhidrilos de las sustancias no proteicas y un leve aumento del contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas.

En el caso del CCl₄, ni él sólo ni sus metabolitos reactivos fueron capaces de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos, tanto de las sustancias proteicas como de las no proteicas.

IV.C.II.2.- ESTUDIO SOBRE MICROSOMAS

Se estudió el efecto de distintas condiciones sobre la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos causado por los metabolitos reactivos del CCl_4 en proteínas microsomales hepáticas de rata.

El sistema de incubación fue similar al utilizado en la determinación de la capacidad de los metabolitos reactivos del CCl_4 y del NADPH de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos en las proteínas antes mencionadas.

En este sistema se ensayó el efecto de dichas sustancias en una atmósfera de nitrógeno, comparándose con el efecto observado en atmósfera de aire. Se la comparó con el efecto del NADPH y los metabolitos reactivos del CCl_4 en atmósfera de aire.

Se estudió además el posible efecto protector de grupos sulfhidrilos de antioxidantes, determinándose el efecto del α -tocoferol (antioxidante liposolubles normalmente presente en las células, del hemisuccinato de α -tocoferol (derivado del α -tocoferol más hidrosoluble) y Trolox (análogo hidrosolubles del α -tocoferol al cual le falta la cadena isoprénica).

También se determinó el efecto del EDTA, el cual, como se indicó anteriormente, inhibe la peroxidación de lípidos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

A continuación se indican los resultados obtenidos en cada uno de estos ensayos.

➤ IV.C.II.2.1.- Efecto del CCl_4 sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales en atmósfera de aire y de nitrógeno

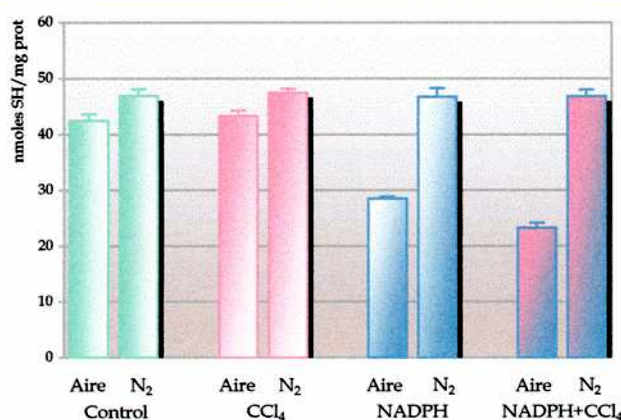
En este caso se estudió el efecto de una atmósfera de nitrógeno sobre la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos causada *in vitro* por los metabolitos reactivos del CCl_4 y el NADPH en las proteínas microsomales hepáticas de rata.

Como ya ha sido mencionado, en atmósfera de nitrógeno se forma únicamente $\cdot\text{CCl}_3$ por activación del CCl_4 .

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Tabla IV.C.II.2.1: Efecto del CCl₄ sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales en atmósfera aire y de nitrógeno

Tratamiento ^a	Nitrógeno	nmoles SH/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	42,5 ± 1,1	100
Control	+	46,9 ± 1,2 ^b	110
CCl ₄	-	43,3 ± 1,0 ^{b,c}	102
CCl ₄	+	47,5 ± 0,7 ^{b,c}	112
NADPH	-	28,5 ± 0,3 ^{b,c}	67
NADPH	+	46,7 ± 1,6 ^{b,c}	110
NADPH + CCl ₄	-	23,3 ± 0,9 ^{b,c}	55
NADPH + CCl ₄	+	46,8 ± 1,2 ^{b,c}	110



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (4,7 mg proteínas/ml incubado) fueron incubadas 1 hora a 37 °C en atmósfera de aire o de N₂, en presencia o no de sistema generador de NADPH y/o CCl₄ 2 mM según se indique. El contenido de grupos sulfhidrilos (SH) fue determinado con la técnica de 2,4 dinitrofenilhidracina. Fueron utilizadas cinco muestras por grupo. Se agruparon los valores de la estadística para facilitar la tabla.

^b $p < 0,01$:
cualquier comparación entre aire y N₂.
NADPH vs Ctl, o CCl₄.
NADPH + CCl₄ vs Ctl, CCl₄, o NADPH.

^c $p < 0,05$:
CCl₄ vs Ctl.
todas las comparaciones entre grupos en N₂.

El contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales en atmósfera de nitrógeno fue levemente mayor que en atmósfera de aire.

Al igual a lo observado anteriormente, el CCl₄ por sí mismo no fue capaz de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales. El efecto de la atmósfera de nitrógeno en presencia de CCl₄ fue similar al efecto sobre el control.

En atmósfera de nitrógeno se inhibió totalmente el efecto del NADPH sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales.

La atmósfera de nitrógeno también inhibió totalmente el efecto de los metabolitos reactivos del CCl₄ (en este caso del •CCl₃, ya que no habría oxígeno para la formación de CCl₃O₂•).

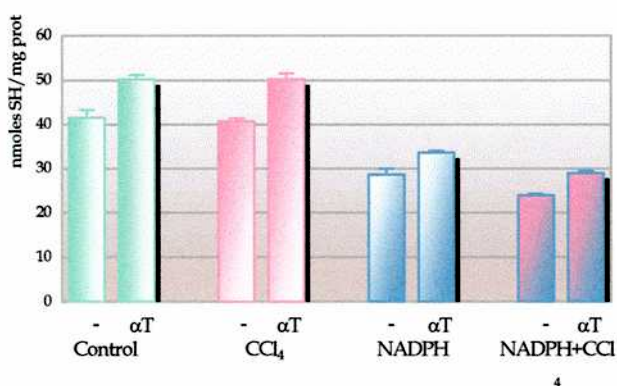
➤ IV.C.II.2.2.- Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

Se estudió el efecto del α -tocoferol 1 mM (α T) sobre la alteración del contenido grupos sulfhidrilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.C.II.2.2: Efecto del α -tocoferol 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

Experimento ^a	α T	nmoles SH/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	41,5 $\pm$ 1,9	100
Control	+	50,2 $\pm$ 1,0 ^b	121
CCl_4	-	40,7 $\pm$ 0,6 ^{b,c}	98
CCl_4	+	50,2 $\pm$ 1,6 ^b	121
NADPH	-	28,6 $\pm$ 1,4 ^b	69
NADPH	+	33,6 $\pm$ 0,4 ^b	81
NADPH + CCl_4	-	23,9 $\pm$ 0,4 ^b	58
NADPH + CCl_4	+	29,0 $\pm$ 0,5 ^{b,c}	70



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml de incubado) y en presencia o no de CCl_4 2 mM, sistema generador de NADPH y/o α -tocoferol 1mM, según se indique, fueron incubadas 1 hora a 37°C. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con la técnica Ellman. Se usaron 4 muestras por grupo. Se unificaron las estadísticas según el valor máximo del grupo.

^b $p < 0,03$:

todas las comparaciones entre grupos con α T y grupos sin α T, excepto NADPH+ CCl_4 + α T vs NADPH.

NADPH vs Ctl o CCl_4 .

NADPH+ α T vs cualquier otro grupo con α T.

NADPH+ CCl_4 vs Ctl, CCl_4 o NADPH.

NADPH+ CCl_4 + α T vs Ctl+ α T o CCl_4 + α T.

^c $p > 0,05$:

CCl_4 vs Ctl; CCl_4 + α T vs Ctl vs α T.

NADPH+ CCl_4 + α T vs NADPH.

Se puede observar que el α T sería capaz de aumentar el contenido de grupos sulfhidrilos del grupo control y del grupo tratado con CCl_4 .

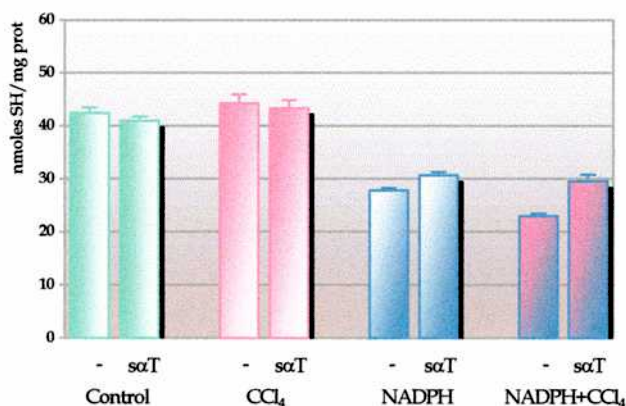
En el caso de NADPH y de los metabolitos reactivos del CCl_4 , el α T fue capaz de prevenir parcialmente el efecto por ellos causado sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas microsomales hepáticas.

➤ IV.C.II.2.3.- Efecto del hemisuccinato de α -tocoferol 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

El α T sólo produjo un pequeño efecto protector sobre la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 . Como se indicó anteriormente, esto podría ser debido a la liposolubilidad del α T. Para estudiar esta posibilidad se ensayo un derivado del α T, el hemisuccinato de α T 1 mM (α sT), más hidrosoluble que el α T.

Tabla IV.C.II.2.3: Efecto del hemisuccinato de α -tocoferol 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

Experimento ^a	α sT	nmoles SH/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	42,4 $\pm$ 1,0	100
Control	+	40,9 $\pm$ 0,8 ^b	97
CCl_4 (C)	-	44,2 $\pm$ 1,7 ^b	104
CCl_4	+	43,3 $\pm$ 1,5 ^b	102
NADPH	-	27,8 $\pm$ 0,4 ^c	66
NADPH	+	30,6 $\pm$ 0,6 ^{c,d}	72
NADPH + CCl_4	-	22,9 $\pm$ 0,5 ^c	54
NADPH + CCl_4	+	29,0 $\pm$ 1,2 ^{b,c}	69



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml incubado) y en presencia o no de sistema generador de NADPH, CCl_4 2 mM y/o hemisuccinato de α -tocoferol 1mM (α sT), según se indique, fueron incubadas 1 hora a 37°C. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con la técnica Ellman. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p > 0,05$:

Ctl+ α sT vs Ctl; CCl_4 vs Ctl o Ctl+ α sT.

CCl_4 + α sT vs Ctl, Ctl+ α sT o CCl_4 .

NADPH+ CCl_4 α sT vs NADPH o NADPH+ α sT.

^c $p < 0,01$:

NADPH vs Ctl, Ctl+ α sT, CCl_4 o CCl_4 + α sT.

NADPH+ α sT vs Ctl, Ctl+ α sT, CCl_4 , CCl_4 + α sT.

NADPH+ CCl_4 vs cualquier otro grupo.

NADPH+ CCl_4 + α sT vs Ctl, Ctl+ α sT, CCl_4 , CCl_4 + α sT

^d $p < 0,05$:

NADPH+ α sT vs NADPH.

Se puede observar que el hemisuccinato de α -tocoferol (al igual que el α T) fue capaz de prevenir sólo parcialmente la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos causada

los metabolitos reactivos del CCl_4 y por el NADPH.

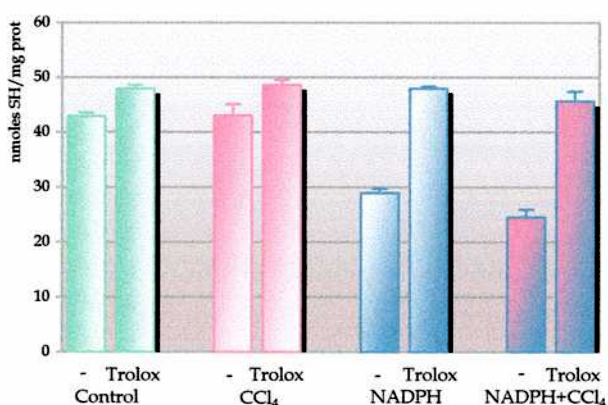
En cambio, a diferencia del αT , la presencia de hemisuccinato de αT en la mezcla de incubación no fue capaz de aumentar el contenido de grupos sulfhidrilos de los grupos control y CCl_4 .

➤ IV.C.II.2.4.- Efecto del Trolox 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

En este ensayo se estudió el efecto del Trolox 1 mM sobre el contenido alterado de grupos sulfhidrilos causado por el CCl_4 . Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Tabla IV.C.II.2.4: Efecto del Trolox 1 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

Experimento ^a	Trolox	nmoles SH/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	42,9 ± 0,6	100
Control	+	47,9 ± 0,7 ^b	112
CCl_4	-	43,0 ± 2,1 ^{b,c}	100
CCl_4	+	48,6 ± 0,9 ^{b,c}	113
NADPH	-	28,9 ± 0,8 ^b	67
NADPH	+	48,4 ± 0,4 ^b	113
NADPH + CCl_4	-	24,5 ± 1,4 ^b	57
NADPH + CCl_4	+	45,6 ± 1,8 ^{b,d}	106



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml incubado) y en presencia o no de CCl_4 2 mM, sistema generador de NADPH y/o Trolox 1mM, según se indique, fueron incubadas 1 hora a 37°C. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con la técnica Ellman. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p < 0,01$:

Cualquier comparación entre un grupos con y otro sin Trolox.

NADPH vs Ctl o CCl_4 .

NADPH+ CCl_4 vs Ctl, CCl_4 o NADPH.

NADPH+ CCl_4 +Trolox vs (CCl_4 + o NADPH)+Trolox

^d $p < 0,05$:

NADPH+ CCl_4 +Trolox vs Ctl+Trolox.

^c $p > 0,05$:

CCl_4 vs Ctl; CCl_4 +Trolox vs Ctl+Trolox.

NADPH+Trolox vs Ctl+Trolox o CCl_4 +Trolox.

En este experimento se analizó la posibilidad de que el bajo efecto protector del α T contra la alteración de grupos sulfhidrilos generada por el CCl_4 podría ser debido a su liposolubilidad, para lo cual se usó un análogo hidrofílico del α T, el Trolox.

Se determinó que el Trolox, al igual que el α T, causó un aumento en el contenido de grupos sulfhidrilos presente en las proteínas microsomales del grupo control y del grupo tratado con CCl_4 .

El Trolox fue capaz de inhibir totalmente la acción del NADPH sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales.

En el caso de la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 , el Trolox previno casi totalmente la alteración de grupos sulfhidrilos por ellos causada.

➤ IV.C.II.2.5- Efecto del EDTA 3 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl_4 en proteínas microsomales

Se estudió el efecto del EDTA 3 mM sobre el contenido alterado de grupos sulfhidrilos causado por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

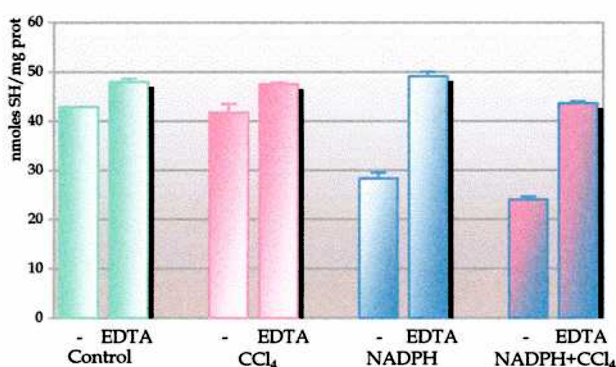
El EDTA en concentración 3 mM es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos causada por el CCl_4 , por lo que se lo utilizó para ponderar el efecto que podría tener la peroxidación de lípidos en la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos causada por el tóxico.

Como se indicó en la Introducción, los productos de peroxidación de lípidos son capaces de reaccionar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, pudiendo disminuir de esa manera el contenido de grupos detectables con la técnica de Ellman.

A continuación se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.C.II.2.5: Efecto del EDTA 3 mM sobre el contenido de grupos sulfhidrilos generado por el CCl₄ en proteínas microsomales

Experimento ^a	EDTA	nmoles SH/mg prot	% del Control
Control (Ctl)	-	42,9 ± 0,2	100
Control	+	48,0 ± 0,6 ^b	112
CCl ₄	-	41,7 ± 1,8 ^{b,c}	97
CCl ₄	+	47,5 ± 0,3 ^{b,c}	111
NADPH	-	28,3 ± 1,2 ^{b,c}	66
NADPH	+	49,1 ± 0,9 ^{b,c}	114
NADPH + CCl ₄	-	24,0 ± 0,6 ^b	56
NADPH + CCl ₄	+	43,6 ± 0,4 ^{b,c}	101



^a Las mezclas de incubación conteniendo microsomas (3,8 mg proteína/ml), en presencia o no de CCl₄ 2 mM, sistema generador de NADPH y/o EDTA 3 mM, según se indique, fueron incubadas 1 hora a 37°C. Los grupos sulfhidrilos (SH) fueron determinados con la técnica Ellman. Se usaron 4 muestras por grupo.

^b $p < 0,001$:

cualquier comparación entre grupos con EDTA y sin EDTA, excepto NADPH+CCl₄+EDTA vs Ctl o CCl₄.

NADPH vs Ctl o CCl₄.

NADPH+CCl₄ vs Ctl, CCl₄ o NADPH

NADPH+CCl₄+EDTA vs (Ctl, CCl₄ o

NADPH)+EDTA.

^c $p > 0,05$:

NADPH+CCl₄+EDTA vs Ctl, o CCl₄.

CCl₄+EDTA vs Ctl+EDTA.

NADPH+EDTA vs (Ctl o CCl₄)+EDTA.

De los resultados se puede observar que el contenido de grupos sulfhidrilos en presencia de EDTA fue mayor que el contenido de grupos sulfhidrilos del control y del CCl₄ solo.

En el caso del NADPH, el EDTA fue capaz de prevenir totalmente la disminución de grupos sulfhidrilos causada por el NADPH.

En el caso de los metabolitos reactivos del CCl₄, el EDTA sólo previno parcialmente la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos causada por dichos metabolitos.

V.- DISCUSIÓN

V.- DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la realización de este Trabajo de Tesis indican que el CCl_4 , vía sus metabolitos reactivos, sería capaz de afectar a proteínas de dos maneras:

- .- alterando la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas nucleares.
- .- causando la alteración química de las proteínas.

A continuación se discuten los resultados obtenidos. Para facilitar la discusión se tratan separadamente los efectos antes nombrados, analizándolos finalmente en forma conjunta.

➤ V.A.- *Alteración de la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas nucleares*

En este Trabajo de Tesis se determinó que el CCl_4 causa la disminución de la incorporación de un aminoácido (leucina radioactiva) a las proteínas nucleares hepáticas de rata macho Sprague-Dawley.

El efecto del tóxico sobre la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas microsomales (el cual había sido determinado previamente (77)) se utilizó como un control del efecto sobre las proteínas nucleares.

La acción del CCl_4 sobre la incorporación de leucina marcada a las proteínas nucleares y microsomales fue máxima a la hora de intoxicación para ambas clases de proteínas, siendo las microsomales las más afectadas. A las dos horas se observó una recuperación parcial en ambos casos. La incorporación a las proteínas nucleares se recuperó totalmente a las 4 horas de intoxicación, en tanto que la incorporación a las microsomales sólo se recuperó parcialmente en ese tiempo. Esto último coincide con los resultados obtenidos previamente (77).

El principal lugar de activación en las células hepáticas del CCl_4 es el retículo endoplásmico (3, 14), los metabolitos reactivos del CCl_4 allí formados causan la ruptura y el despegue de los polisomas unidos al retículo (131, 77, 79). Es en estos polisomas en donde se sintetizan las proteínas microsomales (124, 12), lo que explicaría que se vea tan afectada la incorporación de un aminoácido marcado a dichas proteínas.

Las proteínas nucleares son sintetizadas en polisomas libres en el citosol (12, 124). En el citosol no se produce la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos (14). Sin embargo, dado que los ribosomas libres y los unidos al retículo endoplásmico son intrínsecamente los mismos, que forman parte de los polisomas libres o los unidos a la membrana de retículo de acuerdo a cuál sea la proteína que estén sintetizando en ese momento, existiría la posibilidad de que cualquier ribosoma se una en un momento dado a la membrana del retículo endoplásmico donde se activa el CCl_4 , pudiendo ser alterado por los metabolitos reactivos del mismo. Esta posibilidad estaría avalada por el hecho de que se produce la unión covalente de productos del CCl_4 a proteínas ribosómicas (73, 14), tanto de ribosomas unidos como libres, indicando que ambas clases de ribosomas estarían alterados en la intoxicación por CCl_4 . Esto permitiría explicar el hecho de que se vea afectada la síntesis de proteínas nucleares en la intoxicación por CCl_4 .

Además, la mayoría de los ribosomas de las células hepáticas (el 80%) están unidos al retículo endoplásmico (131), por lo que existiría una gran probabilidad de que los ribosomas puedan ser afectados por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Investigaciones previas (77) indican que en la intoxicación por CCl_4 se produce también la inhibición de la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas mitocondriales y citosólicas hepáticas de rata, las cuales también se sintetizan en polisomas libres (124, 12). Esta "propagación del daño" es un efecto característico del CCl_4 (77). También en este caso el efecto máximo fue a la hora de intoxicación. A diferencia de las proteínas nucleares, la incorporación del aminoácido marcado a las proteínas mitocondriales y citosólicas no se recuperó totalmente a las cuatro horas de intoxicación.

Por lo tanto, en la intoxicación por CCl_4 se verían afectadas en general las proteínas celulares, recuperándose más rápidamente la síntesis de las proteínas nucleares. Las proteínas microsomaes son las que más tardan en recuperarse.

El corto tiempo durante el cual se ve afectada la incorporación del aminoácido marcado a las proteínas nucleares sugiere que las proteínas que se estarían afectando serían las de alto recambio y/o que la célula posee mecanismos que priorizan la síntesis de las proteínas nucleares. El que a las 4 horas de intoxicación no se hubiera recuperado totalmente la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas mitocondriales y citosólicas (77) avalaría el hecho de que existirían mecanismos de recuperación preferenciales para las proteínas nucleares.

Además, la recuperación preferencial de la incorporación de un aminoácido a las proteínas nucleares se produce también en la acción de otras sustancias tóxicas, por ejemplo, a las 24 h de la intoxicación con cicloheximida la síntesis proteica es mayor para las proteínas

nucleares que para el resto de las proteínas celulares (216).

El CCl_4 podría afectar la incorporación del aminoácido marcado a proteínas nucleares actuando a varios niveles, por ejemplo, afectando la síntesis proteica, alterando el traslado de las proteínas sintetizadas al núcleo o afectando la entrada de las mismas al núcleo a través del poro nuclear.

La entrada de las proteínas sintetizadas al núcleo podría ser afectada en forma directa por los metabolitos reactivos del CCl_4 dado que existen en la membrana nuclear los sistemas metabolizantes necesarios para su activación, habiéndose demostrado la unión covalente a proteínas nucleares (169, 170).

Para verificar si la inhibición de la síntesis proteica podría reflejarse rápidamente en una alteración de las proteínas nucleares, se utilizó un potente inhibidor de la síntesis proteica, la cicloheximida (CHX), la cual inhibe la síntesis proteica actuando a nivel de la aminoaciltransferasa de los ribosomas, impidiendo la traslación de los ribosomas a lo largo del RNA mensajero en los polisomas (193, 124).

La inhibición de la síntesis proteica por la cicloheximida causó, al igual que el CCl_4 , una rápida disminución de la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas nucleares, siendo el efecto de la CHX mayor que el del CCl_4 .

A diferencia del CCl_4 , el grado de inhibición de la incorporación del aminoácido marcado causado por la CHX fue similar para las proteínas nucleares y microsomales, lo cual coincidiría con que por su mecanismo de acción la CHX pueda afectar de igual manera a los ribosomas libres y a los unidos al retículo endoplásmico, en tanto que en el caso del CCl_4 , como se dijo anteriormente, sólo se afectarían los ribosomas que en algún momento se encuentren cerca del retículo endoplásmico.

La CHX impide la ruptura de los polisomas producida por el CCl_4 (179). Sin embargo, el hecho de que en los animales intoxicados con CCl_4 a los cuales se los trató previamente con CHX la inhibición sea mayor que en los animales intoxicados sólo con CCl_4 o con CHX indicaría que, aunque la CHX evite la ruptura de los polisomas por el CCl_4 , éstos no serían completamente capaces de efectuar una síntesis proteica normal.

En lo que respecta a las fracciones proteicas nucleares, los resultados obtenidos indican que se produce la incorporación de leucina marcada a todas las fracciones proteicas nucleares. Esto sugeriría que en todas las fracciones existiría un cierto grado de recambio a tiempos muy cortos, incluso en el caso de las histonas.

Las histonas no sólo se adicionan a la cromatina durante la replicación del ADN sino que también son reemplazadas o intercambiadas en la cromatina no replicante (217), lo cual

permitiría explicar la incorporación del aminoácido marcado a la fracción histónica en tiempos cortos.

El CCl_4 afecta de una manera similar a todas las fracciones proteicas, salvo las histonas que resultaron ser las más afectadas.

A las dos horas de intoxicación se observó la recuperación parcial o total del nivel de aminoácido incorporado, incluso en el caso de las histonas, indicando que la recuperación preferencial de la incorporación del aminoácido marcado a las proteínas sería válida para todas las fracciones proteicas.

Parte de la incorporación del aminoácido marcado a proteínas nucleares a tiempos tan cortos podría deberse a la síntesis de proteínas por las células que están creciendo y dividiéndose. Sin embargo, la velocidad de recambio celular no sería tan alta como para justificar totalmente la incorporación del aminoácido marcado observada a tiempos tan cortos (131). Sí podría ser la razón a tiempos más largos ya que en la intoxicación por CCl_4 se estimula la división celular (14, 191).

➤ ***V.B.- Alteraciones químicas en proteínas causadas por el CCl_4***

Los metabolitos reactivos del CCl_4 , pero no el CCl_4 por sí mismo, serían capaces de causar la formación de grupos carbonilos y la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en distintas proteínas en diferentes condiciones. Se analizarán primero los resultados de la acción de los metabolitos reactivos CCl_4 sobre la formación de grupos carbonilos y a continuación sus efectos sobre grupos sulfhidrilos.

➤ ***V.B.I.- Formación de grupos carbonilos***

Los metabolitos reactivos del CCl_4 , pero no el CCl_4 per se, fueron capaces de aumentar el contenido de grupos carbonilos en albúmina de huevo en un sistema netamente químico en el cual el CCl_4 fue activado con luz ultravioleta C.

Los dos radicales libres generados a partir del CCl_4 ($\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) serían capaces de generar grupos carbonilos en proteínas ya que dicha formación se observa tanto en aerobiosis (donde se forma fundamentalmente $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) como en anaerobiosis (donde se forma únicamente $\cdot\text{CCl}_3$). El hecho de que ambos radicales libres sean capaces de causar la formación de grupos carbonilos sobre proteínas coincide con que ambos reaccionen con

varios aminoácidos (186-189, 14).

Se ha indicado en la Introducción de este Trabajo de Tesis que los grupos carbonilos generados en las proteínas por acción de especies reactivas podrían tener al menos dos orígenes: por acción directa sobre las moléculas de proteína (por ejemplo por abstracción de hidrógeno) o por causar dichas especies tóxicas la peroxidación de lípidos, formándose aldehídos reactivos capaces de unirse a los grupos sulfhidrilos o aminos de residuos de aminoácidos de las proteínas quedando un grupo carbonilo libre (145, 67, 152, 154).

La albúmina de huevo nativa posee lípidos asociados (203, 204) y los metabolitos reactivos del CCl_4 son capaces de causar la peroxidación de lípidos (14, 85), por lo que en teoría parte de los grupos carbonilos detectados podrían ser debidos a la peroxidación de lípidos. Sin embargo, la cantidad de grupos carbonilos formados por la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 en la albúmina de huevo nativa y en la albúmina de huevo delipidada fue similar en ambos casos, indicando que la peroxidación de lípidos por los metabolitos reactivos del CCl_4 no podría ser la causante de la generación de grupos carbonilos en proteínas en el sistema químico. Esto señalaría que el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre las proteínas se debería a una acción directa de los mismos.

La luz ultravioleta C tuvo un efecto muy importante sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas. Este efecto será analizado con más detalle más adelante.

El efecto formador de grupos carbonilos de los metabolitos reactivos del CCl_4 fue totalmente inhibido por el Trolox (análogo hidrosoluble del α -tocoferol), lo que sugeriría que dichos metabolitos estarían actuando como radicales libres, dando, por ejemplo, reacciones de abstracción de hidrógeno o de ruptura de cadenas proteicas. Se sabe que los radicales libres son capaces de reaccionar de esta forma con las proteínas (121, 68).

En cambio, el α -tocoferol no fue capaz de inhibir la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 . Ambos antioxidantes tienen una capacidad antioxidante similar (204), lo que los diferencia es que el Trolox es más soluble en agua por no tener la cadena poliprénica del α -tocoferol. La diferencia de acción de ambos antioxidantes podría ser debida a que la naturaleza lipídica del α -tocoferol le podría impedir llegar al lugar donde debería actuar por ser acuoso el medio en el que se desarrolla la reacción.

Esta acción protectora del Trolox también ha sido descrita en la prevención de la acción de los radicales hidroxilo y superóxido sobre albúmina de suero bovino (94), sugiriendo que los mecanismos de alteración de proteínas de los radicales libres del CCl_4 podrían ser similares a los de otros radicales libres.

La presencia de EDTA (quelante de metales como por ejemplo el hierro) en el medio de reacción disminuyó parcialmente la formación de grupos carbonilos en medio aerobio y anaerobio, lo que sugeriría que parte de la activación del CCl_4 en este medio podría ser debida a la acción de los metales presentes (6). Los metabolitos reactivos del CCl_4 generados por acción de metales unidos a proteínas afectarían a los residuos de aminoácidos del entorno del sitio de unión del metal ya que la gran reactividad de los metabolitos reactivos del tóxico haría que reaccionen con grupos químicos cercanos al lugar de su formación. Esto sería similar a lo que sucede en los sistemas de oxidación catalizada por metales (120).

Los metabolitos reactivos del CCl_4 causaron la formación de grupos carbonilos en los 20 aminoácidos presentes normalmente en las proteínas de las células eucariotas. Resultaron particularmente afectados la fenilalanina, el triptófano, la cisteína, la leucina, la serina y la treonina.

Estos resultados coinciden con los de otros sistemas ensayados, por ejemplo, los radicales hidroxilo serían capaces de causar la alteración de los aminoácidos comúnmente presentes en las proteínas, en algunos casos con formación de compuestos carbonílicos (147, 150, 67, 68).

Los metabolitos reactivos del CCl_4 , pero no el CCl_4 por sí mismo, también fueron capaces de causar la formación de grupos carbonilos en proteínas de microsomas hepáticos de rata en un sistema *in vitro*. Esto coincide con que, como se indicó anteriormente, los microsomas serían la fracción subcelular con mayor contenido de sistema activador del CCl_4 (3, 14, 70, 73, 74).

En cambio, no se detectó la formación de grupos carbonilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 en proteínas nucleares y mitocondriales de rata en sistemas *in vitro*, pese a que en estas organelas existen, aunque en mucha menor proporción que en microsomas, sistemas de activación del CCl_4 (74, 75, 76).

En microsomas y núcleos (a las tres horas de incubación en el caso de núcleos), el NADPH *per se* causó la formación de grupos carbonilos en las proteínas. Este efecto podría ser debido a la peroxidación de lípidos causada por el NADPH. Como se indicó anteriormente, la presencia de NADPH en sistemas de incubación *in vitro* de microsomas y núcleos (aunque en mucho menor grado (176)) provoca la peroxidación de lípidos, probablemente por acción de los citocromos P450, fundamentalmente el *cyp2E1*, el cual al estar normalmente presente en su estado de alto spín sería capaz de generar en presencia de su cofactor (el NADPH) especies reactivas capaces de iniciar la peroxidación de lípidos (37,

41, 91).

No es posible evitar la presencia de NADPH en los sistemas de incubación ya que es el cofactor necesario para la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos.

La baja cantidad de sistema metabolizante del CCl_4 en núcleos y mitocondrias permitiría explicar que no se formaran grupos carbonilos en cantidad suficiente como para ser detectados por la técnica empleada para determinar grupos carbonilos en este Trabajo de Tesis.

Por otra parte, los núcleos y las mitocondrias poseen sistemas que les permiten disponer de las proteínas oxidadas (105, 143), por lo que también podría suceder que de formarse proteínas oxidadas las mismas fueran degradadas a componentes no detectables.

Para analizar si la baja activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos podría ser la responsable de que no se formaran grupos carbonilos sobre las proteínas nucleares se empleó CBrCl_3 , el cual es activado a los mismos metabolitos reactivos que el CCl_4 pero en mucho mayor grado debido a que la energía del enlace C-Br es mucho menor que la del C-Cl (42, 72, 7, 55).

El CBrCl_3 no solo no causó la formación de grupos carbonilos en las proteínas, sino que provocó la disminución del contenido normal de grupos carbonilos. Esto podría ser debido a que durante su activación se forma también bromo, el cual al ser oxidante podría oxidar aún más las proteínas, formando especies químicas no detectables por la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina. También podría suceder que el mayor grado de oxidación de las proteínas favorezca su degradación. Como se indicó en la Introducción, la mayor oxidación de las proteínas, siempre que no sea excesiva, favorece la degradación de las mismas (105, 159, 92).

En el caso de las mitocondrias, el NADPH no fue capaz de formar grupos carbonilos sobre sus proteínas. Esto coincide con que la formación de grupos carbonilos causada por el NADPH sería debida a la formación de productos de peroxidación de lípidos ya que no se ha detectado la peroxidación de lípidos en las mitocondrias *in vitro* o *in vivo* (77).

No se detectó la formación de grupos carbonilos en proteínas citosólicas incubadas *in vitro* debidas al CCl_4 , a sus metabolitos reactivos o al NADPH. Esto era esperado ya que en el citosol no existen los sistemas necesarios para la activación del CCl_4 o para la peroxidación de lípidos vía NADPH (14, 77).

En la formación de grupos carbonilos en las proteínas microsomales por activación

del CCl_4 contribuirían ambos metabolitos reactivos del CCl_4 ya que se produjo la formación de grupos carbonilos tanto en atmósfera de nitrógeno como de aire. El efecto del $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$ fue mucho mayor que el del $^\bullet\text{CCl}_3$, lo cual coincidiría con que tiene una mayor capacidad para abstraer hidrógenos (14).

En atmósfera de nitrógeno disminuyó el contenido de grupos carbonilos del control, lo que tal vez indicaría que de alguna manera radicales libres de oxígeno podrían estar actuando en el medio de incubación.

En atmósfera de nitrógeno se inhibió totalmente la formación de grupos carbonilos causada por el NADPH, lo que concuerda con que dichos grupos carbonilos pudieran ser productos de la peroxidación de lípidos, ya que en dicha atmósfera se inhibe la peroxidación de lípidos por ser necesaria la presencia de oxígeno para la formación de lipoperóxidos (41).

Antioxidantes fueron capaces de proteger contra la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 .

El α -tocoferol, el cual se sabe que protege contra la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 (6, 183), fue capaz de inhibir en parte la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 pero no la del NADPH. Antioxidantes más hidrosolubles como el hemisuccinato de α -tocoferol o el Trolox fueron mejores protectores. De hecho, el Trolox inhibió totalmente la formación de grupos carbonilos causada tanto por los metabolitos reactivos del CCl_4 como por el NADPH. Se sabe además que el Trolox es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos causada por el NADPH (41).

El que el hemisuccinato de α -tocoferol fuera mejor protector que el α -tocoferol coincide con que también lo sea en la intoxicación por CCl_4 , probablemente porque pueda llegar mejor a las estructuras celulares, siendo transformado a α -tocoferol en el lugar donde debe actuar (205).

El Trolox también disminuyó el contenido de grupos carbonilos del control, lo que podría ser debido a que por su presencia se inhiban o reviertan oxidaciones que normalmente ocurran en las células.

El EDTA inhibió totalmente la formación de grupos carbonilos causada por el NADPH pero sólo parcialmente la causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Se sabe que el EDTA inhibe totalmente la peroxidación de lípidos causada por el NADPH y por los metabolitos reactivos del CCl_4 , sin interferir en la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos (206, 41, 7, 49).

La inhibición del EDTA de la formación de grupos carbonilos generada por el NADPH avalaría la idea de que la acción del NADPH sería debida a la peroxidación de

lípidos.

La inhibición de la acción del CCl_4 por el EDTA podría ser debida a su efecto inhibidor de la peroxidación de lípidos generada por el tóxico. También podría producto del efecto quelante del EDTA, que inhibiría la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos por los metales de transición que pudieran estar presentes. Este efecto quelante permitiría también explicar la disminución del contenido de grupos carbonilos de los controles causada por la presencia de EDTA en el medio de incubación.

El que el EDTA no inhiba totalmente la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 estaría indicando que parte de los grupos carbonilos generados por los metabolitos reactivos del CCl_4 en proteínas microsomales serían debidos a la acción directa de los mismos sobre las proteínas, lo cual coincidiría con el efecto observado en el sistema netamente químico.

El CCl_4 fue capaz de producir el aumento del contenido de grupos carbonilos en las proteínas microsomales hepáticas de rata *in vivo*. El aumento fue máximo a la hora de intoxicación, recuperándose las proteínas oxidadas a las 3 horas de la intoxicación. La recuperación del nivel normal de carbonilos podría ser debida a la acción de proteasas como el proteosoma, el cual se sabe que degrada preferencialmente proteínas oxidadas y que es activado después de un estado de estrés oxidativo (105, 92)

No se detectó la alteración del contenido de grupos carbonilos en las proteínas nucleares a una, dos, tres y seis horas de intoxicación, lo cual coincide con los resultados obtenidos *in vitro*. Esto podría ser debido a que los niveles de activación en el núcleo del CCl_4 no serían suficientes como para causar un daño detectable, a que los núcleos estén protegidos de alguna manera contra la oxidación de sus proteínas o a que las proteínas oxidadas son eliminadas lo suficientemente rápido como para que no sean detectadas. Esto último podría coincidir con el hecho de que, como se ha indicado, el sistema de degradación de proteínas oxidadas (el proteosoma) también puede ser encontrado en el núcleo (143).

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis sobre la formación de grupos carbonilos en proteínas están avalados por estudios realizados sobre la acción del CCl_4 sobre proteínas hepáticas totales en intoxicación aguda y cirrosis de ratas preinducidas con fenobarbital, administrando el CCl_4 en forma inhalatoria (166).

➤ **V.B.II.- Disminución del contenido de grupos sulfhidrilos**

Los metabolitos reactivos del CCl_4 , pero no el CCl_4 por sí mismo, fueron capaces de disminuir el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas en el sistema netamente químico empleado en el estudio de los grupos carbonilos.

La disminución del contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 no sería atribuible a la presencia de lípidos en la proteína empleada ya que la albúmina de huevo nativa y la albúmina de huevo delipidada resultaron igualmente afectadas.

Al estudiar la contribución de cada uno de los metabolitos reactivos del CCl_4 (empleando una atmósfera de nitrógeno para determinar la contribución del $\cdot\text{CCl}_3$ y una atmósfera de aire para la del $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ (principalmente)), surgió la dificultad de que la luz ultravioleta C sola en atmósfera de nitrógeno produjo un notablemente incremento del contenido de grupos sulfhidrilos.

La albúmina de huevo posee un puente disulfuro, por lo que cabría la posibilidad de que la luz UVC pudiera causar su apertura, formándose grupos sulfhidrilos. Esta posibilidad se analizará con más detalle al considerar los efectos de la luz ultravioleta sobre proteínas.

Debido al efecto formador de grupos sulfhidrilos de la luz ultravioleta C no se pudo evaluar fehacientemente la contribución de cada radical libre del CCl_4 en este sistema; los resultados sugerirían que sólo actuaría el $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$, pero no se podría excluir que parte de los grupos sulfhidrilos detectados hayan sido generados por la apertura del puente disulfuro.

No se detectó que el CCl_4 o sus metabolitos reactivos fueran capaces de alterar el contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína, pese a que los grupos sulfhidrilos de las proteínas provendrían de este aminoácido. El que no afecte a los grupos sulfhidrilos de la cisteína pero sí a los de la albúmina sugeriría que es el entorno dentro de la proteína lo que alteraría la capacidad de reacción del aminoácido, permitiendo así su oxidación. Esto es lo que sucede en el caso de las proteínas sensible a las variaciones redox en las células, la configuración alrededor del grupo sulfhidrilo sería la que determina si el mismo puede ser o no oxidado (63).

Los metabolitos reactivos del CCl_4 tienen una gran capacidad de abstracción de hidrógeno. Muchas de las reacciones de estos radicales libres como aminoácidos tales como metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, prolina e hidroxiprolina, se iniciarían por reacciones de abstracción (14, 186-189, 83)

Dada esta capacidad de abstracción de hidrógeno de los radicales libres del CCl_4 , se estudió la posibilidad de que se formen productos volátiles a partir de albúmina de huevo

por acción del tóxico, determinándose la formación productos volátiles (que se comportarían cromatográficamente como cloroformo y diclorometano), los cuales se podrían haber originado por abstracción de hidrógeno de la proteína.

El residuo de aminoácido que más fácilmente cedería un hidrógeno sería la cisteína, por lo que se ensayó la formación de productos volátiles a partir de cisteína, determinándose la formación de cloroformo.

Como se ha mencionado, en los ensayos con el aminoácido cisteína se determinó la formación de cloroformo pero no se detectó la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos (lo cual debería ser una consecuencia de la cesión del hidrógeno de grupos sulfhidrilos). Esto podría ser debido a que la técnica empleada para la detección del HCCl_3 es más sensible que la determinación de grupos sulfhidrilos.

El Trolox fue capaz de inhibir parcialmente la formación de los compuestos volátiles a partir de albúmina de huevo, confirmando en cierta medida que podrían estar participando reacciones de abstracción de hidrógeno.

Los radicales libres generados a partir del CCl_4 serían capaces de causar la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas microsomales, pero no en proteínas nucleares, mitocondriales y citosólicas.

En el caso de los microsomas se determinó la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos causada por el NADPH y por los metabolitos reactivos del CCl_4 , pero no por el CCl_4 solo. Al igual que en el caso de la formación de grupos carbonilos, esto coincide con que el retículo endoplásmico sea el principal sistema de activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos (3, 14, 70, 73, 74). Estos efectos serán considerados en mayor detalle al tratar la acción de distintas sustancias sobre la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 en las proteínas microsomales.

En el caso de los núcleos, el NADPH causó la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en tanto que los metabolitos reactivos del CCl_4 no fueron capaces de lo mismo, Esto podría ser debido a que la activación del CCl_4 no fue suficiente como para causar un efecto significativo.

La disminución del contenido de grupos sulfhidrilos causada por el NADPH podría ser debida a que, como se indicó anteriormente, el NADPH produce la peroxidación de lípidos en sistemas de incubación de núcleos (176), lo que podría generar aldehídos reactivos capaces de reaccionar con los grupos sulfhidrilos de proteínas (37, 41, 91).

Al igual que en el caso de los núcleos, no se observó en las proteínas mitocondriales una alteración del contenido de grupos sulfhidrilos proteicos debida al CCl_4 o sus metabolitos reactivos, lo cual podría ser debido a que la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos no hubiera sido suficiente como para causar una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos detectable con la técnica empleada.

A diferencia de su efecto en los núcleos, el NADPH no causó la alteración del contenido de grupos sulfhidrilos de las proteínas mitocondriales. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que el CCl_4 no causa la peroxidación de lípidos en las mitocondrias (76, 77).

En la fracción citosólica se analizaron los grupos sulfhidrilos no proteicos y proteicos. El CCl_4 o sus metabolitos reactivos no causaron la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en ninguno de los dos casos. Esto es coherente ya que, como ha sido indicado, en el citosol no existen los mecanismos necesarios para la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos.

En cambio, el NADPH causó un muy importante incremento del contenido de grupos sulfhidrilos tanto en proteínas como en sustancias no proteicas, principalmente en estas últimas. Esto se podría explicar por la presencia en el citosol de la enzima glutatión reductasa, la cual reduce grupos sulfhidrilos oxidados. Esta enzima requiere NADPH, por lo que la presencia de NADPH en el medio de incubación podría generar el medio reductor necesario para que dicha enzima pudiera reducir grupos sulfhidrilos proteicos y no proteicos oxidados.

En el caso de los microsomas, una atmósfera de nitrógeno inhibió totalmente la disminución de grupos sulfhidrilos, lo que sugeriría que sería el $\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$ el principal oxidante de los grupos sulfhidrilos; esto concuerda con que la capacidad de abstracción de grupos hidrógeno del $\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$ sea mucho mayor que la del $^\cdot\text{CCl}_3$ (14).

Sin embargo, anteriormente se indicó que en el sistema químico (sobre albúmina de huevo) se había detectado la formación de HCCl_3 . Esta discrepancia en los resultados podría ser debida a que la detección por cromatografía gaseosa es mucho más sensible que la de la técnica de determinación de grupos sulfhidrilos, por lo que no se podría descartar que el $^\cdot\text{CCl}_3$ pudiera abstraer hidrógenos de los residuos cisteína con formación de HCCl_3 y que la disminución de grupos sulfhidrilos resultante no fuera suficiente como para ser detectada con la técnica de determinación de grupos sulfhidrilos empleada.

El α -tocoferol fue capaz de inhibir parcialmente la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos causada por el NADPH y por los metabolitos reactivos del CCl_4 . El hemisuccinato de α -tocoferol causó el mismo efecto. En ninguno de los dos casos el efecto

fue importante.

En el caso del α -tocoferol, pero no en el del succinato del α -tocoferol, se observó que su presencia aumentó el contenido de grupos sulfhidrilos con respecto al control, lo que podría ser debido a la inhibición o reversión de la oxidación de grupos tioles. La diferencia entre ambos antioxidantes podría deberse a la necesidad de que se produzca la ruptura del enlace éster del hemisuccinato para que este derivado de α T pueda ejercer su acción, lo que podría limitar su acción antioxidante sobre el conjunto de grupos sulfhidrilos protegido de alguna manera por el α -tocoferol.

El Trolox inhibió totalmente el efecto del NADPH y casi totalmente el efecto de los metabolitos reactivos del CCl_4 .

Todo lo anteriormente indicado sugiere que los antioxidantes serían capaces de inhibir la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 y del NADPH sobre los grupos sulfhidrilos de proteínas.

El EDTA fue capaz de inhibir el efecto del NADPH sobre los grupos sulfhidrilos, lo cual coincidiría con que probablemente dicho efecto sea generado completamente por la peroxidación de lípidos causada por el NADPH. Ha sido indicada la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en microsomas sometidos a la peroxidación de lípidos, en los cuales los grupos tioles podrían ser atacados por radicales lipídicos y/o por aldehídos resultantes de la peroxidación de lípidos (218).

El hecho de que el EDTA no inhiba completamente la acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sugeriría que la acción de los mismos se debería, al menos en parte, a la acción directa de dichos metabolitos sobre las proteínas microsomales, lo cual coincidiría con los resultados obtenidos en el sistema netamente químico.

➤ *V.C.- Efectos de la luz ultravioleta sobre la oxidación de proteínas*

Una consideración aparte merece la acción de la luz ultravioleta C, empleada para la activación del CCl_4 a sus metabolitos reactivos. La luz ultravioleta C tuvo un efecto muy importante sobre la estructura química de proteínas y aminoácidos.

La luz UVC causó la formación de grupos carbonilos en la albúmina de huevo. En esta acción podrían intervenir especies reactivas de oxígeno ya que se determinó la disminución de la formación de grupos carbonilos en una atmósfera de nitrógeno libre de

oxígeno.

La formación de grupos carbonilos en albúmina de huevo por efecto de la luz ultravioleta C coincide con que se formen grupos carbonilos en proteínas por radiaciones ionizantes, pese a que la energía de la radiación ultravioleta C sea mucho menor (219).

La acción de la luz ultravioleta sobre la formación de grupos carbonilos no sería a través de productos lipídicos ya que el efecto causado por dicha radiación sobre la albúmina nativa y la albúmina delipidada fue similar.

Un antioxidante liposoluble como el α -tocoferol no evitó la formación de grupos carbonilos por la luz ultravioleta, en cambio, un antioxidante hidrosoluble, el Trolox, sí lo hizo. La diferencia de acción de ambos antioxidantes podría ser debida a sus distintas solubilidades, efecto anteriormente explicado.

La acción del Trolox fue similar en atmósfera de aire que de nitrógeno, sugiriendo que el efecto protector del antioxidante no estaría relacionado con su posible acción sobre especies reactivas de oxígeno.

La acción de la luz ultravioleta no estaría relacionada con la oxidación catalizada por metales, ya que no se alteró la formación de grupos carbonilos por la luz ultravioleta en presencia de EDTA.

La luz ultravioleta C fue capaz de alterar la estructura química de aminoácidos con formación de grupos carbonilos sobre los mismos. El grado de alteración dependió del aminoácido, resultando muy afectados triptofano, fenilalanina, histidina, y particularmente afectados los aminoácidos azufrados.

La luz UVC tendría muy poco efecto sobre los grupos sulfhidrilos proteicos ya que en medio aerobio casi no se alteró el contenido de los mismos en albúmina de huevo nativa y delipidada. Esto se corresponde con que cause una leve alteración del contenido de grupos sulfhidrilos en el aminoácido cisteína.

En cambio, la luz UVC tendría un efecto importante sobre los puentes disulfuro; la irradiación de albúmina de huevo delipidada en medio anaerobio causó un importante aumento en el contenido de grupos sulfhidrilos, lo que podrían ser explicado por la apertura de un puente disulfuro con formación de grupos sulfhidrilos. Esto podría ser posible en el sistema empleado ya que la albúmina de huevo posee un puente sulfhidrilo en su estructura (200, 201).

Para estudiar esta posibilidad se ensayó el efecto de la luz UVC sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de glutatión oxidado (que posee un puente disulfuro en su estructura) en medio aerobio y anaerobio. En ambos medios se determinó un importante aumento del contenido de grupos sulfhidrilos, siendo el efecto más importante en atmósfera de nitrógeno.

Esto apoyaría la posibilidad de que el efecto de la luz ultravioleta sobre la formación de grupos sulfhidrilos en la albúmina de huevo en medio anaerobio pudiera ser causado por la apertura de puentes disulfuro.

Así, la luz ultravioleta podría causar la ruptura del puente disulfuro con formación de radicales tiilo. En medio aerobio estos radicales podrían oxidarse por la presencia de especies oxigenadas a sulfenos (9, 87), en tanto que en medio anaerobio tal vez podrían perdurar lo suficiente como para abstraer un hidrogeno de alguna molécula y reducirse de esa manera a sulfhidrilos detectables.

Esto coincide con que las radiaciones ionizantes y el radical superóxido también causan la apertura de puentes disulfuro con formación de grupos sulfhidrilos en medio anaerobio (219, 150).

El poco efecto de la luz UVC sobre los grupos sulfhidrilos de proteína sugeriría que los mecanismos que intervendrían no serían por abstracción de hidrógeno.

La luz UVC es absorbida en la estratosfera por el ozono, por lo que no llega a la superficie terrestre. Sin embargo, existe exposición laboral a UVC, por ejemplo, trabajadores que emplean soldaduras de arco están expuesto a altos niveles de UVC (196, 197). Así, parte del daño causado sobre la piel por exposición a UVC podría ser debido al efecto de dicha radiación sobre proteínas.

➤ V.D.- Consideraciones generales

Las alteraciones provocadas por los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre proteínas indicadas en este Trabajo de Tesis podrían ser causantes de algunos de los efectos observados en la intoxicación por CCl_4 .

Un esquema de los efectos del CCl_4 sobre proteínas determinados en este Trabajo de Tesis y sus posibles consecuencias se representa en la figura V.I.

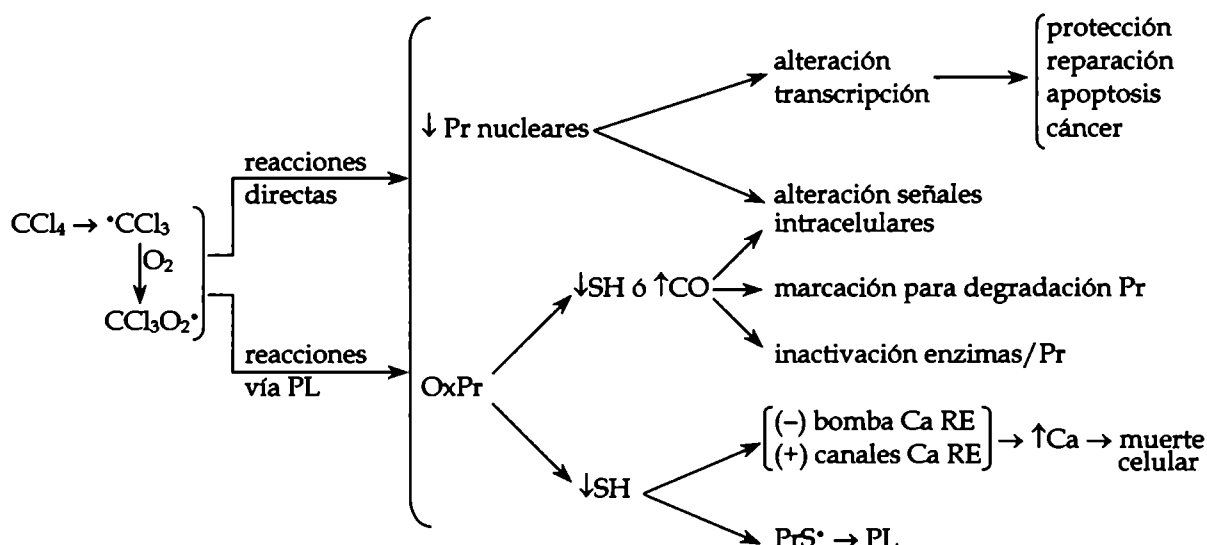


Figura V.I: Efectos del CCl_4 determinados en este Trabajo de Tesis y sus posibles consecuencias

La alteración de la llegada de proteínas al núcleo, aunque solo fuera transitoriamente, podría ser causante de la alteración de mecanismos celulares como replicación del ADN, control del ciclo celular, así como de factores que regulan la homeostasis celular; todo lo cual podría llevar a una alteración de la homeostasis celular.

Al mismo tiempo, dichas alteraciones podrían ser las causantes de la estimulación de mecanismos de protección y reparación celular. De hecho, se sabe que en la intoxicación por CCl_4 se inducirían factores similares a los que se producen durante la reparación del hígado luego de una hepatectomía, los cuales a su vez se han asociado con la apoptosis y la producción de cáncer (14, 191, 220).

Aunque la alteración de la incorporación de un aminoácido a proteínas nucleares fue transitoria, habría que tener en cuenta que el que se recupere el nivel de incorporación normal no significa que las proteínas nucleares sintetizadas sean las mismas; que tal vez exista una alteración de la clase y/o la cantidad de proteínas sintetizadas en respuesta a la intoxicación. De hecho, para otras sustancias químicas como la cicloheximida, se ha determinado que los niveles de síntesis de proteínas nucleares son mayores que los normales a las 24 h de intoxicación, y que dentro de estas proteínas son mayores los niveles de las no histónicas, sugiriendo un aumento de la síntesis de proteínas específicas en respuesta a la situación estresante (221).

En lo que respecta a la alteración bioquímica de proteínas, detectadas como formación de grupos carbonilos o disminución del contenido de grupos sulfhidrilos, los resultados obtenidos indicarían que los metabolitos reactivos del CCl_4 podrían causar la oxidación de proteínas por mecanismos distintos a la peroxidación de lípidos o la oxidación

dependiente de metales. Esto también ha sido sugerido para otras sustancias tóxicas, como el paraquat (222).

La formación de proteínas alteradas en la intoxicación por CCl_4 , no atribuibles a la unión covalente, también ha sido observada en el caso de las proteínas microsomales por electroforesis bidimensional (184).

Ha sido sugerido que daños iniciados sobre una proteína por la acción de un radical libre podrían llevar a la destrucción total de la misma por reacciones de propagación dentro de la misma proteína, prevenibles por el uso de antioxidantes como el Trolox (94, 68). De acuerdo a esto, las oxidaciones determinadas en proteínas en la intoxicación por CCl_4 podrían ser causantes de la destrucción de las moléculas proteicas.

Se sabe que los metabolitos reactivos del CCl_4 causan la destrucción del citocromo 2E1, que es el citocromo que lo activa a sus metabolitos reactivos en condiciones normales (14, 82). Ha sido sugerido en otros sistemas que la oxidación del *cyp2E1* por radicales libres de oxígeno conduciría a la formación de moléculas oxidadas reconocibles por el sistema de degradación de proteínas (223). Si el CCl_4 oxidara al *cyp2E1* de la misma manera que lo hace con las proteínas microsomales en general, este podría ser uno de los mecanismos que llevara a la inactivación y posterior degradación de dicho citocromo.

La formación de proteínas oxidadas podría alterar los equilibrios intracelulares. Se considera que la oxidación de proteínas en residuos como cisteína o histidina podría ser análoga en muchos aspectos a la fosforilación de proteínas, generando respuestas celulares específicas (224, 63, 112).

La oxidación de proteínas por el CCl_4 podría ser la causante de la activación de mecanismos protectores celulares, por ejemplo, proteínas de choque térmico se activan cuando se produce la oxidación de determinados grupos tioles de proteínas (104). El p53 (involucrado en la apoptosis) es regulado por sus grupos tioles (68) y se sabe que es activado en la intoxicación por CCl_4 (14).

Parte de la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos determinado en las proteínas microsomales podría corresponderse con el aumento detectado de grupos carbonilos. Como se ha indicado anteriormente, productos de la peroxidación de lípidos como el HNE o el MDA pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilos quedando libre un grupo carbonilo que puede ser detectado con la técnica de 2,4-dinitrofenilhidracina.

Se sabe que muy temprano en la intoxicación con CCl_4 se produce la inhibición de la bomba de calcio así como la apertura de los canales de calcio dependientes de IP_3 y rianodina

del retículo endoplásmico; en cambio no se ve alterada la bomba de calcio de las mitocondrias (106, 116, 3, 114, 164). Además, tanto la bomba de calcio como los canales de calcio del retículo endoplásmico son proteínas muy sensibles a la oxidación de sus grupos sulfhidrilos. Así, en el caso de la bomba de calcio, para que la misma sea capaz de tomar calcio del citosol sus grupos sulfhidrilos deben estar en forma reducida, en tanto que en el caso de los canales de calcio, se produce la apertura de los mismos cuando sus grupos sulfhidrilos están oxidados (106, 116).

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis indican que los metabolitos reactivos del CCl_4 causan la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas microsomales. Esto coincidiría con que se oxiden los sulfhidrilos tanto de la bomba de calcio como de los canales de calcio, lo que llevaría en el primer caso a la inhibición ((-) en la figura V.I) de la actividad de la bomba y en el segundo a la apertura de los canales de calcio ((+) en la figura V.I). Es decir, la oxidación de ambos tipos de grupos sulfhidrilos llevaría a un aumento de calcio citosólico, que es lo que se observa en la intoxicación por CCl_4 .

También se ha indicado que los metabolitos reactivos del CCl_4 producen la inhibición de la bomba de calcio del retículo endoplásmico aún si se inhibe la peroxidación de lípidos y la unión covalente (14, 116). Esto coincidiría con los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis que indican que los metabolitos reactivos del CCl_4 pueden actuar directamente sobre las proteínas, sin la mediación de la peroxidación de lípidos.

El que no haya habido alteraciones debidas a los metabolitos reactivos del CCl_4 en el contenido de grupos sulfhidrilos o la formación de grupos carbonilos en las proteínas mitocondriales también coincide con que no se afecten las funciones mitocondriales ni la toma de calcio por las mitocondrias. Otras sustancias que sí oxidan los grupos sulfhidrilos mitocondriales como el hidróperóxido de t-butilo o la diamida, producen la apertura de poros en la membrana mitocondrial con entrada de calcio a la mitocondria y pérdida de la función mitocondrial (117).

Ha sido indicado que la oxidación de grupos tioles proteicos, la formación de grupos carbonilos sobre proteínas y la oxidación de glutatión a glutatión oxidado pueden ser indicadores de estrés oxidativo fisiológicamente relevantes (97).

En la intoxicación por CCl_4 no se observa una disminución del contenido GSH y sólo se observa un leve aumento de la excreción de GSSG (3, 98). Esto podría indicar que no se desencadenan mecanismos de protección como la tiolación de proteínas, que, como se indicó en la Introducción, protegería a las proteínas cuando hay un medio oxidante en las células (104, 115, 112). Esto sugeriría que los grupos tioles proteicos en general no estarían protegidos contra la acción del tóxico.

El hecho de que los metabolitos reactivos del CCl_4 sean capaces de reaccionar

directamente con las proteínas, en algunos casos por abstracción de hidrógeno, podría causar la formación de radicales tiilo sobre las mismas. Se sabe que los radicales tiilo son capaces de causar la peroxidación de lípidos (87), por lo que podría suceder que éste fuera otro camino de iniciación de la peroxidación de lípidos por parte de los metabolitos reactivos del CCl_4 , lo cual podría ser posible dado la estrecha relación que existe entre lípidos y proteínas en las membranas celulares (124, 103).

El efecto de abstracción de hidrógeno de los radicales libres del CCl_4 sobre los grupos sulfhidrilos permitiría entender, al menos en parte, que los radioprotectores, agentes dadores de hidrógeno muy eficientes, sean buenos protectores contra la necrosis celular inducida por el CCl_4 y que de hecho sean mejores protectores que otras sustancias que protegen de la acumulación de calcio o de la degradación de componentes celulares (3). Así, sustancias protectoras de los grupos tioles como el tetraacetato de ditiotreitól (que genera ditiotreitól *in vivo*) son buenos protectores en la intoxicación por CCl_4 (190).

Por todo lo anteriormente indicado, las alteraciones causadas por los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre las proteínas podrían ser las causantes de algunos de los efectos tóxicos así como de la estimulación de algunos de los mecanismos de reparación observados en la intoxicación por CCl_4 .

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis se puede concluir que los metabolitos reactivos del CCl_4 serían capaces de afectar a proteínas a dos niveles:

- .- alterando la incorporación de un aminoácido marcado a proteínas, lo cual sería una evidencia de que se vería afectada la síntesis de las críticas proteínas nucleares,
- .- oxidando proteínas, con formación de grupos carbonilos y disminución del contenido de grupos sulfhidrilos de las mismas.

El CCl_4 causa una disminución transitoria de la incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas nucleares hepáticas de rata. El efecto es máximo a la hora de intoxicación, recuperándose los niveles de incorporación normales a las 4 h.

El inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida también produce una rápida disminución de la incorporación del aminoácido marcado a las proteínas nucleares y microsomales.

El efecto de la mezcla cicloheximida- CCl_4 es mayor que el efecto de la cicloheximida o del CCl_4 solos, por lo que, pese a que la cicloheximida impide la ruptura de los polisomas causada por el CCl_4 , dichos polisomas no serían eficientes para la síntesis proteica.

Se ven afectadas todas las fracciones proteicas nucleares de una manera similar, salvo las histonas que resultan ser las más afectadas. A las dos horas de intoxicación todas las fracciones nucleares proteicas muestran algún grado de recuperación de la incorporación del aminoácido marcado.

La recuperación de la incorporación de un aminoácido marcado tanto a las proteínas nucleares totales como a las distintas fracciones proteicas sugeriría la existencia de mecanismos celulares que priorizarían la síntesis de las proteínas nucleares.

Los dos metabolitos reactivos del CCl_4 ($\cdot\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) son capaces de oxidar proteínas en un sistema químico, formando grupos carbonilos y disminuyendo el contenido de grupos sulfhidrilos de las mismas.

La oxidación de proteínas causada por los metabolitos reactivos del CCl_4 en este sistema podría ser por acción directa de los mismos.

CONCLUSIONES

La activación por metales del CCl_4 podría intervenir en la formación de grupos carbonilos sobre proteínas.

Los antioxidantes serían capaces de inhibir la formación de grupos carbonilos sobre proteínas en el sistema químico.

Parte de los efectos de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre proteínas podrían ser debidos a reacciones de abstracción de hidrógeno ya que en el sistema químico se formaría cloroformo.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 causan la formación de grupos carbonilos en los 20 aminoácidos comunes, pero no son capaces de causar la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína.

La luz ultravioleta C es capaz de causar la formación de grupos carbonilos sobre proteínas y aminoácidos en un sistema químico.

Parte del efecto sobre proteínas es inhibible por antioxidantes, lo que podría implicar que están actuando radicales libres.

El efecto de formación de grupos carbonilos no sería dependiente de metales.

Parte de la acción de la UVC podría ser debida a radicales oxigenados.

La luz UVC afecta poco el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas

En cambio, es capaz de causar la apertura de puentes disulfuro de proteínas y péptidos con formación de grupos sulfhidrilos, principalmente en ausencia de oxígeno.

Los metabolitos reactivos del CCl_4 son capaces de causar la formación de grupos carbonilos y la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas microsomales hepáticas de rata en un sistema *in vitro*.

Los mismos metabolitos reactivos no son capaces de causar la formación de grupos carbonilos ni la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en proteínas nucleares, mitocondriales o citosólicas hepáticas de rata en sistemas *in vitro*.

El efecto sobre las proteínas microsomales podría ser causado entre otros por:

- .- acción directa de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre las proteínas
- .- reacción de productos de la peroxidación de lípidos generada por el CCl_4 con grupos proteicos.

Ambos metabolitos reactivos del CCl_4 serían capaces de causar la formación de grupos carbonilos en proteínas microsomales hepática de rata *in vitro*.

El $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$ causa la disminución del contenido de grupos sulfhidrilos en las proteínas microsomales. El efecto del $\bullet\text{CCl}_3$ no se puede precisar totalmente, no pudiéndose excluir que el $\bullet\text{CCl}_3$ pueda reaccionar con los grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales.

Tanto la formación de grupos carbonilos como la disminución de grupos sulfhidrilos serían inhibibles por antioxidantes.

El NADPH es capaz de formar de grupos carbonilos y disminuir el contenido de grupos sulfhidrilos de proteínas microsomales y nucleares, pero no de las mitocondriales. Este efecto sería debido a su capacidad de peroxidar lípidos en microsomas y núcleos pero no en mitocondrias.

El CCl_4 es capaz de causar la formación de grupos carbonilos en proteínas microsomales hepáticas de rata *in vivo*, pero no en las proteínas nucleares.

Este efecto sobre las proteínas microsomales hepáticas de rata es transitorio, recuperándose los niveles de grupos carbonilos en proteínas normales a las 3 horas de intoxicación.

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis indicarían que los metabolitos reactivos del CCl_4 serían capaces de alterar proteínas de diversas maneras. Esto podría tener consecuencias a distintos niveles:

- .- Inactivación de mecanismos de regulación de la homeostasis cálcica.
- .- Alteración la llegada de proteínas al núcleo, con la consiguiente alteración de mecanismos regulatorios al nivel nuclear.
- .- Modificación de mecanismos de regulación intracelulares.
- .- Marcación de proteínas para su degradación, con el consiguiente descenso de las cantidades de proteínas funcionales.
- .- Inactivación de proteínas y enzimas, entre otros.

En definitiva, la alteración de proteínas causada por el CCl_4 podría desencadenar procesos que le permitan a la célula protegerse o que le causen finalmente la muerte.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Castro, J. A.. 1993. "Toxicología básica. Mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana XXVII* (2), pp. 197-206.
- 2.- Raymond, J.; Neisink, M.; de Vries, J.; Hollinger, M. A.. 1996. "Toxicology: Principles and Applications". Capítulos 3, 4, 5, 10 y 22. CRC Press, Inc. and Open University of The Netherlands.
- 3.- Castro, J. A. and Castro, G. D.. 1997. "Treatment of chemically induced free radical mediated cell injury". *Anales de la Sociedad Científica Argentina* **227**, pp. 41-54.
- 4.- Kakkar, P.; Viswanathan, V. and Viswanathan, P. N.. 1995. "Oxidative stress-mediated calcium deregulation as a common unspecific mechanism in toxicity". *TEN* **2** (4), pp. 106-113.
- 5.- Mitchell, J. R.; Corcoran, G. B.; Hughes, H.; Lauterburg, B. H. and Smith, C. V.. 1981. "Acute lethal liver injury caused by chemically reactive metabolites". En: "Organ directed toxicity. Chemical indices and mechanisms", pp. 117-129. Symposium on Chemical Indices and Mechanisms of Organ-Directed Toxicity. Barcelona, Spain. Editores: Brown, S. S. and Davies, D. S.. Pergamon Press.
- 6.- Castro, J. A.. 1990. "Prevention of chemically induced liver injury". En: "Toxic interactions between chemicals. Mechanisms and effects", pp. 233-257. Editores: Goldstein, R. S; Hewitt, W. and Hook, J. B.. Academic Press. New York.
- 7.- Recknagel, R. O. and Glende Jr., E. A.. 1973. "Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage". *Critical Reviews in Toxicology* **2**, pp. 263-297.
- 8.- Casarett & Doull's. 1991. "Toxicology. The basic science of poisons". 4ª edición. Capítulos 2, 3 y 4. Editores: Ambdur, M. O.; Doull, J. and Klaassen, C. D.. Pergamon Press Inc. Nueva York.
- 9.- Castro, G. D. y Castro, J. A.. 1988. "Formación de especies químicas reactivas en la biotransformación de xenobióticos y toxicología". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana XXII* (2), pp. 221-238.
- 10.- Castro, J. A.. 1984. "Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury". IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology. London, pp. 243-250. Editores: Paton, W.; Mitchell, J. and Turner, P.
- 11.- Faroon, O.; DeRosa, C. T.; Smith, L.; Mehlman, M. A.; Riddle, J.; Hales, Y and Brattin, W. J.. 1994. "ATSDR evaluation of health effects of chemicals. I. Carbon tetrachloride: health effects, toxicokinetics, human exposure and environmental fate". *Toxicology and Industrial Health* **10**, Supplement 1, pp. 1-118.
- 12.- Cardell, E. L. and Cardell, R. R.. 1997. "Structure and function of hepatic parenchymal cells". En "Comprehensive Toxicology". Volumen 9, Capítulo 2, pp. 11-33. Editores del volumen:

Mc Cuskey, R. and Earnest, D. L.. Editores de la serie: Sipes, I. G.; Mc Queen, C. A. and Gandolfi, A. J.. Elsevier Science. New York.

13.- Sasse, D.; Spornitz, U. M. and Maly, I. P.. 1992. "Liver architecture". *Enzyme* **46**, pp. 8-32.

14.- Castro, J. A. and Castro, G. D.. 1997. "Carbon tetrachloride". En "Comprehensive Toxicology". Volumen 9, Capítulo 14, pp. 251-271. Editores del volumen: Mc Cuskey, R. and Earnest, D. L.. Editores de la serie: Sipes, I. G.; Mc Queen, C. A. and Gandolfi, A. J.. Elsevier Science. New York.

15.- Wang, P.; Kaneko, T.; Tsukada, H.; Nakano, M. and Sato, A.. 1997. "Dose- and route-dependent alterations in metabolism and toxicity of chemical compounds in ethanol-treated rats: difference between highly (chloroform) and poorly (carbon tetrachloride) metabolized hepatotoxic compounds". *Toxicology and Applied Pharmacology* **142**, pp. 13-21.

16.- Díaz de Toranzo, E. G.. 1990. "Absorción de tóxicos. Un concepto básico en toxicología". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana XXIV* (4), pp. 375-383.

17.- Jeffery, E. H.. 1991. "Biochemical Basis of Toxicity". En: "Handbook of Toxicologic Pathology", Capítulo 5, pp. 50-70. Academic Press, Inc.

18.- Smith, D. A.; Ackland, M.J. and Jones, B. C.. 1997. "Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates. Part 2: properties of cytochrome P450 substrates". *Drug Discovery Today* **2** (11), pp. 479-486.

19.- Van Bezooijen, C. F. A.. 1990. "Morphology, ultrastructure and function of hepatocytes during liver drug metabolism". *Journal of Electron Microscopy Technique* **14**, pp. 152-174.

20.- Castro, J. A.. 1985. "Biotransformación de sustancias extrañas al organismo. Reacciones y enzimas involucradas". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana XIX* (2), pp. 201-213.

21.- McCuskey, R. S. and Sipes, I. G.. 1997. "Introduction to the liver and its response to toxicants". En "Comprehensive Toxicology". Volumen. 9, Capítulo 1, pp. 1-9. Editores del volumen Mc Cuskey, R. and Earnest, D. L.. Editores de la serie: Sipes, I. G.; Mc Queen, C. A. and Gandolfi, A. J.. Elsevier Science. New York.

22.- Graham-Lorence, S. and Peterson, J. A.. 1996. "P450s: Structural similarities and functional differences". *FASEB Journal*. **10**, pp. 206-214.

23.- Kauffman, F. C.. 1997. "Xenobiotic metabolism by the liver". En "Comprehensive Toxicology". Volumen 9, Capítulo 5, pp. 73-95. Editores del volumen: Mc Cuskey, R. and Earnest, D. L.. Editores de la serie: Sipes, I. G.; Mc Queen, C. A. and Gandolfi, A. J.. Elsevier Science. New York.

24.- Oinonen, T. and Lindros, K. O.. 1998. "Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation". *Biochemical Journal* **329**, pp. 17-35.

25.- de Groot, H. and Sies, H.. 1989. "Cytochrome P-450, reductive metabolism, and cell injury". *Drug Metabolism Reviews* **20** (2-4), pp. 275-284.

- 26.- Guengerich, F. P. and Shimada, T.. 1991. "Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes". *Chemical Research in Toxicology* **4** (4), pp. 391-407.
- 27.- Beedham, C.. 1997. "The role of non-P450 enzymes in drug oxidation". *Pharmacology World and Science* **19** (6), pp. 255-263.
- 28.- Mansuy, D.. 1998. "The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450". *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* **121**, pp. 5-14.
- 29.- Omiecinski, C. J.; Remmel, R. P. and Hosagrahara, V. P.. 1999. "Concise Review of the cytochrome P450s and their roles in Toxicology". *Toxicological Sciences* **48**, pp. 151-156.
- 30.- Black, S. D.. 1992. "Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes". *FASEB Journal* **6**, pp. 680-685.
- 31.- van der Brink, H. J. M.; van Gorcom, R. F. M.; van den Hondel, C. A. M. J. J. and Punt, P. J.. 1998. "Cytochrome P450 enzyme systems in fungi". *Fungal Genetics and Biology* **23**, pp. 1-17.
- 32.- Murray, M.. 1999. "Mechanisms and significance of inhibitory drug interactions involving cytochrome P450 enzymes (review)". *International Journal of Molecular Medicine* **3**, pp. 227-238.
- 33.- Waxman, D. J. and Azaroff, L.. 1992. "Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression". *Biochemical Journal* **281**, pp. 577-592.
- 34.- Guengerich, F. P.. 1994. "Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity". *Toxicology Letters* **70**, pp. 133-138.
- 35.- Benedetto, Ch.; Dianzani, M. U.; Ahmed, M.; Cheeseman, K.; Connelly, C. and Slater, T.F.. 1981. "Activation of carbon tetrachloride, and distribution of NADPH-cytochrome c reductase, cytochrome P-450, and other microsomal enzyme activities in rat tissues". *Biochimica et Biophysica Acta* **677**, pp. 363-372.
- 36.- Bühler, R.; Lindros, K. O.; Nordling, Å.; Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M.. 1992. "Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver". *European Journal of Biochemistry* **204**, pp. 407-412.
- 37.- Yu, B. P.. 1994. "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". *Physiological Reviews* **74** (1), pp. 139-162.
- 38.- Koop, D. R.. 1992. "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1". *FASEB Journal* **6**, pp. 724-730.
- 39.- Guengerich, F. P.; Hosea, N. A.; Parikh, A.; Bell-Parikh, L. Ch.; Johnson, W. W.; Gillam, E. M. J. and Shimada, T.. 1998. "Twenty years of biochemistry of human P450s. Purification, expression, mechanism and relevance to drugs". *Drug Metabolism and Disposition* **26** (12), pp. 1175-1178.
- 40.- Bast, A.; Brenninkmeijer, J. W.; Savenije-Chapel, E. M. and Noordhoek, J.. 1983. "Cytochrome P450 oxidase activity and its role in NADPH dependent lipid peroxidation". *FEBS*

Letters **151** (2), pp. 185-188.

41.- Rashba-Step, J. and Cederbaum, A. I.. 1994. "Generation of reactive oxygen intermediates by human liver microsomes in the presence of NADPH or NADH". *Molecular Pharmacology* **45**, pp. 150-157.

42.- Macdonald, T. I.. 1983. "Chemical mechanisms of halocarbon metabolism". *Critical Reviews in Toxicology* **11** (2) , pp. 85-119.

43.- Halpert, J. R.; Guengerich, F. P.; Bend, J. R. and Correia, M. A.. 1994. "Selective inhibitors of cytochromes P450". *Toxicology and Applied Pharmacology* **125**, pp. 163-175.

44.- Castro, G. D. y Castro, J. A.. 1990. "Reacciones de abstracción de hidrógeno de los radicales libres, peroxidación de lípidos y toxicología". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **XXIV** (2), pp. 127-146.

45.- Yang, Ch. S.; Brady, J. F. and Hong, J.. 1992. "Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity". *FASEB Journal* **6**, pp. 737-744.

46.- Hong, J.; Pan, J.; Gonzalez, F. J.; Gelboin H. V. and Yang, Ch. S.. 1987. "The induction of a specific form of cytochrome P-450 (P-450j) by fasting". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **142** (3), pp. 1077-1083.

47.- Ronis, M. J.; Johansson, I.; Hultenby, K.; Lagercrantz, J.; Glaumann, H. and Ingelman-Sundberg, M.. 1991. "Acetone-regulated synthesis and degradation of cytochrome P4502E1 and cytochrome P4502B1 in rat liver". *European Journal of Biochemistry* **198**, pp. 383-389.

48.- Eliasson, E.; Mkrtchian, S. and Ingelman-Sundberg, M.. 1992. "Hormone-and substrate-regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the endoplasmic reticulum membranes". *The Journal of Biological Chemistry* **267** (22), pp. 15765-15769.

49.- Tingberg, N. and Ingelman-Sundberg, M.. 1989. "Cytochrome P-450 and oxygen toxicity. Oxygen-dependent induction of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver and lung". *Biochemistry* **28**, pp. 4499-4504.

50.- Johansson, I.; Ekström, G.; Scholte, B.; Puzycki, D.; Jörnvall, H. and Ingelman-Sundberg, M.. 1988. "Ethanol-, Fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies". *Biochemistry* **27**, pp. 1925-1934.

51.- Bestervelt, L. L.; Vaz, A. D. N. and Coon, M. J.. 1995. "Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isoenzymes by trans-4-hidroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, pp. 3764-3768.

52.- Coon, M. J.; Vaz, A. D. N. and Bestervelt, L. L.. 1996. "Peroxidative reactions of diversozymes". *FASEB Journal* **10**, pp. 428-434.

53.- Plaa, G. L.. 1998. "Potentiation of Chemically-Induced Hepatotoxicity". *Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT) Founders' Award Presentation*. *CIIT Activities* **18** (5), pp. 2-6.

- 54.- Dianzani, M. U.. 1992. "Free radicals in physiology and pathology". *Bolletino della Società Italiana de Biología Sperimentale*. LXVIII (8/9), pp. 491-511.
- 55.- Slater, T. F.. 1984. "Free radical mechanism in tissue injury". *Biochemical Journal* **222**, pp. 1-15.
- 56.- Aust, S. D.; Chignell, C. F.; Bray, T. M.; Kalyanaraman, B. and Mason, R. P.. 1993. "Free radicals in Toxicology". *Toxicology and Applied Pharmacology* **120**, pp. 168-178.
- 57.- Rice Evans, C. A.; Diplock, A. T. and Symons M. C. R.. 1991. "Techniques in free radical research". En: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*". Capítulos 1, 2 y 7. Editores: Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H.. Elsevier. New York, USA.
- 58.- Wolff, S. P.; Garner, A. and Dean, R. T.. 1986. "Free radicals, lipids and protein degradation". *Trends in Biological Sciences* **11**, pp. 27-31.
- 59.- Sies, H.. 1993. "Strategies of antioxidant defense". *European Journal of Biochemistry* **215**, pp. 213-219.
- 60.- Sies, H.. 1991. "Oxidative stress: from basic research to clinical application". *The American Journal of Medicine* **91** (supplement 3C), pp. 31S-38S.
- 61.- Frey, P. A.. 1997. "Radicals in enzymatic reactions". *Current Opinion in Chemical Biology* **1**, pp. 347-356.
- 62.- Sies, H.. 1991. "Role of reactive oxygen species in biological processes". *Klin Wochenschr* **69**, pp. 965-968.
- 63.- Lander, H. M.. 1997. "An essential role for free radicals an derived species on signal transduction". *FASEB Journal* **11**, pp.118-124.
- 64.- Dean, R. T.; Geiseg, S. and Davies, M. J.. 1993. "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins". *Trends in Biological Sciences* **18**, pp. 437-441.
- 65.- Poli, G.. 1993. "Liver damage due to free radicals". *British Medical Bulletin* **49** (3), pp. 604-620.
- 66.- Harman, D.. 1992. "Free radical theory of aging". *Mutation Research* **275**, pp. 257-266.
- 67.- Stadtman, E. R. and Berlett, B. S.. 1997. "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease". *Chemical Research on Toxicology* **10**, pp. 485-494.
- 68.- Dean, R. T.; Fu, Sh.; Stocker, R. and Davies, M. J.. 1997. "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation". *Biochemical Journal* **324**, pp. 1-18.
- 69.- Clawson G. A.. 1989. "Mechanisins of carbon tetrachloride hepatotoxicity". *Pathology and Immunopathology Research* **8**, pp. 104-112.
- 70.- Slater, T. F.. 1966. "Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation". *Nature* **209** (5018) pp. 36-40.
- 71.- Ley de Higiene y Seguridad del Trabajo. Ley 19.587. Reglamentación de la Ley de

Higiene y Seguridad del Trabajo. Decreto 351/79. Legislación Laboral 1999.

72.- Farber, J. L. and Gerson, R. J.. 1984. "Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals". *Pharmacological Reviews* 36 (2), pp. 71S-75S.

73.- Castro, J. A.; Díaz Gómez, M. I; de Ferreyra, E. C.; de Castro, C. R; D'Acosta, N. and de Fenos, O. M.. 1973. "Differences in the carbon tetrachloride-induced damage to components of the smooth and rough endoplasmic reticulum from rat liver". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 50, (2) pp. 337-343.

74.- Castro, G. D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1990. "Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal species". *Cancer Letters* 53, pp. 9-15.

75.- Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1980. "Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform". *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 27 (1), pp. 191-194.

76.- de Castro, C. R.; Bernacchi, A. S.; Villarruel, M. C.; Fernández, G. and Castro, J. A.. 1984. "Carbon tetrachloride activation by highly purified liver mitochondrial preparations". *Agents and Actions* 15 (5/6), pp. 664-667.

77.- Villarruel, M. C., Fernández, G.; Aguilar, E. G. and Castro, J. A.. 1987. "Early biochemical alterations in liver mitochondrial from carbon tetrachloride poisoned rats". *Journal of Applied Toxicology* 7 (3), pp. 173-177.

78.- Tomasi, A.; Albano, E.; Banni, S.; Botti, B.; Corongiu, F.; Dessi, M. A.; Iannone, A.; Vannini, V. and Dianzani, M. U.. 1987. "Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation". *Biochemical Journal* 246, pp. 313-317.

79.- Recknagel, R. O.; Glende Jr., E.A.; Dolak J. A. and Waller, R. L.. 1989. "Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity". *Pharmacological Therapies* 43, pp. 139-154.

80.- Mico, B. A. and Pohl, L. R.. 1983. "Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 225 (2), pp. 596-609.

81.- Slater, T. F.. 1972. "Free radical mechanisms in tissue injury". Capítulo 10. Ediciones Pion.

82.- Allis, J. W.; Brown, B. L.; Simmons, J. E.; Hatch, G. E.; McDonald, A. and House, D. E.. 1996. "Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: the central role of cytochrome P450". *Toxicology* 112, pp. 131-140.

83.- Castro, G. D. and Castro, J. A.. 1996. "Tryptophan reaction with free radicals arisen from carbon tetrachloride in a model system. A mass spectrometric study". *Redox Report* 2 (1), pp. 47-54.

84.- Diz, T. A. and Aikens, J.. 1993. "Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation". *Chemical Research in Toxicology* 6, pp. 2-18.

- 85.- Esterbauer, H.; Schaur, R. J. and Zollner, H.. 1991. "Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malondialdehyde and related aldehydes". *Free Radical Biology & Medicine* **11**, pp. 81-128.
- 86.- Sterbauer, H.. 1982. "Aldehydic products of lipid peroxidation". En: "Free radicals, lipid peroxidation and cancer". Editores: Mc Brien, D. C. H. and Slater, T. F.. Academic Press. London.
- 87.- Karoui, H.; Hogg, N.; Fréjaville, C.; Tordo, P. and Kalyanaraman, B.. 1996. "Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite". *The Journal of Biological Chemistry* **271** (11), pp. 6000-6009.
- 88.- Esterbauer, H.. 1993. "Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products". *American Journal of Clinical Nutrition* **57** (suppl), pp. 779S-786S.
- 89.- Kuo, Ch.; Vaz, A. D. N. and Coon, M. J.. 1997. "Metabolic activation of trans-4-hydroxy-2-nonenal, a toxic product of membrane lipid peroxidation and inhibitor of P450 cytochromes". *The Journal of Biological Chemistry* **272** (36), pp. 22611-22616.
- 90.- Burcham, P. C. and Kuhan, Y. T.. 1997. "Disminished susceptibility to proteolysis after protein modification by the lipid peroxidation product malondialdehyde: inhibitory role for crosslinked and noncrosslinked adducted proteins". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **340** (2), pp. 331-337.
- 91.- Ji, L. L. and Leichtweis, S.. 1997. "Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems". *Age* **20**, pp. 91-106.
- 92.- Grune, T.; Reinheckel, T.; Joshi, M. and Davies, K. J. A.. 1995. "Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome". *The Journal of Biological Chemistry* **270** (5), pp. 2344-2351.
- 93.- Steenvoorden, D. P. T. and Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J.. 1997. "The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **41**, pp. 1-10.
- 94.- Neuzil, J.; Gebicki, J. M. and Stocker, R.. 1993. "Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants". *Biochemical Journal* **293**, pp. 601-606.
- 95.- Upston, J. M.; Terentis, A. C. and Stocker, R.. 1999. "Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement". *FASEB Journal* **13**, pp. 977-994.
- 96.- Kim, H.; Arai, H.; Arita, M.; Sato, Y.; Ogihara, T.; Inoue, K.; Mino, M. and Tamai, H.. 1998. "Effect of α -tocopherol status on α -tocopherol transfer protein expression and its messenger RNA level in rat liver". *Free Radical Research*. **28** (1), pp. 87-92.
- 97.- Murphy, M. E. and Kehrer, J. P.. 1989. "Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy". *Biochemistry Journal* **260**, pp. 359-364.
- 98.- Kitta, D.; Schwarz, M.; Tennekes, H. A.; Uehleke, T. H. and Kunz, W.. 1982. "Covalent binding of CCl₄-intermediates to reduced pyridine nucleotides in mouse liver". En:

Biological reactive intermediates, Volumen II: "Chemical Mechanisms and Biological Effects". Editores: Snyder, R.; Parke, D. V.; Kocsis, J. J.; Jollow, D. J.; Gibson, C. G. and Witmer, Ch. M.. Plenum Press. New York.

99.- Gorla, N.; de Ferreyra, E. C.; Villarruel, M. C.; de Fenos, O. M. and Castro, J. A.. 1983. "Studies on the mechanism of glutathione prevention of carbon tetrachloride-induced liver injury". British Journal of Experimental Pathology **64**, pp. 388-395.

100.- Voet, D. y Voet, J. G.. 1992. "Bioquímica". Capítulos: 5, 11, 29, 30 y 33. Editores: Omega S. A.. Barcelona.

101.- Torres, H. N.; Carminatti, H. y Cardini, C. E.. 1983. "Bioquímica General". Capítulos: 6, 7, 8, 44 y 45. Editores: El Ateneo. Buenos Aires.

102.- Stryer, L.. 1996. "Biochemistry". 4ª edición. Capítulos: 12, 34 y 35. Editores: Freeman, W. H. and Company, New York.

103.- De Robertis, E. D. P y de Robertis (h), E. M. F.. 1985. "Biología Celular y Molecular". 10ª edición. Capítulos: 10, 15, 22, 23 y 24. Editores: El Ateneo, Buenos Aires.

104.- Sen, Ch. K.. 1998. "Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants". Biochemical Pharmacology **55**, pp. 1747-1758.

105.- Grune, T.; Reinheckel, T. and Davies, K. J. A.. 1997. "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells". FASEB Journal **11**, pp. 526-534.

106.- Stoyanovsky, D. A. and Cederbaum, A. I.. 1996. "Thiol Oxidation and cytochrome P450-dependent metabolism of CCl₄ triggers Ca²⁺ release from liver microsomes". Biochemistry **35** (49), pp. 15839-15845.

107.- Forbes, D. J.. 1992. "Structure and function of the nuclear pore complex". Annual Reviews of Cell Biology **8**, pp. 495-527.

108.- Trump, B. F.; Berezsky, I. K.; Smith, M. W.; Phelps, P. C. and Elliget, K. A.. 1989. "The relationship between cellular ion deregulation and acute and chronic toxicity". Toxicology and Applied Pharmacology **97**, pp. 6-22.

109.- Gething, M. J. and Sambrook, J.. 1992. "Protein folding in the cell". Nature **355**, pp. 33-45.

110.- Zimmermann, R.. 1998. "The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum". Biological Chemistry **379**, pp. 275-282.

111.- Hwang, C.; Sinskey, A. J. and Lodish, H. F.. 1992. "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum". Science **257**, pp. 1496-1502.

112.- Sen, Ch. K. and Packer, L.. 1996. "Antioxidant and redox regulation of gene transcription". FASEB Journal **10**, pp. 709-720.

113.- Akamatsu, Y.; Ohno, T.; Hirota, K.; Kagoshima, H.; Yodoi, J. and Shigesada, K.. 1997. "Redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. The roles of two conserved cysteine residues". The Journal of Biological Chemistry **272** (23), pp. 14497-14500.

- 114.- Reed, D. J.. 1990. "Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury". *Chemical Research in Toxicology* 3, pp. 495-502.
- 115.- Thomas, J. A.; Poland, B. and Honzatko, R.. 1995. "Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 319 (1), pp. 1-9.
- 116.- Srivastava, S. P.; Chen, N. and Holtzman, J. L.. 1990. "The *in vitro* NADPH-dependent inhibition by CCl₄ of the ATP-dependent calcium uptake of hepatic microsomes from male rats. Studies on the mechanism of the inactivation of the hepatic microsomal calcium pump by the 'CCl₃ radical'. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (15), pp. 8392-8399.
- 117.- Castilho, R. F.; Kowaltowski, A. J. and Vercesi, A. E.. 1998. "3,5,3'-Triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 354 (1), pp. 151-157.
- 118.- Stadtman, E. R.. 1990. "Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover". *Biochemistry* 29 (27), pp. 6323-6331.
- 119.- Stadtman, E. R.. 1986. "Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function". *Trends in Biological Sciences* 11, pp. 11-12.
- 120.- Stadtman, E. R. and Oliver, C. N.. 1991. "Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences". *The Journal of Biological Chemistry* 266 (4), pp. 2005-2008.
- 121.- Stadtman E. R.. 1993. "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions". *Annual. Reviews of Biochemistry*. 62, pp. 797-821.
- 122.- Reznick, A. Z.; Cross, C. E.; Hu, M.; Suzuki, Y. J.; Khwaja, S.; Safadi, A.; Motchnik, P. A.; Packer, L. and Halliwell, B.. 1992. "Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation". *Biochemical Journal* 286, pp. 607-611.
- 123.- Reinheckel, T.; Nedeliev, B.; Prause, J.; Augustin, W.; Schulz, H.; Lippert, H. and Halangk, W.. 1998. "Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis". *Free Radical Biology & Medicine* 24 (3), pp. 393-400.
- 124.- Alberts, B; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.. 1996. "Biología Molecular de la célula". 3ª edición. Capítulos: 6, 8, 12 y 15. Editores: Omega S. A., Barcelona.
- 125.- Lewin, B.. 1997. "Genes VI". Capítulos: 2, 7, 8 y 10. Editores: Oxford University Press and Cell Press.
- 126.- Jansen, R.. 1999. "RNA-cytoskeletal associations". *FASEB Journal* 13, pp. 455-466.
- 127.- Yonath, A. and Franceschi, F.. 1998. "Functional universality and evolutionary diversity: insights from the structure of the ribosome". *Structure* 6, pp. 679-684.
- 128.- Nigg, E. A.; Baeuerle, P. A.. and Lührmann, R.. 1991. "Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms". *Cell* 66, pp. 15-22.

- 129.- Lamond, A. I. and Earnshaw, W. C.. 1998. "Structure and function in the nucleus". *Science* **280**, pp. 547-553.
- 130.- Hesketh, J. E. and Pryme, I. F.. 1991. "Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton". *Biochemical Journal* **277**, pp. 1-10.
- 131.- Smuckler, E. A. and Arcasoy, M.. 1969. "Structural and functional changes of the endoplasmic reticulum of hepatic parenchymal cells". *International Review of Experimental Pathology* **7**, pp. 305-418.
- 132.- Suzuki, T.; Yan, Q.; and Lennarz, W. J.. 1998. "Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum". *The Journal of Biological Chemistry* **273**, (17), pp. 10083-10086.
- 133.- Sommer, T. and Wolf, D. H.. 1997. "Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return". *FASEB Journal* **11**, pp. 1227-1233.
- 134.- Rapoport, T. A.. 1992. "Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane". *Science* **258**, pp. 931-935.
- 135.- Carelli, S.; Ceriotti, A.; Cabibbo, A.; Fassina, G.; Ruvo, M. and Sitia, R.. 1997. "Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the RE". *Science* **277**, pp. 1681-1684.
- 136.- Görlich, D.. 1998. "Transport into and out of the cell nucleus". *The EMBO Journal* **17** (10), pp. 2721-2727.
- 137.- Turpin, P.; Ossareh-Nazari, B. and Dargemont, C.. 1999. "Nuclear transport and transcriptional regulation". *FEBS Letters* **452**, pp. 82-86.
- 138.- Parnaik, V. K.. 1996. "Nucleocytoplasmic transport of proteins and control of cellular function". *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **33**, pp. 164-167.
- 139.- Moore, M. S.. 1998. "Ran and nuclear transport". *The Journal of Biological Chemistry* **273** (36), pp. 22857-22860.
- 140.- Stochaj, U. and Silver, P.. 1992. "Nucleocytoplasmic traffic of proteins". *European Journal of Cell Biology* **59**, pp. 1-11.
- 141.- Schmalz, D.; Hucho, F. and Buchner, K.. 1998. "Nuclear import of protein kinase C occurs by a mechanism distinct from the mechanism used by proteins with a classical nuclear localization signal". *Journal of Cell Science* **111**, pp. 1823-1830.
- 142.- Steele, W. J. and Busch, H.. 1963. "Studies on acidic nuclear proteins of the Walker tumor and liver". *Cancer Research* **23**, pp. 1153-1163.
- 143.- Rivett, A. J.. 1993. "Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes". *Biochemical Journal* **291**, pp. 1-10.
- 144.- Stadtman, E. R.. 1992. "Protein oxidation and aging". *Science* **257**, pp. 1220-1224.
- 145.- Stadtman, E. R. and Berlett, B. S.. 1998. "Reactive oxygen-mediated protein oxidation

in aging and disease". *Drug Metabolism Reviews* **30** (2), pp. 225-243.

146.- Vilar-Rojas, C.; Guzman-Grenfell, A. M. and Hicks, J. J.. 1996. "Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins". *Archives of Medical Research* **27** (1) pp. 1-6.

147.- Davies, K. J. A.. 1987. "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects". *The Journal of Biological Chemistry* **262**, (20), pp. 9895-9901.

148.- Sahakian, J. A.; Szweda, L. I.; Friguier, B.; Kitani, K. and Levine, R. L.. 1995. "Aging of the liver: proteolysis of oxidatively modified glutamine synthetase". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **318** (2), pp. 411-417.

149.- Wolff, S. P. and Dean, R. T.. 1986. "Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis". *Biochemical Journal* **234**, pp. 399-403.

150.- Davies, K. J. A.; Delsignore, M. E. and Lin, S. W.. 1987. "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids". *The Journal of Biological Chemistry* **262** (20), pp. 9902-9907.

151.- Davies, K. J. A. and Delsignore, M. E.. 1987. "Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure". *The Journal of Biological Chemistry* **262** (20), pp. 9908-9913.

152.- Uchida, K. and Stadtman, E. R.. 1992. "Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal". *Proceedings of National Academy of Science, USA*, **89**, pp. 4544-4548.

153.- Toyokuni, S.; Uchida, K.; Okamoto, K.; Hattori-Nakakuki, Y.; Hiai, H. and Stadtman, E. R.. 1994. "Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrolotriacetate". *Proceedings of National Academy of Science, USA*, **91**, pp. 2616-2620.

154.- Dean, R. T.; Giese, S. P. and Simpson, J. A.. 1993. "Marker or mechanism: possible pro-oxidant reactions of radical-damaged proteins in aging and atherosclerosis, an age-related disease". En: "Free Radicals: From Basic Science to Medicine", pp. 175-184. Editores: Poli, G.; Albano, E. and Dianzani, M. U.. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.

155.- Gebicki, J. M.. 1997. "Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species". *Redox Report* **3** (1), pp 1-12.

156.- Schraermeyer, U.. 1994. "Transformation of albumin into melanin by hydroxyl radicals". *Comparative Biochemistry and Physiology* **108C** (3), pp. 281-288.

157.- Goto, S. and Nakamura, A.. 1997. "Age-associated, oxidatively modified proteins: a critical evaluation". *Age* **20**, pp. 81-89.

158.- Babiy, A. V.; Gebicki, S. and Gebicki, J. M.. 1993. "Protein peroxides: formation by superoxide-generating systems and during oxidation of low density lipoprotein". En: "Free Radicals: From Basic Science to Medicine", pp. 340-347. Editores: Poli, G.; Albano, E. and Dianzani, M. U.. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.

- 159.- Grant, A. J.; Jessup, W. and Dean, R. T.. 1992. "Accelerated endocytosis and incomplete catabolism of radical-damaged protein". *Biochimica et Biophysica Acta* **1134**, pp. 203-209.
- 160.- Starke, P. E., Oliver, C. N. and Stadtman, E. R.. 1987 "Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration". *FASEB Journal* **1**, pp. 36-39.
- 161.- Santella, L. and Carafoli, E.. 1997. "Calcium signaling in the cell nucleus". *FASEB Journal* **11**, pp. 1091-1109.
- 162.- Trump, B. F. and Berezsky, I. K.. 1995. "Calcium-mediated cell injury and cell death". *FASEB Journal* **9**, pp. 219-228.
- 163.- Nicotera, P; Bellomo, G. and Orrenius, S.. 1992. "Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **32**, pp. 449-470.
- 164.- Moore, L.; Davenport, R. and Landon, E. J.. 1976. "Calcium uptake of a rat liver microsomal subcellular fraction in response to *in vivo* administration of carbon tetrachloride". *The Journal of Biological Chemistry* **251** (4), 1197-1201.
- 165.- Gravela, E.; Albano, E.; Dianzani, M. U.; Poli, G. and Slater, T. F.. 1979. "Effects of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes. Inhibition of protein and lipoprotein secretion". *Biochemical Journal* **178**, pp. 509-512.
- 166.- Sundari, P. N.; Wilfred G. and Ramakrishna, B.. 1997. "Does oxidative protein damage play a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride-induced liver injury in the rat?". *Biochimica et Biophysica Acta* **1362**, pp. 169-176.
- 167.- Manno, M. and Rezzadore, M.. 1994. "Critical role of ethanol abuse in carbon tetrachloride poisoning". *The LANCET* **343**, pp. 232.
- 168.- Cohen, S. D.; Pumford, N. R.; Khairallah, E. A.; Boekelheide, K.; Pohl, L. R.; Amouzadeh, H. R. and Hinson, J. A.. 1997. "Selective protein covalent binding and target organ toxicity". *Toxicology and Applied Pharmacology* **143**, pp. 1-12.
- 169.- Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1980. "Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to liver nuclear DNA, proteins and lipids". *Toxicology and Applied Pharmacology* **56**, pp. 199-206.
- 170.- Castro, G. D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1989. "Species differences in the interaction between CCl₄ reactive metabolites and liver DNA or nuclear protein fractions". *Carcinogenesis* **10** (2), pp. 289-294.
- 171.- Díaz Gómez, M.I. and Castro, J. A.. 1981. "Reaction of trichloromethyl free radicals with deoxyribonucleic acid bases". *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **32** (1), pp. 147-153.
- 172.- Castro, G. D. and Castro, J. A.. 1993. "Cytosine attack by free radicals arising from bromotrichloromethane in the presence of benzoyl peroxide catalyst: a mass spectrometric study". *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **13**, pp. 235-245.

- 173.- Castro, G. D.; Simpson, J. T. and Castro, J. A.. 1994. "Interaction of trichloromethyl free radicals with thymine in a model system. A mass spectrometric study. *Chemico-Biological Interactions* **90**, pp. 13-22.
- 174.- Castro, G. D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1997. "DNA bases attack by reactive metabolites produced during carbon tetrachloride biotransformation and promotion of liver microsomal lipid peroxidation". *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* **95**, (3) 253-258.
- 175.- Montalto de Mecca, M.; Castro, G. D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1995. "Dithiothreitol inhibitory effects on carbon tetrachloride-promoted NADPH-dependent lipid peroxidation in liver microsomal suspensions". *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* **88** (2), pp. 205-213.
- 176.- Fanelli, S. L. and Castro, J. A.. 1993. "Carbon tetrachloride promoted malondialdehyde formation in liver microsomal and nuclear preparations from Sprague-Dawley or Osborne-Mendel male rats". *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **82** (2), pp. 233-236.
- 177.- Smuckler, E. A. and Koplitz, M.. 1969. "The effects of carbon tetrachloride and ethionine on RNA synthesis *in vivo* and in isolated rat liver nuclei". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **132**, pp. 62-79.
- 178.- Castro, J. A.; Díaz Gómez, M. I.; de Castro, C. R.; de Fenos, O. M.; de Ferreyra, E. C. and D'Acosta, N.. 1975. "Carbon tetrachloride induced polysome breakdown. Relative importance of lipid peroxidation and of binding to ribosomal components in the process". *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **10** (1), pp. 93-104.
- 179.- Castro, J. A. and Díaz Gómez, M. I.. 1976. "Further studies on the mechanism of the carbon tetrachloride induced polysome breakdown". *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology* **13** (4), pp. 731-741.
- 180.- Clawson, G. A.; MacDonald, J. R. and Woo, C. H.. 1987. "Early hypomethylation of 2'-O-ribose moieties in hepatocyte cytoplasmic ribosomal RNA underlies the protein synthetic defect produced by CCl₄". *The Journal of Cell Biology* **105**, pp. 705-711.
- 181.- Smuckler, E. A. and Benditt, E. P.. 1963. "Carbon tetrachloride poisoning in rats: alteration in ribosomes of the liver". *Science* **140**, pp. 308-310.
- 182.- Smuckler, E. A. and Benditt, E. P.. 1965. "Studies on carbon tetrachloride intoxication. III. A subcellular defect in protein synthesis". *Biochemistry* **4**, (4) pp. 671-679.
- 183.- Fraga, C. G.; Zamora, R. and Tappel, A. L.. 1989. "Damage to protein synthesis concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices: effect of halogenated compounds, peroxides and vitamin E". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **270** (1), pp. 84-91.
- 184.- Anderson, N. L.; Giere, F. A. Nance, S. L.; Gemmell, M. A.; Tollaksen, S. L. and Anderson, N. G.. 1987. "Effects of toxic agents at the protein level: quantitative measurement of 213 mouse liver proteins following xenobiotic treatment" *Fundamental and Applied Toxicology* **8**, pp. 39-50.
- 185.- Villarruel, M. C. and Castro, J. A.. 1980. "Reactions of trichloromethyl free radicals

with amino acids". Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology **28** (1), pp. 79-85.

186.- Castro, G. D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A.. 1991. "Interaction of trichloromethyl radicals with phenylalanine". Archives of Toxicology **65**, pp. 340-343.

187.- Castro, G. D.; Stamato, C. J. and Castro, J. A.. 1994. "Tyrosine attack by free radicals derived from catalytic decomposition of carbon tetrachloride". Free Radical Biology & Medicine **16** (6), pp. 693-701.

188.- Castro, G. D.; Stamato, C. J. and Castro, J. A.. 1995. "Proline interaction with trichloromethyl and trichloromethyl peroxy free radicals in a model system: studies about the nature of the reaction products formed". Drug Metabolism Reviews **27** (1&2), pp. 257-275.

189.- Castro, G. D. and Castro, J. A.. 1996. "Hydroxyproline reaction with free radicals generated during benzoyl peroxide catalytic decomposition of carbon tetrachloride. Structure of reaction products formed". Amino Acids **10**, pp. 283-294.

190.- de Mecca, M. M.; Castro, G. D. and Castro, J. A.. 1993. "Antioxidative stress therapy with dithiothreitol tetraacetate. I. Protection against carbon tetrachloride induced liver necrosis". Archives of Toxicology **67**, pp. 547-551.

191.- Kaplan, D. J. and Novak, R. F.. 1997. "Proteases and transcription factors: cutting edge determinants of the proliferative or apoptotic response in hepatic tissue". En: "Comprehensive Toxicology". Volumen 9 Capítulo 11, pp. 199-207. Editores del volumen: Mc Cuskey, R. and Earnest, D. L.. Editores de la serie: Sipes, I. G.; Mc Queen, C. A. and Gandolfi, A. J. Elsevier Science. New York.

192.- Wettstein, F. O.; Noll, H. and Penman, S.. 1964. "Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis *in vitro*". Biochimica et Biophysica Acta **87**, pp. 525-528.

193.- Baliga, B. S.; Pronczuk, A. W. and Munro, H. N.. 1969. "Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell free system prepared from rat liver". The Journal of Biological chemistry **244** (16), pp. 4480-4489.

194.- Castro, J. A.; de Ferreyra, E. C.; de Castro, C. R.; de Fenos, O. M.; Díaz Gómez, M. I.; Gram, T. E.; Reagan, R. L. and Guarino, A. M.. 1977. "Studies on the role of protein synthesis in cell injury by toxic agents: I. Effect of cycloheximide administration on several factors modulating carbon tetrachloride-induced liver necrosis". Toxicology and Applied Pharmacology **41**, pp. 305-320.

195.- Lindstrom, T. D. and Anders, M. W.. 1977 "Effect of cycloheximide and Actinomycin D on carbon tetrachloride hepatotoxicity". Toxicology and Applied Pharmacology **42**, pp. 167-173.

196.- WHO. 1994. "Ultraviolet radiation". Environmental Health Criteria 160. World Health Organization. Geneva.

197.- IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans Volume 40. Appendix: "Ultraviolet Radiation". 1986. International Agency for Research on Cancer.

- 198.- Moan, J. and Peak, M. J.. 1989. "Effects of UV radiation on cells". Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology 4, pp. 21-34.
- 199.- Applegate, L. A. and Frenk, E.. 1995. "Cellular defense mechanisms of the skin against oxidant stress and in particular UVA radiation". European Journal of Dermatology 5, pp. 97-103.
- 200.- Nisbet, A. D.; Saundry, R. H.; Moir, A. J. G.; Fothergill, L. A. and Fothergill, J. E.. 1981. "The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin". European Journal of Biochemistry 115, pp. 335-345.
- 201.- Huang, Ch.; Mayer Jr., H. E. and Montgomery, R.. 1970. "Microheterogeneity and paucidisparity of glycoproteins. Part I. The carbohydrate of chicken ovoalbumin". Carbohydrate Research 13, pp. 127-137.
- 202.- Olszowski, S.; Olszowska, E. Stelmaszynska, T.; Krawczyk, A.; Marcinkiewicz, J., and Baczek, N.. 1996. "Oxidative modification of ovoalbumin". Acta Biochimica Polonica 43 (4), pp. 661-672.
- 203.- Chen, R. F.. 1967. "Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment". The Journal of Biological Chemistry 242 (2), 173-181.
- 204.- Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I.; Castro, G. D. and Castro, J. A.. 1997. "Carbon tetrachloride-induced free radical mediated protein oxidation *in vitro* and *in vivo*". Redox Report 3 (1), pp. 23-29.
- 205.- Tirmenstein, M. A.; Leraas, T. L. and Fariss, M. W.. 1997. "α-tocopheryl hemisuccinate administration increases rat liver subcellular α-tocopherol levels and protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity". Toxicology Letters 92, pp. 67-77.
- 206.- de Groot, H. and Hass, W.. 1980. "O₂-independent damage of cytochrome P450 by CCl₄-metabolites in hepatic microsomes". FEBS Letters 115 (2), pp. 253-256.
- 207.- Viviani, A.; Lutz, W. K. and Schlatter, C.. 1978. "Time course of the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in rat liver nuclei and microsomes by phenobarbital, 3-methylcolanthrene, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, dieldrin and other inducers". Biochemical Pharmacology 27, pp. 2103-2108.
- 208.- Sacchi, A.; Ferrini, U. and Cammarano, P.. 1971. "Isolation and characterization of mitochondrial ribosomes in rat liver". Italian Journal of Biochemistry 20, pp. 191-203.
- 209.- Masana, M.; de Toranzo, E. G. D. and Castro, J. A.. 1984. "Reductive metabolism and activation of benznidazole". Biochemical Pharmacology 33 (7), pp. 1041-1045.
- 210.- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A.; Randall, R.. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". The Journal of Biological Chemistry 193, pp. 265-275.
- 211.- Graph Pad Software.1993. Graph Pad In Instant Statistics, Graph Pad Software, San Diego, CA. 1.
- 212.- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.; Ahn, B.; Shaltiel, S. and Stadtman, E. R.. 1990. "Determination of carbonyl content in oxidatively modified

proteins". *Methods in Enzymology* **186**, 464-474.

213.- Ellman, G. L.. 1959. "Tissue sulfhydryl groups". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**, pp. 70-77.

214.- Sedlak, J. and Lindsay, R.. 1968. "Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent". *Analytical Biochemistry* **25**, pp. 192-205.

215.- Jocelyn, P. C.. 1987. "Spectrophotometric assay of thiols". *Methods in Enzymology* **143**, pp.44-55.

216.- Rothblum, L. I.; Devlin, T. M. and Ch'ih, J. J.. 1976. "Regulation of mammalian protein synthesis *in vivo*. Protein synthesis in rat liver and kidney after the administration of sublethal doses of cycloheximide". *Biochemical Journal* **156**, pp. 151-157.

217.- Bonner, W. M.; Wu, R. S.; Panusz, H. T. and Muneses, C.. 1988. "Kinetics of accumulation and depletion of soluble newly synthesized histone in the reciprocal regulation of histone and DNA synthesis". *Biochemistry* **27**, pp. 6542-6550.

218.- Palamanda, J. R. and Kehrer, J. P.. 1992. "Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **293** (1), pp. 103-109.

219.- Swallow, A. J.. 1960. "Some substances of biological interest". En: *International series of monographs on radiation effects in materials. Volumen 2: Radiation Chemistry of Organic Compounds. Capítulo VIII*, pp. 186-241. Editor: Charlesby, A.. Pergamon Press, Oxford.

220.- Raffray, M. and Cohen, G. M.. 1997. "Apoptosis and necrosis in Toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?". *Pharmacology & Therapeutics* **75** (3), pp. 153-177.

221.- Ch'ih, J. J. ; Procyk, R. and Devlin, T. M.. 1977. "Regulation of mammalian protein synthesis *in vivo*. Stimulated protein synthesis in liver *in vivo* after cycloheximide treatment". *Biochemical Journal* **162**, pp. 501-507.

222.- Blakeman, D. P.; Ryan, T. P.; Jolly, R. A. and Petry, T. W.. 1998. "Protein oxidation: examinations of potential lipid-independent mechanisms for protein carbonyl formation". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **12** (3), pp. 185-190.

223.- Tierney, D. J; Haas, A. L. and Koop, D. R.. 1992. "Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **293** (1), pp. 9-16.

224.- Finkel, T.. 1998. "Oxygen radicals and signaling". *Current Opinion in Cell Biology* **10**, pp. 248-253.

VIII.- ABREVIATURAS

VIII.- ABREVIATURAS

- .- (+): activación
- .- (-): inhibición
- .- $\uparrow$: aumento
- .- $\downarrow$: disminución
- .- ' : minuto
- .- αT : α -tocoferol
- .- αTTP : proteína de transferencia de α -tocoferol
- .- μCi : microcuries
- .- μl : microlitro
- .- μM : micromolar
- .- aa : aminoácido
- .- abs : abstracción
- .- Ac : ácido
- .- Ac : componentes anillares del poro nuclear del lado citoplasmático
- .- ADN : ácido desoxirribonucleico
- .- ADP : adenosina difosfato
- .- $AGEs$: productos de glicosilación avanzada (productos de Maillard)
- .- Ala : alanina
- .- alb : albúmina de huevo nativa
- .- $AMPc$: adenosina monofosfato cíclico
- .- A_N : componentes anillares del poro nuclear del lado nuclear
- .- Arg : arginina
- .- ARN : ácido ribonucleico
- .- Asp : ácido aspártico
- .- ATP : adenosina trifosfato
- .- $ATPasa$: adenosina trifosfatasa
- .- $^{\circ}C$: grado centígrado
- .- C : citosina
- .- $CBPs$: proteínas de unión al cap
- .- $\cdot CCl_3$: radical triclorometilo
- .- $CCl_3O_2\cdot$: radical triclorometilperoxilo
- .- CHX : cicloheximida
- .- CIF : factor de entrada de calcio
- .- $[Cit-S-Fe]$: citocromo P450
- .- Cis : cisteína
- .- CLS : señal de localización citoplasmática
- .- cm^2 : centímetro cuadrado
- .- CMP : concentración máxima permisible ponderada en el tiempo
- .- $CMP-CPT$: concentración máxima permisible para cortos períodos de tiempo

- .- **CPN**: complejo del poro nuclear
- .- **Ctl**: control
- .- **cyp2B**: citocromo 2B
- .- **cyp2E1=CYP2E1**: citocromo 2E1
- .- **D**: sustancia a ensayar
- .- **DAG**: diacilglicerol
- .- **d-alb**: albúmina de huevo delipidada
- .- **DOPA**: 3,4-dihidroxi-fenilalanina
- .- **DTNB**: ácido ditiobis-(2-nitrobenzoico)
- .- **e⁻**: electrón
- .- **EDTA**: ácido etilendiamino tetraacético, sal disódica
- .- **eEF**: factor de elongación eucariota
- .- **eIF**: factor de iniciación eucariota
- .- **EPA**: Environmental Protection Agency
- .- **eRF**: factor de liberación eucariota
- .- **FAD**: flavinadenina dinucleótido
- .- **Fc**: fibras citoplasmáticas del poro nuclear
- .- **Fen**: fenilalanina
- .- **FMN**: flavina-mononucleótido
- .- **FP₁**: citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH
- .- **FP₂**: citocromo b₅ reductasa dependiente de NADH
- .- **Frac**: fracción
- .- **g**: gramo
- .- **G**: guanina
- .- **GDP**: guanosina difosfato
- .- **Gli**: glicina
- .- **Glu**: glutamina
- .- **GS[•]**: radical libre del glutatión
- .- **GSH**: glutatión reducido
- .- **GSSG**: glutatión oxidado
- .- **GTP**: guanosina trifosfato
- .- **h**: hora
- .- **HEPES**: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
- .- **His**: histidina
- .- **HIV**: virus de inmunodeficiencia adquirida
- .- **HNE**: 4-hidroxinonenal
- .- **hnRNP**: partículas ribonucleoproteicas nucleares
- .- **HO[•]**: radical hidroxilo
- .- **HO₂[•]**: radical hidroperóxido
- .- **Hsp**: proteínas inducidas por choque térmico
- .- **IARC**: International Agency for Research on Cancer
- .- **ICDH**: isocitrato deshidrogenasa
- .- **ip**: intraperitoneal

- .- **ICDH**: isocitrato deshidrogenasa
- .- **ip**: intraperitoneal
- .- **IP₃**: inositol trifosfato
- .- **isoc.**: isocitrato de sodio
- .- **J_N**: jaula nuclear
- .- **kg**: kilogramo
- .- **l**: litro
- .- **L[•]**: radical lipídico
- .- **Leu**: leucina
- .- **¹⁴C-Leu**: leucina marcada uniformemente con ¹⁴C
- .- **L-[¹⁴C(U)]-Leucina**: leucina marcada uniformemente con ¹⁴C
- .- **LDL**: lipoproteína de baja densidad
- .- **LH**: ácido graso poliinsaturado
- .- **Lis**: lisina
- .- **LO[•]**: radical alcóxido
- .- **LOO[•]**: radical lipoperoxido
- .- **LOOH**: hidroperóxido de lípido
- .- **m**: metro
- .- **M**: molar
- .- **mARN**: ARN mensajero
- .- **mCi**: milicurios
- .- **MCO**: oxidación catalizada por metales
- .- **MDA**: malondialdehído
- .- **Me**: metal
- .- **Memb.**: membrana
- .- **Met**: metionina
- .- **Met-tARN_i**: aminoacil tARN iniciador
- .- **MFO**: oxidasa de función mixta
- .- **mg**: miligramo
- .- **mic**: microsomas
- .- **min**: minuto
- .- **mit**: mitocondrias
- .- **ml**: mililitro
- .- **mm**: milímetro
- .- **mM**: milimolar
- .- **MNE**: membrana nuclear externa
- .- **MNI**: membrana nuclear interna
- .- **mW**: miliwatt
- .- **N**: normal
- .- **NAD⁺**: nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
- .- **NADH**: nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida
- .- **NADP⁺**: fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
- .- **NADPH**: fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida

- .- **NES**: secuencia de exportación nuclear
- .- **NLS**: señal de reconocimiento nuclear
- .- **nm**: nanometro
- .- **nmoles**: nanomoles
- .- **NO[•]**: óxido nítrico
- .- **NOS**: óxido nítrico sintasa
- .- **O₂[•]**: radical superóxido
- .- **¹O₂**: oxígeno singulete
- .- **ONOO⁻**: peroxinitrito
- .- **p/v**: peso en volumen
- .- **P**: poro nuclear
- .- **PEST**: secuencia Pro-Glu-Ser-Tre
- .- **P_i**: fosfato inorgánico
- .- **PL**: peroxidación de lípidos
- .- **PLA₂**: fosfolipasa A₂
- .- **PLC**: fosfolipasa C
- .- **poli A**: poliadenilato
- .- **(poli A)*mARN**: mensajero con cola de poliadenina
- .- **PPO**: 2,5-difeniloxazol
- .- **Pr**: proteína
- .- **Pr[•]**: radical proteico
- .- **Pro**: prolina
- .- **PrO[•]**: radical alcóxido de proteína
- .- **PrOO[•]**: radical alquilperóxido de proteína
- .- **PrOOH**: hidroperóxido de proteína
- .- **prot**: proteína
- .- **PUFA**: ácidos grasos poliinsaturados
- .- **R**: rueda del poro nuclear
- .- **rad**: radical
- .- **rARN**: ARN ribosomal
- .- **Rc**: receptor
- .- **RE**: retículo endoplásmico
- .- **RH**: sustrato reducido
- .- **RNP**: ribonucleoproteínas
- .- **RO[•]**: radical alcóxido
- .- **ROH**: sustrato oxidado
- .- **ROS**: especie reactiva oxigenada
- .- **RS**: especie reactiva no oxigenada
- .- **RS[•]**: radical tiilo
- .- **RSOO[•]**: radical tioperóxido
- .- **S**: Sverdberg
- .- **saT**: hemisuccinato de α-tocoferol
- .- **SDS**: dodecil sulfato de sodio

- .- **Ser**: serina
- .- **SH**: grupos sulfhidrilos
- .- **snARNs**: ARNs nucleares pequeños
- .- **snoRNPs**: pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares
- .- **snRNPs**: pequeñas ribonucleoproteínas nucleares
- .- **SRP**: partícula de reconocimiento de señales
- .- **STKM**: solución de sacarosa de la concentración indicada en TKM
- .- **tARN**: ARN de transferencia
- .- **TCA**: ácido tricloroacético
- .- **TKM**: solución de Tris 50 mM; KCl 2,5 mM y MgCl₂ 5 mM llevada a pH 7,5 con HCl.
- .- **TOPA**: trihidroxifenilalanina
- .- **Tóx**: sustancia tóxica
- .- **Tre**: treonina
- .- **Tris**: (hidroximetil) aminometano
- .- **Trolox**: ácido 2-carboxi-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
- .- **UE**: unidades enzimáticas
- .- **U**: uracilo
- .- **UC**: unión covalente
- .- **UDP**: uridina difosfato
- .- **UVC**: luz ultravioleta C
- .- **Val**: valina
- .- **vol**: volumen
- .- **vs**: versus
- .- **W**: Watt
- .- **X[•]**: radical libre
- .- **Xb**: xenobiótico
- .- **xg**: aceleración de la gravedad

IX.- APÉNDICE

IX.- APÉNDICE

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis dieron origen a los siguientes Trabajos y presentaciones a Congresos:

➤ IX.A.- Trabajos publicados

.- "Decreased incorporation of ^{14}C -Leucine in different liver nuclear protein fractions at early stages of carbon tetrachloride poisoning in the rat". 1994.

Galelli, M.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A..

Archives of Toxicology **68**, pp. 206-209.

.- "Carbon tetrachloride-induced free radical mediated protein oxidation *in vitro* and *in vivo*". 1997.

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I., Castro, G. D. and Castro, J. A..

Redox Report **3** (1), pp. 23-29.

.- "Liver nuclear activation of carbon tetrachloride or bromotrichloromethane to trichloromethyl and trichloromethylperoxyl free radicals. Their reactions with lipids and proteins". 1998.

Fanelli, S. L.; Castro, G. D.; Galelli, M. E. and Castro, J. A..

Biomedical and Environmental Science **11**, pp. 101-114.

.- "Effect of trichloromethyl and trichlorometyl peroxyl free radicals on protein sulphydryl content. Studies in model and in enzymatic carbon tetrachloride activation systems". 1998.

Galelli, M. E. and Castro, J. A..

Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology **100** (2), pp. 227-238.

➤ IX.B.- Presentaciones a Congresos

.- "Incorporación de ^{14}C -Leucina a las proteínas nucleares hepáticas de la rata en la intoxicación por CCl_4 ".

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I. y Castro, J. A..

XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (S.A.F.E.).
Buenos Aires, 23 al 25 de noviembre 1992.

.- "Incorporación de ^{14}C -Leucina a las proteínas nucleares hepáticas de la rata en la intoxicación por CCl_4 ".

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I. y Castro, J. A..

VI Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial (EXPOFYBI). Buenos Aires, 31 de mayo al 5 de junio 1993.

.- "Efecto del CCl_4 sobre la incorporación de ^{14}C -Leucina a proteínas nucleares y microsomales hepáticas de ratas Sprague-Dawley y Osborne-Mendel"

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I.; S. L. Fanelli y Castro, J. A..

XXIX reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica (SAIB), Carlos Paz, Córdoba. 17 al 20 de noviembre 1993.

.- "Ataque de proteínas, aminoácidos y bases de ADN por radicales libres triclorometilo y triclorometil peroxilo. Efecto del α -tocoferol".

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I.; Castro, G. D.; Stamato, C. J. y Castro, J. A.

XXX reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica (SAIB), Iguazú, Misiones. 26 al 29 de octubre 1994.

.- "Ataque de proteínas, aminoácidos y bases de ADN por radicales libres triclorometilo y triclorometilperoxilo. Efecto del α -tocoferol".

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I.; Castro, G. D.; Stamato, C. J. y Castro, J. A.

IX Congreso Latinoamericano de Toxicología. Montevideo, Uruguay. 8-11 de mayo de 1995.

.- "Oxidación de proteínas en la intoxicación por CCl_4 "

Galelli, M. E. y Castro, J. A..

IX Jornadas de Becarios de Investigación de la UBA (EXP-CYT-UBA). Facultad de Derecho y Ciencias Sociales, Buenos Aires. 28 de noviembre al 1 de diciembre de 1995,

.- "Acción de los metabolitos reactivos del CCl_4 sobre proteínas, aminoácidos y bases"

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I.; Castro, G. D. y Castro, J. A.

JorFyBi'96. Quintas Jornadas Argentinas de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires. 4-7 de junio de 1996.

.- "Efecto sobre proteínas, aminoácidos y citosina de los metabolitos reactivos del CCl_4 ".

Galelli, M. E.; Díaz Gómez, M. I.; Castro, G. D. y Castro, J. A.

X Congreso Argentino de Toxicología. Buenos Aires. 18-20 de Septiembre de 1996.

.- "Oxidación de proteínas en la intoxicación por CCl_4 ".

Galelli, M. E. y Castro, J. A..

X Jornadas de Becarios. Buenos Aires. 24-26 de Septiembre de 1996.

.- "Oxidación de proteínas hepáticas de la rata debidas a la acción del CCl_4 ".

Galelli, M. E. y Castro, J. A..

2^{das} Jornadas de Becarios y Docentes Auxiliares del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires. 28-29 de Noviembre de 1996.

.- "Oxidación de proteínas en la intoxicación por CCl_4 ".

Galelli, M. E. y Castro, J. A..

XI Jornadas de Becarios. Buenos Aires. 25-27 de Octubre de 1997.