Capítulo 2

Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la peroxidación lipídica de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3.

2.1. Introducción

Es un hecho ampliamente reconocido que la ingesta de ácidos grasos poli-no-saturados de la familia n-3 (PUFAs n-3) representa un beneficio para la salud en general (Watkins y German, 1998). Diversos estudios básicos, clínicos y epidemiológicos han reportado ventajas importantes en campos tan diversos como cardiología, neurología, oncología, patologías inflamatorias crónicas, oftalmología, entre otros. Además, los ácidos grasos de la familia n-3 constituyen un componente crítico para el desarrollo y funcionalidad del tejido nervioso.

Síntesis de PUFAs n-3. Los ácidos grasos no pueden ser desaturados endógenamente a partir de la posición 9 debido a que el humano carece de las enzimas Δ12- y Δ15-desaturasa. Por esta razón, los ácidos linoleico (LA, 18:2 n-6) y α-linolénico (ALA, 18:3 n-3) deben ser incorporados en la dieta y son llamados "esenciales". Elongaciones y desaturaciones de estos ácidos grasos producen los PUFAs de cadena larga entre los que se encuentran el ácido eicosapentenoico (EPA, 20:5 n-3), y el ácido docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3). Esta vía de biosíntesis es posible pero muy poco eficiente en humanos por lo que, sin ser considerados esenciales, también deben ser incorporados con la dieta (Tvrzicka y col, 2011; SanGiovanni y Chew, 2005). De hecho, los niveles tisulares de PUFAs son modificables con la ingesta y dependientes de ella.

Importancia fisiológica de los PUFAs n-3. El contenido elevado de DHA en tejido nervioso y retina es de extrema importancia, dado que sus propiedades únicas le dan un rol principal en el mecanismo de transducción de señales, probablemente involucrando la regulación de proteína G (Simopoulos, 1991; Simopoulos, 2009). Los PUFAs n-3 demostraron la capacidad de modular la producción, activación y potencia de moléculas bioactivas. En algunos casos operan como complejos lipoproteicos que desencadenan cascadas de señalización en compartimientos citosólicos y nucleares. En otros casos afectan pools de sustratos y disponibilidad de enzimas biosintéticas. También influencian la expresión génica como ligandos de factores de transcripción y actúan como autocoides endocanabinoides (SanGiovanni y Chew, 2005).

Los PUFAs n-3 poseen una gran variedad de efectos sobre el metabolismo lipídico y energético como ligandos del receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR-α). Se cree que activan el PPAR-α disminuyendo así la lipogénesis y la secreción de VLDL (Burdge y col, 2009). Otros efectos potenciales de PUFAs n-3 son aumentar la actividad de lipoproteínlipasa, disminuir la concentración de apo C III y potenciar el transporte reverso de colesterol (Calder y Yaqoob, 2009; Calder y Yaqoob, 2010). Como suplementos dietarios de

elevada concentración, se cree que los PUFAs n-3 inducen expresión de proteínas desacoplantes y aumentan la densidad de mitocondrias en el músculo (Tvrzicka y col, 2011). El efecto inmunomodulador de PUFAs n-3 se asocia a su capacidad de suprimir la activación de linfocitos T (Calder, 2008).

Fuentes de PUFAs n-3. Las principales fuentes de ácido linolénico son aceites vegetales de soja, canola, entre otros, mientras que EPA y DHA se encuentran en elevadas concentraciones en aceites de pescados, mamíferos marinos o algas unicelulares. Aproximadamente el 10% de DHA proviene de la ingesta de huevos (SanGiovanni y Chew, 2005).

Como ya fue descripto en el Capítulo 1, en los sistemas químicos puros las moléculas más susceptibles al ataque de los radicales libres son, precisamente, los PUFAs y, en general, esta susceptibilidad aumenta con el número de dobles enlaces (Wagner y col, 1994). *In vivo*, se supone el mismo comportamiento. Entonces, se plantea la paradoja de que el organismo precisa de nutrientes que son altamente susceptibles a la peroxidación, haciendo que los tejidos a los que se incorporan también lo sean. *In vivo*, tal predisposición al daño resultaría catastrófica si no existiera un sistema antioxidante equiparable para responder a tal estrés. La susceptibilidad a la peroxidación de estos ácidos grasos también representa un problema en el almacenamiento de grasas, aceites y alimentos ricos en ellos. Por ello es que se hace imprescindible encontrar nuevos y más efectivos antioxidantes de origen natural, dado que existe una fuerte tendencia a reemplazar los antioxidantes sintéticos, que en varios casos presentan efectos secundarios indeseables e incluso, pueden llegar a ser cancerígenos (como en el caso de BHT). Basándonos en estos lineamientos planteamos como objetivo del presente capítulo:

✓ Analizar el efecto antioxidante de melatonina, N-acetilserotonina, 5-metoxitriptamina y 5HO-triptófano sobre la peroxidación de triglicéridos ricos en PUFAs n-3 disueltos en cloroformo, cuando la reacción es iniciada por hidroperóxido de cumeno.

Las técnicas empleadas en el presente capítulo fueron (ver **Anexo**):

❖ **Quimioluminiscencia.** Desde el punto de vista analítico la etapa de terminación de la reacción de peroxidación lipídica es muy interesante dado que se acompaña de emisión de luz al combinarse entre sí dos radicales lipoperoxilos (LOO•). La intensidad de luz emitida es útil para cuantificar la concentración de radicales LOO• (Vladimirov y col, 1980). Un compuesto capaz de reaccionar con radicales LOO• es, por definición, un antioxidante cortador de cadena

y por esta razón será capaz de evitar la emisión de luz. Basándonos en estos principios empleamos la técnica de fotoemisión para monitorear el proceso de peroxidación de triglicéridos enriquecidos en ácidos grasos n-3 (Tg PUFAs n-3) y la actividad antioxidante cortadora de cadena de melatonina (MLT) e indolaminas relacionadas.

❖ **Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).** Esta reacción es ampliamente utilizada como un índice de peroxidación lipídica, dado que el ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con productos de peroxidación de PUFAs generando un compuesto coloreado. Este compuesto posee un máximo de absorción a 532 nm y puede ser determinado espectrofotométricamente. El principal producto de peroxidación capaz de reaccionar con el TBA es el malondialdehído (MDA) aunque no es el único. Otros dialdehídos formados durante esta reacción pueden también formar un producto coloreado con el TBA. En el presente capítulo la determinación espectrofotométrica de TBARS fue utilizada para estimar la formación de productos de peroxidación de Tg PUFAsn-3, en ausencia y presencia de MLT e indoles relacionados.

❖ **Ensayo de DPPH.** Es una de las diversas técnicas empleadas para estimar la actividad anti-radicalaria de compuestos específicos o extractos naturales. Se determinó la capacidad de MLT, e indolaminas relacionadas, de decolorar el radical estable 2, 2, difenil-1-picrilhidracil (DPPH•) en solución metanólica (Blois, 1958). Esta técnica espectrofotométrica emplea DPPH, que posee un espectro de absorbancia característico, con un máximo de absorbancia a 515 nm. La reducción de DPPH provocada por un antioxidante (AH) o un radical, implica disminución en la absorbancia a 515 nm (Brand-Williams y col, 1995).

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

El proceso de peroxidación lipídica se estudió en aceite comercial de atún (triglicéridos enriquecidos en ácidos grasos n-3, Tg PUFAsn-3) donado por *Winterization Europe Fécamp Cedex*, Francia. Los triglicéridos utilizados contenían, según datos del productor: 18,43% de ácido eicosapentenoico (EPA, 20:5 n-3) y 13,11% de ácido docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3).

1,1,difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) como radical libre (90% pureza), hidroxitolueno butilado (BHT), N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina, MLT), 5-metoxitriptamina (5MTP), 5-hidroxitriptófano (5HO-TRP), N-acetilserotonina (NAS), placas de sílica gel sobre láminas de aluminio para cromatografía en capa delgada (TLC) con indicador fluorescente a 254 nm, hidroperóxido de cumeno, (CHP, hidroperóxido de isopropilbenceno), trizma base y otros reactivos fueron suministrados por *Sigma* (St. Louis, MO, EEUU). Cloroformo estabilizado con etanol al 1% y H_2O_2fueron provistos por la empresa *Mallinkrodt Baker*, México. Ácido tiobarbitúrico (TBA) fue suministrado por *Fluka.* Se utilizaron metanol, diclorometano y acetato de etilo de calidad cromatográfica.

Para los ensayos de determinación de quimioluminiscencia se empleó un contador fotónico (luminómetro) modelo 20/20n de *Turner Biosystems*, Sunnyvale, EEUU, con rango de respuesta espectral entre 350 y 650 nm. El ensayo de DPPH• fue llevado a cabo en un espectrofotómetro Agilent Chem Station UV-VIS con arreglo de diodos.

2.2.2. Métodos y técnicas

2.2.2.1. Determinación de quimioluminiscencia

Un volumen de 100µl de aceite de pescado (Tg PUFAsn-3) disuelto en cloroformo fue incubado durante 90 minutos a 37 °C en tubos Eppendorf en una cámara termostatizada (la C_f de lípidos equivale ≈100 mM tomando un PM promedio de triglicéridos ≈900 g/mol y una densidad de 0,94 g/ml). La peroxidación fue iniciada por adición de CHP (C_f= 50 mM) disuelto en cloroformo. Para analizar el efecto de MLT y demás indolaminas se preincubaron las muestras de Tg PUFAs n-3 disueltas en cloroformo durante 15 minutos con diferentes concentraciones de estos compuestos como se detalla en la **tabla 2.1**. BHT, MLT, 5MTP y NAS se disolvieron en etanol mientras que 5HO-TRP fue disuelto en metanol.

Tabla 2.1. **Concentraciones analizadas en los ensayos de quimioluminiscencia y producción de TBARS**.

	Concentraciones finales analizadas (mM)				
BHT			2,0	4,0	8,0
NAS			2,3	4,6	9,2
MLT	0,5	1,0	2,0	4,0*	8,0*
5HO-TRP	0,5	1,0	2,0		
5MTP	0,5	1,0	2,0		

BHT: hidroxitolueno butilado, NAS: N-acetilserotonina, MLT: melatonina, 5HO-TRP: 5-hidroxitriptófano y 5MTP: 5-metoxitriptamina. (*) Concentraciones no analizadas con la técnica de TBARS

En todos los casos el volumen final fue de 1 ml. Todas las soluciones fueron preparadas al momento de la reacción.

El progreso de la reacción fue determinada mediante quimioluminiscencia. La intensidad lumínica se determinó en función del tiempo con un luminómetro, registrándose las unidades lumínicas relativas (RLUs) cada 5 minutos. Para comparar el efecto inhibitorio producido por los diferentes compuestos analizados se determinó la sumatoria de RLUs (RLUs totales).

2.2.2.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras empleadas para el ensayo de quimioluminiscencia fueron analizadas con el ensayo de TBARS según el método de Buege y Aust (1978). Para ello alícuotas de 10 µl de las mezclas de reacción fueron incubados con 500 µl de TBA durante 10 min a 100 °C. Finalizado este lapso, se agregaron 2 ml de agua y se midió la absorbancia en espectrofótometro a 532 nm (Maisuthisakul y col, 2006; Vasantha Rupasinghe y col, 2010).

2.2.2.3. Determinación de actividad secuestradora de radicales mediante ensayo de 1, 1, difenil-2-picrilhidracil (DPPH)

Para llevar a cabo el ensayo, se emplearon diferentes concentraciones de las indolaminas y BHT, disueltos en metanol. Un volumen de 100 µl de soluciones de diferentes concentraciones de cada compuesto se agregó a 3,9 ml de solución de DPPH• en metanol (60 µM).El blanco se realizó con 100 µl de metanol agregados a 3,9 ml de solución de DPPH. La

absorbancia de las mezclas de reacción fue determinada a 515 nm durante 350 minutos. La absorbancia inicial fue cercana a 0,700 en todos los casos. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. El porcentaje de DPPH• remanente (%$DPPH_{rem}$) en el estado estacionario fue calculado según la siguiente expresión:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{A_f}{A_0} x\ 100$$

A_0 y A_f corresponden a la absorbancia a 515 nm de la solución de DPPH• al inicio y en el estado estacionario de la reacción, respectivamente. El %$DPPH_{rem}$ en el estado estacionario es inversamente proporcional a la actividad anti-radicalaria del compuesto evaluado. El %$DPPH_{rem}$ fue graficado en función de las concentraciones de los compuestos con el fin de calcular el índice "Concentración Efectiva 50" (EC_{50}). Este índice se define como la concentración de antioxidante necesaria para disminuir la absorbancia de DPPH• al 50% de su absorbancia inicial, en el estado estacionario.

2.2.2.4. Análisis de formación de AFMK durante la peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 en presencia de melatonina

H_2O_2 concentrado fue diluido a una concentración de 50 mM con buffer Tris-HCl (pH 7,4) y se agregó MLT para obtener una concentración final 2 mM en 1 ml de volumen final (Tan y col, 2000a). La mezcla fue incubada a 37 °C durante 100 min en los que la reacción fue monitoreada por fotoemisión. Una vez cumplido este lapso se agregaron a la mezcla 200 µl de diclorometano y se agitó manualmente durante 10 min. Una alícuota de 10 µl de esta fase orgánica fue sembrada en una placa (5 x 10 cm) de sílica gel (0,2 mm de espesor) soportada sobre aluminio. Las placas poseen indicador fluorescente que permite observar las manchas utilizando una lámpara de luz UV. El solvente de corrida utilizado fue acetato de etilo.

2.2.2.5. Expresión de resultados

Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre las medias se utilizó ANOVA y Test Múltiple de Rango basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer con un 95 % de confianza para discriminar entre las medias.

2.3. Resultados

Dependencia de quimioluminiscencia y formación de TBARS con la concentración de Tg PUFAs n-3.

El CHP es un peróxido orgánico utilizado como iniciador de reacciones radicalarias (por ej: polimerizaciones). Dado que el enlace O-O es lábil puede formar radicales libres del tipo RO• que, en este caso, inician la reacción de peroxidación lipídica. La peroxidación iniciada por CHP de Tg PUFAs n-3 fue analizada por determinación de fotoemisión. La **figura 2.1** muestra la quimioluminiscencia (en unidades lumínicas relativas, RLUs) en función del tiempo producida por diferentes cantidades de triglicérido en solución clorofórmica. Previo al agregado de CHP se observó que la línea de base aumentó con la concentración del lípido y, por lo tanto, no está relacionado con la reacción. El salto de la señal al agregar el iniciador de reacción también aumentó con la concentración de lípido pero esta dependencia perdió linealidad por encima de 50 µl de Tg PUFAs n-3. El área bajo la curva, estimada como la sumatoria de las RLUs (RLUs totales) en el rango de tiempo de la reacción (10 a 90 min), fue una función que depende linealmente de la concentración de Tg PUFAs n-3 (**Figura 2.2**) y, por lo tanto, de la concentración de radicales LOO• generados. Éste fue el parámetro que seleccionamos para cuantificar el efecto inhibidor de la peroxidación de MLT y demás indolaminas.

La cantidad de Tg PUFAs n-3 seleccionada para ser utilizada en todos los experimentos de fotoemisión y formación de TBARS fue de 100 µl ya que mayores cantidades significaron una desviación de la linealidad de la respuesta lumínica (como RLUs totales) con respecto a la cantidad de Tg PUFAs n-3.

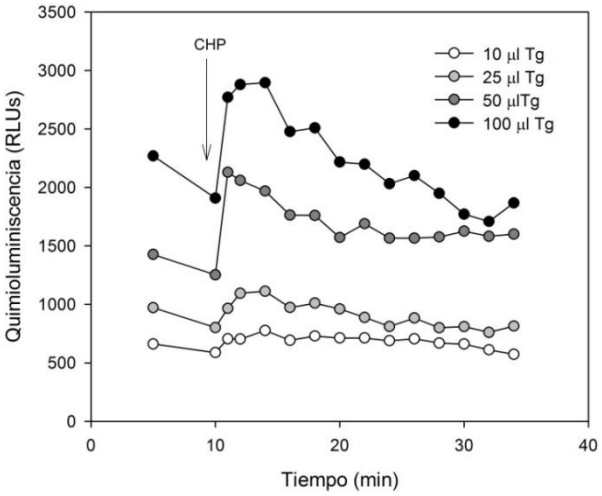


Figura 2.1. Quimioluminiscencia producida en función del tiempo por la peroxidación lipídica de diferentes cantidades de Tg PUFAs n-3 inducida por

hidroperóxido de cumeno (50 µM) en solución clorofórmica. Volumen final: 1 ml.

La **figura 2.2** muestra que también la dependencia de la producción de TBARS con la cantidad de lípido analizado fue lineal.

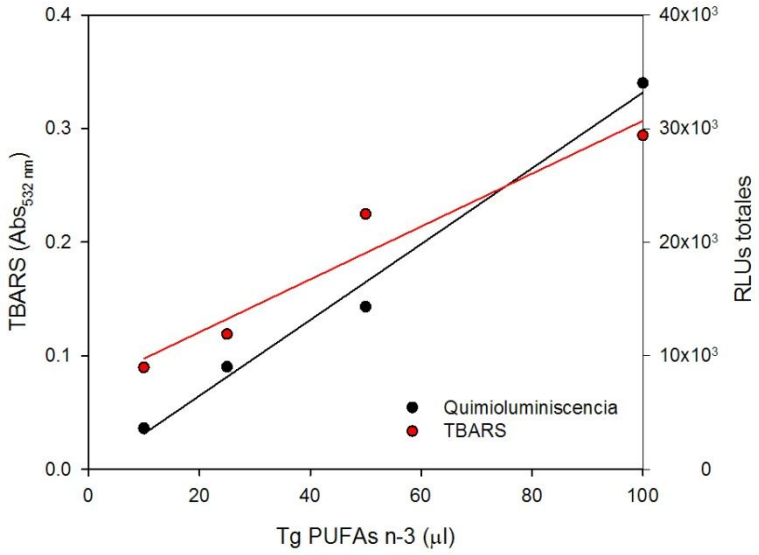


Figura 2.2. **Peroxidación lipídica en función de diferentes cantidades de Tg PUFAs n-3** determinada por quimioluminiscencia y ensayo de TBARS.

Efecto de melatonina y análogos estructurales sobre la peroxidación de Tg PUFAs n-3 determinado por quimioluminiscencia y formación de TBARS.

Los Tg PUFAs n-3 disueltos en cloroformo fueron rápidamente afectados por la peroxidación cuando se incubaron con CHP. La adición del iniciador de reacción a los triglicéridos produjo aumento de la fotoemisión con un pico máximo de 2851 RLUs 10 minutos después de agregado el CHP (**Figura 2.3**) (**Tabla 2.2**)

La **figura 2.3** compara el efecto de las distintas indolaminas a una de las concentraciones estudiadas (2 mM) sobre la peroxidación de Tg PUFAs n-3. La presencia de BHT, NAS y 5HO-TRP disminuyó significativamente la fotoemisión (**Figura 2.3 izq.**) mientras que MLT y 5MTP la aumentaron notablemente (**Figura 2.3 der.**).Nótense las distintas escalas empleadas en ambos gráficos. La curva control (círculos negros), presente en ambos, hace evidente la marcada diferencia en el efecto que las diferentes indolaminas ejercieron sobre el sistema.

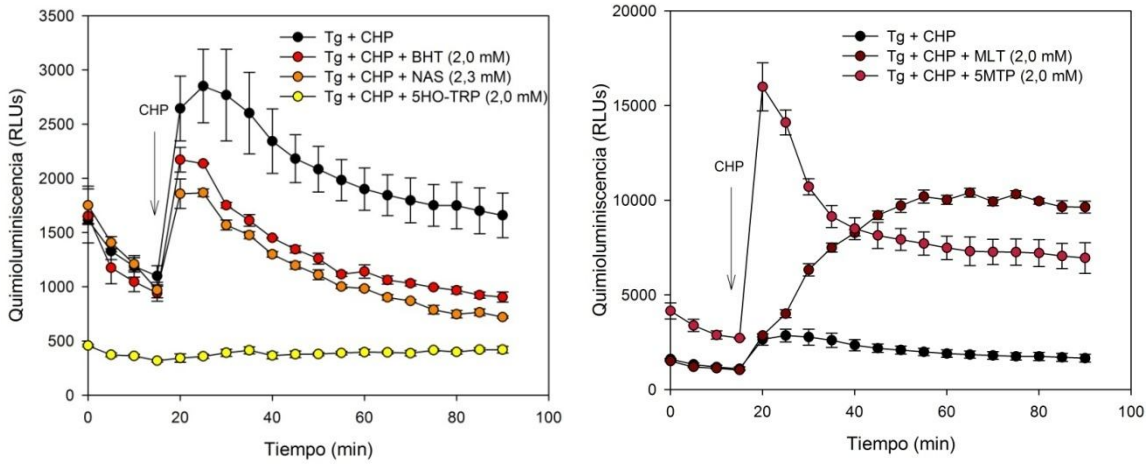


Figura 2.3. Gráfico comparativo del efecto de BHT e indolaminas sobre quimioluminiscencia producida por la peroxidación de Tg PUFAs n-3. BHT, NAS, 5HO-TRP (Izquierda), MLT y 5MTP (Derecha). Las curvas control (círculos negros) corresponden a Tg PUFAs n-3 incubados con CHP (50 µM). Cada punto representa: $\bar{x} \pm \frac{SD}{\sqrt{n}}$ de tres experimentos independientes

Según los datos de RLUs totales y RLUs máximas (T**abla 2.2**) el efecto inhibidor de la quimioluminiscencia ejercido por BHT, NAS y 5HO-TRP fue dependiente de la concentración. Esto permitió calcular el índice IC_{50} (**Tabla 2.3**) definido como la concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de la fotoemisión (o de la producción de TBARS, según corresponda). Según este índice se deduce que 5HO-TRP (IC_{50}= 0,7±0,1 mM) y NAS (IC_{50}= 6,2±1,4 mM) fueron inhibidores de la quimioluminiscencia más efectivos que BHT (IC_{50}= 9,7± 1,5 mM).

MLT y 5MTP produjeron aumento en la emisión de luz (aumento de RLUs totales y RLUs máx.). 5MTP mostró un efecto amplificador de la luminiscencia dependiente de la concentración mientras que el efecto de MLT no fue dependiente de la concentración (**Tabla 2.2**). Dado que no presentaron inhibición no fue posible definir un valor de IC_{50} para estos compuestos (**Tabla 2.3**).

Resultados similares a los obtenidos con la técnica de quimioluminiscencia se observaron en la determinación de productos de reacción por ensayo de TBARS. BHT, NAS y 5HO-TRP inhibieron la aparición de TBARS de manera dependiente de la concentración, mientras que MLT y 5MTP la aumentaron significativamente (**Tabla 2.2**). Para comparar la efectividad inhibitoria de formación de TBARS, se calculó el índice IC_{50}. Según este índice, el

inhibidor más efectivo fue 5HO-TRP (IC_{50}= 1,3 mM), luego BHT (IC_{50}=1,4 mM) y NAS (IC_{50}=9,3 mM) (**Tabla 2.3**). Dado que MLT y 5MTP no presentaron inhibición el índice IC_{50} no pudo ser calculado. Para descartar que el metanol o etanol en el que se disolvieron las indolaminas y el BHT hubieran producido algún efecto en la quimioluminiscencia o la producción de TBARS, se analizaron blancos de reactivos con agregado de estos solventes. Estos solventes no produjeron interferencias a las concentraciones analizadas.

Tabla 2.2. Efecto de diferentes concentraciones de BHT e indolaminas sobre la peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 incubados con hidroperóxido de cumeno.

		Quimioluminiscencia			TBARS
	[mM]	RLUs máx.	RLUs totales	% inhibición	% inhibición
Control		2851±678 (25 min)	37089±7078		
BHT	2,0	2172±197 (20 min)	24685±1339*	33±8	67
	4,0	2041±82 (20 min)*	22733±460*	39±8	77
	8,0	1673±51 (20 min)*	20127±717*	46±10	73
NAS	2,3	1867±72 (25 min)*	22493±1414*	39±10	26
	4,6	1489±174 (20 min)*	17403±524*	53±12	35
	9,2	992±38 (20 min)*	12017±643*	68±16	49
5HO-TRP	0,5	1261±175 (25 min)*	19784±1865*	47±14	29
	1,0	376±18 (25 min)*	7382±358*	80±19	46
	2,0	358±35 (25 min)*	7356±534*	80±21	52
MLT	0,5	6378±518 (90 min)*	72236±1766*	-95±20	-12
	1,0	10409±1947 (85 min)*	113753±16999*	-207±70	-16
	2,0	10395±470(65 min)*	132791±5346*	-258±60	-34
	4,0	9192±533 (65 min)*	129957±3661*	-250±60	ND
	8,0	9105±258 (60 min)*	124275±3685*	-235±52	ND
5MTP	0,5	6534±621 (20 min)*	80948±12538*	-118±40	-19
	1,0	7595±1153 (20 min)*	98499±7388*	-166±44	-41
	2,0	15990±2544 (20 min)*	145865±16674*	-293±90	-27

ND: no determinado. Cada valor representa: $\bar{x}$ ± SD de tres experimentos independientes. El tiempo al que se produce el máximo valor de RLUs se indica entre paréntesis. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control se señalan con un asterisco (*). La inhibición porcentual se calculó a partir de los valores de RLUs totales (quimioluminiscencia) o de absorbancia a 532 nm (TBARS) con respecto al control (Tg PUFAs n-3 + CHP).

Tabla 2.3. Inhibición de quimioluminiscencia y TBARS (IC_{50}), y **actividad secuestradora de radicales** (EC_{50}) **producidas por BHT e indolaminas.**

	IC_{50} (mM)		EC_{50} (µM)
	Quimioluminiscencia	**TBARS**	**DPPH**
BHT	9,7±1,5	1,4	8,4±0,1
NAS	6,2±1,4	9,3	4,7±0,3
5HO-TRP	0,7±0,1	1,3	4,1±0,2
5MTP	ND	ND	ND
MLT	ND	ND	ND

ND: no determinado. Cada valor informado representa: $\bar{x}$ ± SD de tres experimentos independientes

Actividad secuestradora de radicales de melatonina e indolaminas relacionadas.

La actividad secuestradora de radicales de MLT, NAS, 5HO-TRP y 5MTP fue determinada por el ensayo de DPPH y comparada con la actividad de BHT. Los resultados demostraron que 5HO-TRP y NAS presentaron una actividad secuestradora que es dependiente de la concentración analizada (**Figura 2.4**). Así, a una concentración de 10 µM, 5HO-TRP y NAS lograron reducir la concentración de DPPH• en un 85 y 74 % respectivamente, en el estado estacionario (**Figura 2.5**). BHT presentó 51 % de reducción mientras que MLT y 5MTP sólo mostraron una reducción de 2 y 5% respectivamente.

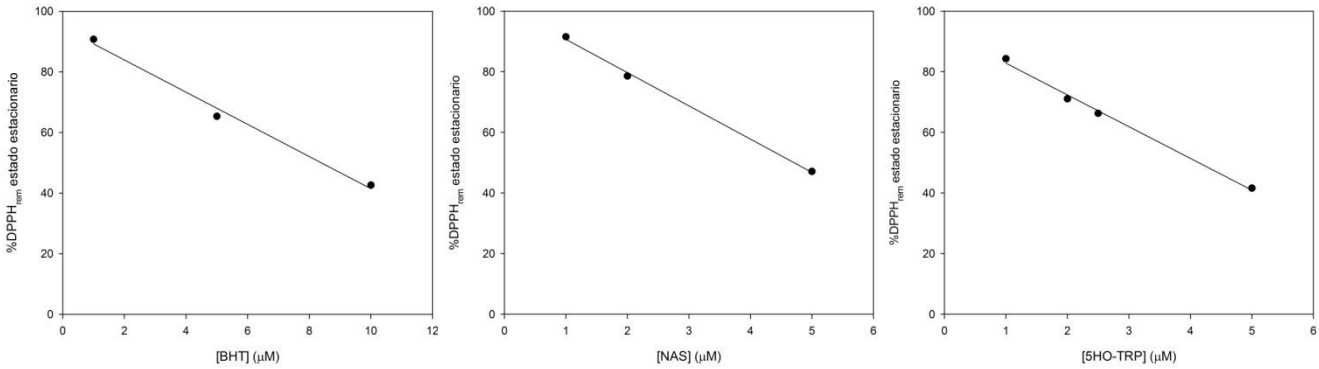


Figura 2.4. Dependencia de %DPPH$_{rem}$ en el estado estacionario con la concentración de BHT, NAS y 5HO-TRP

Para comparar la efectividad secuestradora de radical DPPH de BHT e indolaminas se calculó el índice EC_{50} (**Tabla 2.3**). Según este índice los secuestradores de radicales más

potentes resultaron ser 5HO-TRP (EC_{50}= 4,1±0,2 μM) y NAS (EC_{50}= 4,7±0,3 μM), seguidos de BHT (EC_{50}= 8,4±0,1 μM). El índice EC_{50} no fue calculado para MLT ni 5MTP dado que no presentaron acción secuestradora de radicales relevante a las concentraciones analizadas.

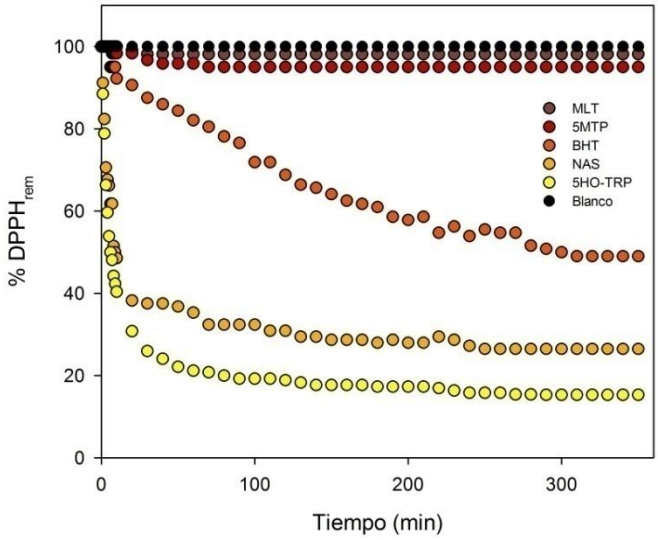
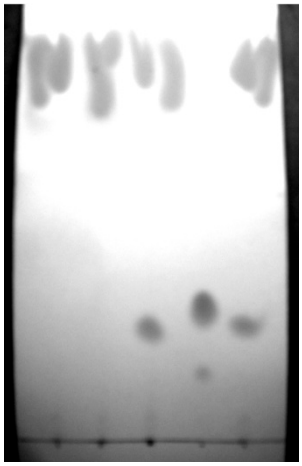


Figura 2.5. Gráfico comparativo de la capacidad secuestradora de radicales de melatonina y sus análogos estructurales (10 μM).

Posible formación de AFMK durante la peroxidación de Tg PUFAs n-3 en presencia de melatonina.

Para determinar si el efecto amplificador de luminiscencia provocado por MLT en la peroxidación de Tg PUFAs n-3 se debe a la formación de N1-acetil, N2-formil, 5-metoxikinuramina (AFMK) se empleó la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC). Los productos de reacción de MLT con H_2O_2 y Fe^{2+} se emplearon como control positivo para identificar la formación de AFMK como producto de peroxidación de Tg PUFAs n-3, en presencia de MLT.

La **figura 2.6** muestra un análisis de TLC donde pueden observarse los productos de reacción de MLT con H_2O_2 y Fe^{2+} (**línea 4**). En esta muestra se observaron claramente las manchas correspondientes a AFMK (Rf=0,15) y MLT (Rf=0,29) mientras que en la muestra de Tg + CHP + MLT (**línea 3**) la mancha correspondiente a AFMK no fue detectable. La **figura 2.7** muestra el perfil de fotoemisión originado por la reacción de MLT (2 mM) con H_2O_2 (50 mM) y $FeCl_2$ (0,5 mM)



1 2 3 4 5

Figura 2.6. Análisis por TLC de: 1) Tg PUFAs n-3, 2) Tg PUFAs n-3 + CHP, 3) Tg PUFAs n-3 + CHP + MLT, 4) MLT + H_2O_2 + Fe^{2+} y 5) Tg PUFAs n-3 + CHP + MLT agregada después de la incubación). Se empleó acetato de etilo como solvente de corrida y las manchas fueron visualizadas con luz UV.

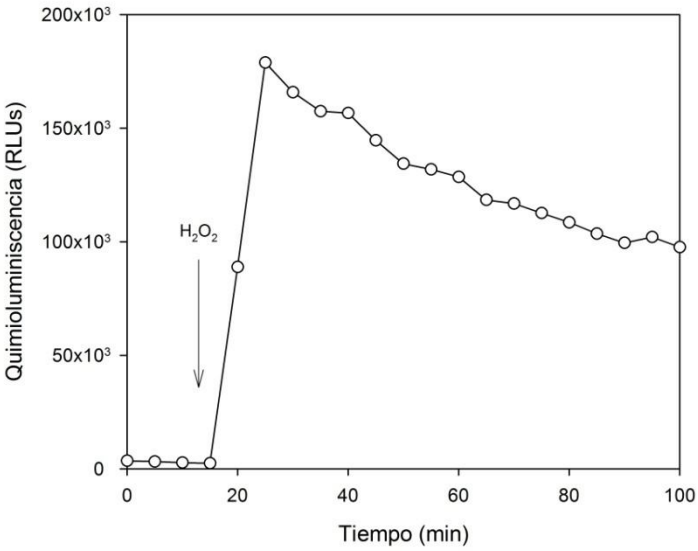


Figura 2.7. Quimioluminiscencia producida por reacción de melatonina (C_f= 2 mM) con H_2O_2 (C_f=50 mM) + $FeCl_2$ (C_f=0,5 mM)

2.4. Discusión

Los antioxidantes cortadores de cadena (en inglés: *chain-breaking*) se definen como aquellos capaces de reaccionar con radicales LOO•, cediéndoles un radical H• y cortando así la cadena de peroxidación (Laguerre y col, 2007). Sin embargo, esta propiedad por sí misma no es suficiente para catalogar a un antioxidante como un buen cortador de cadena. Además, debe poseer una estructura que le permita estabilizar el electrón desapareado por resonancia haciéndolo menos reactivo e impidiendo así que se inicien nuevas cadenas de reacción. El ejemplo típico de moléculas que cumplen estas condiciones son los fenoles (tocoferoles, flavonoides, etc). Un buen antioxidante cortador de cadena debe tener, además, la capacidad de llegar al lugar donde los radicales están siendo producidos. La capacidad antioxidante también está determinada por la energía de disociación de enlace (BDE) de la unión O-H en estos compuestos, donde la capacidad dadora de un átomo H aumenta conforme BDE disminuye (Laguerre y col, 2007).

Comparando la estructura de MLT (**1**) con la de antioxidantes cortadores de cadena clásicos se observa que ésta no muestra similitudes con α-tocoferol (vit. E) (**2**) ni sus análogos (**3** y **4**) ni cualquier otro antioxidante cortador de cadena conocido (**Figura 2.8**).

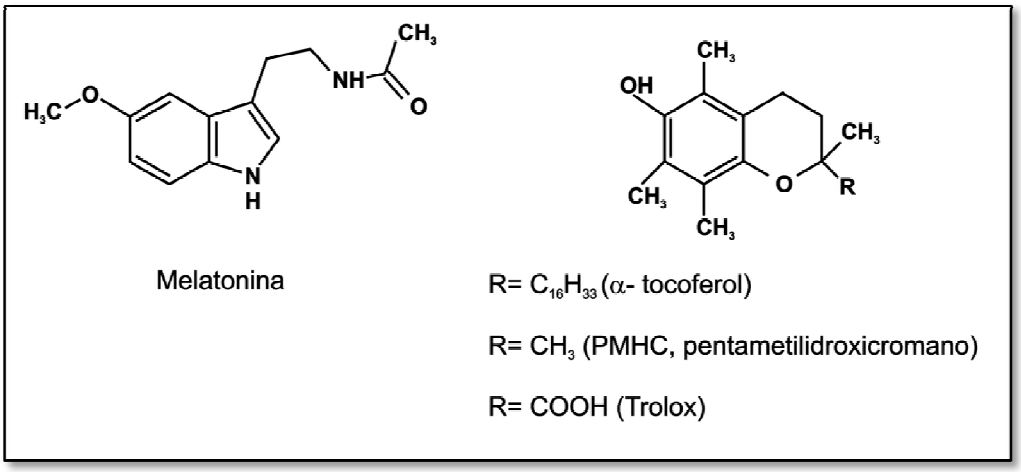


Figura 2.8. Comparación estructural entre melatonina y tocoferoles.

A pesar de tener cierto carácter bencílico, radicales derivados de MLT no son demasiado estabilizados, por lo que su formación no puede detener la reacción en cadena. MLT es un indol sustituido y sólo analizando su estructura, no podría ser considerada como un antioxidante atrapador de peroxilos. Antunes y colaboradores (1999) llevaron a cabo un estudio exhaustivo de la eficacia de MLT como atrapador de radicales LOO• y llegaron a la conclusión de que MLT no es un cortador de cadena eficaz. Más aún, señalaron que los

compuestos que contienen un grupo NH en un anillo pirrólico sustituido en posición 5, generalmente no son antioxidantes atrapadores de LOO•. Sin embargo, existen evidencias en la literatura de que MLT podría actuar como antioxidante cortador de cadena "no clásico" (Livrea y col, 1997; Marshall y col, 1996).

Desde el descubrimiento de la MLT como antioxidante (Ianas y col, 1991) ha habido un enorme número de trabajos documentando esta acción bajo un casi ilimitado número de condiciones. *In vivo,* MLT ha demostrado reducir los efectos del estrés oxidativo en diversos estudios: disminuyendo la acción de agentes cancerígenos (Tan y col, 1993b), contrarrestando el efecto de lipopolisacárido (Sewerynek y col, 1995), inhibiendo el daño oxidativo generado por herbicidas (Melchiorri y col, 1995), entre otros. Para explicar estos resultados se han sugerido efectos indirectos tales como activación de enzimas antioxidantes e inducción por modulación de la expresión génica (Pandi-Perumal y col, 2006; Barlow-Walden y col, 1995). Sin embargo, el estudio de MLT y sus análogos estructurales en sistemas modelo *in vitro* arrojaron y arrojan resultados variables (Livrea y col, 1997; Abuja y col, 1997; Fowler y col, 2003) y, muchas veces, contradictorios indicando que su actividad antioxidante directa depende del sistema y las condiciones de estudio.

En el presente capítulo se estudió el efecto antioxidante (cortador de cadena) *in vitro* de MLT y de compuestos (**Figura 2.9**) que están estrechamente relacionados con ella dado que todos pertenecen a la familia de indolaminas. Para ello se utilizó un sistema puramente lipídico que, a diferencia de la complejidad de los sistemas utilizados en varios trabajos previos, elimina la contribución de enzimas y otros compuestos antioxidantes no enzimáticos, midiéndose únicamente las propiedades antioxidantes de las moléculas estudiadas.

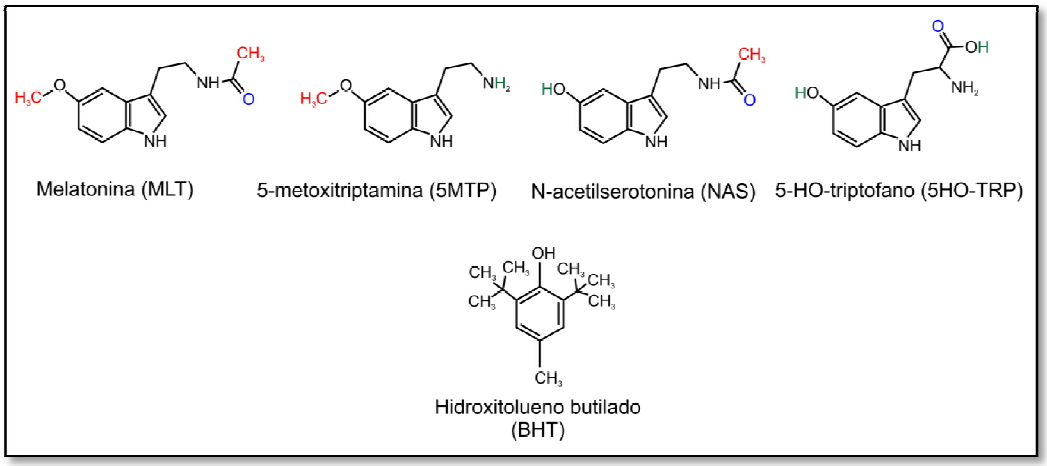


Figura 2.9. Estructura de los compuestos estudiados en el presente capítulo

Según nuestros resultados, 5HO-TRP demostró ser un secuestrador de radicales peroxilos más efectivo que el BHT cuando se estudió por las técnicas de quimioluminiscencia y producción de TBARS. Este efecto es coherente con la elevada actividad demostrada frente al radical DPPH• lo que lleva a la conclusión de que este compuesto posee elevada tendencia a ceder un radical H• a los radicales LOO• generados durante la peroxidación de Tg PUFAs n-3, cortando la cadena de peroxidación y protegiendo a los lípidos de sus efectos en forma dependiente de la concentración. NAS (también es un 5-HO derivado) mostró actividad secuestradora de radicales LOO•, disminuyendo la quimioluminiscencia e inhibiendo la formación de TBARS en forma concentración-dependiente. También demostró tener capacidad dadora de H• en el ensayo de DPPH. Su efectividad como antioxidante cortador de cadena fue menor que 5HO-TRP lo que indica que su única diferencia estructural (cadena lateral en posición 3) es un factor que influencia la actividad como antioxidante.

MLT no demostró ser un eficiente dador de H• cuando se analizó por ensayo de DPPH y el mismo comportamiento se observó para otro 5-metoxi derivado, 5-MTP. Estos resultados son consistentes con la falta de inhibición de producción de TBARS y la incapacidad de disminuir la producción de quimioluminiscencia demostrada por estos compuestos. Estos resultados nos permiten concluir que MLT y 5MTP no actuarían como antioxidantes cortadores de cadena clásicos en este sistema.

La formación de AFMK, el principal producto de reacción entre MLT y ciertas ROS (**figura 2.10**), es una reacción luminiscente. Esta reacción da lugar a la ruptura oxidativa del anillo indólico vía un intermediario dioxetano, o a través de la reacción de epoxidación de alquenos seguida de hidrólisis para formar el diol que puede ser oxidado a AFMK (Tan y col, 2000a). El intermediario formado excitado decae a una molécula estabilizada por resonancia lo que origina una típica reacción luminiscente (Fuhrberg y col, 1994; Hardeland y col, 1997). AFMK fue detectado como producto de reacción entre melatonina y $^1O_2$ (Poeggeler y col, 1994; Zang y col, 1998). La formación de AMK (metabolito de AFMK) también es quimioluminiscente. Por lo tanto, el efecto amplificador de quimioluminiscencia observado en presencia de MLT y 5MTP podría deberse a un efecto prooxidante (consistente con los resultados observados en TBARS) o podría deberse a un efecto antioxidante en el que MLT reacciona con radicales formando AFMK y generando quimioluminiscencia (Carampin y col, 2003). Para resolver esta situación analizamos la formación de AFMK por cromatografía en capa fina (TLC) empleando una reacción de MLT con H_2O_2 y Fe^{2+} como control positivo. No se evidenció formación de AFMK en el sistema de Tg PUFAs n-3 peroxidados con CHP en presencia de MLT. La conclusión a la que nos llevan estos resultados es que MLT estaría reaccionando con especies generadas

durante la reacción de peroxidación pero esto no significaría un efecto protector de los lípidos. Por lo tanto, MLT no se comporta en este sistema como un antioxidante cortador de cadena clásico. 5MTP presentó un comportamiento análogo al de MLT por lo que las conclusiones se hacen extensivas a este compuesto.

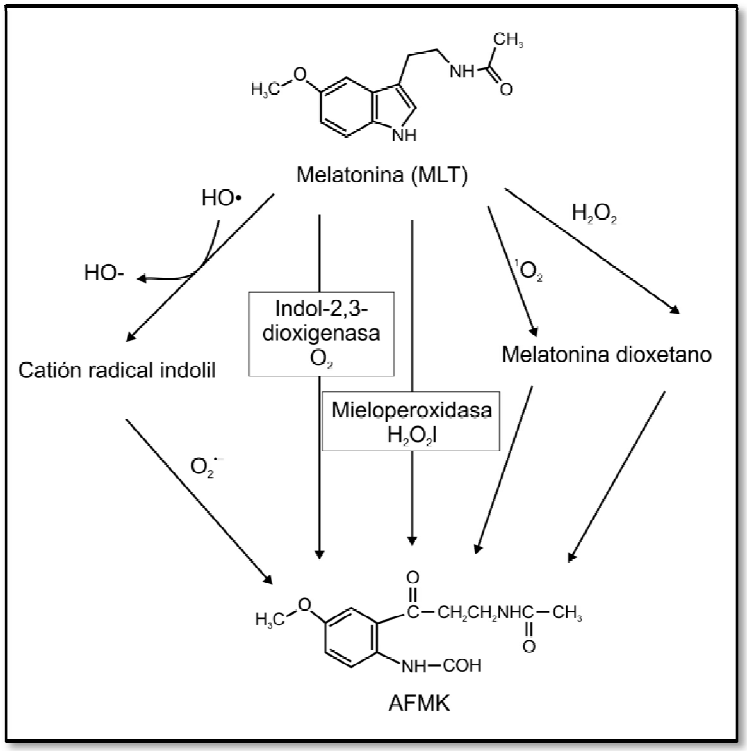


Figura 2.10.Vía química y enzimática de reacción de formación de AFMK a partir de melatonina (Tan y col, 2001)

Barsacchi y colaboradores (1998) obtuvieron resultados similares cuando evaluaron el efecto de MLT y NAS en el consumo de vitamina E en glóbulos rojos peroxidados con CHP y cuando estudiaron su actividad frente al radical galvinoxilo (ensayo similar al de DPPH). En el primer ensayo MLT no sólo no presentó efecto protector sino que aumentó el consumo de vitamina E. Por el contrario, NAS logró suprimir el consumo de vitamina E, inhibiéndolo completamente a la máxima concentración analizada (400 mM). Por otro lado, MLT no mostró actividad dadora de H dado que no fue capaz de inhibir la señal de ESR del radical galvinoxilo. A la misma concentración, NAS logró reducir la intensidad de la señal mientras que vitamina E, empleada como control, la suprimió casi totalmente. Mediante estudios electroquímicos determinaron los potenciales de oxidación de MLT y NAS. Por los potenciales de oxidación obtenidos (positivos, menor para NAS) concluyeron que ambas indolaminas pueden actuar

como antioxidantes por un mecanismo de transferencia de electrones. Por sus potenciales de oxidación moderadamente bajos, MLT y NAS podrían sufrir oxidación por radicales fuertemente oxidantes tales como hidroxilo (Keithanh y Lerchl, 2005), fenoxilo y alcoxilo. MLT presentó un potencial de oxidación similar a otros derivados 5-metoxi indol y el potencial de NAS fue cercano a los de otros 5-HO derivados. Sin embargo, debido a su estructura química que posee un grupo OH conjugado con un NH, NAS puede sufrir el proceso de abstracción de hidrógeno antes que oxidación.

La comparación de análogos estructurales reveló una importancia crucial de los sustituyentes en las indolaminas. La presencia del grupo metoxi en posición 5 disminuye drásticamente la capacidad secuestradora de radicales (LOO• y DPPH). La presencia de un grupo OH en posición 5 determina una elevada actividad cortadora de cadena en NAS y 5HO-TRP.

Varios trabajos presentan resultados que sustentan nuestras conclusiones: Marshall y colaboradores (1996) demostraron que MLT posee una limitada actividad antioxidante, Livrea y colaboradores (1997) demostraron que MLT ejerce una actividad antioxidante en liposomas de fosfatidilcolina de soja mucho menor que α-tocoferol, Reiter y colaboradores (2001) encuentran debatible la capacidad de MLT para secuestrar radicales LOO•.