

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**PEROXIDACION DE LIPIDOS, SIGNIFICADO  
BIOQUIMICO, FARMACOLOGICO Y BIOLOGICO**

**REYES DIAZ TREJO**

**LUZ MARIA DE L. TREJO VILLASEÑOR**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1 9 7 9**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB TESIS 1979  
ABO M.C. 102  
FECHA \_\_\_\_\_  
PRQC \_\_\_\_\_  
S \_\_\_\_\_



PRESIDENTE: IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA

VOCAL : MARIA DEL CONSUELO HIDALGO Y MONDRAGON

SECRETARIO: PAULINA CASTRO ARDON

1er. VOCAL: TERESA COPPOLA FERNANDEZ

2o. VOCAL: EZEQUIEL MURILLO GARCIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

CENTRO MEDICO NACIONAL IMSS

REYES DIAZ TREJO

LUZ MARIA DE LOURDES TREJO VILLASEÑOR

ASESOR DEL TEMA QFB. MARIA DEL CONSUELO HIDALGO Y MONDRAGON

SUPERVISOR TECNICO DR. GUSTAVO MARTINEZ ZEDILLO

AI DOCTOR GUSTAVO MARTINEZ ZEDILLO.

por su valiosa ayuda, para la elaboración de este trabajo y por habernos transmitido sus conocimientos, que son un ejemplo para seguir adelante y poder confrontar cualquier problema que se presente.

A LA MEMORIA DE MI PADRE:

Quien con su ejemplo me  
guiará toda la vida.

A MI MADRE Y MIS HERMANOS:

Por su ayuda, apoyo y  
cariño que me brindaron.

A MIS AMIGOS CON AFECTO:

A MIS MAESTROS:

LUZ MARIA

A MIS PADRES:

Con cariño, admiración y  
respeto.

A MIS HERMANOS:

Con amor.

A LA UNIVERSIDAD:

Por haberme permitido  
salir adelante.

ESPECIALMENTE PARA IRMA:

como un aliciente para  
que siga y salga siem--  
pre adelante.

REYES

"PEROXIDACION DE LIPIDOS, SIGNIFICADO BIOQUIMICO,  
FARMACOLOGICO Y BIOLOGICO"

T E M A R I O  
= = = = =

- I.- ESTRUCTURA MOLECULAR DEL OXIGENO
- II.- ESTRUCTURA MOLECULAR DEL FIERRO
- III.- RADICALES LIBRES
- IV.- PEROXIDACION
- V.- ENZIMAS QUE CONTROLAN LA PEROXIDACION
- VI.- ALTERACIONES DE LAS MEMBRANAS
- VII.- VITAMINA E EN LA LIPOPEROXIDACION
- VIII.- ENVEJECIMIENTO CELULAR
- IX.- EFECTO DE LAS DROGAS EN LA PEROXIDACION
- X.- C O N C L U S I O N E S
- XI.- B I B L I O G R A F I A.

## I N T R O D U C C I O N .

Desde hace tiempo, al hombre le ha intrigado las causas por las cuales uno envejece muy rápido. Se piensa que esto se debe a lesiones que ocurren en las células y que repercuten en los tejidos y órganos.

En investigaciones realizadas recientemente, se ha visto que se producen "partículas" llamadas radicales libres, las cuales son generadas principalmente por acción de la luz solar sobre el agua o sobre el oxígeno, formándose especies muy reactivas que van a provocar reacciones en cadena y realizar una peroxidación, la cual se va aumentando si hay metales como fierro, cobre, etc.

Los radicales libres actúan sobre los lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos (DNA, RNA), ocasionando graves lesiones a las células tanto en su corteza, como en el material genético, lesiones como cáncer, amiloidosis, hipertensión, enfermedades pulmonares, etc. y por esta acción se cree que el organismo envejezca.

El organismo está expuesto a sufrir alteraciones degenerativas y procesos patológicos, por la presencia de estos ra-

dicales libres, pero existen ciertas sustancias, las cuales - van a inhibir su acción y evitar que se produzca un desencadenamiento de estos radicales; estas sustancias son la vitamina E (alfa-tocoferol) y la vitamina C (ácido ascórbico) que son antioxidantes naturales: o bien por las enzimas propias - del organismo (Superoxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa y Catalasa) que ayudan a la protección de todos los agentes toxicos (radicales), pero si el daño es producido, la actividad - de las enzimas se verá disminuida al igual que las defensas - inmunológicas, de tal forma que los radicales libres actuaran libremente en todo el organismo agotando todas las reservas energéticas hasta que llega el punto crítico, la muerte.

## ESTRUCTURA MOLECULAR DEL OXIGENO.

El oxígeno se encuentra en estado libre como gas (21% en volumen atmosférico); con fórmula molecular  $O_2$ , incoloro, inodoro, insípido, poco soluble en agua y soluble en aceite, importante en procesos biológicos (respiración), muy activo, -- porque se combina con todos los elementos, excepto los gases nobles, más denso que el aire y tiene tres isótopos:  $^{18}O$ ,  $^{17}O$  y  $^{16}O$ .

### Propiedades del Oxígeno.

Número atómico	-----	8
Peso atómico	-----	16.00 g/mol
Densidad a 0 °C	-----	1.4290 g/l
Punto de fusión	-----	-218.9°C
Punto de ebullición	-----	-183 °C
Electronegatividad	-----	3.5 (Escala de Pauling)
Momento dipolar	-----	0
Radio covalente	-----	0.74 Å

El oxígeno forma una molécula diatómica ( $O_2$ ), es paramagnética porque presenta dos electrones sin aparear. A altas temperaturas (de 300°C) reacciona fácilmente con la mayoría de los elementos (oxidación), produciendo desprendimiento de calor y de luz.

Los dos electrones con mayor energía del oxígeno en estado basal se encuentran en los orbitales  $\pi$  (pi) degenerados -- (Teoría de Orbitales Moleculares). El oxígeno molecular contiene diez electrones, en cinco orbitales moleculares formando pares y dos electrones periféricos con spin paralelo en los orbitales  $\pi^*$  ( $\pi^*$ ).

El oxígeno presenta un estado de excitación que se designa como oxígeno singulete y es diamagnético (electrones con -- spin opuesto), se designa como  $\Delta gO_2$  y  $\Sigma O_2$ , en el primero, el momento angular está orientado en la misma dirección y en un mismo orbital, los dos electrones con su spin opuesto; en el segundo, el momento angular es opuesto y los dos electrones están en diferente orbital con spin opuesto de acuerdo al siguiente diagrama:

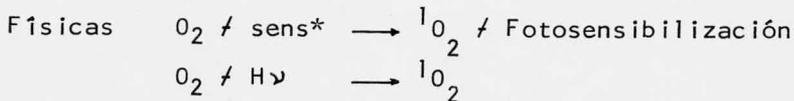
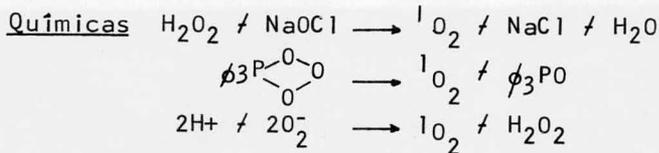
ESTADO	BASAL	PRIMER ESTADO EXCITADO	SEGUNDO ESTADO EXCITADO
Notación	$3O_2$	$\Delta gO_2$	$\Sigma O_2$
Energía	---	23.4 kcal.	37.5 kcal.
Orbital ocupado	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \downarrow \quad \_$	$\uparrow \quad \downarrow$
Carácter magnético	Paramagnético	Diamagnético	Diamagnético

El tiempo de vida del  $\Sigma O_2$  es muy corto ( $10^{-9}$  seg.) pasando al estado  $\Delta gO_2$  que tiene un tiempo de vida de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  seg. El cambio de oxígeno singulete a basal puede ocurrir ---

con la formación de un dimol (estado de excitación donde un electrón brinca de un nivel a otro produciendo una luminiscencia química roja a  $6,334 \text{ \AA}$  y  $7,032 \text{ \AA}$ , en un sistema peróxido-hipoclorito). El  $\Delta gO_2$  se produce excitando un colorante que absorba un fotón de luz o por la reacción de dismutación del oxígeno.

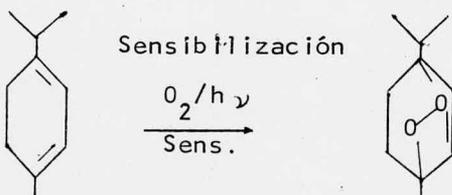
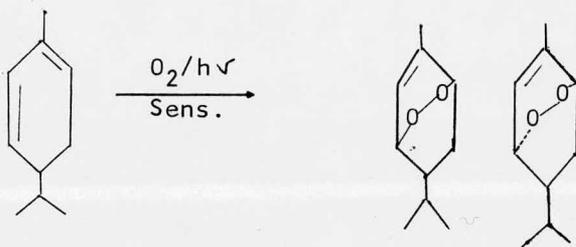
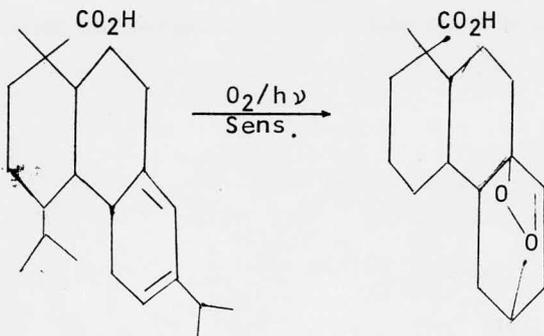
### PROPIEDADES DEL OXIGENO SINGULETE.

El oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) presenta un estado de excitación mayor; las especies energéticas del oxígeno molecular se pueden generar durante el curso de reacciones biológicas por la dismutación espontánea del anión superóxido o como un adjunto de varias reacciones de peroxidación de lípidos. El oxígeno singulete puede ser producido por vías químicas o físicas.

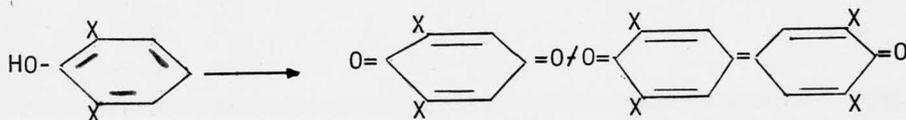
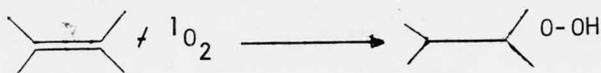


La reactividad del oxígeno singulete es parecida a la del etileno, sin embargo, el  $^1O_2$  es más electrofílico. Reacciona con hidrocarburos insaturados (dienos) produciendo dioxetano; es importante en la oxidación aérea de ácidos de resi-

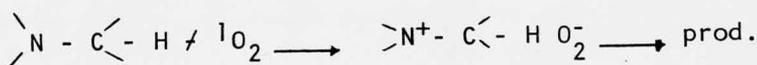
nas y monoterpenos tales como el ácido levopimárico,  $\alpha$ -felandreno y  $\alpha$ -terpineno para dar un producto llamado ascaridol (dioxetano).



La exposición del oxígeno a compuestos que contienen dobles enlaces aislados produce hidroperóxidos alílicos. Algu nos hidrocarburos oxigenados pueden sufrir un proceso de --abstracción del hidrógeno.



Los compuestos que contienen heteroátomos tales como Nitrógeno o Azufre sufren oxidación:

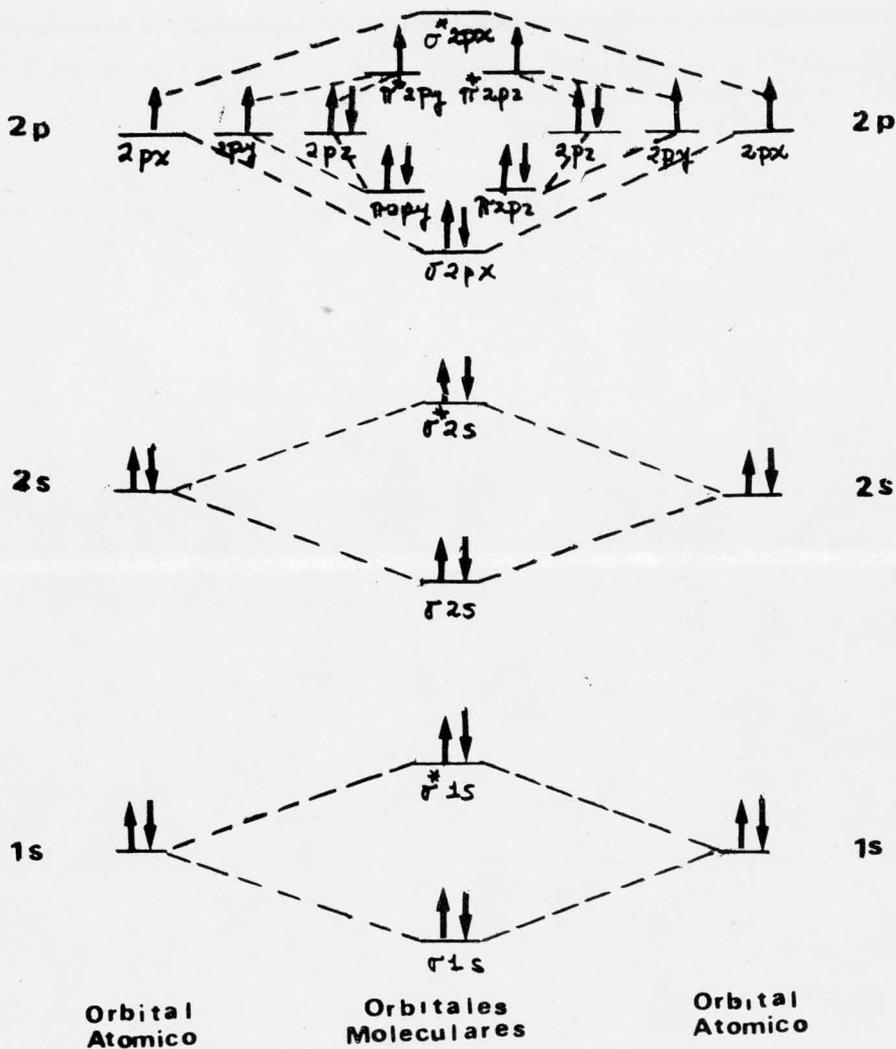


La detección del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) se determina:

- 1.- Espectroscopía de luminiscencia
- 2.- Resonancia paramagnética electrónica
- 3.- Espectroscopía de masas
- 4.- Eliminadores químicos.

En la fotooxidación, el oxígeno es potencialmente capaz de aceptar uno, dos o cuatro electrones para formar radicales superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o agua ( $H_2O$ ) - respectivamente como productos reducidos, éstos electrones entran a los orbitales  $\pi^*$  degenerados.

# ORBITALES MOLECULARES DEL O<sub>2</sub>



## ESTRUCTURA MOLECULAR DEL FIERRO.

El hierro es una sustancia metálica gris, se oxida rápidamente en contacto con el aire húmedo para formar óxido, a pesar de su reactividad tanto el hierro como sus aleaciones son los metales más valiosos usados en las estructuras.

### Propiedades del Hierro.

Número atómico	-----	26
Peso atómico	-----	55.85 g/mol
Densidad	-----	7.87 g/ml
Punto de fusión	-----	1,535 °C
Punto de ebullición	-----	2,800 °C
Electronegatividad	-----	1.7 (Escala Pauling)
Radio covalente	-----	1.16 Å

El hierro es moderadamente activo porque tiene la energía nuclear más baja de todos los elementos. Presenta los estados de oxidación  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Tiene diferentes tipos de hibridación (estado de excitación que presentan los electrones para que cambien de niveles energéticos):  $sp$ ,  $sp^2$ ,  $sp^3$ ,  $dsp^2$ ,  $dsp^3$ ,  $ds^2sp^3$ , este último es el más común en este elemento y tiene una forma octaédrica regular con un ángulo de  $90^\circ$ .

El hierro se caracteriza por tener un subnivel  $d$  parcialmente lleno, forma iones complejos, sus compuestos son

paramagnéticos y generalmente tienen color.

Un compuesto o ion complejo consiste de un átomo central (o ion) rodeado de un número de átomos, iones o moléculas, - cada uno de los cuales comparte por lo menos un par de electrones con el átomo central, las especies que se encuentran alrededor son llamados ligantes. El número de átomos ligantes donadores de electrones coordinados al átomo central se le llama número de coordinación del átomo central.

Para poder explicar los complejos coordinados se necesita aplicar tres teorías de enlace, dichas teorías difieren - en la forma en que están distribuidos los electrones entre - los ligantes y el átomo central al que están unidos. La primera, la de enlace de valencia de Pauling que requiere el -- uso de orbitales atómicos híbridos. Las otras dos teorías - de enlace son la teoría de campo cristalino de la cual forma parte la teoría de campo ligando y la de orbitales moleculares.

### Teoría de Campo Cristalino.

En un complejo iónico cada ion se mantiene en la posición que ocupa en la red, debido a la intersección que existe entre su campo electrónico y los campos de los iones que los rodean. El átomo central del no complejo tiene orbitales híbridos y los pares de electrones de los ligantes que son atraídos

hacia la esfera del átomo central, son rechazados por los electrones en los orbitales atómicos dirigidos.

Esta teoría considera que cuando los ligantes se acercan - para formar el complejo se produce una repulsión electrostática entre éste y los electrones d que destruyen la degeneración de los cinco orbitales d degenerados y excitados, por lo cual los orbitales que quedan a lo largo de la dirección del acercamiento del ligante aumentan su energía debido a la repulsión y los que quedan más lejos de dicha repulsión pierden energía.

Los orbitales d se pueden subdividir en dos grupos:



Los primeros son usados para obtener orbitales de enlace - tanto en el método de enlace-valencia como en el de orbitales moleculares. Los orbitales  $e_g$  se encuentran a lo largo de los ejes, los electrones de éstos orbitales serán repelidos por los ligantes con mayor fuerza que los orbitales  $t_{2g}$  que son más estables.

### Teoría de enlace-valencia.

Permite predecir la geometría de las esferas de coordinación. El ion metálico central actúa como un ácido de Lewis, acepta los pares electrónicos de los ligantes dentro de los orbitales disponibles del ion metálico. Esta teoría considera - estructuras hipotéticas.

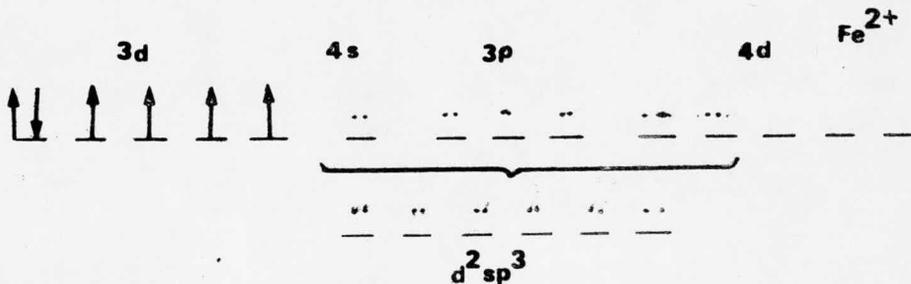
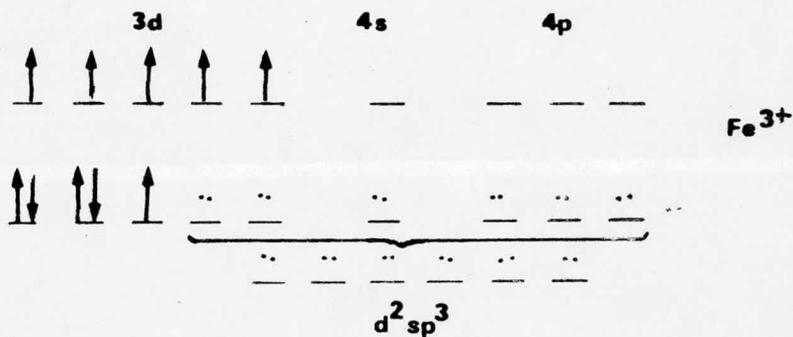
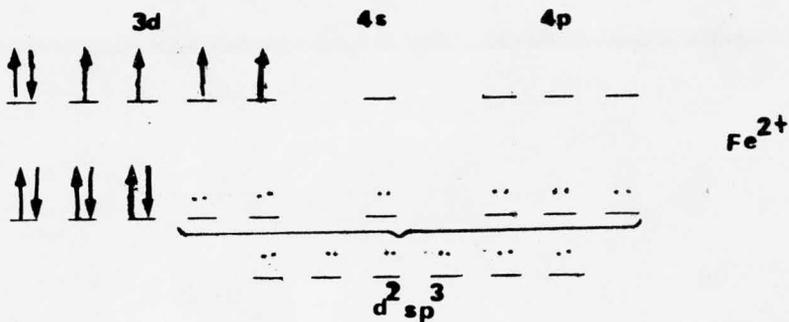
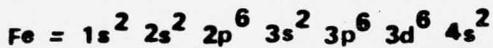
En la teoría enlace-valencia, cada una de las funciones de onda que toman parte en la combinación lineal representan una disposición especial de los electrones. Los ligantes -- comparten sus electrones a los orbitales híbridos dando una superposición máxima. El concepto de enlace de orbitales híbridos está basado en la consideración de que en el proceso de formación del enlace los orbitales electrónicos (que se afirman que existen en los átomos libres) no retienen su independencia y sufren un rearrreglo y modificación. Los nuevos orbitales resultantes son una combinación (híbridización) de los orbitales atómicos.

#### Teoría del Campo Ligando.

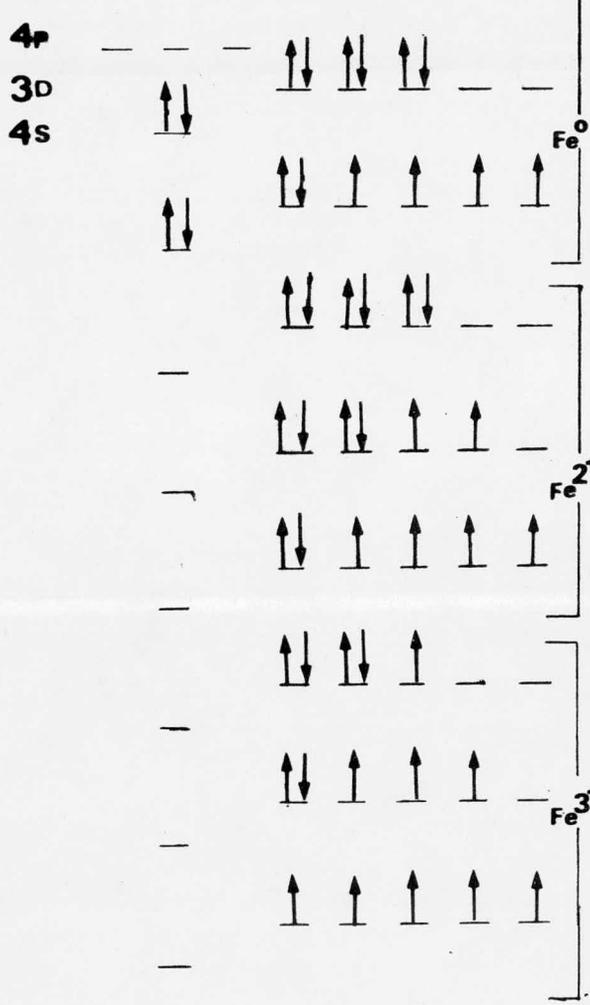
En esta teoría se aplican los principios de la teoría de orbitales moleculares a los complejos de transición.

En los complejos octaédricos los seis orbitales de enlace de los seis ligantes se combinan con los orbitales -----  $(n-1)d_{x^2-y^2}$ ,  $(n-1)d_{z^2}$ ,  $ns$ ,  $nps$ ,  $np_y$  y  $np_z$ , del ion metálico central para producir doce orbitales moleculares, seis de enlace y seis de antienlace, la estabilidad de una molécula se debe a que hay más orbitales de enlace que de antienlace.

# HIBRIDACION DEL $Fe^{2+}$ Y $Fe^{3+}$



DISTRIBUCION ELECTRONICA DE (Fe<sup>0</sup>) (Fe<sup>2+</sup>) (Fe<sup>3+</sup>) Z=26 EN LOS ORBITALES 4P 3D 4S (HIBRIDIZACION D<sup>2</sup>SP<sup>3</sup> DE ACUERDO A LA TEORIA DE ENLACE-VALENCIA



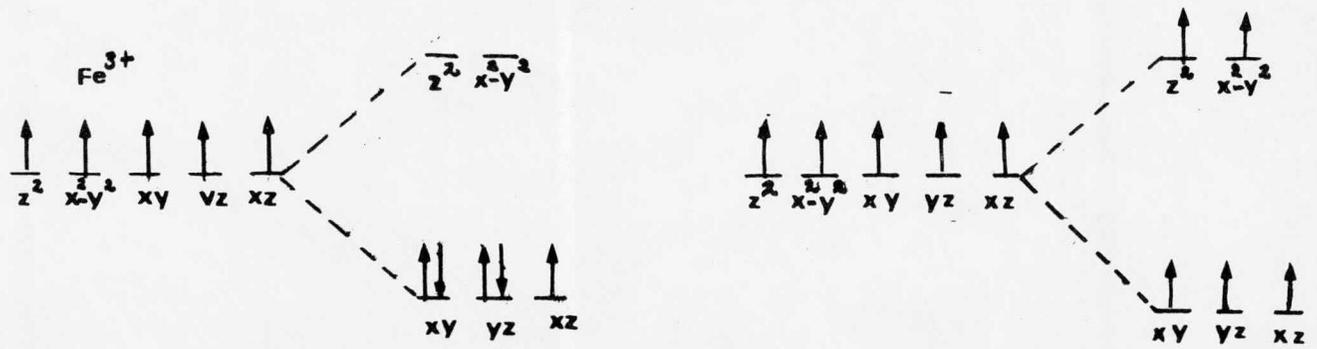
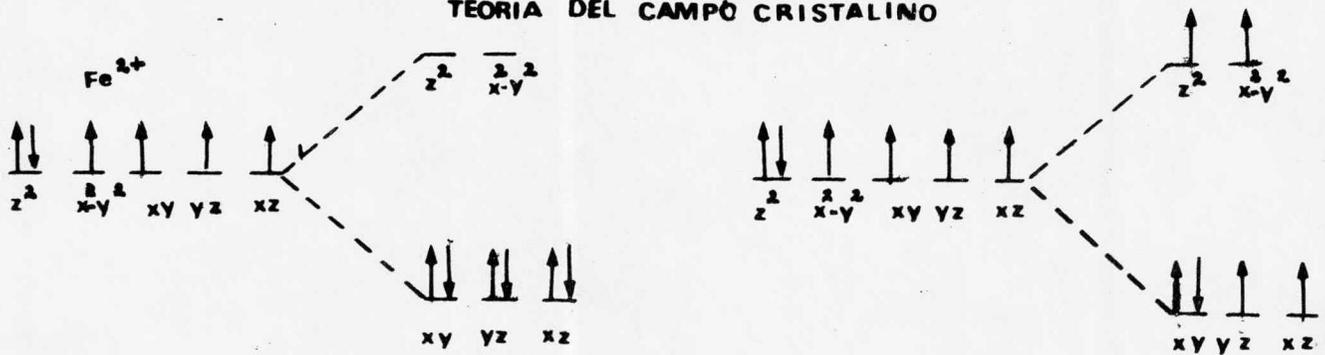
PROPIEDAD MAGNETICA SPIN

D	P	ALTO	BAJO
+++			+++
	++	++	
++			++
	+	+	
	+++++	+++++	
+			+
	+++	+++	
	+++ ++	+++ ++	

D = DIAMAGNETICO (Cero o un electron desapareado)  
 P = PARAMAGNETICO (Dos o mas electrones desapareados.)

SEPARACION DE LOS ORBITALES D CORRESPONDIENTES AL  $Fe^{2+}$  Y  $Fe^{3+}$

TEORIA DEL CAMPO CRISTALINO



## B I B L I O G R A F I A .

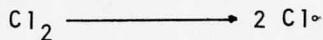
- ANDER P. y SONNESSA, A.: Principios de Química. Edit. Limusa. 1974.
- BLAND, J.: Biochemical Effects of Excited State Molecular Oxygen. J. Chem. Educ. 53 (5)274-279. 1976.
- BRESCIA, F., ARENTS, J., MEISLICH, H. y TURK, A.: Fundamentos de Química. Compañía Editorial Continental, S.A. 1970.
- CARTMELL, E. y FOWLES, G.W.A.: Valencia y Estructura Molecular. Editorial Reverté, S.A. 1970.
- DRAGO, R.S.: Enlace Químico y Estructura Molecular. Editorial Limusa, S.A. 1973.
- GOLBERG, D.: Química; Estructura y Reacciones. -- Fondo Educativo Interamericano. 1972.
- HUNEY, J. E.: Inorganic Chemistry. Principles of Structure and Reactivity. Editorial Hoper. 1972.
- LEE, J.D.: Concise Inorganic Chemistry. Editorial D. Van Nostrand. 1969.
- PAULING, L.: Química General. Editorial W.H. Truman and Co. Ltd. 1977.
- SIENKO, A.P. y BENJAMIN, W.A.: Inorganic Chemistry. Ediciones Aguilar, S.A. 1976.

## RADICALES LIBRES

Un radical libre es una especie química que tiene un electrón desapareado en los orbitales externos. Los radicales -- pueden generarse, propagarse y suprimirse

### GENERACION DE RADICALES LIBRES

Homolisis Térmica.- En este proceso se forman aniones acompañados por el rompimiento de moléculas, manifestándose una disminución en la energía de activación del proceso

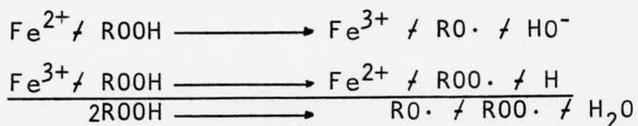


La generación de los radicales libres es favorecida por la presencia de olefinas



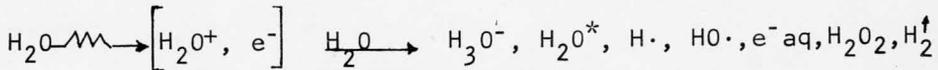
En donde hay diferentes valores de entalpia ( $\Delta H$ ) para la formación o rompimiento de los diferentes tipos de enlace por ejemplo, se necesitan 58 Kcal/mol para romper el enlace Cl-Cl, 60 Kcal/mol para abrir el doble enlace C=C, y 80 Kcal/mol menos para la formación del nuevo enlace C=Cl, con un resultado neto de 38 Kcal/mol.

Reacciones de Oxido-Reducción.- Se lleva a cabo por la catálisis de fierro sobre los hidroperóxidos



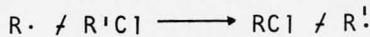
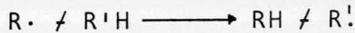
A su vez, los iones férricos pueden ser reducidos por productos naturales como el ácido ascórbico y los tioles.

Fotólisis y Radiólisis.- Los radicales pueden ser generados por una absorción de luz o radiaciones de alta energía. Un ejemplo es la radiólisis del agua ( $H_2O$ ), que produce un radical catiónico  $H_2O^+$  y un electrón como especies primarias, éstos reaccionan nuevamente con el  $H_2O$  produciendo especies más reactivas como:  $H\cdot$ ,  $HO\cdot$ ,  $H_2O^*$ ,  $e^-_{aq}$ ,  $H_2O_2$  y  $H_2$



### PROPAGACION DE LOS RADICALES LIBRES

Transferencias de átomos.- Los radicales reaccionan separando el átomo más externo de la molécula que atacan:



Debido al desplazamiento que hace el radical  $R\cdot$ , la reacción se le conoce como Sustitución Homolítica Biomolecular -- ( $SH_2$ ), ocurre más frecuentemente en átomos univalentes. En este proceso influyen diferentes factores: la fuerza de unión del enlace que está siendo formado, la fuerza de unión del enlace que está siendo roto; efectos polares, efectos estéricos y del solvente. Entre más fuerte es la unión del enlace formado y más débil la unión del enlace roto, la reacción tenderá a ser espontánea.

En la siguiente tabla se observan los valores de velocidad de separación del átomo de hidrógeno por diferentes radicales, los cuales van a formar enlaces con el hidrógeno de la misma fuerza, excepto el radical  $\text{HO}^\bullet$ , que forma un enlace más fuerte; el átomo de cloro separa al hidrógeno con una energía de activación más baja que la requerida por los átomos de hidrógeno o radicales metilo, esto es debido a su electronegatividad.

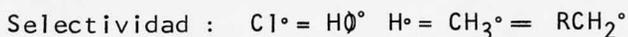
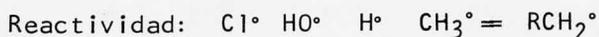
VALORES CONSTANTES PARA LA SEPARACION DE HIDROGENO  
DE ALCOHOLES E HIDROCARBUROS.

DONADOR DE HIDROGENO.	R A D I C A L						
	H° Sol. 25°C	H° Sol. 40°C	HO° Sol. 25°C	CI° Gas 25°C	CH <sub>3</sub> ° Gas 182°C	CH <sub>3</sub> ° Sol. 25°C	Poli- meti- leno Sol. 130°
<u>ALCOHOLES</u>							
CH <sub>3</sub> -OH	(1)	(1)	(1)		(1)	(1)	(1)
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	12.0	5.0	2.0		5.0	4.0	5.0
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-OH	78.0	15.0	11.0		25.0	47.0	20.0
<u>HIDROGENOS DE ALCANO.</u>							
Primario		(1)		(1)	(1)		(1)
Secundario		3.0		4.0	7.0		8.0
Terciario		27.0		5.0	50.0		37.0
K Absoluta para CH <sub>3</sub> OH a 25°C	2x10 <sup>9</sup>		5x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>10</sup>	10	220.0	Ca25+20
X molecular M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>							

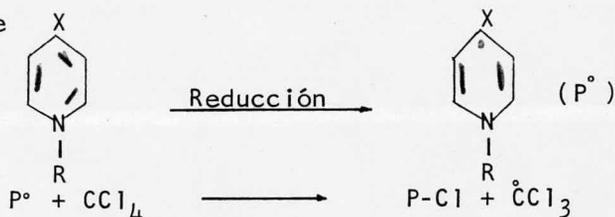
Los radicales hidroxilo reaccionan con diferentes tipos de hidrógeno de acuerdo a su energía de activación.

H-H-----	104 Kcal/mol
CH <sub>3</sub> -H -----	104 Kcal/mol
Cl-H -----	104 Kcal/mol
HO-H -----	119 Kcal/mol

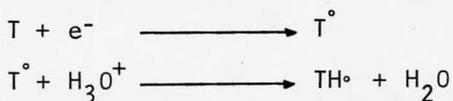
Los radicales son especies muy reactivos y presentan una determinada selectividad como:



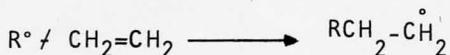
Se presenta también la transferencia de halógenos, por radicales piridinil; sus sales son reducidas para formar radicales por electrólisis, ditionita, varios iones metálicos o fotoquímicamente



Transferencia de electrones.- Consiste en la transferencia de electrones de un radical o un ion radical a uno no radical, - como en la radiolisis, en dónde se forma una radical catiónico y un electrón que reacciona para transferir su electrón y formar determinados productos. Como ejemplo está la producción del aducto timina-hidrógeno.

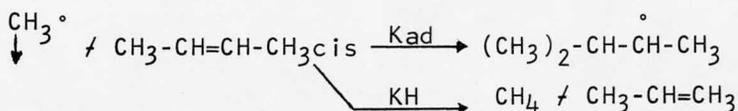


Adición.- Los radicales libres se adicionan a un enlace insaturado (C=C)



Un átomo que tiene un exceso de densidad electrónica reaccionará más fácilmente que un radical poliatómico debido a - que debe presentar una determinada orientación.

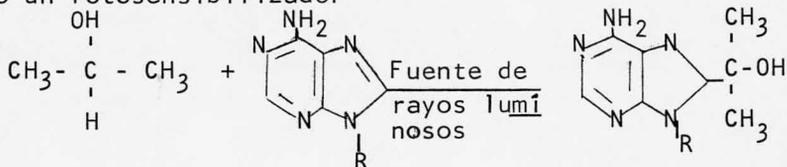
La separación de hidrógeno y la adición a un doble enlace tiene un valor similar en la constante de velocidad (k), - cuando la olefina tenga hidrógenos alílicos reactivos



$$K_{ad} = 4.5 \times 10^7 e^{-7000/RT} \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$$

$$K_H = 1.8 \times 10^7 e^{-7300/RT} \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$$

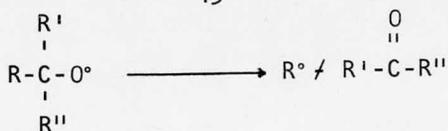
Los radicales libres se adicionan también a anillos aromáticos, teniendo un catalizador que puede ser: rayos X, luz ultravioleta o luz de longitud de onda = 290 nm con acetona, como un fotosensibilizador



R = H (adenina)

o R = Ribosa (adenosina)

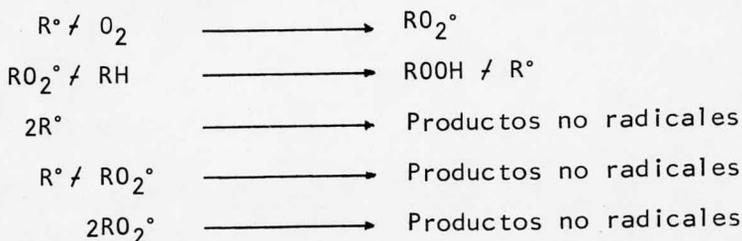
Las reacciones de escisión son lo contrario a la adición en la cual un grupo  $R^\bullet$  desplaza a un electrón y se forma una insaturación



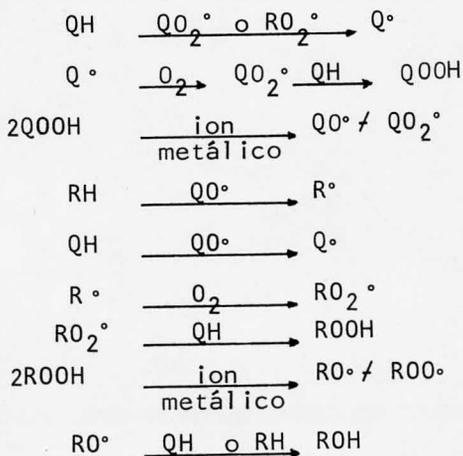
El arreglo se lleva a cabo muy raramente en las reacciones de radicales libres.

### Supresión de las Reacciones de Radicales Libres

Una de las formas de terminación de los radicales libres es la autooxidación de hidrocarburos a bajas temperaturas para generar hidroperóxidos.



La presencia de metales de transición cataliza la descomposición de hidróperóxidos, formándose alcoholes u otros compuestos oxigenados



QH = Compuesto fácilmente oxidable

RH = Compuesto inerte

QO° = Radical alcohoxi

QO<sub>2</sub>° = Radical peróxi

ROOH = Hidroperóxido

Los lípidos actúan como un compuesto fácilmente oxidable (QH) y las proteínas como compuestos de menor reactividad (RH).

Detección. - Las propiedades físicas de los radicales libres permiten su detección y análisis. Se manifiestan porque la partícula está cargada de spin y crea un campo magnético, el radical lo tiene débil y puede ser detectado y analizado por espectroscopía de resonancia paramagnética de electrones.

Regla de Markonikov. - En la adición iónica de un ácido al doble enlace de un alqueno, el hidrógeno de aquél, se une al átomo de carbono que inicialmente ya tiene el número mayor de hidrógenos.

Kharasch y Mayo descubrieron que la orientación de la adición del HBr al doble enlace (C=C), queda determinada exclusivamente por la presencia o ausencia de peróxidos, además, descubrieron que si se excluyen cuidadosamente los peróxidos del sistema reaccionante o si se agregan ciertos inhibidores ---- (Hidroquinona, difenilamina) la adición de HBr a los alquenos sigue la regla de Markonikov. Por otra parte, si no se -



donde A es el factor pre-exponencial y E la energía de activación. Para la reacción  $A-B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$ , el valor de A es aproximadamente  $10^{14}$  ó  $10^{16}$  seg.; donde la energía de activación para la reacción inversa es aproximadamente de cero, E en la ecuación de Arrhenius es igual a la energía de disociación -- del enlace de A-B

$$k = 10^{14} e^{-A(A-B)/RT}$$

usando esta ecuación y el factor de vida media de una reacción unimolecular es igual a  $\ln 2/k$ , entonces se podrá calcular la energía de disociación de la molécula A-B y podrán producir radicales de 1 hora de vida media, a una determinada -- temperatura.

Temperatura a la cual, un iniciador con una determinada longitud de enlace se descompone con 1 hora de vida media.

°C	E por 1 Hr. de vida media.
100	-----30.2
50	-----26.2
35	-----25.0
30	-----24.6
0	-----22.1

### RADICALES SUPEROXIDO.

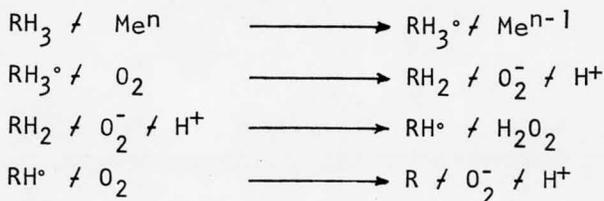
El radical superóxido ( $O_2^-$ ) se genera durante la autooxidación de ferridoxina reducida, flavinas y quinonas reducidas, hemoglobina y epinefrina.

El FMN y el flavodoxin, cuando son reducidos por acción de la ferridosin-TPN óxido reductasa, el oxígeno sufre una reducción univalente y divalente generando radicales superóxido y peróxido. La menadiona (quinona) es una droga hemolítica - la cual reduce al oxígeno a radicales  $O_2^-$ , a su vez, esta menadiona reducida produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), éstos -- son generados por el sistema xantina-oxidasa. En la autooxidación de la Hemoglobina, ésta se transforma a Metahemoglobina produciéndose radicales  $O_2^-$ .

Detección. Los radicales superóxido se detectan porque oxidan a la epinefrina, reducen al ferricitocromo, al nitroazul de tetrazolio (NBT) y por inhibición de la Superóxido dismutasa (SOD).

La autooxidación de epinefrina es iniciada por la presencia de metales pesados ( $Cu^{2+}$ ), como contaminante de los reactivos usados, para producir adrenocromo; la epinefrina es estable en medios ácidos, pero se oxida cuando el  $pH=10.2$  produciéndose los radicales superóxido.

Reacción en cadena para la formación de radicales superóxido y producción de adrenocromo:



$RH_3$  = epinefrina.

R = adrenocromo

Me = metal. Esta reacción es inhibida por la superóxido dismutasa (SOD).

La epinefrina es un donador de electrones que no acepta a los electrones del sistema Oxihemoglobina-Fenilhidrazina --  $\text{HbO}_2\text{-}\phi\text{NHNH}_2$ , reacciona con el radical superóxido para formar el adrenocromo que se lee a 475 nm.

SISTEMA	ENZIMA	pH	OXIDACION	TIEMPO
a) $\text{HbO}_2\text{-}\phi\text{NHNH}_2$	-----	7.0	+++	1 min.
b) $\text{HbO}_2^-\phi\text{NHNH}_2$	Catalasa	7.0	++	1 min.
c) $\text{HbO}_2^-\phi\text{NHNH}_2$	SOD	7.0	++	1 min.
d) $\text{HbO}_2^-\phi\text{NHNH}_2$	Catalasa + SOD	7.0	---	1 min.

En el sistema Metahemoglobina-Fenilhidrazina, la oxidación es más efectiva, pero es casi inhibida por la catalasa y totalmente por la superóxido dismutasa.

La reducción del ferricitocromo c se lee a 550 nm, dependiendo del tipo de enzima la absorbencia aumenta o disminuye de acuerdo a:

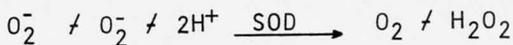
SISTEMA	ENZIMA	pH	REDUCCION	TIEMPO
a) $\text{HbO}_2\text{-}\phi\text{NHNH}_2$	catalasa	7.0	++++	1 min.
b) $\text{HbO}_2\text{-}\phi\text{NHNH}_2$	---	7.0	+++	1 min.
c) $\text{HbO}_2\text{-}\phi\text{NHNH}_2$	catalasa y SOD	7.0	++	1 min.
d) $\text{HbO}_2\text{-}\phi\text{NHNH}_2$	SOD	7.0	+	1 min.

esta reducción es a través de la transferencia de un electrón a un aceptor (ferricitocromo c) y no al oxígeno molecular, es una prueba sensible y cuantitativa para la formación de estos radicales superóxido.

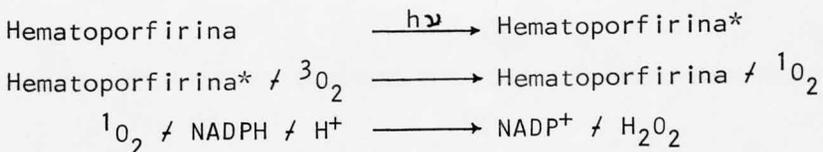
Los radicales superóxido reducen al Nitroazul de Tetrazolio (NBT) a Formazan, la lectura es a 560 nm. El Ditiotreitól es capaz de transferir sus electrones al NBT directamente en condiciones anaerobias sin ser afectada por la SOD o indirectamente en presencia del Oxígeno, es inhibida por la SOD; a diferentes buffers la acumulación de Formazan se incrementó, el Acido Etilen Diamino Tetra-acético (EDTA) inhibe la auto-oxidación de Ditiotreitól y en ausencia de NBT disminuye la oxidación espontánea de ditiotreitól.

### PEROXIDO DE HIDROGENO.

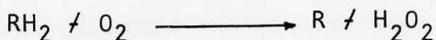
La formación de peróxido de hidrógeno en membrana mitocondrial se lleva a cabo por la reducción de dos electrones del oxígeno molecular o por la reducción de un electrón de los radicales superóxido en la reacción de dismutación



El peróxido de hidrógeno es formado durante la fotooxidación de la hematoporfirina



Los agentes citotóxicos (6-hidroxidopamina, 6-aminodopamina, 6,7-dihidroxitriptamina y ácido dialúrico) generan peróxido de hidrógeno por el consumo de oxígeno

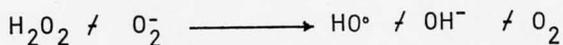


$RH_2$  = compuesto autooxidable

R= forma quinoidal. La enzima catalasa disminuye el consumo de oxígeno.

Detección.- Dependiendo de la cantidad de SOD hay mayor o menor formación de peróxido de hidrógeno en fragmentos mitocondriales, en cambio en tumores se formarán radicales superóxido. La detección del  $H_2O_2$  fue hecha por el método de Escopletina en donde la fluorescencia disminuye por la presencia de peróxido de hidrógeno, se usa antimicina como agente iniciador de la reacción y se determina con ayuda de la peroxidasa del rábano la cual cataliza una oxidación en cadena del NADH o NADPH; la producción fue medida con un electrodo de oxígeno.

Otros radicales que tienen importancia son los hidróxilo ( $HO^\bullet$ ), cuya formación puede ser por la interacción del  $H_2O_2$  y el radical superóxido



o bien por el rompimiento catalítico del peróxido de hidrógeno por metales contaminantes como el  $Fe^{2+}$ .



Detección.- La detección de estos radicales se hace con el Metional ( $\beta$ -metiltiopropionaldehído) para formar etileno. Los agentes citotóxicos producen mayor cantidad de etileno a pH - de 6.4; la producción de etileno es inhibida por tres atrapa- dores de los radicales hidróxilo: benzoato, etanol y manitol.

B I B L I O G R A F I A .

- BODANESS, R.S. y CHAN, P.C.: Singlet Oxygen as a Mediator in the Photooxidation in the Hematoporphyrin-catalized of NADPH to NADP<sup>+</sup> in Deuterium Oxide. J. Biol. Chem. 252 (23):8554-8560. 1977.
- COHEN, G. y HEIKKILA, R.E.: The Generation of Hydrogen Peroxide, Superoxide Radical and Hydroxyl Radical by 6-hydroxydopamine, Dialuric Acid and Related Cytotoxic Agents. J. Biol. Chem. 249(8):2447-2452. 1974.
- DEMOPOULOS, H.B.: The Basis of Free Radical Pathology. Fed. Proc. 32(8):1859-1861. 1973.
- DIONISI, O., GALEOTTI, T., TERRANOVA, T. y AZZI, A.: Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide Formation in Mitochondrial from Normal and Neoplastic Tissues. Biochim Biophys. Acta 403:292-300. 1975.
- GOLDBERG, B. y STERN, A.: The Generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> by the Interaction of the Hemolytic Agent, Phenylhydrazine, with Human Hemoglobin. J. Biol. Chem. 250(6):2401-2403. 1975.
- GOLDBERG, B. y STERN, A.: Superoxide Anion as a mediator of Drug-induced Oxidative Hemolysis. J. Biol. Chem. 251(20):6468-6470. 1976.
- KOPPENOL, W.H. y BUTLER, J.: Mechanism of Reaction Involving Singlet Oxygen and Superoxide Anion. Febbs Letters 83(1):1-3 1977.
- Mc CORD, J.M.: Free Radicals and Inflammation: Protection of Synovial Fluid by Superoxide Dismutase. Science 185:529-531. 1974.
- MISRA, H. P.: Generation of Superoxide Radicals During the Autooxidation of Thiols. J. Biol. Chem. 248(7):2151-2155. 1974.

- MISRA, H.P. y FRIDOVICH, I.: The Generation of Superoxide Radical During the Autoxidation of Hemoglobin. J. Biol. Chem. 247(21): 6960-6962. 1973.
- MISRA, H. P. y FRIDOVICH, I.: The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. J. Biol. Chem. 247(10):3170-3175. 1972.
- MISRA, H.P. y FRIDOVICH, I.: The Univalent Reduction of Oxygen by Reduced Flavins and Quinones. J. Biol. Chem. 247(1):188-192. 1972.
- MORRISON, Robert T, NEILSON BOYD, R.: Organic Chemistry. 2d. Edic. Allyn and Bacon Inc. Boston 187-192. 1966.
- PRYOR, W.A.: Free Radical Reactions and their Importance in Biochemical Systems. Fed. Proc. 32(8):1862-1869. 1973.

PEROXIDACION.

Para estudiar la peroxidación de lípidos en tejidos de sistemas vivos, es importante conocer la composición membranosa de las estructuras que los constituyen (mitocondria, microsomas, lisosomas, etc.).

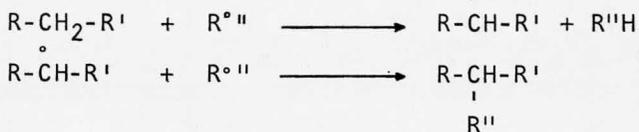
La membrana está compuesta de proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA, y RNA, las proteínas pueden ser estructurales y enzimáticas. Debido a su mayor contenido de aminoácidos -- alifáticos presentan un carácter hidrofóbico.

Los lípidos principalmente de éstas membranas son: Fosfolípidos y colesterol; la composición de los fosfolípidos involucra la presencia de ácidos grasos que pueden ser saturados (palmítico, esteárico) insaturados (oléico) o bien presentar múltiples insaturaciones (araquidónico).

Los carbohidratos contribuyen en ciertas propiedades de la membrana como son la antigenicidad y carga eléctrica de -- los eritrocitos, esta última relacionada con el ácido siálico.

MECANISMO DE DETERIORACION

Radiación. -- La radiación iónica produce radicales libres, sus reacciones son la polimerización y la peroxidación.





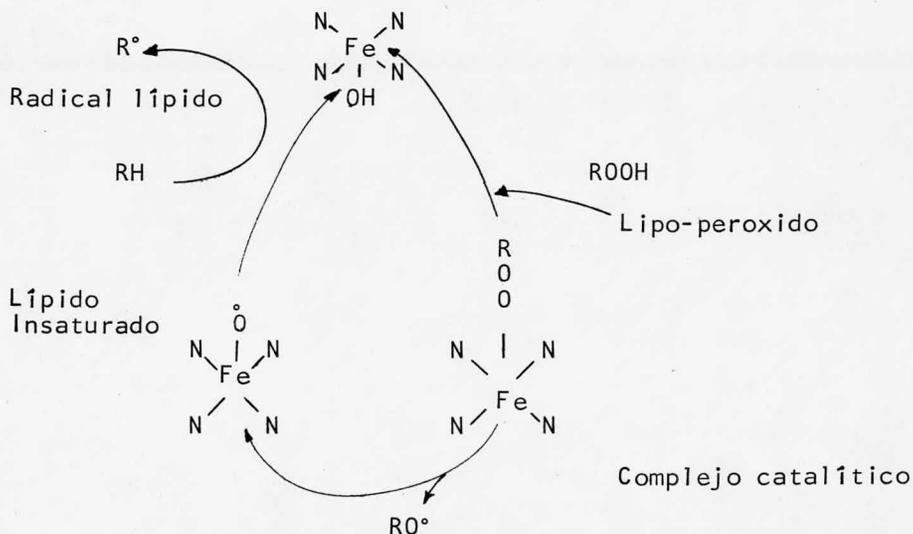
Los radicales libres pueden ser estabilizados por:

- 1.- Hidratación.- En donde una cubierta de moléculas de agua pueden polarizar cerca del electrón desapareado y proteger su ataque.
- 2.- Atrapamiento.- El electrón es deslocalizado por un sistema altamente polarizado, reaccionando con otros compuestos.
- 3.- Reacciones competitivas.- Especies químicas (grupos aromáticos, carbonilo y sulfidrilo) pueden competir por el electrón desapareado.
- 4.- Excitación por solvente.- El electrón desapareado es transferido al solvente debido a su proximidad, como las reacciones que involucran el agua.

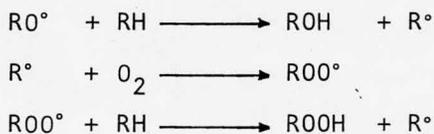
Los lípidos insaturados sufren fácilmente reacciones de radicales libres. Se ha propuesto reacciones en cadena involucrando a un sistema de doble enlace C=C con el fierro del hemo como catalizador.

Los radicales libres en soluciones acuosas y en condiciones aerobias, conducen finalmente a la formación de peróxidos, los cuales tienen una vida media larga, son compuestos reactivos y sufren una descomposición homolítica.

## REACCIONES DE PEROXIDACION.



## DESCOMPOSICION HOMOLITICA.



La reacción de peroxidación de lipo-proteínas en un sistema modelo en el cual los radicales libres forman peróxidos de lípidos cíclicos, provocando una unión cruzada con las proteínas.

Hay una correlación del efecto de la radiación sobre lipoproteínas y la formación de pigmentos de envejecimiento; -

por lo que se deduce que estos pigmentos son derivados de la oxidación de lipo-proteínas. Las evidencias dadas por algunos investigadores son:

- 1.- Radicales libres similares se forman durante la reacción de peroxidación de lipo-proteínas y radiación de proteínas.
- 2.- Diversos aminoácidos aromáticos son peroxidados y este efecto se evita por la acción protectora de antioxidantes similares a los compuestos tioles, la vitamina E y Selenio son buenos agentes protectores contra el daño en este sistema.
- 3.- El sistema peroxidante y la radiación involucran un extenso daño a proteínas, lípidos, DNA, RNA, Carbohidratos, etc., y producen por unión cruzada entre estas moléculas, polimerización, que podría ser la causa de la formación de pigmentos (lipofushina y ceroides durante el envejecimiento).

#### REGULACION MEMBRANAL

La mitocondria muestra un cambio de volumen: debido a los siguientes factores; tonicidad del medio, oxígeno, sustratos aceptores de electrones, cationes, arsenato, agentes desacopladores e inhibidores del transporte de electrones. Este fenómeno puede ser controlado por el uso de agentes quelantes o bien por la acción de enzimas hidrolíticas que liberan los lisosomas.

Los cloroplastos pueden tener cambios de volumen debido a la luz y a la presión osmótica. La luz impulsa el flujo de electrones y las reacciones de transferencia de energía, esto se realiza durante la actividad de la ATPasa: El ADP que es un inhibidor de la ATPasa o el cloruro de amonio que es un desacoplador, retornan los cloroplastos a su volumen normal.

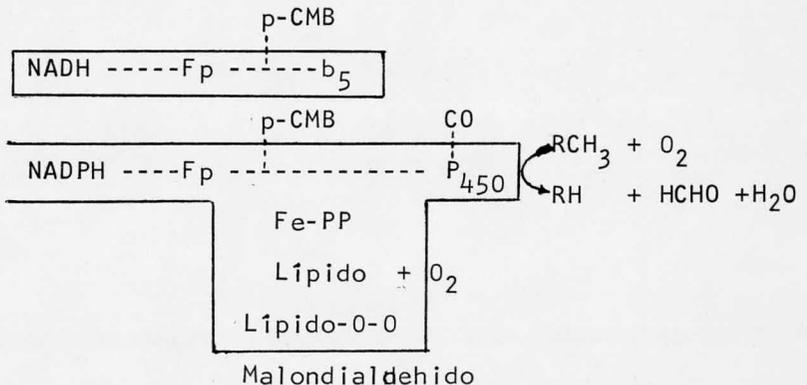
Los lisosomas presentan enzimas de oxidoreducción y no sufren ningún cambio de volumen con la presencia de ATP, NADH o NADPH.

Los microsomas presentan dos tipos de transporte de electrones en los que participan los donadores NADH y NADPH. La oxidación de estos nucleóticos NADH y NADPH se lleva a cabo por dos mecanismos:

I.- Vía oxidación NADH.

II.- Oxidación del NADPH involucrando la transferencia de -- electrones que ocurren durante la detoxificación de dro gas y lipo-peroxidación.

I.



Las flavoproteínas (Fp) de ambos sistemas pueden ser inhibidas por agentes que se unen a grupos sulfhidrilo. La enzima que cataliza la detoxificación de drogas puede ser inhibida por CO, lipasas y detergentes así como reactivos que se unen a grupos sulfhidrilo. Este complejo enzimático se denomina citocromo P<sub>450</sub> y su inactivación lo cambio a P-420 ---- (fracción inactiva o desnaturalizada).

La peroxidación es un proceso de gran importancia en lesiones citopatológicas provocadas por el Tetracloruro de Carbono, durante la intoxicación se forman dienos conjugados, - producto de la peroxidación de lípidos del mocrosoma del hígado. El tetracloruro de carbono estimula la peroxidación e inhibe la síntesis de proteínas y secreción de lipoproteínas, induce la acumulación de grasa dentro de la célula y bloquea la secreción de triglicéridos.

La acción del tetracloruro de carbono es iniciada por - la formación de radicales libres que activan a la peroxidación celular; la potencia de los hidrocarburos halogenados - para producir lesiones hepáticas o estimular a la peroxidación, pueden ser correlacionados con su acción hemolítica, - la gran actividad citotóxica se debe a la formación de radicales libres producidos por la ruptura de enlaces Carbono-halógeno del tetracloruro de Carbono ( $CCl_4 \rightarrow \overset{\cdot}{C}Cl_3 + \overset{\cdot}{Cl}$ ) los cuales son incorporados a las dobles ligaduras de los ácidos; -

fenómeno que se favorece en presencia de iones fosfato y compuestos orgánicos que contienen fierro.

El Iodoformo y el  $\text{CCl}_4$  reaccionan fácilmente para producir radicales libres formándose reacciones en cadena que actúan sobre la fase lípídica de la membrana celular, produciéndose una polimerización parcial de los lípidos, proteínas y los componentes de los ácidos nucleicos, manifestándose así, la lesión celular irreversible.

Detección.- La determinación de la lipoperoxidación puede hacerse por:

- 1.- Determinación de grupos dieno en las etapas iniciales por absorción de luz ultravioleta a 233 nm.
  - a).- Consumo de Oxígeno.
  - b).- Determinación directa de la formación de hidroperóxidos.
- 2.- Determinación directa de Peróxidos.
  - a).- Por Iodometría.
  - b).- Por colorimetría con diferentes reactivos:
    - Tiocianato
    - Tiofluoreceína
    - 2,6-diclorofenol-indofenol
    - Azul de Cresol Brillante
- 3.- Determinación de compuestos carbonilo
  - a).- Prueba del ácido Tiobarbitúrico (TBA).

#### 4.- Determinación de productos finales polimerizados.

- a).- Lipofushina.
- b).- Cuerpos Ceroides.

De estas determinaciones la que se utiliza con mayor frecuencia es la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA), es un método analítico en donde la reacción se forma al interaccionar el TBA con diversos compuestos orgánicos produciéndose un valor de absorción a diferente longitud de onda. Entre estos compuestos están los aldehídos (Malondialdehído) que forma un cromógeno de color rojo con una absorción máxima a 532 nm, -- con compuestos de cinco carbonos la absorción máxima es a 532 nm, un átomo de carbono entre dos moléculas de TBA tiene una absorción a 452 nm, con piridinas substituidas la absorción es a 532 nm. Para que la reacción se realice se necesitan -- solventes no polares y por lo general un PH ácido, además de la acidez del compuesto. El TBA es muy reactivo y forma cromógenos con una gran cantidad de compuestos por lo cual es posible que interfieran con la prueba a pesar de que a ésta se le considera muy sensible y determina concentraciones de malondialdehído del orden de nanomoles.

## B I B L I O G R A F I A

- BARBER, A.A. y BERNHEIM, F.: Lipid Peroxidation: Its Measurement, Occurrence and Significance in - Animal Tissue. Advan. Gerontol. Res. - II: 355-403.
- CHIO, K.S., REISS, U., FLETCHER, B. y TAPPEL, A.L.: Peroxidation of Subcellular Organelles: Formation of Lipofuscin like Fluorescent -- Pigments. Science 166:1535-1542. 1969.
- FLETCHER, B.L., DILLARD, C.J. y TAPPEL, A.L.: Measurement of Fluorescent Lipid Peroxidation Products in Biological Systems and Tissues. --- Annal. Biochem. 52:1-9. 1973.
- MASADA, Y. y MURANO, T.: Carbon Tetrachloride-induced Lipid Peroxidation of Rat Liver Microsomes in Vitro. Biochem. Pharmacol. 26:2275- -- 2282. 1977.
- PACKER, L., DAMER, D.W. y HEATH, R.L.: Regulation and Deterioration of Structure in Membranes. Advan. Gerontol. Res. II:77-120.

## SUPEROXIDO DISMUTASA.

Las metaloproteínas se clasifican en tres grupos:

### A.- Proteínas con hierro:

Ferritina

Hemosiderina

Transferrina

Conalbumina

Hemoeritrina

### B.- Proteínas con cobre:

Hemocianina

Ceruloplasmina

Eritrocupreína

Hemocupreína

Hepatocupreína

Cerebrocupreína

### C.- Otras metaloproteínas contienen: Zinc, Cadmio y Vanadio.

Las metaloproteínas más importantes son las del grupo -- del cobre, denominadas Superóxido Dismutasa (SOD); la eritrocupreína se encuentra en las células rojas de mamíferos, incluyendo al hombre. Contiene 0.36% de cobre, 16.53% de nitró

geno, y 1.05% de azufre, con un peso molecular de 35000. Una molécula contiene dos átomos de Cu, 41 de aspargina, 18 de treonina, 20 de serina, 23 de glutanina, 11 de prolina, 45 de fenil alanina, 20 de lisina, 14.5 de histidina, 9 de arginina, 11 de cist(e)ina y 0.6 de triptofano; 3.4 de hexosamina, 1.8 de hexosa y 1.6 residuos de ácido siálico.

La SOD puede estar constituida por otros metales como Zinc, Mn y Fe principalmente; está formada por dos subunidades de igual tamaño, su masa molecular varía de acuerdo a su localización, algunas presentan grupos sulfhidrilo (-SH) que al polimerizarse y oxidarse forman puentes disulfuro.

ORGANO	ACTIVIDAD U/g	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg DE PROTEINA.
Hígado	4480 ± 1115	22.1 ± 6.2
Adrenal	1563 ± 1053	19.7 ± 5.0
Riñón	1342 ± 383	12.9 ± 3.0
Sangre	785 ± 317	3.6 ± 1.0
Bazo	441 ± 95	4.7 ± 1.1
Corazón	421 ± 109	8.6 ± 2.0
Pancreas	300	
Cerebro	262 ± 68	2.8 ± 0.6
Pulmón	200 ± 55	3.1 ± 1.0
Estómago	140 ± 30	6.5 ± 2.2
Intestino	122 ± 43	2.5 ± 1.5
Ovario	112 ± 45	2.0 ± 0.8
Timo	88 ± 42	1.3 ± 0.5

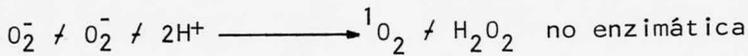
Los estudios realizados en hígado muestran dos clases de superóxido dismutasa; la mitocondrial y la de citosol; la primera es resistente al cianuro pero se inactiva por una mezcla de etanol-cloroformo, es parecida a la SOD de bacterias (*E. coli* B), la fracción citosol se encuentra en numerosos eucariotes (Charophyta, Euglenophyta, Rodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta), ambas clases de SOD se diferencian por el grupo prostético; la mitocondrial contiene manganeso (Mn) mientras el citosol contiene cobre-cinc, ésta última presenta varias isoenzimas, las cuales pueden separarse mediante un análisis electroforético, usando mercaptoetanol como un reactivo selectivo para separar a la SOD de Cu-Zn.

La SOD se encuentra distribuida en todos los microorganismos aerobios, pero no en los anaerobios estrictos, la presencia del oxígeno a una determinada concentración favorece la producción de SOD, mientras que en ausencia, la SOD no se sintetiza.

AEROBIOS	SUPEROXIDO DISMUTASA U/mg
<i>Escherichia coli</i>	1.8
<i>Salmonella tiphimurium</i>	1.4
<i>Halobacterium salinarium</i>	2.1
<i>Rhizobium Japonicum</i>	2.6
<i>Micrococcus radiodurans</i>	7.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.7
<i>Mycobacterium sp.</i>	2.9

AEROBIOS	SUPEROXIDO DISMUTASA U/mg
Pseudomonas sp.	2.0
<u>Anaerobios Estrictos</u>	0
<u>Anaerobios aerotolerantes</u>	
Butyribacterium rettgeri	1.6
Streptococcus fecalis	0.8
Streptococcus mutans	0.5
Streptococcus lactis	1.4
Zymbacterium oroticum	0.6
Lactobacillus plantarum	0

Los metabolitos activos del oxígeno: oxígeno singlete  $^1O_2$ , radicales superóxido  $O_2^-$ , peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  y radicales hidroxilo  $HO\cdot$  producen daño en el organismo y son contrarrestados por la SOD. Los radicales superóxido y oxígeno singlete son inhibidos por la SOD por medio de una -- reacción de dismutación.

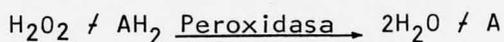


Detección.- Los métodos más usuales para la detección de la Superóxido dismutasa son:

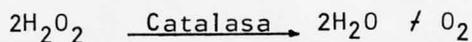
1.- Reducción de Citocromo c

- 2.- Oxidación de Epinefrina
- 3.- Inhibición del NBT (Azul de Tetrazolium)
- 4.- Radiólisis de Pulso
- 5.- Autooxidación de Pirogalol
- 6.- Reducción de tetranitrometano
- 7.- Electroforesis (Gales de Poliacrilamida)

La peroxidasa y la catalasa son enzimas que contienen fe rroporfirinas; utilizan el peróxido de hidrógeno como sustra- to. El grupo prostético de la peroxidasa es el protohemo, el cual, a diferencia de la mayor parte de las proteínas, está débilmente unido a la apoproteína. En la reacción catalizada por la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno es reducido a ex- pensas de varias sustancias que actúan como aceptores de elec- trones, tales como el ascorbato y el citocromo c. La reac- ción catalizada por la peroxidasa se puede expresar como:



La catalasa tiene la función de destruir el peróxido de Hidrógeno formado por la acción de las deshidrogenasas aero- bias, es una hemoproteína, capaz de usar una molécula de peróxi- do de hidrógeno como sustrato donador de electrones y otra mo- lécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante o como aceptor de electrones.



### GLUTATION PEROXIDASA.

La glutatión peroxidasa (GSH-Px), es una selenoproteína, constituida por cuatro átomos de selenio, con un peso molecular de 84,000. Se encuentra en varios tejidos (cerebro, riñón, hígado, bazo, pulmón, páncreas, músculo y corazón); su presencia en los eritrocitos es importante porque los protege contra la acción del peróxido de hidrógeno.

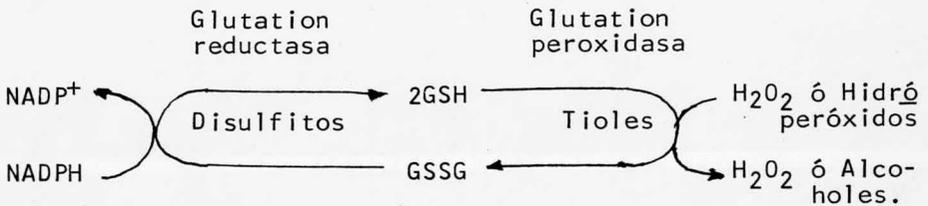
La distribución intra celular de la Glutatión peroxidasa en hígado muestra que la fracción citosólica contiene aproximadamente 75% de GSH-Px y 58% de selenio (sitio activo de la enzima). Se caracteriza principalmente por:

- 1.- Ser estable a temperatura de desnaturalización
- 2.- Presenta un carácter hidrofóbico
- 3.- Presenta carga negativa al incrementarse el pH.

La Glutatión peroxidasa es capaz de bloquear la reacción en cadena, autocatalítica de la peroxidación de lípidos, actuando como antioxidante, cataliza el rompimiento del peróxido de hidrógeno usando al glutatión como el donador de hidrógeno, reduce los hidroperóxidos, es una enzima alostérica; en el hígado compite con la catalasa por el agua oxigenada; por lo tanto hay protección contra los efectos de peroxidación, mientras que la catalasa no presenta efecto sobre la peroxidación de lípidos. La enzima tiene dos sitios alostéricos, uno

responsable de la actividad catalítica y otro involucrado en los enlaces a nucleótidos.

Si el sustrato usado es el hidroperóxido de cumeno se -- presentan dos tipos de glutatión peroxidasa: GSH-Px I, la cual actúa sobre el agua oxigenada, es inhibida por el cianuro y telurito, activada por el selenio; la glutatión-S-transferasa actúa removiendo los hidroperóxidos orgánicos, presenta diferente masa molecular y no es inhibida por el cianuro,- El valor de la  $K_m$  de la glutatión peroxidasa está en el rango de 10 mM a 5 mM.



Detección.- La glutatión peroxidasa es determinada por:

- 1.- Polarográficamente por reducción de los grupos GSH a GSSH
- 2.- Oxidación del NADPH por la glutatión reductasa
- 3.- Reducción de Glutatión por DTNB (NTB)
- 4.- Reducción de Glutatión por Hidroperóxidos de Cumeno
- 5.- Espectrofotométricamente por oxidación del TPNH
- 6.- Medición de la concentración de Peróxido de Hidrógeno.

## C A T A L A S A .

El peróxido de hidrógeno es un producto de oxidación de muchos tejidos, muy tóxico para las células y su acumulación es controlada por la catalasa, que es una enzima elipsoidal, contiene cuatro cadenas de polipeptidos, cada cadena se une a una molécula de protohemin, con una masa molecular de ---- 25,000.

Se encuentra distribuida en el hígado, sangre, eritrocitos, microorganismos y plantas. Algunos sustratos pueden ser oxidados in vitro por la catalasa ( $H_2O_2$ , Metanol, Etanol, Acido Fórmico, tioles y fenoles) La  $K_m$  de la catalasa es de 25 mM.

Detección.- Los métodos para la determinación de la actividad de la catalasa son:

- 1.- Electroforésis (análisis cualitativo)
- 2.- Medición de la producción de calor en la reacción
- 3.- Determinación del oxígeno liberado por la descomposición del agua oxigenada (Método de Clark o menométricamente).
- 4.- Determinación del peróxido de hidrógeno residual por: titulación, espectrofotometría 230-250 nm, polarografía y mediciones electroquímicas con el electrodo de platino.

## B I B L I O G R A F I A

- BABIOR, B.M., CURNUTTE, J.T. y MCMURRICH, B.J.: The Particulate Superoxide Forming Systems from Human Neutrophils. J. Clin. Invest. 58: 289-296. 1976.
- BEAUCHAMP, CH. y FRIDOVICH, I.: Superoxide Dismutase: Improved Assay and a Assay Aplicable to --- Acrylemide Gels. Anal. Biochem. 44: 276-287. 1976
- BOHNENKAMP, W. y WESER, U.: Cooper Deficiency and Erythrocyte. Biophys. Acta 444: 396-406. 1976.
- CADENAS, E., BOVERIS, A., RAGAN, C.I. y STOPPANT, A.O. M.: Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide by NADH-ubiquinone Reductase and Ubiquinone-Citochrome c Reductase from Beef Heart Mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 180: 287-290. 1977.
- CHEEKE, P., y WHENGER, P.D.: Glutathione Peroxidase Activity of Rabbit Tissues. Nutr. Rep. Inter. 13(3): 287-290. 1976.
- CHOW, CH. K. y TÄPPEL, A.L.: Response of Glutathione Peroxidase to Dietary Selenium in Rats. J. Nutr. 104: 444-451. 1974.
- CRAPO, J.D. y TIERNEY, A.L.: Superoxide Dismutase and Pulmonary Oxygen Toxicity. Am. J. Physiol. 226 (6): 1401-1407. 1974.
- DRATH, D.B. y KARNOVSKY, M.L.: Superoxide Production by Phagocytic Leucocytes. J. Exp. Med. 141: 257-262. 1975.
- FLOHE, L. y BRAND, I.: Kinetics of Glutathione Peroxidase. Biochim. Biophys. Acta 191: 541-549. 1969.
- FRIDOVICH, I.: Superoxide Dismutase. Ann. Rev. Biochem. 44: 147-159. 1975.

- FRIEDEN, E., OSAKI, S. y ARNASON, R.M.: Cooper Proteins and -- Oxygen. J. Gerontol. 49:213-252. 1965.
- FRIEDEN, E. y ARNASON, R.M.: Selenium Inducen Glutathione Peroxidase Activity in Mouse Neuroblastoma Cells. Biochim. Biophys. Res. Commun. 79(1): 119-123. 1977.
- GREGORY, E.M. y FRIDOVICH, I.: Oxygen Toxicity and the Superoxide Dismutase. J. Nutr. 104: 580-589. 1974.
- HAFEMAN, D.G., SUNDE, R.A. y HOEKSTRA, W.: Effect of Dietary - Selenium on Erythrocyte and Liver Glutathion Peroxidase in the Rat. J. Bacteriol. 114:1193-1197. 1973.
- JHONSTON, R.B., LEHMEYER, J.E. GUTRIE, L.A.: Generation of Superoxide Anion and Chemiluminescence by Human Monocytes During Phagocytosis and on Contact with Surface bound Immunoglobulin G. J. Exp. Med. 143:1551-1556. 1976.
- KLUG, D. y RABANI, J.: A Direct Demonstration of the Catalitic Action of Superoxide Dismutase Though - the use of Pulse Radiolysis. J. Biol. Chem. 247(15):4839-4842. 1972.
- KONO, Y.: Generation of Superoxide Radical During Autoxidation of Hydroxylamine and an -- Assay for Superoxide Dismutase. Arch. Biochem. Biophys. 186:189-195. 1978.
- LAVELLE, F., MICHELSON, A.M. y DIMITTIJEVIC, L.: Biological -- Protection by Superoxide Dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55(2): 350-357. 1973.
- LAWRENCE, R.A. y BURK, R.F.: Glutathione Peroxidase Activity in Selenium Deficient Rat Liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71(4):952-958. 1976.
- LITTLE, C., OLINESCH, R., REID, K.G. y O'BRIEN, P.J.: Properties and Regulation of Glutathion Peroxidase. J. Biol. Chem. 245(14):3632-3636. 1970.

- MARCHENA, O., GUARNIERI, M. y McKHAN, G.: Glutathione Peroxidase Levels in Brain. J. Neurochem. 22(5): 773-776. 1974.
- MARKLAND, S. y MARKLUND, G.: Involvement of the Superoxide -- Anion in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide -- Dismutase. Eur. J. Biochem. 47:469-474. 1974.
- McCORD, J. y FRIDOVICH, I.: Superoxide Dismutase an Enzymatic Function for Erythrocyte. J. Biol. Chem. 244 (22):6049-6055. 1969.
- McCORD, J., KEELE, B.B. y FRIDOVICH, I.: An Enzyme Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. Proc. Nat. Acad. Sci. 68(5): 1024-1027. 1972.
- PIERCE, S. y TAPPEL, A.L.: Effects of Selenite and Selenomethionine on Glutathione Peroxidase in Rats. J. Nutr. 107: 475-479. 1977.
- PINTO, E.R. y BARTHLEY, W.: The Effect of Age and Sex on Glutathione Peroxidase Activities and on Aerobic Glutathione Oxidation in Rat Liver Homogenates. J. Biochem. 112:109-115. 1969.
- PORTA, E.A., CHING, B.K. y JHON, N.S.: Glutathione Peroxidase System and Microsomal Lipoperoxidation in Pre-necrotic Stages of Dietary Hepatic Necrosis in Rats. J. Nutr. 107: 1852-1858. 1977.
- PROHASKA, J.B., HOEKSTRA, W.G. y GANTHER, H.E.: Glutathione Peroxidase; Inhibition of Cuanide and Release of Selenium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74(1):64-71. 1977.
- PROHASKA, J.B. y GANTHER, H.E.: Glutathione Peroxidase Activity of Glutathione-S-Transferase Purified from Rat Liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76(2):437-445. 1977.
- PROHASKA, J.B. y GANTHER, H.E.: Selenium and Glutathione Peroxidase in Developing Rat Brain. J. Neurochem. 27:1379-1387. 1976.

- RISTER, M. y BAENNER, R.L.: The Alteration of Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and NADPH-Cytochrome c Reductase in Guinea Pigs Polymorphonuclear Leukocytes and Alveolar Macrophages During Hypoxia. J. Clin. Invest. 58:1174-1177. 1975.
- ROTILLO, G., RIGO, A., BRACCI, R., BAGNOLY, F. SARGENTINI, I. y BRUNORI, M.: Determination of Red Blood Cells; Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Newborns in Relation to Neonatal Hemolysis. Clin. Chim. Acta 81:131-134. 1977.
- ROTRACK, J. T., POPE, A.L., GANTHER, H.E., SWENSON, A.B., --- HAFEMAN, D.G. y HOEKSTRA, W.G.: Selenium; Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. J. Clin. Inves. 57:1334-1339. 1975.
- SINET, P.M., MICHELSON, A.M. y JEROME, H.: Superoxide Dismutase Activities of Blood Platelets in --- Trisomy 21. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67(3):910-915. 1975.
- SINET, P.M. MICHELSON, A.M., BAZIN, A., LEJEUNE, J. y JEROME, H.: Increase in Glutathione Peroxidase Activities in Erythrocytes from --- Trisomy 21 Subjects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67(3):904-909. 1975.
- STULTS, F.H., FORSTROM, J.W., CHIN, D.T. y TAPPEL, A.L.: Rat Liver Glutathione Peroxidase; Purification and Study of Multiple Forms. Arch. Biochim. Biophys. 183:490-497. 1977.
- WEISIGER, R.A. y FRIDOVICH, I.: Superoxide Dismutase, Organellar Specificity. J. Biol. Chem. 248(10):3582-3592. 1975.
- WESER, U., PASCHEN, W. y YONES, M.: Singlet Oxygen and Superoxide Dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66(2):769-777. 1975.

## ALTERACIONES DE LAS MEMBRANAS.

La mitocondria presenta modificaciones en su volumen, al cual está asociado con la formación de lipo-peróxidos y reacciones de deterioración, éstas pueden ser reversibles: la contracción de la mitocondria es realizada por la adición de ATP, iones magnesio, suero de albúmina de bovino. etc. Este proceso se ve relacionado con un incremento en la acumulación de - productos de oxidación del ácido tiobarbitúrico (TBA). La -- reacción de deterioración es inducida por una mezcla de glutación oxidado y reducido, produciéndose una expansión junto con la acumulación de TBAT.

La alteración en cloroplastos ocurre como respuesta a -- cambios de osmolaridad, este cambio de volumen se puede determinar por la concentración de sacarosa y otras moléculas sus-pendidas en el medio, ocurre si las condiciones no son favorables para la síntesis de ATP o hidrólisis. La radiación ocasiona una deformación en los cloroplastos por su abundante -- producción de peróxidos, siendo la fosforilación más sensible que el transporte de electrones.

Los lisosomas in vitro al estar en contacto con detergentes, líquidos fríos, sufren un shock osmótico. La adición - de la vitamina A y la lipoperoxidación mediada por radicales libres producen daños a la membrana porque activan las enzi--mas lisosomales.

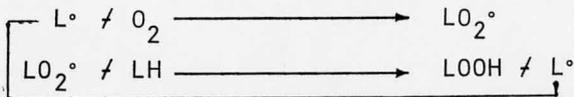
## VITAMINA E EN LA LIPOPEROXIDACION.

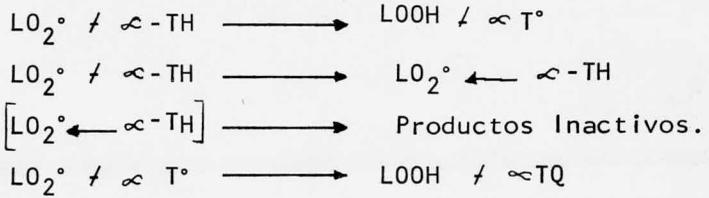
La vitamina E (alfa-tocoferol) es un antioxidante biológico, que actúa inhibiendo la peroxidación de lípidos que contienen ácidos grasos polinsaturados. Esta vitamina se encuentra presente en las mismas membranas biológicas acompañando a los demás lípidos.

El alfa-tocoferol funciona en tres formas:

- 1.- Incrementando la asociación de lípidos de la membrana por sus interacciones de Van der Waals, protegiéndolas del ataque del oxígeno o de fosfolipasas endógenas.
- 2.- Atrapando radicales lipoperóxido que se forman durante el paso del oxígeno o bien durante la transferencia de electrones.
- 3.- Atrapando a los radicales del oxígeno producidos durante las reacciones fisiológicas.

El mecanismo antioxidante de la vitamina E, lo realiza - mediante la donación de átomos de hidrógeno a los radicales - libres formando moléculas neutras e inhibiendo la peroxidación.





$\text{L}^\circ$  y  $\text{LO}_2^\circ$  = Radicales libres

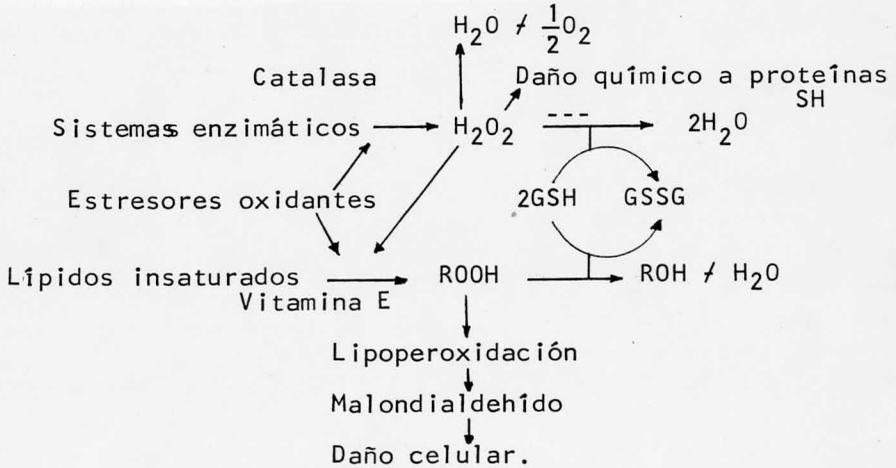
$\alpha\text{-TH}$  = Alfa-tocoferol

$\alpha\text{-T}^\circ$  = Alfa-tocoferol activado

LOOH = Hidroperóxidos

$\alpha\text{-TQ}$  = Alfa-tocoferol quinona.

El selenio actúa también como un antioxidante, es constituyente principal de la glutatión peroxidasa, el selenio y la vitamina E son importantes para prevenir el daño celular producido por los radicales libres e hidroperóxidos.



B I B L I O G R A F I A .

- BARKER, M.). y BRIN, M.: Mechanisme of Lipid Peroxidation in Erythrocytes of Vitamin-E Deficient Rats in Phospholipid Model Systems. Arch. Biochem. Biophys. 166:32-40. 1975.
- BONETTI, E., ABBONDANZA, A., CORTE, E.D., NOVELLO, F. y ---- STIRPE, F.: Studies on the forma--- tion of Lipid Peroxides and on some Enzimic Activities in the Liver of Vitamin-E Deficient Rats. J. Nutr. 105:364-371. 1975.
- CENTURY, B. y HORWITT, M.K.: Biological Availability of va--- rious Forms of Vitamin E with Respect to different Indices of deficiency. Fed. Proc. 24(2-3):906-911. 1965.
- COMBS, G.F., NOGUCHI, T. y SCOTT, M.L.: Mechanisms of Actio of Se and Vitamin E in Protection of Biological Membranes. Fed. Proc. 34: 2090-2095. 1975.
- DIPLOCK, A.T.: Vitamin E Se and the Membrane Drug- Metabolizing Enzyme System of Rat Liver. Vitamin. Horm. 32:445-461. 1974.
- GIASUDOIN, A.S.M., CAYGILL, C.P.J., DIPLOCK, A.T. y JEFERY, E.H.: The Dependence of Vitamin E - and Se of Drug Demethylation in Rat Microsomal Fraction. Biochem J. 146: 339-350. 1975.
- GREEN, J.: Vitamin E and the Biological Antioxi--- dant Theory. Ann. New York Acad. Sci. 203: 29-44. 1972.
- HOEKSTRA, W. G.: Biochemical Function of Se and its Relation to Vitamin E. Fed. Proc. 34 (11):2083-2083. 1975.
- MOLENAAR, I., VOS, J. y HOMMES, F.A.: Effect of Vitamin E De- ficiency on Cellular Membranes. Vitam Horm. 30:45-82. 1972.

- TAPPEL, A.L.: Vitamin E and Radical Peroxidation of Lipids. Ann. New York Acad. Sci. 203:12-18. 1972.
- TSEN, C.C. y COLLIER, H. B.: The Protective Action of Tocopherol Against Hemolysis of Rat Erythrocytes by Dialuric Acid. Con. J. --- Biochem. Physiol. 38(11):957-964. 1960.
- WITTING, LL. A.: Biological Availability of tocopherol and other Antioxidant at the Cellular Level. Fed. Proc. 24:912-916. 1965.

## ENVEJECIMIENTO CELULAR.

El envejecimiento es un proceso metabólico caracterizado por la disminución de las reservas funcionales, conforme pasa el tiempo, este proceso puede ocurrir verticalmente en diferentes niveles: a nivel molecular, a nivel celular y finalmente a nivel tisular y, horizontalmente, a un nivel citológico, bioquímico, fisiológico y por último, a nivel comportamiento.

Citológicamente.- En las células viejas el núcleo se contrae, el cuerpo de Golgi se empieza a fragmentar, el nucleolo se alarga, hay una acumulación de vacuolas, disminuye la masa muscular, algunos órganos aumentan (próstata) y otros disminuyen (cerebro).

Bioquímicamente.- Con el paso del tiempo las células muestran un aumento de lactato, aumenta el entrecruzamiento de la colágena, histonas y lipofushina, disminuye el ATP (adenosin trifosfato) y hay variaciones en ciertos sistemas enzimáticos.

Fisiológicamente.- Hay pérdida de cabello, endurecimiento de las venas, menos producción de sangre en médula y esto se manifiesta clínicamente con la blancura del pelo, arrugamiento en la piel y aumento de la pigmentación de la piel.

Comportamiento.- Hay cambios en la capacidad motora-sensorial (disminución de la visión, oído, equilibrio, gusto y olfato).

Hay varias teorías que tratan de explicar la etiología del envejecimiento, entre ellas están:

1.- Teoría Genética.- Una falla en la replicación, transcripción o translación de DNA; o un mal funcionamiento en el RNA, o en enzimas relativas provocan el envejecimiento, el rompimiento del genoma, con la edad, provoca la producción de proteínas que contienen errores, estas proteínas pueden ser:

- a) inertes y privar a la célula de sus funciones necesarias;
- b) letal y matar a la célula, o
- c) llegar a ser antigénicas. La mutación en los genes - también puede producir errores.

2.- Teoría de la Autoinmunidad.- El cuerpo puede reaccionar consigo mismo para producir antígenos, y los nuevos antígenos pueden ser estimulados por la producción defectuosa de las proteínas y con la edad puede haber una pérdida de tolerancia inmunológica produciéndose un aumento en la respuesta a los antígenos.

La actividad de las células B (derivadas de la médula osea) y las células T (derivadas del timo) disminuyen con la

Edad; las células B producen los anticuerpos que provocan la inmunidad y las células T son linfocitos que atacan a cuerpos extraños al organismo y ayudan a regular la respuesta inmune. Una disminución en la actividad de las células T puede provocar cambios inmunológicos, asociados con la edad por la disminución de las células B, lo que determina un aumento de la autoinmunidad (destrucción por el sistema inmune de los tejidos del propio organismo).

- 3.- Teoría de los Radicales Libres.- Los radicales libres -- son altamente reactivos y pueden provocar un daño en el DNA y en otras estructuras. Son sustancias liberadas -- por las grasas poliinsaturadas, actúan con las membranas de las células y con ciertas enzimas producen reacciones oxidativas que destruyen a la membrana, dañan a la mitocondria y lisosoma, provocan cambios en los cromosomas, acumulación de pigmentos y alteran a la colágena. Para controlar las reacciones de los radicales libres, se modifican las cantidades de alimentos naturales en la dieta de cada individuo, así como la adición de inhibidores adecuados de estos radicales.
  
- 4.- Teoría Transmisora de Vectores de Virus.- Una transmi--- sión vertical por un virus juega un papel importante en el envejecimiento. El Papel de RNA, del tumor de un vi-

rus es transmitido horizontalmente (de persona a persona) y verticalmente (de madre a hijo). Existe un genoma virulento en cada organismo, la forma de las partículas C pueden inhibir la transcripción del RNA y provocar una autoinmunidad.

La redundancia en la información genética, produce una degeneración del Código Genético en el cual casi todos los aminoácidos tienen más de un código mal y la síntesis de proteínas tiene un error que aumenta con la edad.

Existen inhibidores que han sido usados como agentes anti-envejecedores, entre los cuales están la: 2-mercaptoetanolamina, NN-difenil-p-fenilendiamina, dietilditiocarbamato, --eficientes contra las radiaciones; el butilhidroximol usado para los alimentos; la etoxiquina (antioxidante) usado para los alimentos animales, la vitamina E un antioxidante natural.

Debido a la elevada reactividad química de los intermediarios de los radicales libres, hay un gran número de productos. Estas reacciones se pueden llevar a cabo en el medio ambiente debido a las radiaciones ionizantes, la contaminación atmosférica, etc. que son reacciones irreversibles. La reacción entre el oxígeno y compuestos orgánicos se ve aumentada con la presencia de metales como cobre, fierro y manganeso.

La acción de los radicales libres puede formar diversas lesiones celulares como cáncer, amiloidosis, senilidad, arteroesclerosis, hipertensión y enfermedades pulmonares; el envejecimiento cerebral se acompaña de cambios en la corteza del cerebro, los surcos son más profundos y las circunvoluciones más pequeñas, el peso del cerebro disminuye al igual que el volúmen sanguíneo.

## PIGMENTOS DE ENVEJECIMIENTO

Existen pigmentos que se acumulan con la edad, aparecen cuando las manifestaciones metabólicas y fisiológicas de las células se están deteriorando, principalmente en el sistema nervioso, músculo (cardíaco, esquelético y voluntario) hígado, adrenales y tejido graso, son gránulos de lipofushina que presenta una fluorescencia característica a 450 nm; su presencia es debida a la peroxidación de lípidos insaturados de las membranas subcelulares; el análisis del material seco muestra contener lípidos, carbohidratos y proteínas, vistos al microscopio aparecen gránulos de color amarillo-café y a la luz ultravioleta fluoresce de amarillo-verde a naranja. Se cree que el ceroide y la lipofushina son el mismo pigmento, pero con un estado de evolución diferente, se pueden diferenciar por sus características de solubilidad, agentes quelantes o las resinas de intercambio catiónico pueden disolver los ceroides pero no a la lipofushina; vistos al microscopio los gránulos de lipofushina raramente exceden de una micra de diámetro y los gránulos de ceroide son largos. Ambos pigmentos tienen una cubierta compuesta de una simple membrana, lo cual sugiere que son de origen lisosomal. Existe una substancia que puede remover a la lipofushina llamada Centrofenoxina, la cual se utiliza para tratar condiciones confusionales en la edad.

## EFFECTO DE LAS DROGAS EN LA PEROXIDACION

En los microsomas se encuentra un pigmento que unido al monóxido de carbono es reducido por el TPNH el cual es responsable de la hidroxilación microsomal de esteroides, demetilación oxidativa e hidroxilación de drogas; dicho pigmento es el citocromo P-450 que forma un complejo CO reducido que posee una banda de absorción a 450 nm. Los tipos de reacciones que se le atribuyen son:

Hidroxilación alifática	Peroxidación
Hidroxilación aromática	Deaminación
N-oxidación	Desulfuración
Sulfoxidación	Dehalogenación
Epoxidación	Azoreducción
N-dealquilación	Nitroreducción
S-dealquilación	N-oxido-reducción
O-dealquilación	Epóxido reducción

Dichas reacciones pueden formar productos fácilmente excretables o bien sustancias de gran actividad biológica o tóxica. Existen tres fracciones microsomales que son requeridas como cofactores de hidroxilación.

- 1.- Citocromo P-450 identificado como un complejo de CO y en estado reducido.
- 2.- NADPH-citocromo c reductasa
- 3.- Fosfolípidos (Fosfatilcolina).

No se requiere de NADPH y oxígeno, la hidroxilación de una gran variedad de sustratos, incluyendo ácidos grasos, hidrocarburos, drogas y esteroides la reacción es:

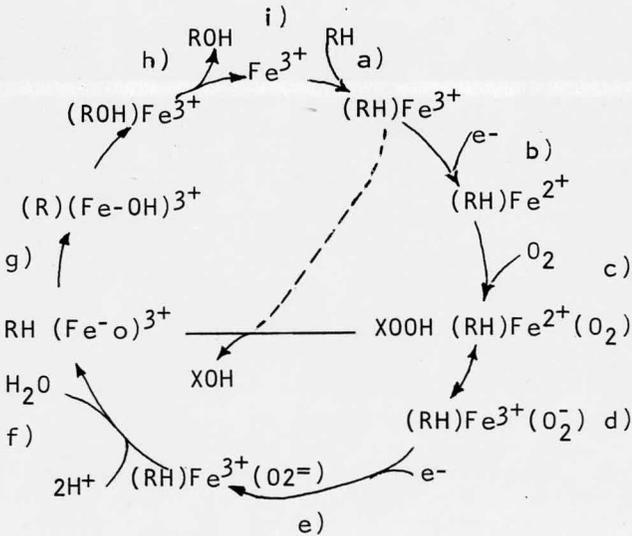


Existen diferentes tipos de citocromo P-450 y cada uno presenta un sustrato más o menos específico.

C L A S E	E J E M P L O S .
Lípidos Fisiológicos	Acidos grasos, prostaglandinas, esteroides, Vitamina D.
D r o g a s	Numerosos compuestos: narcóticos, tranquilizantes, sedativos, anti-coagulantes, antihistamínicos, -- analgésicos, estimulantes, anti--depresivos, sulfonamidas.
Productos de Petr6leo	Hidrocarburos Alifáticos, alicíclicos, y aromáticos
Anestésicos	Metoxiflurano, Fluroxena
Insecticidas	Paration Dieldrin
Carcin6genos	Hidrocarburos policíclicos aromáticos, acetilamino-fluoreno.

El citocromo P-450 tiene un papel importante en la carcinogénesis química, el benzo (a) pireno se convierte a un producto altamente mutagénico por acción del P-450 y de gran actividad carcinogénica, el resultado es un epóxido diol de alta reactividad en las uniones para los ácidos nucleicos.

La activación del oxígeno por el P-450 se cree que involucra la adición de dos electrones para el oxígeno molecular con pérdida de agua y formación de un oxenol de hierro, capaz de atacar a un radical carbono intermediario, para dar un producto hidroxilado.



- a).- P-450 oxidado  $\text{Fe}^{3+}$  + Sustrato RH
- b).- El fierro heme es reducido a ferroso por acción de la reductasa.
- c).- El oxígeno es añadido para formar un complejo ternario.
- d).- El producto está en equilibrio con el complejo Férrico superóxido, requiriendo solo transferir un electrón para este cambio.
- e).- Un segundo electrón es donado por la reductasa o citocromo  $b_5$  dando una especie de peróxido de hidrógeno.
- f).- El anión peróxido sufre una protonación y eliminación de agua con formación de un complejo Fe-O, la actividad del oxígeno puede ser una especie de oxenoide.
- g).- El sustrato sufre una abstracción de hidrógeno para dar un radical carbono intermediario.
- h).- Por último, se combina el radical sustrato con una adecuada posición del oxígeno para producir un producto hidroxilado.
- i).- Con renovación del producto oxidado se puede generar el P-450.

Se ha visto que una dosis de tetracloruro de carbono produce una considerable acumulación de grasa con una necrosis extensa centrilobular en el retículo endoplásmico, el P-450 interacciona con el  $\text{CCl}_4$  y forma radicales endógenos, induciendo la formación de peróxidos de lípidos con una propagación de la peroxidación por el sistema  $\text{NADPH-ADP-Fe}^{2+}$ .

## B I B L I O G R A F I A

- COON, M.J.: Oxygen Activation in the Metabolism of Lipids, Drugs and Carcinogens. Ntr. Rev. 36(11):319-328. 1978.
- HARMAN, D.: Free Radical Theory of Aging: Effect of Amount and Degree of Unsaturation of -- Dietary Fat on Mortality Rate. J. Gerontol. 26(4):451-457. 1974
- HENDLEY, D.D., MILDVAN, A.S. y STREHLER, B.L.: The Properties of Isolated Human Cardiac Age Pigment II. Chemical and Enzimatic Properties J. Gerontol. 18:250-259. 1963.
- MARX, J.L.: Aging Research (1): Cellular Theories - of Senescence. Science 186:1105-1107. 1974.
- MEIER, R.: Aspectos del Envejecimiento Cerebral y sus Consecuencias en Farmacología. (Conferencia).
- PALI, G., GRVELA, E., ALBANO, E. y DIANZAIN, M.U.: Studies - on Fatty liver with Isolated Hepatocytes. The Action of  $CCl_4$  on Lipid Peroxidation, Protein and Triglyceride Synthesis and Secretion. Exp. Mol. --- Path. 30:116-127. 1979.
- PITOT, N.C.: Carcinogenesis and Aging. Two Related Phenomen? Am. J. Path. 87(2):444-472. 1977.
- REICHEL, W.: Lipofucin Pigment Acumulation and Distribution in Five Rat Organs as a Function of Age. J. Gerontol. 28: 1756-1765. 1975.
- RUGE, W.M.: Experimental Pathology and Pharmacology in Brain Research and Aging. Life Science 17 (11):1627-1636. 1976.

- SELL, D.A.: Liver Parenchymal Cell Injury. Lesions of Membrane Cellular. Components Following Iodoform. J. Cell Biol. 41: 736-752. 1977.
- SLATER, T.F.: The Inhibitory Effects in Vitro of -- Phenothiazines and other Drugs on Lipid Peroxidation Systems in Rat Liver Microsomes and their Relationship to the Liver Necrosis Produced by Carbon Tetrachloride. Biochem. J. 106: 155--160. 1968.

## C O N C L U S I O N E S .

La peroxidación es un mecanismo degenerativo celular que se produce por acción de los radicales libres y se involucran con algunos metales,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Va^{2+}$  y la presencia de oxígeno.

Estos radicales se producen de diferentes formas; la principal es por acción de rayos solares que provocan una fotólisis en las células (la luz actúa sobre el agua celular) formando a los radicales libres, que en esta forma son muy activos y empiezan a actuar sobre los lípidos de las membranas celulares, principalmente, polimerizándolos y haciendo que la membrana sea más rígida e inestable, manteniendo el daño celular, las reacciones en cadena consecutivamente, el daño celular irreversible se observa, primordialmente, en personas de edad avanzada, porque en ellas además, las defensas inmunológicas se han visto disminuidas al igual que las enzimas que actúan en contra de la peroxidación, estas enzimas al estar disminuidas permiten que los radicales actúen y formen los peróxidos; las enzimas que actúan en contra de los peróxidos -

son principalmente tres: La Superóxido Dismutasa (SOD), que actúa sobre los radicales derivados del oxígeno, como el oxígeno singulete, y radicales superóxido; la Glutation Peroxiodasa (GSH-Px) sobre los radicales hidroxilo y peróxido, y, - por último, la Catalasa, la cual actúa sobre los radicales peoróxido. Existen otros inhibidores o atrapadores biológicos de radicales libres, el principal es la vitamina E y la Vitamina C los cuales evitan la peroxidación. Los radicales que se escapan de la acción de las enzimas atrapadoras, son los que van a provocar el daño celular, en forma silenciosa, la- que va aumentando conforme la edad avanza ya que las enzimas van disminuyendo en su actividad y la acción de los radicales va incrementándose.

Una perspectiva que se podría utilizar para evitar el enovejecimiento y el daño celular sería: la de purificar las enozimas antioxidantes e introducirlas al organismo; esto toda-  
vía no es factible, tal vez, por la posible antigenicidad de estas enzimas que pueda ser mayor y sean rechazadas o bien -- prevenir el efecto peroxidante con sustancias antioxidantes que deben ser consumidas durante toda la vida, ya que toda eso pecie biológica tiene una vida máxima determinada por el Reloj Biológico que está localizado en su genoma nuclear.