Índice

Página

Índice 5

Reconocimientos 8

Agradecimientos 9

Abreviaturas 11

Resumen- Summary 16

Publicaciones 23

*1. **CAPÍTULO 1.** Introducción general y objetivos.* 24

1.1. Consideraciones generales 25

1.2. Lípidos 25

1.3. Radicales libres 28

1.4. Peroxidación lipídica 33

1.4.1. Peroxidación lipídica no enzimática 33

1.4.2. Peroxidación lipídica enzimática 37

1.5. Antioxidantes 38

1.5.1. Antioxidantes endógenos y dietarios 38

1.5.2. Modo de acción 39

1.5.2.1. Antioxidantes primarios o preventivos 39

1.5.2.2. Antioxidantes secundarios o cortadores de cadena (“chain-breaking”) 40

1.5.2.3. Antioxidantes terciarios o reparadores 41

1.5.3. Compuestos cuya actividad antioxidante se estudió en la presente tesis 41

1.5.3.1. Melatonina e indolaminas relacionadas 41

1.5.3.2. Familia de isómeros conjugados del ácido linoleico (CLAs) 50

1.6. Objetivos 54

*2. **CAPÍTULO 2.** Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la peroxidación lipídica de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3.* 56

2.1. Introducción 57

2.2. Materiales y métodos 60

2.2.1. Materiales 60

2.2.2. Métodos y técnicas 60

2.2.2.1. Determinación de quimioluminiscencia 60

2.2.2.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 61

2.2.2.3. Determinación de actividad secuestradora de radicales mediante ensayo de 1, 1, difenil-1-picrilhidracil (DPPH) 61

2.2.2.4. Análisis de formación de AFMK durante la peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 en presencia de melatonina 62

2.2.2.5. Expresión de resultados 62

2.3. Resultados 63

2.4. Discusión 70

3. ***CAPÍTULO 3.*** *Efecto de isómeros conjugados de ácido linoleico (CLAs) sobre la peroxidación lipídica de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3.* 75

3.1. Introducción 76

3.2. Materiales y métodos 78

3.2.1. Materiales 78

3.2.2. Métodos y técnicas 78

3.2.2.1. Determinación de peroxidación lipídica de ácido linoleico libre, metil linoleato, CLA c9, t11 y CLA t10, c12 por detección de quimioluminiscencia 78

3.2.2.2. Determinación de peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3por detección de quimioluminiscencia. Efecto de CLAs, LA y MLA 79

3.2.2.3. Determinación de actividad secuestradora de radicales de CLAs, LA y MLA por ensayo de DPPH. 79

3.2.2.4. Expresión de resultados 79

3.3. Resultados 80

3.4. Discusión 86

4. ***CAPÍTULO 4.*** *Estudio de la susceptibilidad a la peroxidación de liposomas de lípidos de retina. Efecto de sonicación, medio e iniciador de reacción.* 88

4.1. Introducción 89

4.2. Materiales y métodos 93

4.2.1. Materiales 93

4.2.2. Métodos y técnicas 93

4.2.2.1. Obtención de homogeneizados de retina bovina 93

4.2.2.2. Extracción de lípidos 93

4.2.2.3. Preparación de liposomas 94

4.2.2.4. Determinación de tamaño de liposomas por dispersión dinámica de luz (Dinamic Light Scattering, DLS) 94

4.2.2.5. Determinación espectrofotométrica de dienos y trienos conjugados 95

4.2.2.6. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 95

4.3. Resultados 96

4.4. Discusión 103

5. CAPÍTULO 5.*Efecto de melatonina e indolaminas relacionadas sobre la peroxidación iniciada por Fe^{2+} de liposomas sonicados de lípidos de retina* 107

5.1. Introducción 108

5.2. Materiales y métodos 110

5.2.1. Materiales 110

5.2.2. Métodos y técnicas 110

5.2.2.1. Obtención de homogeneizados de retina bovina 110

5.2.2.2. Extracción de lípidos 110

5.2.2.3. Preparación de liposomas 110

5.2.2.4. Determinación espectrofotométrica de dienos conjugados 110

5.2.2.5. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 111

5.2.2.6. Preparación de metil derivados de ácidos grasos (FAMEs) 112

5.2.2.7. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas 112

5.3. Resultados 113

5.4. Discusión 120

CONCLUSIONES 123

ANEXO. *Técnicas y métodos* 127

Espectrofotometría UV-Visible 129

Quimioluminiscencia 130

Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 132

Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) 134

Ensayo de DPPH 137

BIBLIOGRAFÍA 139

Reconocimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y a la Universidad Nacional de la Plata, por brindar formación PÚBLICA y GRATUITA de excelencia.

A INIFTA, en las personas de su ex Director Dr. Eduardo Castro y actual Director Dr. Roberto Salvarezza, por permitirme desarrollar el trabajo de tesis en esta institución.

A ANPCyT, CIC (Pcia. de Bs. As) y CONICET por financiar los proyectos de investigación y becas de estudio necesarios para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Mabel Tomás y su grupo de trabajo (CIDCA, Dpto. de Qca., Fac. de Cs. Exactas, UNLP – CONICET), por permitirme utilizar equipos e instalaciones tantas veces como fueron necesarios.

Al Dr. José Luis Alessandrini (IFLP, Dpto. Física, UNLP – CONICET) por su valiosa colaboración empleando la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Al Dr. Pedro Carriquiriborde (CIMA, Dpto. Qca, Fac. de Cs. Exactas, UNLP) por permitirme utilizar equipamiento e instalaciones numerosas veces.

A la Dra. Marita Miríffico, Dra. Mónica Mele, Dr. Andrés Thomas y sus grupos de trabajo, por haber colaborado desinteresadamente en diversas ocasiones y por el préstamo de equipamiento o laboratorios.

Agradecimientos

A Dios, por dar las oportunidades que después nosotros aprovechamos (o no).

A Ángel, mi director, por su infinita paciencia, su generosidad, sus palabras de aliento, su confianza. Por muchas veces haber sido un poco amigo y un poco padre.

Al "Negro", mi papá, por haberme enseñado que la honestidad no es sólo una palabra sino una forma de vida, por haberme dicho que yo "podía ser lo que quiera ser". Por haberme dado una vida feliz.

A Griselda, mi mamá, por ser mi fortaleza incondicional, por haberme dejado volar en libertad dándome raíces y alas, por su integridad, su valentía y su eterno amor.

A Nico, Fede y Juanma, mis hermanos (los más lindos del mundo), por el "aguante", los chistes, las risas, las charlas… Por estar en todo momento

A mis abuelos, tíos y primos, porque son parte de mi vida y de lo que soy. Por su cariño y "aguante".

A mi abuela Pepa, por tanto amor y por las recetas de cocina… (¡Te extraño tanto!).

A "Joshela", mi ángel de la guarda, porque siempre está, por su cariño infinito, porque ocupa un lugar muy importante en mi vida y en mi corazón… A su hermosa familia.

A los hermanos que me dio la vida, mis amigos, Barby (y su familia), Vero y Lean (mis compinches en todo momento), Marcos y Mariana (por estar en las buenas y en las malas), Vane y Guille (por hacer de cada instante junto a ellos un momento inolvidable), Darío (porque aprendí mucho de él), Pablo, Walde y Enry (mis "hermanitos" del 4to piso) y las hermosas mujeres que los acompañan, María Elisa (por ser tan genial), Martín (tan excelente persona como amigo y bailarín), Sergio y "el hermano" Massarutti (por la buena onda y predisposición), Yeimi, Jacky, Silvina, Mariela, Rita, Carlita, Laura y Tama (por la buena onda), Chufo, Tomás, Miguel, Gabriel, y Pablo (por los almuerzos desopilantes), Pame (por estar en todo momento), Rosario y familia (por el gran cariño mutuo), Seba (por ser mi profe, mi amigo y mi psicólogo más de una vez), Damián (por su ayuda incondicional), Esther (por

escucharme y bancarme ¡tantas veces!), a Dora Rossi (por su ayuda siempre que la necesité).

A toda la gente del 4to piso del INIFTA, por las charlas de pasillo, por los asados y todos los buenos momentos.

A Santi… porque siempre estuvo, porque está y porque deseo que siempre esté.

A Guille Varela y Santi Frías, mis hermanos del alma que ya no están y que desde alguna nube comparten mis alegrías y tristezas… como si nunca se hubieran ido.

A Vero, Ana, Carla, Flaca, Any, Marita, Mariano, Marcos V, Marcela, Diego, Milvia, Yany, Carlitos, Marcos M, Juan, y Vale, mis amigos-hermanos de la secundaria, por ser parte fundamental de lo que fui, soy y seré.

A Flore, Roly, Edgardo, Hugo, Ñato y Martín, mis amigos del barrio, por la grandeza de la amistad simple y eterna.

A Nico, porque sin su "sí" generoso hoy no habría llegado hasta aquí. Por haber sido parte importante de este camino. A su familia.

A Belén, Luciana, Gaby, Negra, Tano, Sonia, Guille, Pepo, Vero, Nico W, Gaba y Maru, mis amigos de Santa Fe, por haber hecho de esos años una de las mejores etapas de mi vida y por seguir estando.

A mis compañeros de la Cátedra de Química General e Inorgánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, por los buenos momentos vividos.

A toda la "familia" del INIFTA por haberme hecho sentir una más desde el primer día.

A mi amada Añatuya y su gente que me da fuerzas y siempre me invita a volver al lugar de donde soy.

Abreviaturas

% $DPPH_{rem}$	Porcentaje de DPPH remanente
%p/v	Porcentaje peso en volumen
$\bar{x}$	Promedio
°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
µM	Micromolar
$^1O_2$	Oxígeno singlete
5HO-TRP	5-hidroxitriptófano
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
5MTP	5-metoxitriptamina
A•	Radical antioxidante
Abs	Absorbancia
ABTS	2,2´-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A_f	Absorbancia final
AFMK	N1-acetil, N2-formil-5-metoxikinuramina
AH	Antioxidante
ALA	Ácido α-linolénico
A_o	Absorbancia inicial
AOCS	Del inglés: *American Oil Chemist´s Society*
Apo C III	Apolipoproteína C III
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BDE	Energía de disociación de enlace (del inglés: *Bonding dissociation energy*)
BHT	Hidroxitolueno butilado
C20	n-eicosano
CAT	Catalasa
C_f	Concentración final
CHP	Hidroperóxido de cumeno (hidroperóxido de isopropilbenceno)

CLA	Ácido linoleico conjugado (del inglés: *conjugated linoleic acid*)
CLA c9, t11	Isómero conjugado de ácido linoleico cis 9, trans 11
CLA t10, c12	Isómero conjugado de ácido linoleico trans 10, cis 12
Cm	Centímetros
col	Colaboradores
COX	Enzima ciclooxigenasa
CuZnSOD	CuZn- Superóxido dismutasa
DHA	Ácido docosahexenoico
DLS	Dispersión de luz dinámica (del inglés: *dinamic light scattering*)
DO	Densidad óptica
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracil
EC_{50}	Concentración efectiva 50
EEUU	Estados Unidos
EPA	Ácido eicosapentenoico
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ESR	Resonancia de espín electrónico
ETC	Cadena de transferencia de electrones (del inglés: *electron transfer chain*)
etc.	Etcétera
eV	Electronvolt
FOX	Ensayo de oxidación con Fe^{2+} en naranja de xilenol
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GC – MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
GPx	Glutatión peroxidasa
GRd	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión
HHE	Hidroxihexenal
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferasa
HNE	Hidroxinonenal
HO•	Radical hidroxilo
HOO•	Radical hidroperoxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50

iso	Isómero
kHz	Kilohertz
k_n	Constante de velocidad de la etapa “n”
L•, PUFA•	Radical lipídico
LA	Ácido linoleico
LH	Lípido
LNS	Liposomas no sonicados
LO	Enzima lipooxigenasa
LO*	Cetona lipídica activada
LO•, PUFA-O•	Radical alcoxilo lipídico
LOO•, PUFA-OO•	Radical peroxilo lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LS	Liposomas sonicados
M	Molaridad
m/z	Relación masa/carga
M^+	Ión molecular
MAO	Monoaminooxidasa
máx.	Máximo
MDA	Malondialdehído
MIH	Factor inhibidor de melanocitos
min	Minutos
ml	Mililitros
MLA	Metil linoleato
MLT	Melatonina
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MnSOD	Mn-Superóxido dismutasa
mW	Miliwatts
n	Número de experimentos
N	Normalidad
NAS	N-acetilserotonina
NAT	N-acetiltransferasa

ND	No determinado
NIST	Del inglés: *National Institute of Standards and Technology*
NO•	Óxido nítrico
nm	Nanómetros
Ø	Diámetro
$ONOO^-$	Ión peroxinitrito
PI	Índice de polidispersidad
PMHC	Pentametilhidroxicromano
PNR	Productos no radicales
PPAR-α	Receptor activado por proliferadores peroxisomales.
PUFA-H	Ácido graso poli-no-saturado (explicitando el H a perder)
PUFAs	Ácidos grasos poli-no-saturados
PUFAs n-3	Ácidos grasos poli-no-saturados de la familia n-3
Rh	Radio hidrodinámico
RLUs	Unidades lumínicas relativas (del inglés: *relative luminic units*)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (del inglés: *reactive nitrogen species*)
ROO•	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés: *reactive oxygen species*)
ROSg	Segmentos externos de bastones (del inglés: *rod outer segments)*
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
seg	Segundos
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (del inglés: *thiobarbituric reactive substances*)
tBHP	Tert butil hidroperóxido
Tg PUFAs n-3	Triglicéridos ricos en ácidos grasos poli-no-saturados de la familia n-3
TLC	Cromatografía en capa delgada (del inglés: *thin layer chromatography*)
TRP	Triptófano
TVA	Ácido *trans*-vaccénico
UV	Ultravioleta

UV-VIS	Ultravioleta-visible
v/v	Volumen/volumen
V_f	Volumen final
Vit.	Vitamina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés: *very low density lipoprotein*)
w	Velocidad de reacción
W	Watts
X•	Radical X
XH	Iniciador no radical
ΔAbs	Cambio de absorbancia
Φ	Eficiencia cuántica de luminiscencia