Capítulo 5

Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados de lípidos de retina.

5.1. Introducción

La retina es un tejido excepcional ya que posee un perfil de ácidos grasos que contiene el mayor nivel de PUFAs de cadena larga del organismo (Anderson, 1970; Fliesler y Anderson, 1983; Lecomte y col, 1996; O'Brien y Sampson, 1965; SanGiovanni y Chew, 2005), incluyendo ácido docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3) y ácido araquidónico (20:4n-6). De éstos, el DHA es el más abundante en la parte neural como vascular de la retina (Fliesler y Anderson, 1983), en las células epiteliales pigmentarias retinianas (Wang y Anderson, 1993a; Wang y Anderson, 1993b) y en membranas de los discos del segmento externo de los fotorreceptores retinianos (Soubias y col, 2006; Suh y col, 1994). Las propiedades biofísicas y bioquímicas de DHA pueden afectar la función de la membrana del fotorreceptor alterando la permeabilidad, fluidez, espesor y otras propiedades de esta fase lipídica. El ácido graso DHA ejerce una función vital en la fototransducción a través de mecanismos de señalización celular. La insuficiencia tisular de DHA está asociada con alteraciones en la función retiniana.

En la retina de mamíferos, los radicales libres y lipoperóxidos juegan un papel importante en la evolución de diferentes retinopatías incluyendo glaucoma, cataractogénesis, retinopatía diabética, inflamación ocular y degeneración retiniana (Ueda y col, 1996; De La Paz y Anderson, 1992). La producción de radicales libres induce la formación de radicales LOO•, conocidos como radicales libres secundarios, que participan de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica y que pueden dañar las membranas de la retina alterando la función visual (Catalá, 2006).

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MLT), hormona de la familia de las indolaminas, es sintetizada a partir de triptófano en pinealocitos y actúa como hormona endócrina que influencia ciclos circadianos en diversos órganos. Dos funciones bioquímicas en la glándula pineal, síntesis de MLT y lipoxigenación, parecen estar sinérgicamente reguladas por los niveles de ácidos grasos esenciales n-3 tisulares (Catalá, 2010). MLT también es sintetizada por fotorreceptores retinianos pero, aparentemente, ésta no ingresa a la circulación sino que actúa como una señal paracrina dentro del ojo. Cientos de investigaciones han señalado a MLT como un secuestrador eficiente de ciertas especies reactivas de oxígeno como HO•, RO•, HClO, $^1O_2$ y H_2O_2 (Allegra y col, 2003). Un gran número de estudios *in vivo* e *in vitro* señalan que MLT administrada exógenamente brinda protección frente a estrés oxidativo (Karbownik y col, 2001; Khaldy y col, 2000; Sinha y col, 2001; Giusti y col, 1997). Se ha sugerido que MLT y N-acetilserotonina (NAS) pueden ejercer un efecto protector frente a peroxidación lipídica optimizando la fluidez de la membrana (García y col, 1997; García y col, 2001). En

sistemas biológicos también ha presentado efecto protector de PUFAs frente a la peroxidación (Leaden y col, 2002; Leaden y Catalá, 2005). Este efecto puede deberse a la capacidad de MLT de secuestrar directamente especies reactivas de oxígeno y también a la inducción de los mecanismos de defensa antioxidante, como la activación de glutatión peroxidasa (Barlow-Walden y col, 1995) y superóxido dismutasa (Antolín y col, 1996). Por otro lado, hay estudios que sugieren que MLT es ineficaz como antioxidante (Wang y col, 2001; Wölfler y col, 1999; Duell y col, 1998) o, más aún, que tiene efecto prooxidante (Wölfler y col, 2001). En contraste con los estudios mencionados, el presente estudio *in vitro* elimina la contribución e interferencia de enzimas, proteínas y otras moléculas. El objetivo planteado en este capítulo fue:

- ✓ Analizar el efecto de melatonina, N-acetilserotonina, 5-metoxitriptamina (5MTP) y 5-HO triptófano (5HO-TRP) sobre la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas de lípidos de retina bovina.

El sistema liposomal guarda similitudes con la fase lipídica de las membranas biológicas y conserva la composición de ácidos de grasos de la retina. Como iniciador de reacción empleamos Fe^{2+} que en presencia de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) genera radicales libres. El efecto protector de MLT, NAS, 5HO-TRP y 5MTP sobre los liposomas se determinó analizando formación de dienos conjugados y TBARS, y los cambios en la composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). El antioxidante de referencia utilizado fue BHT.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

El proceso de peroxidación se estudió en liposomas sonicados (LS) de lípidos de retina bovina. Para ello, se obtuvieron ojos bovinos donados por Frigorífico Gorina (La Plata, Buenos Aires). Para la extracción de lípidos se utilizaron solventes de calidad cromatográfica: cloroformo (U.V.E.) y metanol (Mallinckrodt). Los demás reactivos utilizados fueron de alta pureza: NaCl (Cicarelli), $FeSO_4$ (Fluka), TBA (Fluka), 1,1,3,3 tetrametoxipropano (Fluka), Trizma base (Sigma), BHT (Sigma), BF_3 en metanol (Fluka), ácido heptadecanoico (Sigma). Melatonina, N-acetilserotonina, 5-hidroxitriptófano y 5-metoxitriptamina (Sigma). Agua calidad mili-Q.

Para la obtención de retinas y, posteriormente, de lípidos se empleó un homogeneizador Ultraturrax X25. Para producir LS se empleó un sonicador Sonics XL-2000 Microson ™. En la determinación de dienos conjugados y TBARS se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

5.2.2. Métodos y técnicas

5.2.2.1. Obtención de homogeneizados de retina bovina

(Ídem punto 4.2.2.1.)

5.2.2.2. Extracción de lípidos

(Ídem punto 4.2.2.2.)

5.2.2.3. Preparación de liposomas

(Ídem punto 4.2.2.3.).

La sonicación se realizó a un voltaje de salida fijado en 12 watts, hasta que la suspensión alcanzó la mínima densidad óptica (Gal y col, 2003).

5.2.2.4. Determinación espectrofotométrica de dienos conjugados

LS de lípidos de retina ($C_f \approx$ 0,1 mM) fueron incubados durante 9 horas a temperatura ambiente en cubetas de cuarzo de 1 cm x 1 cm. Los liposomas fueron incubados con diferentes concentraciones de los compuestos estudiados (BHT, MLT, 5MTP, NAS y 5HO-TRP) y en ausencia de éstos (muestras control), agitando manualmente durante un minuto y luego

dejando la mezcla en reposo durante 4 minutos. Se agregó entonces cantidad necesaria de agua para llevar a un volumen final de 2 ml y se inició la reacción de peroxidación por agregado de Fe^{2+} (C_f= 25 μM).

Para analizar la producción de dienos conjugados durante la peroxidación de liposomas, se registraron los espectros de absorción cada 9 minutos durante 9 horas, entre 200 y 300 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800. El aumento de absorción a 234 nm (debido a formación de dienos conjugados) se graficó en función del tiempo. La velocidad inicial de reacción se determinó como la pendiente de recta con la que se ajustó el rango lineal de la curva ΔAbs en función del tiempo. El tiempo de retardo (fase *lag*) se define como el tiempo transcurrido hasta el inicio de la fase lineal de la curva ΔAbs en función del tiempo (Sargis y Subbaiah, 2003).

Diferencias entre los valores control y los obtenidos en presencia de BHT e indolaminas fueron analizadas por ANOVA

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

La determinación de TBARS se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Camejo y col, 1998). Una alícuota de 10 μl de BHT (0.01 % p/v) se agregó a cada pocillo para prevenir peroxidación adicional durante la incubación. BHT 0.01 % p/v se preparó por dilución con agua a partir de una solución 0.1 % p/v en etanol para minimizar la concentración de etanol en el medio de reacción.

LS se incubaron durante 9 horas en las mismas proporciones y condiciones que para la determinación de dienos conjugados. Se tomaron alícuotas de 15 μl (por triplicado) de las mezclas de reacción a diferentes tiempos y se dispusieron en las placas. Los pocillos ocupados se cubrieron con film adhesivo y las placas se mantuvieron a -22 °C hasta completar la placa. A cada pocillo se agregaron 85 μl de TBA (0.375% p/v en HCl 0,25 N), se taparon las placas y se incubaron a 65 °C durante 30 min en baño de agua. Cada placa contenía además, diferentes concentraciones de soluciones estándares de 1,1,3,3 tetrametoxipropano, para la confección de curvas de calibrado. Para la cuantificación se empleó un coeficiente de absorción molar de 156000 $M^{-1}cm^{-1}$ (Rice-Evans y col, 1991).

Diferencias entre las concentraciones de TBARS entre las muestras control y las obtenidas en presencia de BHT, MLT e indolaminas relacionadas fueron analizadas por ANOVA.

5.2.2.6. Preparación de metil derivados de ácidos grasos (FAMEs)

Para poder analizar la composición de ácidos grasos de retina y liposomas preparados con sus lípidos por cromatografía gaseosa, las muestras deben ser previamente derivatizadas. Los lípidos de liposomas (sin peroxidar, peroxidados y peroxidados en presencia de BHT, MLT e indolaminas relacionadas) fueron extraídos de acuerdo al método de Folch (Folch y col, 1957). Las mezclas de las que se extrajeron los lípidos poseen la misma composición que las empleadas en la determinación de dienos conjugados pero a una escala 7,5 veces mayor (V_f= 15 ml).

Luego de una hora de incubación de los liposomas con y sin Fe^{2+}, en presencia y ausencia de BHT e indolaminas, las muestras se mezclaron con igual volumen (15 ml) de cloroformo: metanol 2:1 v/v, conteniendo 0.01 % p/v BHT para detener la reacción. Esta mezcla se agitó en vórtex, se gaseó con nitrógeno y se mantuvo en heladera toda la noche hasta lograr la separación de fases. La fase clorofórmica inferior se filtró con papel conteniendo Na_2SO_4anhidro para absorber restos de agua. Como estándar externo testigo de metilación se agregaron 25 µl de ácido heptadecanoico (17:0) 10000 ppm (C_f=16,67 ppm). Este ácido graso no se encuentra naturalmente en retina.

La fase clorofórmica obtenida en la extracción de lípidos de retina y la fase clorofórmica obtenida en el paso anterior fueron evaporadas bajo corriente de nitrógeno. Los lípidos secos fueron trasmetilados con 300 µl de BF_3 en metanol 1,3 M, incubándolos a 65 °C durante 180 min. Luego de la incubación, se agregó 1 ml de solución fisiológica y los metil derivados de ácidos grasos se extrajeron con 1 ml de hexano.

5.2.2.7. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Para analizar la composición de ácidos grasos se empleó un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 560D acoplado a un espectrómetro de masas. **Columna:** Recubierta. Elite 5MS (Perkin Elmer). Dimensiones: 30 m; 0,25 mm de Ø interno; 0.25 µm de espesor de fase estacionaria. **Muestra:** 495 µl fase hexano (obtenidos en el paso anterior) + 5 µl n-eicosano (C20) 25000 ppm (C_f= 250 ppm). **Volumen de inyección:** 1µl. **Inyector:** 260 °C. **Split**: 10. **Modo**: Flow. **Gas de corrida**: Helio. **Flujo**: 1 ml/min. **Rango de temperaturas:** de 130 a 250 °C, 5 °C/min. 250 °C durante 6 min. **Temperatura línea de trasferencia:** 250 °C. **Temperatura fuente de iones:** 180 °C. **Energía de ionización:** 70 eV (EI+). **Identificación de compuestos:** por comparación de espectros de masas con los de biblioteca NIST.

5.3. Resultados

En el presente capítulo investigamos la actividad antioxidante de MLT y un grupo de indolaminas relacionadas, frente a la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados de lípidos de retina. El proceso peroxidativo se analizó por formación de dienos conjugados, producción de TBARS y análisis de los cambios de composición de ácidos grasos. La actividad antioxidante de las indolaminas fue comparada con la de BHT seleccionado como antioxidante de referencia.

Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la producción de dienos conjugados durante la peroxidación de liposomas sonicados de lípidos de retina.

La **figura 5.1** muestra la evolución temporal de los espectros UV, tomados entre 200 y 300 nm, durante la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de: LS de lípidos de retina (**Figura 5.1.A**), LS en presencia de MLT 5 μM (F**igura 5.1.B**) y LS en presencia de BHT 5 μM (**Figura 5.1.C**). Los espectros que se observan en la figura fueron tomados a 0, 4,5 y 9hs.Tras el agregado de Fe^{2+} como iniciador, se observó disminución en la absorbancia en el rango entre 200 y 215 nm debido a la pérdida de doble enlaces separados por un grupo metileno (lípidos no peroxidados) como consecuencia de la formación de doble enlaces conjugados como intermediarios de la peroxidación. Cuando los liposomas se incubaron con MLT 5 μM (**Figura 5.1.B**) esta disminución también fue notoria, a diferencia de BHT 5 μM (**Figura 5.1.C**) que logró inhibir estos cambios. Entre 215 y 300 nm, la absorbancia aumentó mostrando un máximo a 234 nm debido a los dienos conjugados. Esto se observó en ausencia y presencia de MLT, mientras que en presencia de BHT estos cambios fueron notablemente disminuidos. La evolución de espectros UV en presencia de NAS, 5MTP y 5HO-TRP fue similar a la observada para MLT, por esta razón y para no extender demasiado esta sección se obviaron estos gráficos.

Una vez iniciada la reacción, la producción de dienos conjugados fue inmediata (**Figura 5.2, 0 μM: sin agregado de indolaminas o BHT**). La presencia de concentraciones crecientes de BHT (**Figura 5.2.A**) determinó mayores tiempos de retardo en el inicio de la reacción y velocidades iniciales de reacción menores (**Tabla 5.1**). Dado que el tiempo de inicio de reacción obtenida en presencia de BHT 5 μM fue superior a las 9 horas (tiempo de monitoreo de la reacción) no se determinó la velocidad de reacción a esta concentración. Si bien aumentó la fase de retardo en presencia de BHT, ésta no fue proporcional a la concentración.

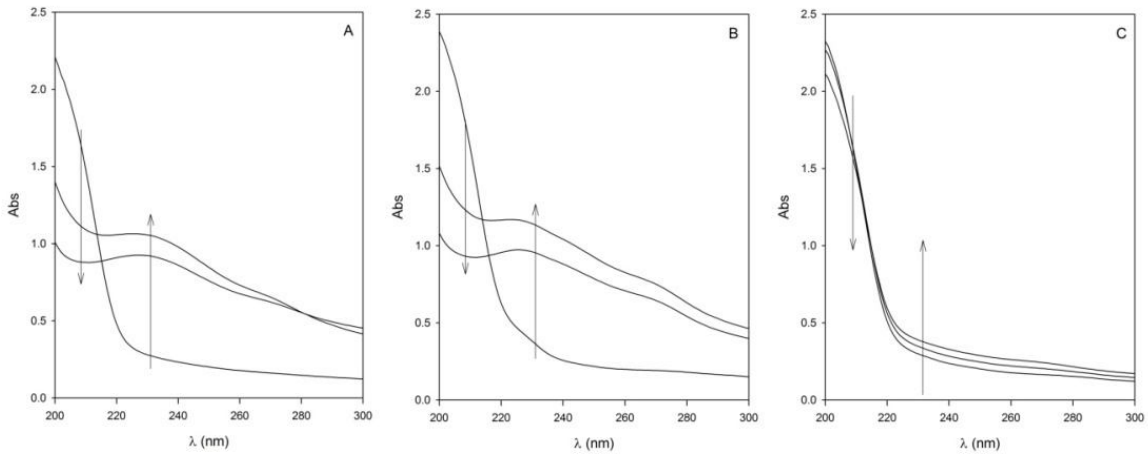
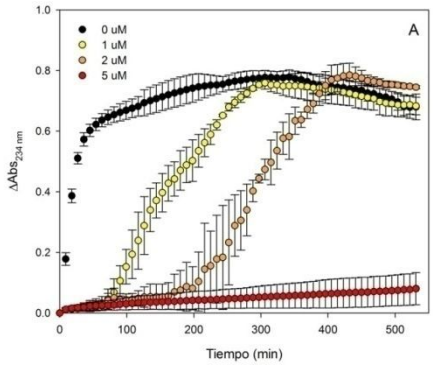


Figura 5.1. Evolución de espectros UV, entre 200 y 300 nm, determinados durante la peroxidación lipídica iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados (0, 4,5 y 9 horas). **A)** Control, **B)** + MLT (5 µM) y **C)** + BHT (5 µM)

Los tiempos de inicio y las velocidades iniciales de reacción no fueron modificados con adición de concentraciones crecientes de MLT (1, 2, 5, 10, 20 µM) (**Figura 5.2.B**), aun cuando se analizaron concentraciones superiores (10 y 20 µM) a las ensayadas con BHT. En presencia de concentraciones crecientes de NAS, 5MTP y 5HO-TRP tampoco se detectó actividad inhibitoria de la peroxidación (**Figuras 5.2. C, D y E**). Si analizamos las velocidades iniciales de reacción en presencia de estas indolaminas se observa una tendencia a aumentar conforme lo hace la concentración, lo que se traduciría en un posible efecto prooxidante. 5HO-TRP 5 µM mostró diferencias estadísticamente significativas de ΔAbs con respecto a los de la curva control (0 µM) manteniéndose por encima de esta curva en el rango de tiempo entre 150 y 400 minutos.



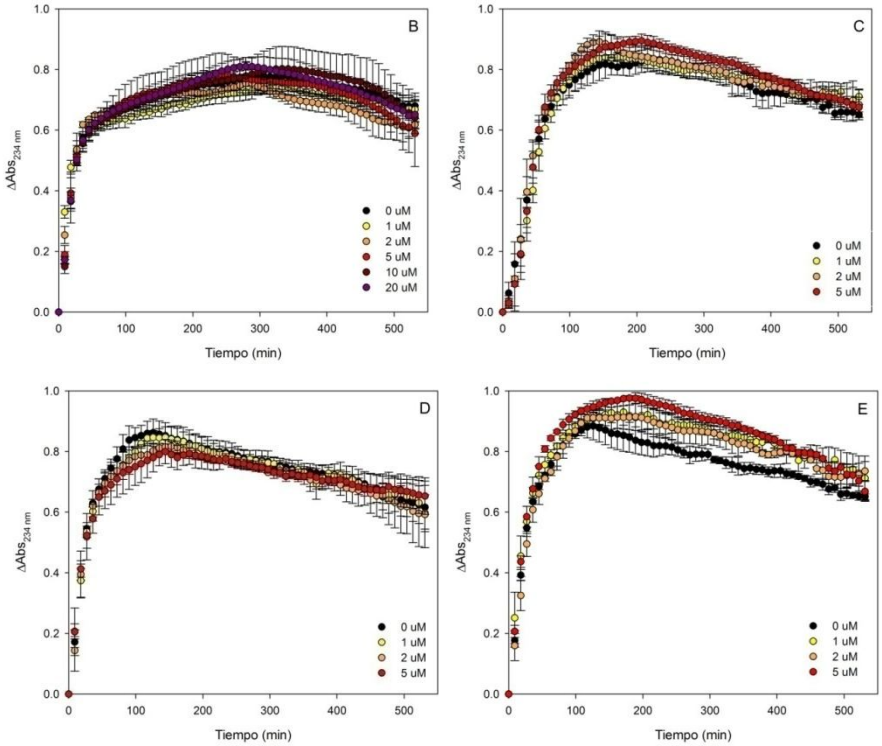


Figura 5.2. Variación de absorbancia a 234 nm en función del tiempo durante la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados de lípidos de retina en presencia de A) BHT, B) MLT, C) NAS, D) 5MTP y E) 5HO-TRP. Cada punto representa x̃ ± SD de 3 experimentos. Donde x̃: promedio y SD: desviación estándar.

Tabla 5.1.Datos cinéticos obtenidos del gráfico de la producción de dienos conjugados en función del tiempo, durante la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados de lípidos de retina en ausencia y presencia de BHT, MLT e indolaminas relacionadas.

		0 µM	1 µM	2 µM	5 µM	10 µM	20 µM
BHT	Veloc. inicial (ΔAbs/min)	0.019	0.003	0.004	ND		
	Fase retardo (min)	0	60	200	≥540		
MLT	Veloc. inicial (ΔAbs/min)	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019
	Fase retardo (min)	0	0	0	0	0	0
NAS	Veloc. inicial (ΔAbs/min)	0.011	0.011	0.013	0.014		
	Fase retardo (min)	0	0	0	0		
5MTP	Veloc. inicial (ΔAbs/min)	0.020	0.020	0.020	0.024		
	Fase retardo (min)	0	0	0	0		
5HO-TRP	Veloc. inicial (ΔAbs/min)	0.020	0.022	0.018	0.024		
	Fase retardo (min)	0	0	0	0		

Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la producción de TBARS durante la peroxidación de liposomas sonicados de lípidos de retina.

La **figura 5.3.A** representa la producción de TBARS en función del tiempo durante la incubación de liposomas sonicados de lípidos de retina con y sin Fe^{2+}. La **figura 5.3.B** muestra la producción de TBARS durante la peroxidación de liposomas en presencia de diferentes concentraciones de BHT. Se observa que todas las concentraciones analizadas fueron igualmente efectivas en inhibir la generación de TBARS, haciendo que los niveles de TBARS sean comparables a los obtenidos en liposomas incubados sin Fe^{2+}. En la **figura 5.4.A** es evidente que MLT no presentó efecto antioxidante a ninguna de las concentraciones analizadas (1, 2, 5, 10 y 20 µM) dado que no hubo diferencias estadísticamente significativas con la curva control (0 µM). Más aún, MLT 20 µM presentó un valor superior al de la curva control a 540 min, con diferencia estadísticamente significativa.

En presencia de diferentes concentraciones de NAS y 5MTP (**Figura 5.4 B** y **C**) no se observaron cambios significativos con respecto a la curva control. 5HO-TRP (**Figura 5.4 D**) no tuvo efecto sobre la peroxidación de liposomas cuando se analizaron las concentraciones 1 y 2 µM. Sin embargo, una concentración de 5 µM mostró aumento significativo de producción de TBARS con respecto al control luego de transcurridos 153 minutos de la reacción.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que MLT, NAS, 5MTP y 5HO-TRP no poseen un efecto antioxidante directo, es decir, no tienen la capacidad de secuestrar los radicales formados durante la reacción de peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas de lípidos de retina.

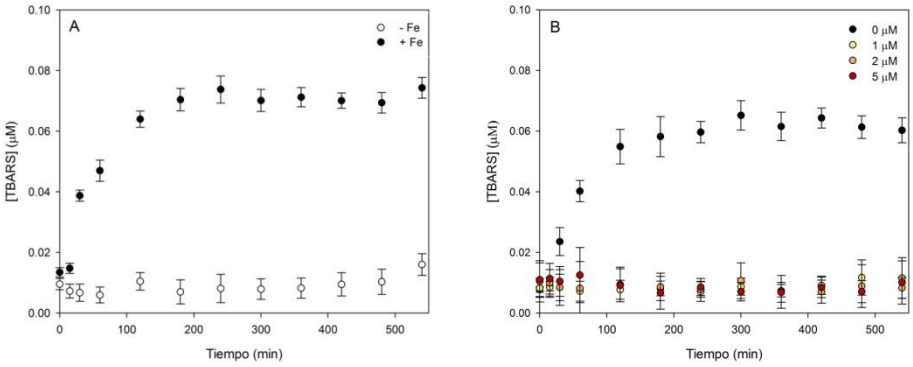


Figura 5.3. Formación de TBARS en función del tiempo, durante la incubación de liposomas sonicados de lípidos de retina en A) ausencia y presencia de Fe^{2+} y B) presencia de Fe^{2+} (C_f= 25 µM) **y diferentes concentraciones de BHT**. Cada

punto representa: $\bar{x} \pm SD$ donde $\bar{x}$: promedio de [TBARS] de 3 experimentos, SD: desviación estándar.

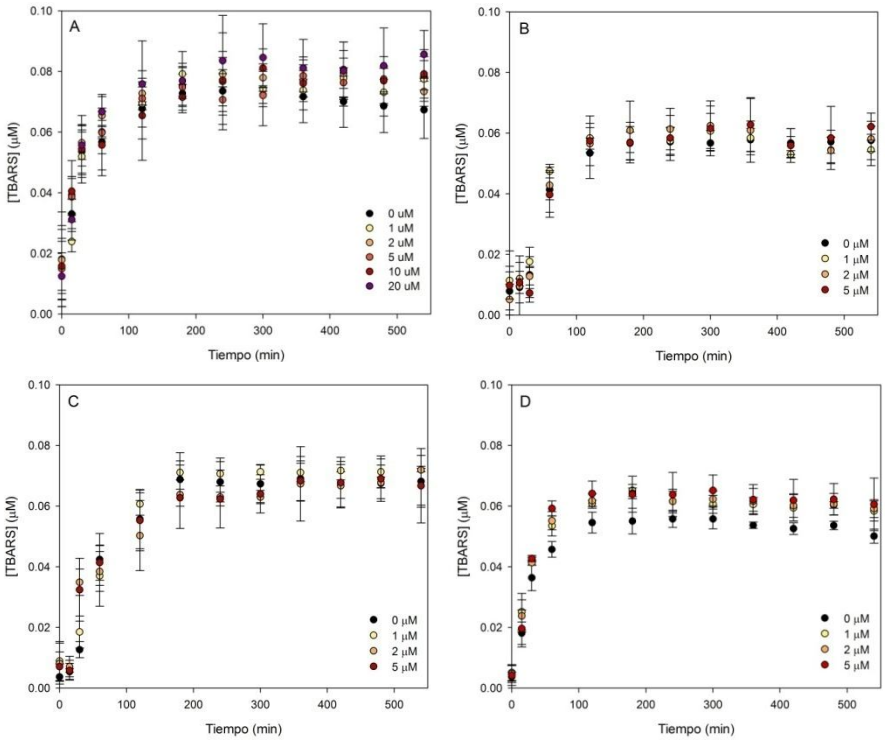


Figura 5.4. Formación de TBARS en función del tiempo, durante la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados de lípidos de retina en presencia de diferentes concentraciones de A) MLT, B) NAS, C) 5MTP y D) 5HO-TRP. Cada punto representa: $\bar{x} \pm SD$ donde $\bar{x}$: promedio de [TBARS] de 3 experimentos y SD: desviación estándar.

Análisis de los cambios en la composición de ácidos grasos durante la peroxidación de liposomas. Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas.

La **figura 5.5** constituye un cromatograma representativo de los metil-derivados de ácidos grasos de retina bovina. Los metil derivados fueron obtenidos por transesterificación con metanol en presencia de BF_3 como catalizador.

Los principales picos identificados correspondieron a los metil derivados de ácido palmítico (16:0), oleico (18:1 n-9), esteárico (18:0), araquidónico (AA, 20:4 n-6) y docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3). En menor proporción se encontraron ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) e isómeros de algunos de los ácidos grasos mayoritarios.

La retina posee un elevado contenido de DHA (25.8 ± 0.6 %), característico de este tejido. Retina posee aproximadamente un 40% de PUFAs y un 60% de saturados y monoetilénicos.

Los picos fueron correctamente separados e identificados por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST.

Los liposomas poseen los mismos ácidos grasos que la retina (**Tabla 5.2**) aunque el proceso de preparación de los mismos determinó diferencias en las proporciones en que éstos se encuentran. Específicamente, se observa una reducción en el contenido porcentual de DHA.

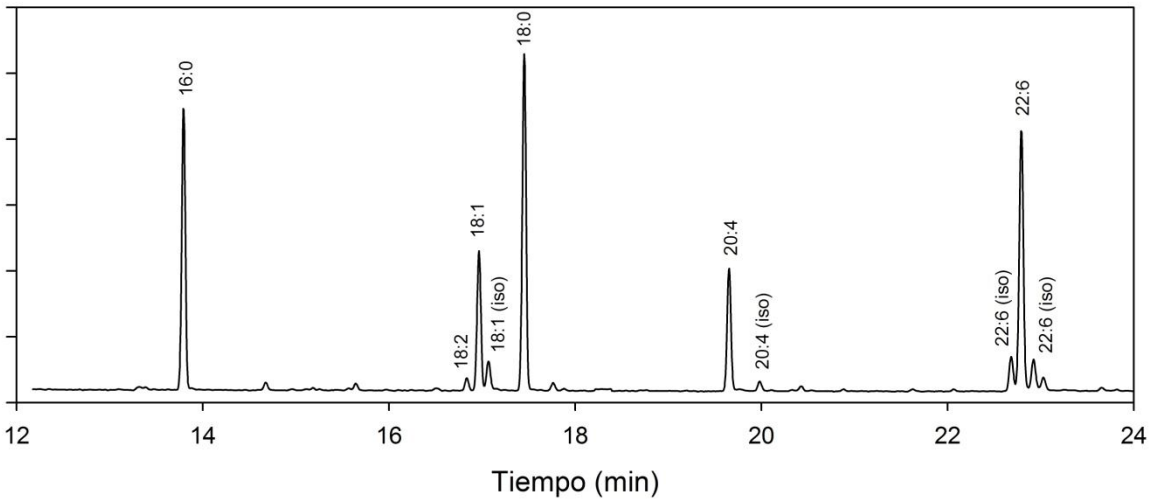


Figura 5.5. Cromatograma representativo de los metil derivados de ácidos grasos de retina. Los compuestos fueron identificados en base a sus espectros de masa.

Todos los PUFAs (LA, AA y DHA) disminuyeron significativamente tras 1 hora de incubación con Fe^{2+}, produciendo consecuentemente un incremento relativo de la composición porcentual de ácidos grasos saturados y monoetilénicos.

La presencia de 5 µM de BHT logró proteger a los PUFAs de la degradación generada por el proceso de peroxidación. Esto se hace evidente ya que el perfil de ácidos grasos de liposomas peroxidados en presencia de BHT no difiere, dentro del error experimental, del control. MLT, NAS, 5MTP y 5HO-TRP ensayados a la misma concentración que BHT no lograron inhibir la degradación de los PUFAs. Los PUFAs disminuyeron drásticamente y el perfil de ácidos grasos obtenidos es similar al de los liposomas peroxidados (control).

Tabla 5.2. Composición porcentual de ácidos grasos de retina y de liposomas sonicados de lípidos de retina. Los liposomas fueron incubados durante una hora en ausencia y presencia de Fe^{2+} (*LS – Fe* y *LS + Fe*) y en presencia de Fe^{2+} junto a BHT y las indolaminas estudiadas.

Ácido graso	Rt (min)	Retina	LS - Fe	LS + Fe	BHT 5 µ	MLT 5 µM	NAS 5 µM	5MTP 5 µM	5HO-TRP 5 µM
16:0	13,34	25.2±0.6	24.0±3.6	39.8±9.2*	25.5±5.7	40.7±2.3*	40.3±0.9*	37.6±0.6*	40.8±5.5*
18:2 n-6	16,37	0.7±0.2	1.2±0.4	ND*	0.8±0.4	0.7±0.3	ND*	0.9±0.3	ND*
18:1 n-9	16,50	10.4±0.1	10.6±2.0	16.5±3.1*	10.5±3.1	18.2±0.7*	17.8±2.3*	17.5±1.1*	19.1±3.6*
18:1 (iso)	16,60	1.7±0.1*	2.3±0.1	3.6±1.4	2.0±1.0	3.5±0.2*	3.9±0.1*	3.3±0.3*	4.3±0.4*
18:0	16,99	22.2±0.2	22.6±1.5	35.8±5.2*	22.2±4.7	33.7±0.4*	34.8±2.2*	33.5±0.2*	35.1±7.8*
20:4 n-6	19,18	9.6±0.1	8.8±1.4	1.2±0.2*	8.8±0.3	1.6±1.0*	1.6±1.4*	1.9±0.6*	ND*
20 :4 (iso)	19,51	0.7±0.1	1.0±0.3	ND*	0.9±0.2	ND*	ND*	ND*	ND*
22:6 (iso)	22,22	1.1±0.1	1.8±0.9	ND*	1.6±0.5	ND*	ND*	0.6±0.1*	ND*
22:6 n-3	22,23	25.8±0.6*	24.3±0.2	1.0±1.0*	24.1±4.7	1.5±0.4*	ND*	2.2±0.5*	ND*
22:6 (iso)	22,46	1.8±0.1	2.4±1.0	1.0±0.3*	2.5±0.1	ND*	ND*	1.4±1.0	ND*
22:6 (iso)	22,56	0.9±0.1	1.0±0.8	ND*	1.1±0.2	ND*	ND*	ND*	ND*
		n=3	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2

Los resultados se expresan como $\bar{x}$ ± SD donde $\bar{x}$: promedio del área porcentual de n experimentos, SD: desviación estándar. Un asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al control (*LS – Fe*) según ANOVA, $p<0.05$. ND: no detectable.

5.4. Discusión

La concentración inusualmente elevada de PUFAs, intensa actividad metabólica y elevada tensión de oxígeno a la que se encuentra expuesta debido a una importante irrigación, sumados a la presencia de pigmentos retinianos que pueden generar ROS cuando son iluminados (Beatty y col, 2000) hacen de la retina un tejido especialmente susceptible a sufrir estrés oxidativo. En el presente capítulo observamos que los PUFAs presentes en los liposomas de lípidos de retina fueron afectados por la peroxidación iniciada por Fe^{2+} disminuyendo hasta casi desaparecer. Una concentración de 5 μM de BHT fue capaz de protegerlos, mientras que MLT y los análogos estructurales no presentaron efecto protector.

Los radicales que dieron inicio a la reacción de peroxidación de liposomas fueron mayoritariamente LO• y LOO• según las reacciones propuestas por Nacka y colaboradores (2001):

(a) Ruptura de LOOH por Fe^{2+} generando radicales alcoxilo (reacciones 1 y 2)

$$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + LO\bullet + OH^- \quad (1)$$

$$LO\bullet + LH \rightarrow L\bullet + LOH \quad (2)$$

y, dado que en las reacciones anteriores se genera Fe^{3+} se considera también la reacción de

(b) escisión de LOOH por Fe^{3+} y subsecuente abstracción de hidrógeno por $LOO^{\bullet}$ (reacciones 3 y 4)

$$Fe^{3+} + LOOH \rightarrow Fe^{2+} + LOO\bullet + H^+ \quad (3)$$

$$LOO\bullet + LH \rightarrow L\bullet + LOOH \quad (4)$$

El principal producto de la glándula pineal, MLT, ha sido descripto como un poderoso antioxidante en diversos tejidos (Catalá, 2007). Posee, además, la ventaja de ser una molécula anfifílica que puede atravesar fácilmente todas las membranas biológicas inclusive la barrera hemato-cerebral (Cabrera y col, 2000). Se ha reportado que MLT previene la formación de cataratas reduciendo el daño oxidativo sobre lípidos y también sobre proteínas (Abe y col, 1994). Aunque el mecanismo de acción no está completamente descripto, algunos investigadores creen que las propiedades antioxidantes de MLT están mediadas por su *capacidad de secuestrar directamente especies reactivas de oxígeno*, como $O_2^{\bullet -}$ y HO• (Tan y col, 2000b), mientras que resulta ineficiente como secuestrador de radicales LOO• (Antunes y

col, 1999; Galano, 2011). Por otro lado, algunos investigadores han sugerido que la acción antioxidante de MLT puede estar mediada por otros mecanismos tales como *estabilización de membranas celulares* (García y col, 1999) y *estimulación de enzimas antioxidantes* (Reiter y col, 2000b). Debido a que en el sistema de estudio utilizado en el presente capítulo no se encuentran enzimas ni genes que puedan ser modulados por MLT, no existe una fuente de formación de radicales HO• o $O_2^{\bullet-}$ y, que MLT y sus análogos estructurales no presentaron acción antioxidante, podemos deducir que el mecanismo de acción antioxidante de MLT *in vivo* no estaría relacionado a su capacidad secuestradora de radicales LOO• y LO• directa. Así, cobra mayor relevancia la hipótesis de que los efectos benéficos de MLT se deben a las acciones indirectas, tales como estimulación de enzimas antioxidantes y modificación de propiedades de membrana.

Además de la simplicidad del modelo, existe otro factor de interés del sistema en estudio como lo es la presencia de hidroperóxidos de ácidos grasos en el medio. Se sabe que los hidroperóxidos lipídicos derivados de fosfolípidos no saturados, glicolípidos y colesterol son intermediarios no radicales de la peroxidación lipídica que provocan perturbaciones en la estructura y función de la membrana con consecuencias citopatológicas. Debido a una mayor polaridad y un mayor tiempo de vida comparados con sus radicales libres precursores, los hidroperóxidos de PUFAs son capaces de migrar desde su sitio de formación a otros más sensibles. En la retina, los hidroperóxidos pueden formarse por oxidación enzimática de PUFAs endógenos como intermediarios de la formación de docosanoides (Bazan y col, 1984). De La Paz y Anderson (1992) postularon que es poco probable que el radical HO• sea el iniciador de la peroxidación en los segmentos externos de los bastones (ROSg). Ellos sugieren que los hidroperóxidos endógenos en presencia de Fe^{2+} forman radicales libres más estables que el radical HO•, lo que resulta en una entrada facilitada de estas especies a la bicapa para iniciar la peroxidación lipídica de las cadenas de ácidos grasos. En nuestro sistema es probable que hidroperóxidos de ácidos grasos se hayan formado durante la preparación de liposomas, aunque hayamos tomado precauciones para proteger a estas membranas de la peroxidación. Por lo tanto, hay un pequeño “pool” de hidroperóxidos en retina que, bajo ciertas condiciones, puede ser una fuente de radicales libres lipídicos y promover la peroxidación de PUFAs, abundantes en membranas retinianas y liposomas hechos a partir de sus lípidos. Dado que el contenido de DHA disminuye cuando los lípidos de retina son transformados en liposomas se sustenta la hipótesis de que durante los pasos de preparación de liposomas se generan hidroperóxidos lipídicos. Estos pueden generar radicales libres que atacan al DHA, altamente susceptible debido a sus 6 dobles enlaces.

El sistema empleado permitió analizar la formación de dienos conjugados y TBARS sin la interferencia que producirían proteínas y otros compuestos presentes en la retina. A través de ambas técnicas se observó el claro efecto antioxidante de BHT. Mientras que MLT, NAS, 5MTP y 5HO-TRP no mostraron actividad antioxidante en este sistema, a pesar que MLT fue ensayada a concentraciones superiores a las de BHT. 5HO-TRP no sólo no mostró actividad antioxidante sino que es posible notar un efecto prooxidante por ambas técnicas.