

Resumen

Los lípidos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con funciones muy importantes en el organismo tales como provisión de energía, constituyentes de membranas celulares y tejidos nerviosos, aislantes térmicos y eléctricos, función hormonal local, etc. La reacción directa entre una molécula de lípido poli-no-saturado y oxígeno molecular se conoce como Peroxidación Lipídica. Esta reacción de deterioro es catalizada por radicales libres (peroxidación no enzimática) o sistemas enzimáticos (peroxidación enzimática). Se produce por oxidación de los enlaces α -metilénicos de los ácidos grasos no saturados que resulta en la formación de lipoperóxidos e hidroperóxidos y, finalmente, fragmentación de la molécula lipídica. Los radicales libres están implicados en el desarrollo de muchas enfermedades tales como aterosclerosis, diabetes, cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades neurodegenerativas como así también en el proceso de envejecimiento. Un antioxidante es una sustancia que, presente en bajas concentraciones comparada con el sustrato peroxidable, previene o retarda la oxidación del mismo. Hay diversas sustancias a las que se les atribuye efecto antioxidante, aunque su efectividad depende de diversos factores tales como la polaridad de los mismos, el sustrato lipídico, pH, temperatura, concentración de antioxidantes y propiedades físicas del sustrato. Debido a esta variedad de factores se observó que algunos antioxidantes retardan la oxidación lipídica bajo ciertas condiciones pero la promueven en condiciones diferentes actuando como prooxidantes. En el presente trabajo de tesis realizamos estudios *in vitro* de peroxidación no enzimática sobre diferentes sustratos lipídicos, con mayor o menor semejanza a membranas biológicas, analizando diferentes prooxidantes y evaluando la actividad antioxidante de diversos compuestos.

En este trabajo de tesis se investigó:

1) El efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la peroxidación lipídica de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3.

La peroxidación de triglicéridos ricos en ácidos grasos poli-no-saturados n-3 disueltos en cloroformo fue analizada por detección de fotoemisión y ensayo de TBARS. La reacción fue iniciada por hidroperóxido de cumeno. En este sistema, hidroxitolueno butilado (BHT), 5HO-triptófano (5HO-TRP) y N-acetilserotonina (NAS) inhibieron la emisión de luz y la producción de TBARS de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, melatonina (MLT) y 5-metoxitriptamina (5MTP) aumentaron la producción de luz y TBARS de una manera dependiente de la concentración. La quimioluminiscencia fue cuantificada a través de las unidades lumínicas relativas (RLUs) totales y se determinó el parámetro IC₅₀. Para 5HO-TRP,

NAS y BHT el valor de este último fue respectivamente 0.7, 6.2 y 9.7 mM. Para evaluar si el aumento de quimioluminiscencia producido por MLT se debe a la producción de N1-acetil, N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) se investigó su presencia por cromatografía en capa delgada (TLC) no encontrándose cantidades detectables del mismo. La actividad secuestradora de radicales de las indolaminas fue evaluada por la técnica de DPPH y los resultados indican que 5HO-TRP, NAS y BHT poseen actividad secuestradora de radicales dependiente de la concentración. Así, el parámetro EC₅₀ para esta técnica obtenido fue 4.1, 4.7 y 8.4 μM respectivamente, mientras que MLT y 5MTP no presentaron actividad secuestradora a las concentraciones estudiadas.

2) El efecto de isómeros conjugados de ácido linoleico (CLAs) sobre la peroxidación lipídica de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3.

Diferentes concentraciones de ácido linoleico (LA), dos de sus isómeros conjugados (CLA c9, t11 y CLA t10,c12) y su metil éster (MLA) disueltos en cloroformo fueron peroxidados con tert butil hidroperóxido (tBHP) como iniciador de reacción. La reacción fue monitoreada por detección de fotoemisión. Los resultados demuestran que ambos isómeros conjugados mostraron aumento de fotoemisión significativa (a 100 y 200 mM) con respecto al control, mientras que LA y MLA no mostraron aumento de emisión de luz significativa a ninguna de las concentraciones analizadas. Estos resultados indican que en este sistema los CLAs son más susceptibles a la peroxidación que LA y MLA. También por fotoemisión se investigó el efecto de CLAs, LA y MLA sobre la peroxidación de triglicéridos ricos en ácidos grasos poli no saturados n-3 disueltos en cloroformo iniciada por tBHP. Ambos CLAs produjeron inhibición significativa de la fotoemisión siendo más efectivo el isómero t10, c12 (100 mM) que el c9, t11 (200 mM). LA y MLA no mostraron efecto inhibidor en este sistema. El ensayo de DPPH fue utilizado para determinar la actividad secuestradora de radicales de LA, MLA y los isómeros conjugados. CLA t10,c12 y c9,t11 reaccionaron con DPPH obteniéndose valores de EC₅₀ de 16,4±0,8 y 16,9±0,9 mM, respectivamente. LA y LAME no presentaron actividad secuestradora de radical DPPH. Estos datos indican que, a diferencia de LA y MLA, los CLAs pueden proteger a los lípidos que contienen ácidos grasos poli-no-saturados de los efectos de los radicales libres. Sin embargo, se deben tener en cuenta las elevadas concentraciones necesarias para este fin.

3) La susceptibilidad a la peroxidación de liposomas de lípidos de retina y el efecto de la sonicación, el medio e iniciador de reacción sobre este sistema.

La retina es un tejido especialmente susceptible al daño oxidativo debido a su elevado contenido en ácidos grasos poli-no-saturados (PUFAs), principalmente ácido docosahexenoico (22:6 n-3). Se sabe que el proceso de peroxidación lipídica participa de numerosos eventos fisiológicos y patológicos de la retina. Para poder comprender aspectos que no pueden ser estudiados directamente en membranas biológicas se puede recurrir al uso de membranas modelo, por ej: liposomas. Para poder evaluar sustancias antioxidantes es necesario obtener un modelo de membranas fácilmente peroxidables, para tal fin se prepararon liposomas sonicados (LS) y liposomas no sonicados (LNS) a partir de lípidos aislados de retinas bovinas. Estos liposomas fueron peroxidados con Fe^{2+} o Fe^{3+} (como iniciadores de reacción) en agua, solución fisiológica o buffer Tris-HCl pH 7,4. El seguimiento de la reacción se realizó por espectrofotometría UV (absorbancia a 234 y 270 nm), para detectar formación de dienos y trienos conjugados, y por ensayo de TBARS. Empleando Fe^{2+} como iniciador de reacción, tanto LS como LNS en buffer produjeron TBARS tras 60 min de iniciada la reacción, este tiempo fue de 30 min en agua y 0 min en solución fisiológica. La mayor y más rápida formación de dienos y trienos conjugados se observó en solución fisiológica mientras que la mínima producción se obtuvo en buffer. Empleando Fe^{3+} como iniciador, para ambos tipos de liposomas, la producción de TBARS fue más lenta en buffer que en los demás medios y la producción de dienos y trienos conjugados también fue la menor en buffer. Los resultados demuestran que: LS fueron más susceptibles a la peroxidación que LNS; solución fisiológica fue el medio en el que la peroxidación lipídica fue más eficiente, siguiendo en este orden agua y, en último lugar, buffer Tris-HCl; Fe^{2+} es un iniciador de peroxidación lipídica mucho más eficiente que Fe^{3+} cualquiera sea el medio acuoso de reacción o el tipo de liposoma empleado. En resumen, la peroxidación depende del tipo de liposoma, iniciador y medio de reacción.

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

Melatonina es una hormona que ha demostrado amplia actividad antioxidante *in vivo* aunque su actividad como secuestrador directo de radicales no está muy bien definida. En esta tesis investigamos la capacidad antioxidante de melatonina y de algunos de sus análogos estructurales en un sistema de liposomas sonicados preparados con lípidos de retina bovina. La reacción fue iniciada por Fe^{2+} empleando agua como medio de reacción. La actividad antioxidante de melatonina (MLT), N-acetilserotonina (NAS), 5HO-triptófano (5HO-TRP) y 5 metoxitriptamina (5MTP) fue comparada con la de hidroxitolueno butilado (BHT), seleccionado como referencia por su conocido y elevado poder antioxidante. La reacción de peroxidación

fue monitoreada por determinación de dienos conjugados y ensayo de TBARS. Tras la adición de Fe²⁺ al sistema de liposomas la formación de dienos conjugados fue inmediata. En presencia de diferentes concentraciones de BHT, el inicio de la formación de dienos conjugados fue retardado y la velocidad de formación fue disminuida. Sin embargo, estos parámetros no fueron modificados en presencia de MLT y demás indolaminas. La formación de TBARS fue inhibida por todas las concentraciones de BHT empleadas. MLT y las indolaminas analizadas no lograron disminuir la formación de TBARS. Mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) se analizaron los perfiles de ácidos grasos de retina y de los liposomas preparados con sus lípidos, antes y después de ser peroxidados, en presencia y ausencia de BHT, MLT o las indolaminas estudiadas. Los ácidos grasos poli-no-saturados (PUFAs) disminuyeron significativamente después de una hora de incubación con Fe²⁺ hasta casi desaparecer. La presencia de BHT protegió a los PUFAs de la peroxidación mientras que MLT y las indolaminas no presentaron efecto protector alguno. Los resultados obtenidos por las diferentes técnicas utilizadas son consistentes y sustentan la hipótesis de que MLT y algunos de sus análogos estructurales no poseen actividad antioxidante *directa* en este sistema modelo.

Summary

Lipids are a heterogeneous group of compounds with important body functions such as: an energy source, cell membranes and nerve tissues constituents, thermal and electrical insulators, local hormone function, etc. The direct reaction between a polyunsaturated lipid molecule and molecular oxygen is known as lipid peroxidation. This degradation reaction is catalyzed by free radicals (non-enzymatic peroxidation) or enzymatic systems (enzymatic peroxidation). It occurs by oxidation of unsaturated fatty acid α -methylene bonds producing lipid and hydro peroxides and, finally, lipid molecule fragmentation. Apart from playing a major role in the aging process, free radicals are involved in the development of many diseases, namely atherosclerosis, diabetes, cancer, chronic inflammatory and neurodegenerative diseases. An antioxidant is a substance whose low concentrations levels, as compared to those of oxidizable substrate, prevent or slow its oxidation. Many substances have an antioxidant effect. Nevertheless, their effectiveness depends on various factors such as: polarity, the lipid substrate, pH, temperature, concentration of antioxidants and physical properties of the substrate. Due to this variety of factors, it was noted that while some antioxidants delay lipid peroxidation others act as pro-oxidants. In this thesis we studied *in vitro* non enzymatic lipid

peroxidation of different lipid species, in a more or less similar way to biological membranes, analyzing different pro oxidants and assessing antioxidant activity of various compounds.

In this thesis we investigated:

1) The effect of melatonin and related indoleamines on the lipid peroxidation of triglycerides with high content of n-3 polyunsaturated fatty acids.

The lipid peroxidation of triglycerides rich in polyunsaturated fatty acids was investigated by photoemission and TBARS assay. The reaction was initiated by cumen hydroperoxide (CHP). In this system, butylated hydroxitoluene (BHT), 5HO tryptophan (5HO-TRP) and N-acetylserotonin (NAS) inhibited light emission and TBARS production in a concentration dependent way. However, melatonin (MLT) and 5-methoxytryptamine (5MTP) enhanced light emission and TBARS production in a concentration dependent manner. Chemiluminescence was quantified by total Relative Luminic Units (RLUs) and IC₅₀ parameter. IC₅₀ value to 5HO-TRP, NAS and BHT was 0.7, 6.2 and 9.7 mM. The possible formation of N (1)-acetyl-N (2) formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) during lipid peroxidation of triglycerides rich in PUFAs in the presence of melatonin was also analyzed by thin layer chromatography (TLC). The free-radical scavenging activity of the indoleamine derivatives was also analyzed by the DPPH method, and the results indicate that 5OH-TRP, NAS and BHT exhibited a dose-dependent free-radical scavenging ability at all tested concentrations. The EC₅₀ value for these compounds was 4.1, 4.7 and 8.4 μM respectively, while MLT and 5MTP did not show any radical scavenger activity.

2) The effect of conjugated linoleic acid (CLAs) isomers on lipid peroxidation of triglycerides rich in fatty acids n-3.

Different concentrations of linoleic acid (LA), two of its conjugated isomers (c9, t11 and t10, c12) and methyl linoleate (MLA) dissolved in chloroform were peroxidized with tert-butyl hydroperoxide (tBHP). The reaction was monitored by chemiluminescence detection. The results showed that both conjugated linoleic acid isomers enhanced photoemission with respect to control, while LA and MLA did not enhance light emission significantly. These results indicate that CLAs are more susceptible to lipid peroxidation than LA and MLA. Also, by means of photoemission, we investigated the effect of CLA, LA and MLA on lipid peroxidation of triglycerides rich in polyunsaturated fatty acids n-3 dissolved in chloroform initiated by tBHP. Both CLAs inhibited photoemission significantly and the isomer t10, c12 (100 mM) was more

efficient than c9, t11 (200 mM). LA and MLA did not show any protection in this system. DPPH assay was used to determine free radical scavenger activity of LA, MLA and conjugated isomers. CLA t10, c12 and c9, t11 reacted with DPPH giving EC₅₀ values of 16,4±0,8 y 16,9±0,9 mM, respectively. LA and MLA did not present activity against DPPH. These results show that CLAs can protect lipids against free radical action but LA and MLA cannot. However, we must take into account the high effective concentrations used.

3) The susceptibility of sonicated liposomes made of retinal lipids to lipid peroxidation: effect of sonication, medium and initiator.

The retina is a tissue especially susceptible to lipid peroxidation due to its high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly docosahexaenoic acid (22:6 n-3). It is known that lipid peroxidation is involved in many pathological and physiological retinal events. Model membranes can be used to address issues that otherwise cannot be directly studied in biological membranes, i.e.: liposomes. Obtaining an easily peroxidable system is necessary to analyze antioxidant activity in those model membranes. To achieve this goal we prepared sonicated (SL) and no-sonicated (NSL) liposomes made of retinal lipids. These liposomes were peroxidized by Fe²⁺ and Fe³⁺ in water, NaCl 0.15 M or buffer Tris-HCl pH 7.4. Conjugated dienes and trienes, determined by absorption at 234 and 270 nm respectively and TBARS were measured as a function of time. Using Fe²⁺ as reaction initiator, SL and LNS in buffer produced TBARS after 60 min, in water this time was 30 min and in NaCl 0.15 M was 0 min. The highest and fastest dienes and trienes production was observed in NaCl 0.15 M, and the lowest in buffer. With Fe³⁺ as initiator, both liposomes presented the slowest TBARS production in buffer as it was the case for dienes and trienes production. These results show that: SL were more susceptible to lipid peroxidation than NSL, NaCl 0.15 M was the medium where the lipid peroxidation was the most efficient and Fe²⁺ was a better initiator than Fe³⁺. Summarizing, lipid peroxidation depends on: liposome type, reaction initiator and reaction medium.

4) The effect of melatonin and related indoleamines on lipid peroxidation initiated by Fe²⁺ of sonicated liposomes made of retinal lipids.

Melatonin is a hormone with a high *in vivo* antioxidant power although its activity as a direct free radical scavenger is not very well defined. In this thesis we investigated the antioxidant activity of melatonin and some of its structural analogues in a system of sonicated liposomes made of retinal lipids. The reaction was initiated by Fe²⁺ in water as a reaction medium. The antioxidant activity of melatonin (MLT), N-acetylserotonin (NAS), 5HO-

tryptophan (5HO-TRP) and 5-methoxytryptamine (5MTP) was compared to that of butylated hydroxytoluene (BHT) chosen because of its high well-known antioxidant power. The reaction was assessed by detection of conjugated dienes and TBARS. After addition of Fe^{2+} , diene production started immediately. Different concentrations of BHT delayed the start of conjugated diene production. However, this parameter was not modified by MLT or the other indoleamines. TBARS production was inhibited by all concentrations of BHT. MLT and indoleamines were unable to prevent TBARS formation. By gaseous chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) we analyzed fatty acids profiles of retinal lipids and liposomes made of retinal lipids, before and after Fe^{2+} -peroxidation and with and without BHT, MLT and indoleamines. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) diminished significantly after one hour of incubation with Fe^{2+} until they almost disappeared. BHT protected PUFAs against peroxidation while MLT and indoleamines presented no protective effect. All these results support the hypothesis that MLT and some of its structural analogues do not show direct antioxidant activity in this model system.

Publicaciones originadas durante el periodo de formación doctoral

- Natalia Fagali, Angel Catalá. 2007. The effect of melatonin and structural analogues on the lipid peroxidation of triglycerides enriched in ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*. 81: 299-305.

IF=2.661



- Natalia Fagali, Angel Catalá. 2008. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH• techniques. *Biophysical Chemistry*. 137: 56–62.

IF=2.254



- Natalia Fagali, Angel Catalá. 2009. Fe^{2+} and Fe^{3+} initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chemistry and Physics of Lipids*. 159: 88–94.

IF= 2.861



- Natalia Fagali, Angel Catalá. 2011. Melatonin and structural analogues do not possess antioxidant properties on Fe^{2+} -initiated peroxidation of sonicated liposomes made of retinal lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 164: 688-695.

IF= 2.861

