



**TITULO DE LA TESIS** MECANISMO MOLECULAR DEL EFECTO CITOTOXICO  
DE LA CISTEINA EN HEPATOCITOS CULTIVADOS DE RATA

**AÚTOR** GUILLERMO SAEZ TORRES :

**DIRECTOR** JOSE VIÑA RIBES

**TRIBUNAL:** Prof.Dr.D. RAFAEL CARMENA  
Prof.Dr.D. JOSE VIÑA GONZALEZ  
Prof.Dr.D. HERMENEGILDO BEGATE  
Prof.Dr.D. JOSE CABO  
Prof.Dr.D. JOSE VIÑA RIBES

**FECHA DE LECTURA:** FEBRERO-83

**CALIFICACION OBTENIDA:** SOBRESALIENTE "CUM LAUDE"

MECANISMO MOLECULAR DE LA CITOTOXICIDAD  
DE LA CISTEINA EN HEPATOCITOS AISLADOS  
DE RATA.

Tesis presentada para  
la obtención del grado  
de Doctor en Medicina y  
Cirugía por GUILLERMO  
SAEZ TORMO.

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA.

AÑO 1.983



UMI Number: U607436

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607436

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

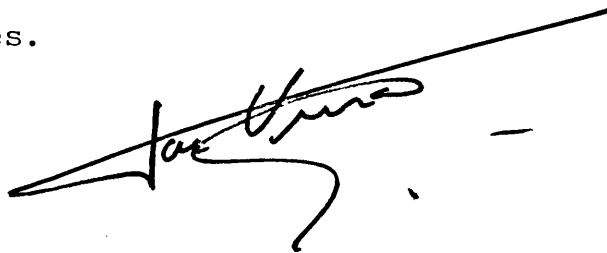


ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

DON JOSE VIÑA RIBES, Profesor Adjunto Numerario  
de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de  
Medicina de la Universidad de Valencia,

C E R T I F I C O: Que D. GUILLERMO SAEZ TORMO,  
licenciado en Medicina y Cirugía,  
presenta, bajo mi dirección, la Tesis  
Doctoral titulada "MECANISMO MOLECULAR  
DE LA CITOTOXICIDAD DE LA CISTEINA EN  
HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA".

Y para que conste, firmo el presente certificado  
en Valencia, a doce de Enero de mil novecientos  
ochenta y tres.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Viña Ribes', written over a horizontal line.

Firmado: Dr. José Viña Ribes

A MARIBEL Y  
A MIS PADRES.

CON MI SINCERO AGRADECIMIENTO

Al Profesor D. JOSE VIÑA GINER, por ofrecerme la oportunidad de formarme en su departamento y estimularme para nuevos proyectos en el campo de la investigación. A su continuo interés demostrado por los jóvenes investigadores debo la realización de esta tesis, así como otras satisfacciones científicas.

A D. VICENTE ANTON VILANOVA, cuya acogida en su laboratorio en los primeros momentos de mi aprendizaje no olvidaré nunca.

A JOSE VIÑA RIBES, por guiarme en mi trayectoria científica y académica con un estilo singular en el que se funden la genialidad didáctica del buen profesor con el apoyo y comprensión del buen amigo.

A él debo la conclusión de este trabajo y todos cuantos conocimientos he adquirido durante su realización.

Quiero resaltar también el valor incalculable de la ayuda técnica y moral que durante tanto tiempo he recibido de todos los miembros del departamento de Bioquímica y Fisiología, especialmente de Inmaculada Puertes, Mercedes Izquierdo, Juana Benlloch, Concha García y Asunción Salanova,

asi como la colaboración, consejos y afecto de M<sup>a</sup> Dolores Catalá, Juan Viña, Ricardo Bolinches, F.Javier Romero, José Estrela, Juan Montoro, y Tomas García.

Agradezco enormemente la labor realizada por la Stra. Pilar Zamora que sacrificó gran parte de su tiempo libre para mecanografiar el manuscrito de esta tesis.

---



Al Profesor H.A. Krebs, por descubrirme y permitirme experimentar el placer embriagador de la labor creativa.

A Reg Hems, por prestarme su ayuda teórica y técnica desarrollada siempre en un ambiente de cordialidad y agradable sentido del humor del que guardo gratos recuerdos.

J.V. Bannister, por sus fecundas sugerencias y afecto con el que se dirigió a mi desde el primer momento.

Finalmente, agradezco a todos los miembros del METABOLIC RESEARCH LABORATORY por su acogida, ayuda y amistad.

---

INDICE

## INDICE GENERAL

	<u>Pag.</u>
I. <u>INTRODUCCION AL EFECTO CITOTOXICO DE LA CISTEINA.</u>	2
1. <u>Objetivo de la presente Tesis Doctoral.</u>	2
2. <u>Importancia del glutatión reducido (GSH) en el metabolismo celular.</u>	5
2.1. Generalidades.	5
2.2. Estructura.	6
2.3. Funciones metabólicas del glutatión.	8
2.3.1. Funciones no mediadas enzimáticamente.	8
2.3.2. Función del GSH como coenzima.	9
2.3.3. Papel en la eliminación de peróxidos.	10
2.3.4. Papel del GSH en la eliminación de radicales libres.	11
2.3.5. Papel del glutatión como sustrato de las transdehidrogenasas.	12
2.3.6. Papel del GSH en la protección de membranas.	14
2.3.7. Papel del GSH en la radioprotección celular.	14
2.3.8. Función del GSH en el transporte de aminoácidos a través de las membranas.	16

	<u>Pag.</u>
2.4. Vida media del glutathion en hígado y otros órganos.	19
3. <u>Importancia de los nucleótidos adenílicos (ATP, ADP y AMP) como índice de viabilidad celular.</u>	24
4. <u>Importancia de los radicales libres en la citotoxicidad.</u>	29
4.1. Generalidades.	29
4.2. Concepto de radical libre.	34
4.3. Reactividad de los radicales libres.	38
4.4. Posibles mecanismos en la formación de radicales libres "in vivo".	43
4.5. Reacciones de propagación.	55
4.6. Reacciones de terminación.	63
4.7. Radicales libres y Lipidoperoxidación. La lesión de la membrana y sus consecuencias.	67
5. <u>La L-Cisteína.</u>	79
5.1. Estructura.	79
5.2. Propiedades físico-químicas.	79
5.3. Metabolismo de la L-Cisteína.	89
5.3.1. Generalidades.	89
5.3.2. Síntesis de Cisteína.	90
5.3.3. Destinos metabólicos de la L-Cisteína.	94

	<u>Pag.</u>
5.4. Antecedentes acerca de la citotoxicidad de la Cisteína.	98
6. <u>Substratos citotóxicos producidos en el metabolismo del oxígeno.</u>	103
6.1. Generalidades.	103
6.2. El radical Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).	105
6.3. El peligro del radical Superóxido.	107
6.4. El radical Hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ).	108
6.5. La toxicidad del radical $OH^{\cdot}$ .	109
6.6. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).	111
6.7. Mecanismo de defensa contra la citotoxicidad del oxígeno.	114
6.7.1. Introducción.	114
6.7.2. Respuesta Sistémica a la citotoxicidad del oxígeno.	115
6.7.3. Mecanismos enzimáticos.	116
6.7.3.1. La hiperóxido dismutasa (SOD).	116
6.7.3.2. La Catalasa.	118
6.7.3.3. La glutatión peroxidasa.	122
6.7.4. Mecanismo químico.	124



	<u>Pag</u>
2.3.3. Determinacion de la concentracion de adenosin difosfato (ADP) y adenosin monofosfato (AMP).	142
2.3.4. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa	142
2.4. Resonancia paramagnética de electrones y la técnica del Spin-trap.	143

III. RESULTADOS

1. Efecto de la adición de cisteína sobre la concentración de glutatión en hepatocitos aislados de rata. 147
2. Efecto de las trazas de cobre sobre la disminución del GSH causada por la cisteína. 149
3. Efecto del cloruro amónico sobre el nivel de glutatión en los hepatocitos aislados de la rata. 152
4. Efecto de la cisteína y el cloruro amónico sobre el contenido de ATP en los hepatocitos aislados de rata alimentada y en ayunas de 48 horas. 155
5. Efecto del cobre sobre la disminución de ATP y la liberación de LDH inducida por la cisteína y el cloruro amónico en los hepatocitos aislados de rata. 159
6. Efecto del lactato y otros estimuladores de la neoglucogénesis sobre la disminución de los nucleótidos adenílicos en hepatocitos aislados incubados con cisteína y cloruro amónico. 162



	<u>Pag.</u>
7. Efecto de los ácidos grasos y el etanol sobre la depleción de nucleótidos adenílicos causada por la cisteína y el cloruro amónico.	165
8. Efecto de la catalasa sobre la concentración de GSH y liberación de LDH en los hepatocitos incubados con cisteína y cloruro amónico.	168
9. Efecto de la catalasa sobre la liberación de LDH por los hepatocitos incubados en presencia de cisteína, cloruro amónico y cobre.	172
10. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno a las incubaciones de hepatocitos aislados de rata.	175
11. Efecto del etanol en presencia de cisteína y cloruro amónico sobre la concentración de ATP en los hepatocitos aislados de la rata.	178
12. Efecto de tres enzimas detoxificantes contra la acción citotóxica de radicales libres.	181

13. Efecto de la cisteína, cloruro amónico y cobre sobre la concentración de ATP y la liberación de LDH en los hepatocitos aislados de la rata incubados bajo condiciones anaeróbicas. 184
14. Efecto de la catalasa sobre el consumo de oxígeno durante la autooxidación de la cisteína. 187
15. Espectro de resonancia paramagnética de electrones (r.p.e.) obtenido a partir de los productos de la oxidación espontánea de la cisteína. 190
16. Efecto de las concentraciones progresivas de cisteína sobre la producción de DMPO-OH y DMPO-Cys. 197
17. efecto del cobre, hierro y DETAPAC sobre la formación de los compuestos de aducción producidos en la oxidación espontánea de la cisteína. 200
18. Efecto de varias concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre la producción de DMPO-Cys en la autooxidación de la cisteína. 204

19. Efecto de la superóxido dismutasa y catalasa sobre la producción de DMPO-Cys y DMPO-OH en la autooxidación de la cisteína. 207
20. Medida del consumo de oxígeno en la autooxidación de la cisteína y factores que lo afectan. 211
21. Reducción del citocromo C por la cisteína en tampón fosfato 50 mM y pH 7,4. Efectos de algunos substratos sobre la velocidad de reducción. 215
22. Espectro de r.p.e. producto de la autooxidación de la cisteína y en presencia de hepatocitos aislados de rata. 219
-

	<u>Pag.</u>
IV. <u>DISCUSION</u>	
1. La autooxidación de la cisteína.	223
1.1. Introducción	"
1.2. Efecto del cloruro amónico.	"
1.3. Efecto del cobre sobre la autooxidación de la cisteína.	226
1.4. Productos de la autooxidación de la cisteína.	229
2. Interacción de la cisteína con los hepatocitos aislados de rata.	235
2.1. Pruebas de la viabilidad metabólica de los hepatocitos y el efecto de la cisteína.	"
2.2. Importancia de la situación nutricional del animal sobre la citotoxicidad de la cisteína.	239
2.3. El efecto de los radicales libres sobre los hepatocitos.	243
3. Consideraciones acerca de la administración de cisteína a animales de experimentación y seres humanos. Consecuencias practicas.	244

#### V. CONCLUSIONES

#### VI. BIBLIOGRAFIA

INDICE DE TABLAS

RESULTADOS

- R-1: Efecto de trazas de cobre sobre la disminución del GSH causada por la cisteína. 151
- R-2: Efecto del cloruro amónico sobre el nivel de glutatión en hepatocitos aislados de rata incubados con cisteína. 154
- R-3: Efecto de la cisteína y el cloruro amónico sobre el contenido de ATP y la liberación de LDH en los hepatocitos aislados de rata alimentada y ayunada. 158
- R-4: Efecto del cobre sobre la disminución del ATP y la liberación de LDH inducida por la cisteína y el cloruro amónico en hepatocitos aislados de rata. 161
- R-5: Efecto del lactato y otros estimuladores de la neoglucogénesis sobre la disminución de nucleótidos adenílicos en hepatocitos aislados incubados con cisteína y cloruro amónico. 164

- R-6: Efecto de los ácidos grasos y el etanol sobre la depleción de nucleótidos adenílicos causada por la cisteína y el cloruro amónico. 167
- R-7: Efecto de la catalasa sobre la concentración de GSH y liberación de LDH en los hepatocitos incubados con cisteína y cloruro amónico. 171
- R-8: Efecto de la catalasa sobre la liberación de LDH por los hepatócitos incubados en presencia de cisteína, cloruro amónico y cobre. 174
- R-9 Efecto del etanol en presencia de cisteína y cloruro amónico sobre la concentración de ATP en los hepatocitos aislados de la rata. 180
- R-10: Efecto de tres enzimas detoxificantes contra la acción citotóxica de los radicales libres. 183
- R-11: Efecto de la cisteína, cloruro amónico y cobre sobre la concentración de ATP y la liberación de LDH en hepatocitos aislados de rata incubados bajo condiciones anaeróbicas. 186

DISCUSION

- D-1: Efecto de la inyección intraperitoneal de cisteína sobre el contenido de GSH y nucleótidos adenílicos en el hígado de la rata. 245
- D-2: Evolución en el tiempo de la concentración de nucleótidos adenílicos en los hepatocitos aislados incubados con cisteína 4 mM. 247

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION

- I-1: Estructura del Glutation. 7
- I-2: Ciclo del enlace Gamma-glutamilo. 20
- I-3: Reacciones encadenadas de radicales libres en la autooxidación del ácido linoleico. 73
- I-4: Via biosintética de la L-cisteína. 93
- I-5: Destinos metabólicos de la L-cisteína. 96

	<u>Pag.</u>
I-6: dos tipos de reacciones generadoras del radical OH• a partir de $O_2^{\cdot -}$ y $H_2O_2^{\cdot}$ .	110.

### MATERIAL Y METODOS

M-1: Espectrofotómetro de resonancia paramagnética de electrones (r.p.e.)	130
M-2: Cavidad electromagnética y de la muestra.	131
M-3: Unidad de control con monitor osciloscópico y servoregistro automático.	132
M-4: Pantalla con sistema adquirente de datos.	133
M-5: Perfusión del hígado de rata.	138

### RESULTADOS

R-1: Efecto de la catalasa sobre el consumo de oxígeno durante la autooxidación de la cisteína.	189
---	-----



	<u>Pag.</u>
R-2: Espectro de r.p.e. a partir de los los productos de la oxidación expon- tánea de la cisteína.	190
R-3: Estructura química de los compuestos de aducción.	195
R-4: Espectro de r.p.e. a partir de diversas concentraciones de cisteína.	198
R-5: Efecto del cobre y el hierro sobre la formación de compuestos de aduccion producidos en la oxidación expontánea de la cisteína.	202
R-6: Efecto de varias concentraciones de $H_2O_2$ sobre la producción de DMPO-Cys	205
R-7: Efecto de la superóxido dismutasa Cu/Zn y catalasa sobre la producción de DMPO- -Cys y DMPO-OH a partir de cisteína.	209
R-8: Consumo de oxígeno durante la autooxida- ción de la cisteína en tampón fosfato 50 mM y pH 7,4.	213
R-9: Reducción del citocromo C por la cisteí- na en tampón fosfato 50 mM y pH 7,4	217

- R-10: Espectro por r.p.e. de la autooxidación de la cisteína en presencia de hepatocitos aislados de rata. 220

DISCUSION

- D-1: Mecanismo propuesto para la autooxidación de la cisteína. 233
- D-2: Mecanismo de acción propuesto para el efecto citotóxico de la cisteína sobre los hepatocitos aislados de la rata en ayunas de 48 horas. 234
- D-3: evolución en el tiempo de la concentración de nucleótidos adenílicos en los hepatocitos de la rata incubados con cisteína 4 mM. 248
-

INTRODUCCION

## I. INTRODUCCION AL EFECTO CITOTOXICO DE LA CISTEINA

### 1. OBJETIVO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

En 1.978, Viña, Hems y Krebs, observaron que la incubación de hepatocitos aislados de rata con concentraciones progresivamente crecientes de cisteina, - causa una depleción de glutatión reducido (GSH) en las células. (Viña y otros 1.978).

Aquel efecto, que fué catalogado como citotóxico, constituye el punto de partida de este trabajo en el que presentamos la extensión y mecanismo de acción de la citotoxicidad por la cisteina en las células aisladas del hígado.

Es conocido el papel que el GSH juega - en el mantenimiento del metabolismo y estructura celular. Se sabe que pocos minutos después de la depleción del glutathion reducido, se pone en peligro la - integridad celular debido principalmente a la lipido peroxidación de su membrana (Hogberg y Kristoferson 1.977).

Como veremos a lo largo de la introducción de éste trabajo. el mantenimiento del GSH a con centraciones fisiologicas resulta indispensable para las funciones metabólicas y defensivas del organismo.

Una vez comprobado el efecto de la cisteina sobre el glutathion reducido, buscamos otros efectos intimamente relacionados con el funcionamiento e integridad celular que reflejaran la alteración de los mismos incubando hepatocitos aislados de rata en presencia de cisteina y bajo diversas condiciones ex perimentales.

Se sugirió la medida de los nucleótidos adenílicos, ATP, ADP y AMP así como la captación de azul tripano por parte de las células incubadas con este aminoácido, como índice del daño celular que acompaña a la disminución del GSH. Esta última prueba se substituyó, mas tarde , por la liberación de Lactato deshidrogenasa (LDH) por los hepatocitos al medio de incubación.

Así pues, valoramos el índice de citotoxicidad en base a los siguientes parámetros: Depleción de la concentración de GSH, disminución de los nucleótidos adenílicos y la liberación de LDH citoplasmática en los hepatocitos aislados incubados en presencia de cisteína.

Por otra parte, estos análisis enzimáticos se acompañaron de la simulación del efecto citotóxico observado por parte de otros agentes tóxicos conocidos y se completó con la detección de radicales libres, utilizando resonancia paramagnética de electrones (r.p.e.) en el medio de incubación previa autooxidación de la cisteína.

## 2. IMPORTANCIA DEL GLUTATION REDUCIDO (GSH) EN EL METABOLISMO CELULAR

### 2.1. Generalidades

El glutation es el tiol no proteico más abundante en la célula hepática (Jocelyn 1972). Comprende el 97 % de los tioles solubles totales celulares.

Gracias a sus funciones, que especificamos más adelante, se considera como elemento esencial no sólo para el hepatocito, sino también para otros tejidos del organismo.

Así pues, creemos oportuno presentar a continuación algunas de las propiedades fisicoquímicas que confieren al tripéptido su importancia metabólica, justificada en gran parte por un grupo sulfidrilo (-Sh) que protege así estructuras proteicas, mantiene el estado reducido de ciertas enzimas, preserva membranas celulares contra el stress oxidativo y juega un importante papel en la detoxificación de un gran número de compuestos extraños. El GSH juega también un papel muy importante como coenzima en varias reacciones enzimáticas.

## 2.2. Estructura

El glutathion fue aislado por primera vez en 1888 por J. del Rey a partir de extractos de levadura. El glutathion reducido es un tripéptido compuesto por gamma-glutamil-cisteinil-glicina (FIGURA I-1). Las dos características fundamentales de la molécula son el enlace gamma-peptídico, y el grupo tiol de la molécula de cisteína.

En 1929 F. Hopkins lo cristalizó a partir de la levadura creyendo que era un dipéptido compuesto por glutámico y cisteína, lo que le inspiró a denominarlo glutathion.

Seis años después al trabajo de Hopkins, Harrington y Mead (1935) descubrieron la estructura correcta del tripéptido.

Gran parte de sus propiedades pueden ser deducidas, como ya antes apuntábamos, de las particularidades de su estructura. Su función en el transporte de aminoácidos se deben a la presencia del enlace gamma-glutamilo. Por tener este enlace, la mayoría de las peptidasas no pueden separar la cisteína del glutámico, ya que estas enzimas sólo actúan sobre enlaces amino-acilo. Por ello la presencia de dicho enlace hace del GSH el sustrato más abundante para la gamma-glutamil-transpeptidasa.



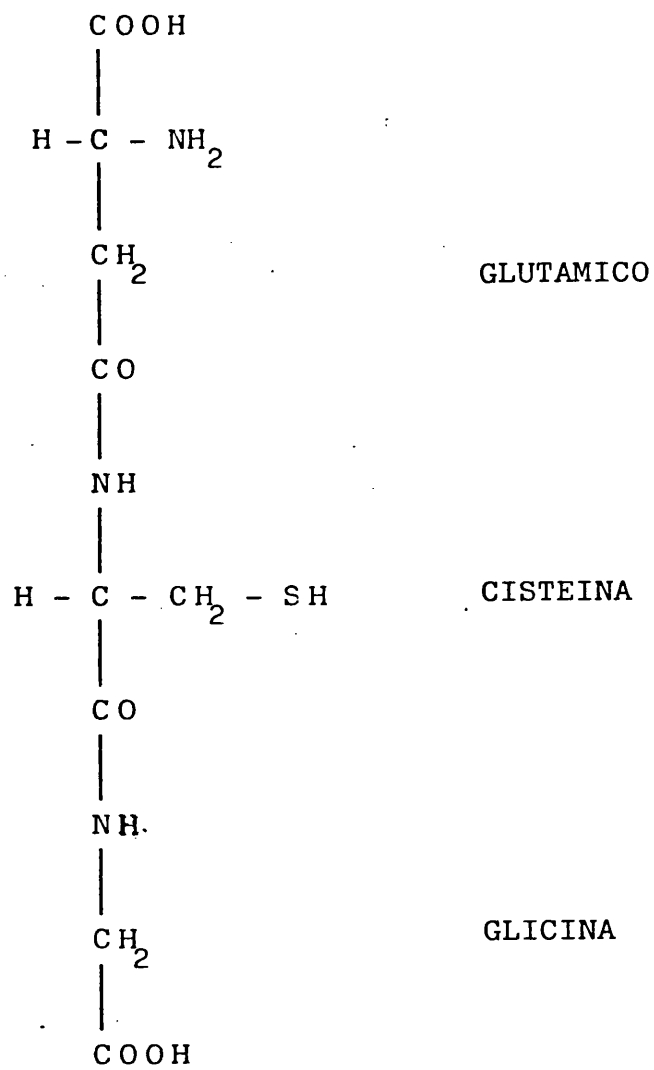


FIGURA I-1 Estructura del Glutation

Por otra parte, el grupo sulfidri-  
lo es el responsable de gran número de las propiedades  
del glutathion el cual participa en reacciones de oxido-  
-reducción y en reacciones de desplazamiento nucleofí-  
lico.

### 2.3. Funciones Metabólicas del Glutathion

Ya hemos apuntado antes que el glu-  
tathion se haya ampliamente distribuido en la naturale-  
za, y en concreto, se haya muy difundido en la mayo-  
ría de los tejidos animales llegando a concentraciones  
relativamente altas (4 a 5 micromoles/gr.de tejido).

Se han publicado valores muy di-  
ferentes para la concentración de GSH en cerebro, osci-  
lando entre 0,5 y 3,5 micromoles/ gr. de tejido húme-  
do. Un rango similar de concentraciones se han encon-  
trado en varias regiones del cerebro donde se encuen-  
tra principalmente (97%) en su forma reducida.

Un componente que existe en tan  
gran cantidad en la célula, debe tener gran número de  
funciones, algunas de las cuales todavía no son bien  
conocidas. Vamos a exponer algunas de las más intere-  
santes.

#### 2.3.1. Funciones no mediadas enzi- máticamente

Debido a que el GSH es el tiol  
más abundante en la célula, funciona no enzimática-

mente para reducir algunos tioles proteicos que hayan sido oxidados para formar disulfuros mixtos, ya que se producen reacciones de intercambio entre el GSH y dichos disulfuros mixtos (Harter y Weber 1974).

Ejemplos de estas funciones son la acción de la glucógeno sintetasa D, la cual es inactivada por el glutatión oxidado (GS-SG) y reactivada por el GSH (Ernest y Kim 1973), así como la acción sobre la fructosa 1-6 difosfatasa (Williams 1976).

### 2.3.2. Función del GSH como Coenzima

Racker, en 1951, descubrió la reacción de transformación del metilglioxal en ácido D-Láctico, catalizada por las glioxalasa I y II. En ella el GSH actúa como coenzima.

El proceso engloba dos reacciones. La primera, catalizada por la glioxalasa I, consiste en la condensación del metilglioxal con el glutatión para formar S-lactoil-glutatión. (Esta reacción es la base del método enzimático que se ha utilizado en este trabajo para medir la concentración de glutatión en las muestras tisulares.)

La segunda reacción consiste en la hidrólisis del S-lactoil-glutatión para dar GSH y D-lactato. Esta reacción está catalizada por la glioxalasa II.

Vemos pues, que el GSH se gasta en la primera reacción del proceso, pero se regenera en la segunda. Actúa pues como coenzima. El GSH también puede actuar como coenzima en la catálisis de varias reacciones como hidrataciones, deshidrogenaciones e isomerizaciones.

### 2.3.3. Papel en la Eliminación de Peróxidos

El GSH actúa como substrato de la peroxidasa (E.C.1.1.1.1.9). Esta enzima fue descubierta por Millsen (1957) en los eritrocitos de buey. Se supuso que servía para proteger la hemoglobina contra el  $H_2O_2$ . En 1962, Neubertwojkak y Lehninger encontraron un factor en las mitocondrias de rata, con actividad peroxidásica.

Little y O'Brien en 1968, descubrieron una actividad peroxidásica en hígado de rata que reducía, no sólo al  $H_2O_2$  sino también a otros peróxidos, entre aquellos a los lipídicos.

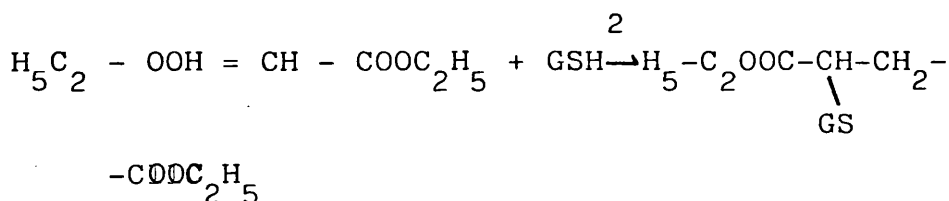
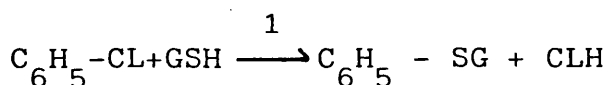
Por la acción de esta enzima, el GSH interviene en la destrucción catalítica de peróxidos. Esto protege a la célula contra la acción destructora de estos peróxidos. (Aebi y Sutter 1974).

2.3.4. Papel del GSH en la Eliminación de Radicales Libres

Es una de las funciones más importantes del glutathion, proteger la célula contra compuestos extraños o sus productos metabólicos.

Esta protección está medida por las glutathion transferasas (Chasseaud 1.974).

Dos ejemplos de éstas reacciones son las siguientes:



1.- GSH - S- ariltransferasa

2.- GSH-S- aquiltransferasa

Estas reacciones tienen dos finalidades. Una es la conjugación del glutathion con compuestos potencialmente tóxicos y otra es la solubilización de éstos compuestos potencialmente tóxicos, para facilitar la excreción biliar de los mismos (Chasseaud 1.973).

Es de interés señalar, que varios

derivados S - sustituidos son substratos más activos para la glutamil transpeptidasa que el propio glutathion (Tate y Meister 1.974).

Además en las actividades de la glutathion S-transferasa hay actividades degradatorias que son dependientes del glutathion pero que no forman conjugados de éste.

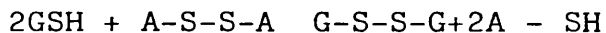
Estas actividades incluyen la degradación de tiocianatos orgánicos reduciendo ésteres de tiosulfuro (Mannerwik y Cols. 1.977).

La detoxificación de compuestos - por conjugación con el glutathion parece ocurrir principalmente en hígado, como parece deducirse sirva como ejemplo, las experiencias realizadas sobre intoxicaciones con paracetamol donde el glutathion se combina con un metabolito activo de éste fármaco impidiendo así la formación de radicales libres y protegiendo como consecuencia al organismo frente a una posible hepto-toxicidad.

#### 2.3.5. Papel del glutathion como - sustrato de las transdeshidrogenasa.

El GSH puede actuar como sustrato de ciertas oxidoreductasas.

Estos enzimas, llamadas transdes-  
hidrogenasas catalizan la reacción general.



El substrato A puede ser: Homocis-  
teina y el enzima sería la glutathion homocisteina oxi-  
doreductasa (E.C. 1.8.4.1.) disulfuros proteicos, y -  
en éste caso la enzima sería la glutathion protein oxi-  
doreductasa (E.C. 1.8.4.4) CoA y en éste caso sería -  
la glutathion CoA reductasa (E.C. 1.1.4.3.) etc.

Se ha purificado también una GSH  
transhidrogenasa no específica (Tietza 1.970).

Las más interesantes de las nom-  
bradas antes es la GSH-protein disulfuro oxido-reduc-  
tasa, conocida normalmente como GSH-insulin transhi-  
drogenasa, que ha sido estudiada por Tomizawa y Hal-  
sey (1.959). Tomizawa (1.962).

Esta reacción cataliza el primer  
paso de la degradación secuencial de la insulina (Va-  
randani, 1.973).

Se desconoce si ésta reacción tie-  
ne importancia fisiológica desde el punto de vista de  
la regulación del catabolismo de la retroalimentacion

### 2.3.6. Papel del GSH en la protección de membranas.

La disminución de la concentración de GSH per se, no ocasiona daño celular. Se necesita la presencia de una agresión adicional (Infección severa, algunos farmacos, etc) (Bernini y otros - 1.964; Jaffé 1.970, Yoshida 1.973).

Se ha demostrado (Kossower, 1.973) que el daño celular, se debe a una modificación de las membranas ocasionada probablemente por una combinación del GSH con otros tioles de las proteínas que forman la membrana, ocasionando una alteración de las estructuras terciarias y cuaternaria lo cual conlleva un deterioro de la membrana, con el consiguiente daño celular.

### 2.3.7. Papel del GSH en la Radio-Protección celular.

Los tioles no proteicos celulares (principalmente GSH y cisteína) juegan un papel fundamental en la protección de las células contra la irradiación (Rink 1.973).

Se ha sugerido varias hipótesis - para explicar éste fenómeno. Vamos a exponer algunas de ellas.



a) Teoría química.

La irradiación provoca la aparición de radicales libres que oxidan a los tioles, provocando la formación de disulfuros, los cuales serían reducidos posteriormente mediante reacciones metabólicas. Probablemente también se forman disulfuros mixtos de GSH con grupos de SH de proteínas (Bacq y Gauthier, 1.967).

b) Teoría de los grupos tioles de las proteínas.

En 1.950, Barron demostró que enzimas que contenían grupos SH eran inactivadas al ser sometidas a radiaciones. Posteriormente se observó que "in vivo" los fenómenos eran más complejos, porque dosis letales de radiaciones no inducían la disminución de actividad enzimática celular (Ord y Stocken, 1.961).

De hecho, se considera que ciertos tioles no-proteicos, son más importantes que los enzimáticos para entender el mecanismo de radioprotección (Adams y otros, 1.965),

c) Radioprotección de tioles, relacionada con el ciclo celular

Existe cierta evidencia para poder

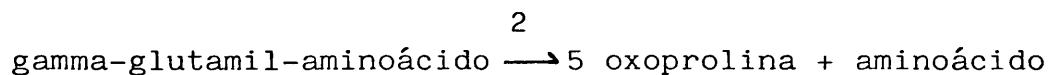
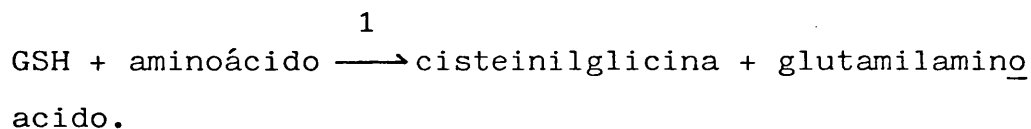
afirmar que la radioresistencia varia durante el ciclo mitótico-celular de modo paralelo a como lo hace la concentración de GSH y en general de los grupos --tioles libres (Stern 1.956, O'hara y otros 1.970).

#### 2.3.8. Función del GSH en el Transporte de Aminoácidos a través de las Membranas.

El trabajo de Meister y sus cols. ha permitido postular una nueva función para el glutathion, relacionado con su enlace gamma-glutamilo (Orlowsky y Meister 1.970, Vanderwerf Steffani y Meister 1.974, Meister 1.973).

Esta función supone postular el llamado ciclo del enlace gamma-glutamilo.

Las reacciones implicadas son las siguientes:



La reacción está catalizada por la enzima gamma-glutamil-transferasa, antes llamada gamma-glutamil transpeptidasa.

La segunda reacción es catalizada por la gamma-glutamil ciclo transferasa.

El estudio detallado de éstas --- reacciones lo llevaremos a cabo más adelante cuando - analicemos las características de la degradación del glutathion. Lo que nos interesa ahora es estudiar la - importancia fisiopatológica de éste ciclo metabólico.

El postular la existencia de éste ciclo no implica el negar la existencia de otros mecanismos de transporte. De hecho, el ciclo del gamma- - glutamilo sirve sólo para transportar aquellos aminoá- - cidos que son substratos de la gamma-glutamil transfe- - rasa.

Para poder probar la existencia - de éste ciclo se han usado dos aproximaciones experi- - mentales.

Una consistente en estudiar el -- efecto del glutathion sobre la concentración tisular - de GSH o sobre su recambio metabólico.

Meister (1.973) estudió el efecto sobre el riñón de la inyección de altas dosis de aminoácidos a ratas y observó que cuando se inyectaba - aminoácidos como la metionina o glutamina, que son - substratos de gamma glutamil transferasa, bajaba la - concentración de glutathion en el riñón.

De éste modo, relacionaba la respuesta del riñón a altas dosis de aminoácidos con el nivel tisular de GSH.

Posteriormente en nuestro laboratorio (Viña y Cols. 1.980) se demostró que cuándo se incuban acinis aislados de rata con altas concentraciones de aminoácidos su contenido disminuye.

Otra aproximación para demostrar el funcionamiento del ciclo consiste en observar la incorporación de aminoácidos a los tejidos con la actividad gamma-glutamyl-transferasa inhibida por serina borato (Revel y Ball 1.959).

En éste caso se ha observado, en mama de rata, que la captación de aminoácidos, medida por diferencia arteriovenosa, está muy disminuida (Viña y cols. 1.980).

La mayor cuestión que queda abierta en éste campo es el hecho de que la gamma-glutamyl transferasa debe reaccionar con aminoácidos extracelulares y con glutatión intracelular.

Los mecanismos por los cuales ésta enzima reacciona con un substrato fuera de la célula y otro dentro, no han sido aclarados.

Un esquema del ciclo del enlace -

gamma - glutamilo se encuentra en la figura I-2.

#### 2.4. Vida Media del Glutation en Hígado y otros Organos.

El contenido de glutacion en el hígado de la rata es de 5 a 8 micromoles/gr. Esta es la cantidad correspondiente a una rata en condiciones normales de alimentación.

Después del ayuno de 24 horas, la concentración de glutacion en el hígado de la rata, disminuye hasta 2/3 ó 1/2 de su valor normal.

El mecanismo y la significación fisiológicas de este hecho, aún no han podido ser totalmente dilucidados, siendo por otra parte el "turn-over" del glutacion hepático muy rápido.

Tateishi y Higashi (1,974), han demostrado claramente la existencia de dos "pools" de glutacion en el hígado de la rata.

Estos dos picos representantes del GSH hepático, presentan entre ellos una aparente diferencia respecto a sus vidas medias y que son de

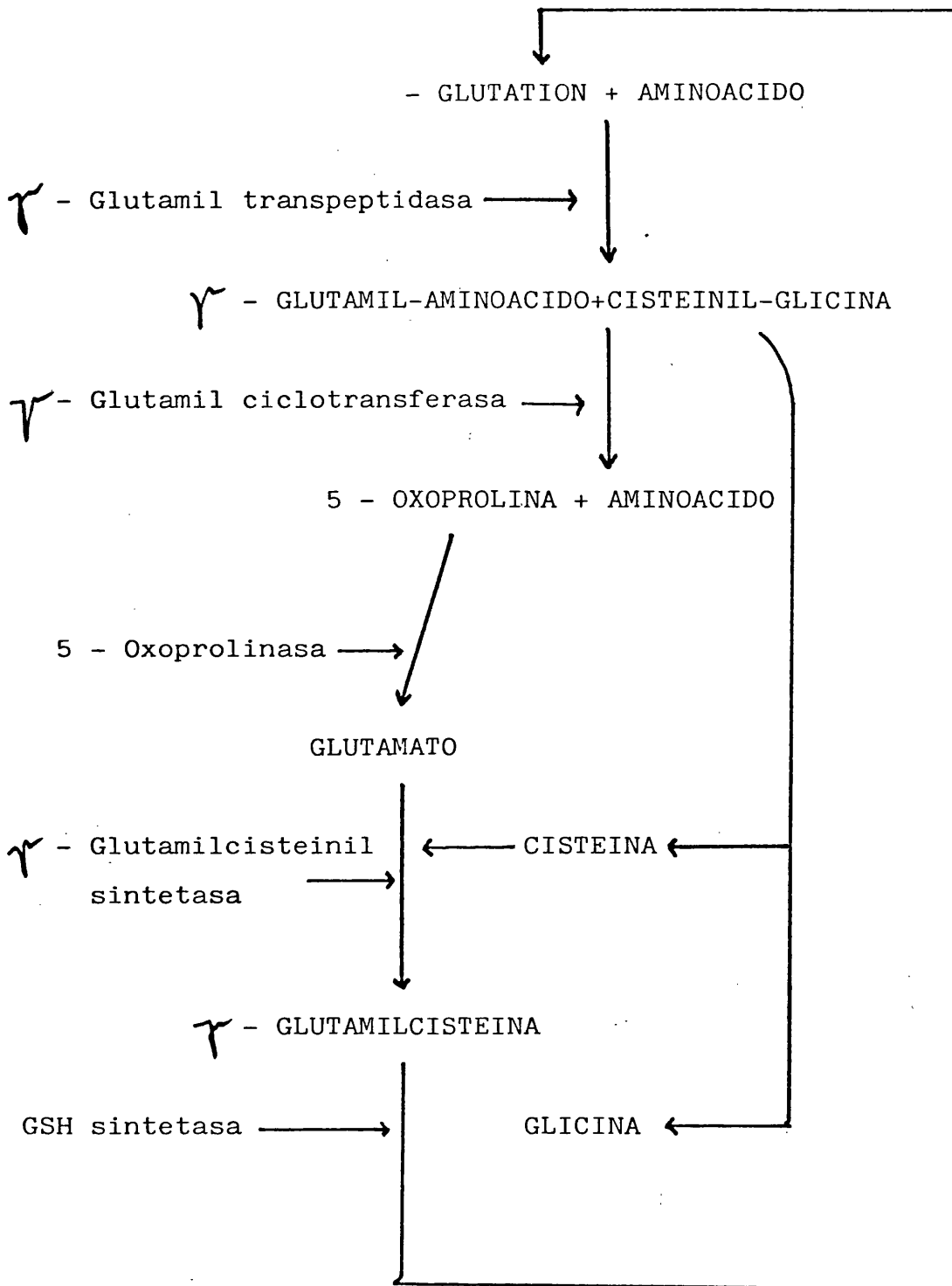


Figura I - 2. Ciclo del enlace gamma-glutamilo

1,7 y 28,5 horas. El pool más lábil de los dos presenta sus variaciones en función del reservorio de cisteína en el hígado.

Así, por ejemplo, el glutatión libera cisteína para la síntesis proteica cuando otras condiciones se encuentran cubiertas alcanzando entonces la cisteína tasas mínimas límites.

Inversamente, cuando se suministra a una rata un exceso de cisteína, ésta es almacenada en forma en forma de glutatión hepático, evitando así el acúmulo de éste aminoácido en el interior de los hepatocitos.

También es importante la influencia que sobre la concentración del glutatión ejercen los alimentos, así como la cisteína contenida en la alimentación.

La realimentación de las ratas ayunadas, aumenta la tasa de glutatión en las dos primeras horas, alcanzándose su máximo nivel después de las 8 horas de realimentación.

Se sabe, que los niveles fisiológicos de glutatión sólo se consiguen alcanzar con dietas aproximadamente de 10 gr./día /150 gr. de peso corporal. Cantidades menores producen disminuciones del glutatión hepático demostrándose de esta forma el rápido recambio de este tripéptido.

También es conocido el efecto potenciador que tiene la cisteína contenida en la dieta de una rata. Este aminoácido administrado en dosis fisiológicas incrementa la concentración de GSH en el hígado de la rata.

Esta relación se explica por las propiedades de las enzimas que sintetizan glutatión así como por la cisteína presentes en el hígado.

Existen otros mecanismos que pueden ejercer acción sobre la dependencia demostrada del glutatión por la cisteína. Estos aminoácidos proteicos pueden atenuar el efecto estimulador de la cisteína para la síntesis de glutatión.

Así, el incremento del glutatión en las ratas cuando éstas son alimentadas con glutatión conteniendo 0,18 % de cisteína, es siempre completamente abolido cuando se añade posteriormente un 0,18 % de L-triptófano.

Por otra parte, sólo la adición aumentada de cisteína, que supera la dosis fisiológica es capaz de remontar el efecto supresor ejercido por el triptófano en la síntesis de glutatión.

El triptófano, como demuestran Tateishi y Higashi, estimula la incorporación de cisteína (medida radioactivamente) a las proteínas del



hígado y de la sangre, disminuyendo de ésta forma la cisteína que se incorpora al glutatión hepático.

Esto supone, la disminución de la síntesis de glutatión cuyo límite establece la cifra en 3 micromoles/gr.

Concluyendo, se sabe de la existencia de dos pools de glutatión en el hígado de la rata. sus vidas medias aparentes son 1,7 y 28,5 horas.

La cisteína utilizada para la síntesis proteica juega un papel fundamental en la vida media más corta del glutatión.

El otro pool estable y cuya vida media es de 28,5 horas, bajo condiciones normales de alimentación, es utilizado en aquellas reacciones intrahepáticas que requieren el aporte de compuestos sulfidrilos.

Concluimos en que una de las funciones más importantes del glutatión hepático es la de servir de reservorio de cisteína regulando de esta forma su utilización.

En el cerebro, los hechos son algo diferentes. El glutatión es sintetizado rápidamente. Se ha calculado la constante de velocidad de primer orden para la síntesis del glutatión en el cerebro, resultando ser de  $0,17 \cdot 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$  (Orlowski 1976).

### 3. IMPORTANCIA DE LOS NUCLEOTIDOS ADENILICOS COMO INDICE DE VIABILIDAD CELULAR.

El análisis sobre las transformaciones energéticas de los organismos vivos ha progresado considerablemente desde los años cuarenta y ha contribuido al esclarecimiento de curiosas características sobre la organización química de la materia viva.

Se sabe desde 1.941 que la energía liberada en la degradación de los productos alimenticios, y exceptuando aquella parte de la energía que es transformada en calor, se convierte en una forma especial de energía química antes de ser de nuevo transformada o utilizada como por ejemplo, en el trabajo muscular u osmótico de las glándulas secretoras. Esta forma especial de energía química es la que se encuentra almacenada en forma de enlaces fosfato del ATP .(Lipmann 1.941).

Uno de los objetivos principales del metabolismo celular es la formación de nucleótido adenílico ATP y que se lleva a cabo en la oxidación completa de diversos combustibles hasta el  $CO_2$  al mismo tiempo que se genera, por medio de la cadena respiratoria, un flujo continuado de electrones hasta el oxígeno, aceptor último de los misos. (Krebs 1953).

El ATP unido al adenosin disfosfato (ATP-ADP), forma un sistema funcional que actúa como transportador de energía química, ya que el ADP es capaz de aceptar un grupo fosfato en las reacciones acopladas del catabolismo y el ATP así formado ceder su grupo fosfato terminal en otras reacciones acopladas que requieren energía.

El ATP, ADP y AMP, de la célula - existen a concentraciones constantes en el estado estacionario. La relación de estas concentraciones sirve como medio de comunicación entre las reacciones - que emplean ATP y los que lo producen. En otras palabras, las reacciones del metabolismo están controladas parcialmente por la "carga energética" que es una medida del estado de alta energía de la célula.

$$\text{Carga Energética} = \frac{\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

La "carga energética" puede tener un valor que oscila entre 0 (todo AMP) y 1 (todo ATP).

Daniel Atkinson ha demostrado que las rutas generadoras de ATP son inhibidas por una carga de energía alta, mientras que las que utilizan ATP son estimuladas. (Atkinson 1.968). Es pues de esperar que se pongan en marcha procesos metabólicos como la neoglucogénesis o síntesis de urea, es decir rutas metabólicas consumidoras de ATP.

Krebs cuantificó los requerimientos de ATP para estos dos procesos juntos y funcionando al máximo de velocidad de sus flujos metabólicos respectivos en 43 micromoles de ATP por min. y por gramo, es decir el 72% del suministro de ATP por la respiración. Estos requerimientos de ATP pueden ser mayores si la fosforilación oxidativa no funciona al máximo de sus posibilidades.

Pero quizá el objetivo primordial de todo proceso metabólico celular sea el mantenimiento del medio interno o bien el mantenimiento de un gradiente de concentración para iones inorgánicos y la fácil difusión de componentes orgánicos de bajo peso molecular. (Krebs y cols. 1.973).

La concentración de potasio en el tejido hepático, es aproximadamente 18 veces más alta que en el plasma sanguíneo y según experiencias realizadas por Nooman, la velocidad de intercambio de estas iones entre el plasma y los tejidos es muy rápida. (Nooman y cols. 1.941). Esto quiere decir que el potasio es transportado al interior del tejido hepático contra gradiente de concentración de aproximadamente 1:18.

De igual forma son acumulados y mantenidos en los tejidos, muchos aminoácidos. Para esta tarea, la célula tisular dispone de un mecanismo consumidor de energía y provisto de un transportador que en numerosas ocasiones está representado por una

lipoproteína. La energía necesaria es suministrada por el ATP y es posible que esta misma lipoproteína o transportador actúe como ATP-asa para liberar dicha energía. Sin embargo, la energía necesaria para estos sistemas de transporte no se puede calcular con precisión ya que no se conoce con exactitud el mecanismo de las demás bombas ATP-ásicas (Soutter y Judah 1.972).

Se desprenden de todas estas propiedades metabólicas y fisiológicas del ATP la importancia de este nucleótido, moneda energética universal de los sistemas biológicos, en procesos tan importantes como el mantenimiento del metabolismo intermedio, biosíntesis y degradaciones, transportes activos e integridad celular, contracción muscular y otros movimientos celulares. Prueba de ello pueden ser las experiencias realizadas por Dickson y Pogson con hepatocitos aislados de rata, en las que se demuestra la importancia de este nucleótido para el mantenimiento de la funcionabilidad e integridad celular (Dickson y Pogson 1.977). Se ha demostrado, por otra parte que, cuando el nivel hepático de ATP desciende a un 35% de su valor control, las mitocondrias comienzan a presentar cambios en el control de la generación de energía por la respiración, (Vogt y Farber 1.970) es decir se pierde la habilidad de la mitocondria para responder ante el ADP adicional y el dinitrofenol. Por el contrario el cociente P:O, permanece normal incluso bajo estas condiciones y sólo después de 24 h. muestra un descenso significativo. (Farber 1.973).

Por todas estas razones decidimos estudiar el mantenimiento de las concentraciones fisiológicas de los nucleótidos adenílicos como índice de viabilidad celular en los hepatocitos expuestos a la acción de las altas concentraciones de cisteína.

#### 4. IMPORTANCIA DE LOS RADICALES LIBRES EN LA CITOTOXICIDAD.

##### 4.1. Generalidades.

El concepto de la formación de radicales libres presenta a lo largo de su historia un desarrollo activo si tenemos en cuenta que desde su -- principio se ha visto envuelto en una nube de controversias.

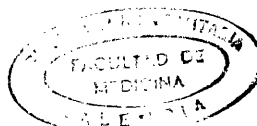
Los radicales en general eran considerados como grupos químicos unidos a las moléculas no haciéndose distinción conceptual entre radical libre o unido a éstas. Por otra parte los métodos y -- técnicas experimentales existentes por aquel entonces no estaban todavía capacitadas y perfeccionadas para tal diferenciación (W.A. Prior 1.968; C. Walling --- 1.957). Sin embargo, a finales de 1.800, mejoraron -- los métodos analíticos destinados a esta disciplina y la literatura química empezó a reflejar un vivo debate sobre la existencia real del radical libre. Los estudios sobre la fase de solución del radical trifenilmetilo realizadas por Moses Gómborg en 1.900, y el -- trabajo sobre la fase gaseosa del radical alquilo realizado por Paneth en 1.926, lograron convencer, incluso a los más exceptivos, de la existencia del radical libre, aunque su aparición en la mayoría de los sis-- temas era de forma efímera o fugaz.

El interés moderno por las reacciones que involucraban radicales comenzó en 1.930 -- con los estudios de una serie de reacciones sintéticas que abrieron nuevas expectativas tanto científicas como industriales.

Por su parte Walter y Hey demostraron la existencia de reacciones con participación de radicales libres en un variado número de sistemas orgánicos (W.A. Prior 1.966 y 68; W.A. Waters 1.948 y 1.959).

En los años comprendidos entre 1.935 y 1.945 se desarrollaron técnicas para la obtención de caucho sintético a partir de estireno-butadieno y consecuentemente la invención de una serie de plásticos aplicables, obtenidos por polimerización de los radicales monómeros de vinilo. Esto convirtió la química de los radicales en un campo fascinante donde alternaban problemas tanto de investigación teórica como práctica y de consecuencias industriales.

En el campo más puramente bioquímico fué Michaelis quien, publicó en 1.939 su predicción sobre la intervención de radicales libres como intermediarios en todas las oxidaciones de moléculas orgánicas. (L. Michaelis 1.939; B. Chance 1.961). Esta atrevida afirmación se vió relegada cuándo Westheimer y cols. demostraron la existencia de algunas reacciones biológicas importantes de oxido-reducción no





mediadas por radicales. (H.F. Fisher 1.953; E.M. Kosower 1.962). Estos resultados fueron interpretados por algunos como clara evidencia de que los radicales libres no estaban implicados en los procesos biológicos. Durante las dos últimas décadas se acepta la idea, más lógica, de admitir la participación de radicales libres en algunos sistemas y procesos biológicos pero sin cumplirse este hecho para la absoluta mayoría de los mismos. Sin embargo la controversia continúa dominando a la química de los radicales libres cuya expresión se hace patente con los múltiples debates que todavía existen al respecto. Valga como ejemplo la discusión en torno a la Vitamina E y su papel como antioxidante (Nutrition 1.973; Ann N.Y. Acad. Sci. 1.972).

Producto de su polémica histórica y rápido desarrollo de la extensa literatura que sobre los radicales se ha producido ya que la producción de radicales libres es propiedad también de una extensa gama de sistemas no relacionados con el mundo de la biología. La investigación en este campo se extiende a lo largo de un amplio espectro de disciplinas científicas que comprende desde la biofísica y bioquímica hasta la medicina. Tanto por razones históricas como por la mayor accesibilidad de las técnicas experimentales, la química de los radicales libres se ha desarrollado en una serie de áreas bien diferenciadas algunas de las cuales vamos a exponer:

a) Producción enzimática de radicales:

Es una área extensamente desarrollada en las dos últimas décadas (H. Beinert 1.965; M.S. Blois 1.961; H. Beinert 1.972). Se sabe que muchos procesos enzimáticos que implican transferencia electrónica producen radicales libres como intermediarios (I. Yamazaki 1.971).

b) Fotosíntesis:

Se sabe que el primer acontecimiento fotosintético es un proceso de transferencia de electrones.

c) Daño por radiación:

Se creyó por algún tiempo que todas las reacciones inducidas por radiación ionizante llevaban consigo la producción de radicales libres. Aunque hoy no se admite esto como absolutamente cierto, muchas y quizá la mayoría de las reacciones producidas por radiación son procesadas por radicales.

d) Química del oxígeno a alta presión:

Es de sobra conocido que las concentraciones altas de oxígeno tienen un efecto letal (I.W. Brown 1.966; J.:E. Allen 1.973); J.M.C. Douze 1.981) sobre los sistemas biológicos.

e) Química del Ozono, No, No<sub>2</sub> y otros componentes de la contaminación:

Las reacciones de éstos agentes - contaminantes y las reacciones inducidas por ellos - constituyen materia de estudio y de comprensión reciente.

f) Química del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido:

Es un campo prometedor para el esclarecimiento de muchas de las confusas observaciones que ofrece la antigua literatura científica sobre la generación de radicales libres en medios biológicos.

g) La autooxidación de lípidos:

Existe clara evidencia sobre la existencia de lipíperoxidación in vivo siéndole por otra parte notable el extenso número de técnicas desarrolladas para la determinación y cuantificación de éste proceso oxidativo.

Hemos de reconocer que parte de la confusión existente en torno a éste campo de la química es también el resultado de generalizaciones ocasionales y falsas afirmaciones. Algunos autores han señalado que las reacciones por radicales libres parecen implicadas en casi todos los tipos de procesos vivos normales y patológicos. Esto es claramente una exageración.

#### 4.2. Concepto de Radical Libre.

Se definen los radicales libres -- como especies o elementos quimicos que contienen en -- su configuración electrónica un número impar de electrones. El sentido de giro o spin del electrón impar no está apareado con el giro de sentido contrario de otro electrón en un mismo nivel energético (P.F. Knowles 1.976). Esta configuración es, energéticamente hablando, más desfavorable comparada con la estructura electronica par y responsable entre otras razones, de la señal espectroscópica que los radicales libres -- ofrecen en el espectro de resonancia paramagnética de electrones. (r.p.e.).

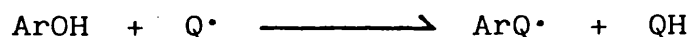
A pesar de que los radicales libres son en su mayoría substancias o elementos orgánicos, éstos también pueden formarse a partir de elementos o moléculas inorgánicas. (R.P.Mason 1.982).

Su carga eléctrica podrá ser positiva, negativa o neutra (C. Walling 1.957; W.A. Pryor 1.966; W.A. Waters 1.959 y 1.948). Esta se señala por los correspondientes signos + ó - a excepción del radical neutro que no lleva signo. En los tres casos se representa al radical libre con un punto situado a -- continuación de su simbolo representativo. Es muy frecuente utilizar el signo Q• para representar un radical libre en general.

Por ejemplo el radical  $RS\cdot$  es un radical libre de carga eléctrica neutra y por lo tanto sin signo. Este radical puede ser producido por el robo de un átomo de hidrógeno de un grupo tiol-SH por otro radical orgánico cualquiera.



También es neutro el radical que se forma por la captación de hidrógeno a partir de un grupo fenol.

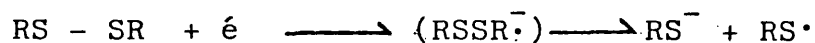


La Vitamina E y el coenzima Q participan en reacciones similares "in vivo". El radical  $ArO\cdot$  generalmente no se propaga a través de cambios oxidativos posteriores, razón por la cual los grupos fenoles pueden actuar como inhibidores de las oxidaciones de los compuestos orgánicos (A.A.Barber 1.959 y 1.966).

Por otra parte, los radicales  $RS\cdot$ , también pueden ser formados por reacciones de oxidación-reducción de las cuales se conocen dos grupos importantes:

- a) Reacciones con un solo electron.
- b) Reacciones con dos electrones.

a) Como ejemplo del primer caso podemos citar la reducción de un grupo disulfuro --- (RS - SR) por un solo electron.



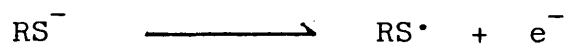
Se atribuyen a éste tipo de reacciones las propiedades de protección que los grupos -tiolicos y disulfuro manifiestan frente al cancer --- (Radiation damage and sulphhydryl Compounds IAEA Vienna 1.969).

En general los grupos tioles presentan gran reactividad y tendencia hacia la formación de radicales libres donando electrones para reducir a los atomos de carbono, oxigeno ó nitrogeno y oxidarse ellos mismos, siéndo esta una característica también aplicable a los grupos disulfuro. La propiedad del grupo SH, basada en la cesión de hidrogenos, es probablemente uno de los puntos más importantes a considerar en relación con el papel biológico del glutathion reducido (GSH). En la reacción.



Si R· se produce a partir del GSH una captación posterior de hidrogeno a partir de cualquier otra molécula podría producir, por ejemplo, gamma-glu-Ala-Gly, es decir, un posible competidor del GSH para los sitios activos sobre los que éste actúe.

Además de la transferencia o abstracción de hidrogeno existen otros tipos de reacciones significativas en las que los grupos SH participan para dar radicales libres como son la fotoionización.



y la transferencia electrónica a iones metálicos.



b) En las oxidaciones llevadas a cabo por medio de dos electrones se distinguen igualmente varios tipos que podemos esquematizar de la siguiente forma:

Proceso oxidativo normal con dos electrones:

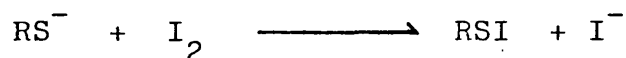
Este es el caso de un radical cargado negativamente y que perdiendo electrones de su configuración electrónica pasa a estar cargado positivamente.



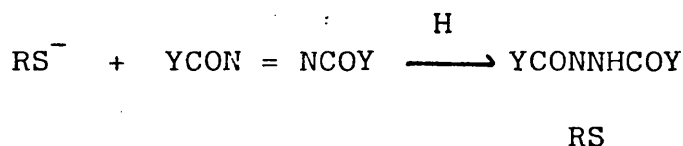
De forma similar se comporta una reacción de oxido-reducción con un solo electron que oxida a un radical y reduce a otro.



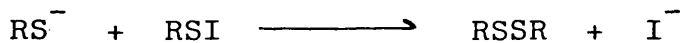
Existen otros dos grupos de reacciones dentro de este apartado de oxidaciones por dos electrones que se conocen con los nombres de reacciones de oxidación por desplazamiento.



y por adición nucleofílica



Un tercer grupo comprende las reacciones de oxidación-reducción por desplazamiento. Es decir,



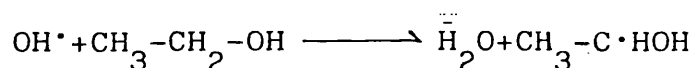
No nos detendremos en el estudio de los radicales libres cationicos y anionicos por no afectar tan directamente a nuestras conclusiones experimentales como lo hacen los radicales SH· y SG·, si bien es cierto, que el radical aniónico, en su forma de superóxido O<sup>-</sup>·, está algo más relacionado con nuestros resultados aunque éste no ha sido detectado por resonancia paramagnética de electrones.

#### 4.3. Reactividad de los Radicales Libres.

Los radicales se diferencian y --



varian de una especie a otra en función de su reactividad y al igual que cualquier otra propiedad química, esta reactividad se afecta por la temperatura, la concentración de las moléculas y la composición del medio. A temperaturas muy bajas incluso los radicales más reactivos pueden ser inmovilizados en cristales altamente viscosos y pueden prolongar, en estas condiciones, su vida media. De esta forma se alcanza la estabilidad necesaria para su estudio con resonancia paramagnética de electrones. (r.p.e.). A temperaturas cercanas a 37° C difieren entre sí por su reactividad. En estas condiciones sus reactividades son tan altas que interaccionan rápidamente con moléculas vecinas. Este es el caso del radical OH· con el CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH· (Anbar 1.967).



Esta reacción tiene una Kte de velocidad bimolecular igual a  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .

La mayoría de los radicales orgánicos tienen Ktes. de reactividad altas aunque estas no sean tan altas como las que presentan los radicales OH· siéndo su valor aproximado de  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .

Como consecuencia de estas reactividades, relativamente elevadas, sus concentraciones son bajas y comprendidas normalmente entre  $10^{-4}$  y  $10^{-9}$  M. Sin embargo estas constantes pueden ser determina-

das por técnicas pulsátiles u otros métodos ideados -- para este fin. Este es el caso de la constante de reactividad calculada para la ecuación.



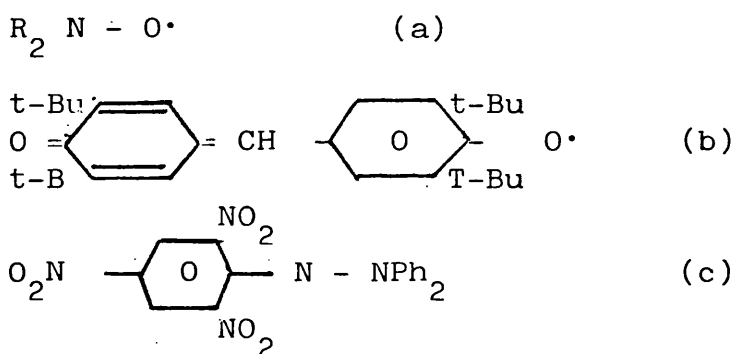
a 25°C, en la que cuando R y Q son grupos benzoicos -- la constante es del orden de  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  ó bien  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  cuando R y Q representan a un grupo ciclohexilo ó propilo respectivamente (R.B. Burkhart 1.969; B. Smaller 1.968).

Existe también una dependencia en -- tre la constante de reactividad y el solvente de la disolución.

Las reacciones de adición por ra- -- dicales también pueden ser muy rápidas, siéndo éste -- el caso de la polimerización del estireno, extensamen -- te estudiada y donde se produce un radical tipo ben -- zoico. Sin embargo, la constante de adición es de  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  a 60°C y la concentración total de todos -- los radicales poliestirénicos es inferior a  $10^{-8} \text{ M}$ , ra -- zón por la cual no puede ser detectado por r.p.e. -- (H.M. Swantz 1.972).

Otros radicales, por el contrario -- poseen una estabilidad poco usual. Por ejemplo los ra -- dicales nitroxidos (R. Bonnet 1.959; W. Kliegel 1.970) -- utilizados en el estudio y detección del sentido de --

giro tanto de átomos como partículas atómicas. Actúan como sustancias atraparadoras o estabilizadoras de -- otros radicales en el medio sometido a estudio evi-- tando así la reactividad posterior de los mismos en - el citado medio. Esta técnica aplicada en r.p.e. se - denomina spin-trapping. En la actualidad existe un am- plio número de agentes encaminados a éste fin (V.E. - Zubarev 1.979; J.C. Scaino 1.976, K.Eiben 1.968). El radical nitroxido se obtiene por adición de radicales al grupo nitroso (E.G. Janzen 1.969 y 1.973) al galvi- noxido (b) y al difenil-picrilhidracilo (DPPH) (c).



Estos radicales no solo producen la captación de hidrogenos a partir de fenoles y tioles, de los que se conoce su tendencia a la producción de radicales libres, sino que además reaccionan con - compuestos relativamente inertes, si bien es cierto - que en éste último caso sus constantes de reactividad son menores. Un compuesto con características DDPH seme- jantes es el agua que es capaz de la abstracción de - hidrogenos de las proteínas (J.C. Dearden 1.973).

La medida de la reactividad de ra dicales estables también tiene consecuencias biológicas importantes. Los radicales producidos en el apara to respiratorio están asociados a enzimas y cofactores locales y esto, en principio, puede suponer un impedi mento para la salida de éstos radicales fuera del apa rato respiratorio con las consecuencias patológicas - que ello implicaría.

Sin embargo, a pesar de la escasa reactividad que estos radicales respiratorios mani--- fiesan, puede que ésta sea suficiente como para pro- ducir daño biológico fuera del ambiente donde estos - son producidos.

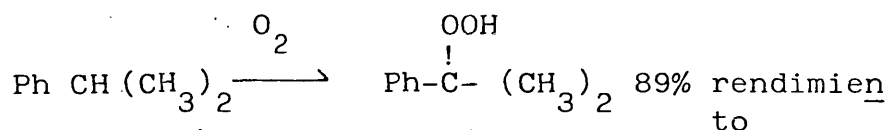
El grado y extensión con que és- tos electrones son dispersados y causan daño citológico es una de las cuestiones más importantes del estudio de los radicales libres en biología.

Recientes experiencias realizadas por Mc Cay demuestran la producción de radicales hi-- droxilo por interacción del radical superoxido  $O_2 \cdot^-$  y el peroxido de hidrogeno  $H_2O_2$  (P.B. Mc Cay citado por W.A. Pryor).

El radical  $OH \cdot$  es una especie con reactividad poco usual y se sabe que actua como media dor en el daño o letalidad causado por las radiacio-- nes ionizantes (S. Okada 1.970). Mc Cay sugirió que -



Los hidrocarburos dispuestos en -  
 cadena alifática o aromática son oxidados rápidamente  
 con un rendimiento bastante alto de hidroperóxidos.



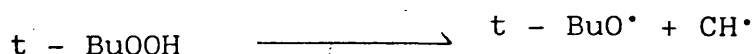
A pesar de la protección que las  
 proteínas ofrecen contra la oxidación de lípidos celu-  
 lares y del papel que desarrollan los agentes antioxi-  
 dantes, como la vitamina E, el glutatión y otros, no  
 se puede impedir la autooxidación en su 100%. De he-  
 cho existe cierta evidencia de autooxidación celular  
 como es el caso de los cuerpos coloreados que apare-  
 cen con el envejecimiento de las células y que denomi-  
 namos pigmentos seniles o de lipofucsina (Siakotos --  
 1.973).

El estudio de estas células que -  
 aparecen fundamentalmente en tejidos no regenerativos  
 como el corazón, sistema nervioso o músculo ha revela-  
 do la presencia de fragmentos de materiales membrano-  
 sos, como ácidos grasos poliinsaturados y proteínas -  
 oxidadas en su estructura.

Los hidroperóxidos lipídicos se -  
 producen también in vivo bajo ciertas circunstancias  
 (Barber 1.967; Packer 1.967; Chio 1.969; Thomas 1.968  
 Evans 1.963) y por lo tanto el estudio de las constan-

tes de descomposición de los mismos es de gran interés.

La energía de disociación del enlace O - O en el t - Butilhidroperóxido, un hidroperóxido estudiado detenidamente, es de 43 Kcal/Mol (S.W. Benson 1.964).



Esta cifra permite deducir una constante de velocidad para la reacción no catalizada  $K=10^{15} e^{-43000/RT} = 5 \times 10^{-16} \text{ sec}^{-1}$  siéndo su vida a 37°C igual a  $10^9$  años. No es por lo tanto una reacción que, sin ser catalizada, pueda producirse en un sistema biológico.

Sin embargo se sabe que muchos hidroperóxidos, dentro de los cuales se incluyen los procedentes de los ácidos grasos poliinsaturados se descomponen a velocidades considerablemente rápidas - incluso a temperaturas moderadas.

Así la energía de activación para la descomposición del hidroperóxido linoleato de etilo es inferior a 20 Kcal/mol (F. Franks 1.965) siéndo su velocidad de descomposición elevada incluso a 25°C

Estas descomposiciones, que no son simples reacciones de primer orden, son más rápidas

das de lo esperado debido en parte, al papel inductor de radicales libres en este sistema (C. Walling 1.957; W.A. Pryor 1.966; S.W. Benson 1.964 y 1.968). Una reacción de descomposición hidroperóxidica inducida por radicales es extremadamente rápida. No son en realidad reacciones de iniciación, ya que durante las mismas el número de radicales permanece constante, sino más bien de propagación. No obstante, estos hidroperóxidos pueden estar sujetos a un proceso de iniciación denominado homólisis asistida en el que los radicales se producen a altas velocidades y donde la energía de activación disminuye considerablemente debido a la formación de enlaces químicos que acompañan a la homólisis de otros enlaces.

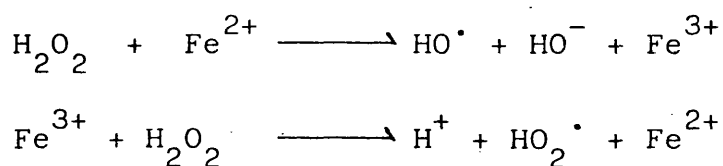
En la homólisis asistida la descomposición de hidroperóxidos lipídicos es acelerada por el alcohol, los ácidos grasos, por otros hidroperóxidos y en general por cualquier compuesto que pueda formar puentes de hidrógeno y así, reducir la energía de disociación del enlace O - O (L. Reich 1.969; R. Hiatt 1.971; O.S. Privett 1.962; N. Urí 1.961).

b) Otro mecanismo iniciador de la producción de radicales libres consiste en la transferencia de electrones a partir de iones metálicos.

Las reacciones redox entre iones metálicos de transición y compuestos peroxidicos juegan un papel importante en la formación de radicales



libres "in vivo". El ciclo de Haber-Weiss, en el que el hierro cataliza la descomposición de agua oxigenada, ha sido ampliamente estudiado, (C. Walling 1.957; W.A. Pryor 1.966, A.L. Tappel 1.961; K.V. Ingold 1.962; G. Sosnovsky 1.971).



Estas reacciones pueden ser rápidas incluso a temperaturas inferiores a los 25°C. (C. Walling 1.957; H.W. Schultz 1.962).

Por otra parte, se sabe que muchos de los complejos metálicos de transición, que se producen en la célula, catalizan la descomposición de peróxidos (A.L. Tappel 1.961; E.D. Wills 1.969; Mc Cay 1.971) y estudios realizados "in vitro" sobre la autooxidación de tejidos u órganos subcelulares demuestran como los compuestos que contienen hierro son con frecuencia prooxidantes (R.C. Mc Knight 1.965; A.L. Tappel 1.972; E.D. Wills 1.969; J.L. Poyer 1.971).

Podemos añadir que algunos de los sistemas de la toxicidad ferrica son similares a aquellos producidos por lipidoperoxidación (C.L. Witzleben 1.971; L. Goldberg 1.957 y 1.962).

Finalmente en leucocitos polimorfos nucleares y en macrófagos parece ser que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  juega

un papel importante en la destrucción de bacterias fagocitadas (P.W. Reed 1.969; A. Khandivala 1.973), y a pesar de que el mecanismo de acción no se conoce con precisión, la posibilidad de la intervención de radicales libres es bastante obvia.

c) La ruptura de enlaces químicos por la acción fotolítica puede producir radicales libres (N.J. Turro 1.965). Sin embargo, la luz no puede producir alteraciones biológicas en aquellas zonas que ésta no puede alcanzar debido a la barrera natural que supone la dermis y el tejido celular subcutáneo. Por la misma razón se explica la especial sensibilidad que presentan los microorganismos translúcidos a la luz ultravioleta (K.C. Smith y P.C. Hannawalt 1.969).

Parece probable, por otra parte, la existencia de una relación directa entre en el envejecimiento acelerado de la piel, en aquellas áreas más expuestas a la luz y el aire (como manos y cara); y la fotólisis o fotoautooxidación del colágeno (Elden and Rizer 1.970)

Los antioxidantes como la vitamina E administrados con la dieta, inhiben la producción de colesterol x-oxidado a partir del colesterol normal en la piel de ratas irradiadas. Es decir, que al menos un carcinógeno puede ser inhibido por un captador de radi

cales, (W.B. Lo; Black H.S. 1973)

d) El ozono es un compuesto diamagnético que reacciona con cualquier tipo de compuesto orgánico para producir radicales libres. Su reacción con alcanos (C.C. Schubert and R.N. Pease 1.956) y con silanos (L. Spialter y cols. 1.972) para dar alcoholes parece estar mediada por radicales libres.

También reacciona con aldehidos para producir inicialmente  $RC(O) - OOH$ , un aciltrióxido que más tarde se descompondrá para dar periacidos y radicales libres como producto de esta descomposición. (H.M. White and P.S. Bailey 1.965).

Con los alquenos genera no solo radicales libres, sino también, hidroperóxidos y peróxidos poliméricos de diversa estructura con una velocidad de síntesis muy alta, como se deduce de sus aplicaciones y utilidades sintéticas.

En su reacción con las aminas también se postula la intervención de radicales libres - (P.S. Bailey and J.E. Keller 1.968).

La participación de radicales libres en el mecanismo tóxico del ozono es un hecho comprobado en varios laboratorios del mundo.

Pryor demostró que niveles de ozono del orden 0.02.p.p.m. inician la autooxidación del

metilinooleato a una velocidad superior que aquellas obtenidas para el aire puro. La inhibición de esta autooxidación por agentes como -tocoferol, tioles u otros captadores de radicales libres sugiere efectivamente la presencia de radicales en dicho proceso.

Por otra parte la interacción del ozono con ácidos grasos desaturados, evidencia, por medio de las imágenes obtenidas utilizando resonancia paramagnética de electrones, la presencia de radicales libres en la misma (B.D. Goldstein y cols. 1.968).

e) La formación de radicales libres por la acción de las radiaciones ionizantes es un hecho bien conocido así como sus consecuencias citopatológicas "in vivo" y sus aplicaciones comerciales en los procesos de polimerización industrial (W.A. Pryor 1.968; J.F. Mead 1.961; R.N. Feinstein 1.963; G.O. Phillips 1.968).

Los cambios patológicos inducidos por las radiaciones ionizantes es un efecto ampliamente comprobado, pero queda por demostrar el papel que las radiaciones de fondo (Background rad.) juegan en la iniciación de radicales libres. Para algunos autores este papel es mínimo e incluso despreciable para el organismo humano (W.A. Pryor 1.973 y 1.974).

Por otra parte la ruptura cromosómica, medida como índice del daño biológico tanto

en células humanas como en hamsters sometidos al efecto de dosis permitidas en radiación, en varios ordenes de magnitud menor que el efecto producido por el ozono (R.E. Zelac 1.971) y se cree que las reacciones de iniciación "in vivo" son más frecuentes en presencia de agentes pulógenos que por radiación ionizante.

Las radiaciones de fondo pueden producir cambios genéticos ligeros ó leves debido a las pequeñas alteraciones que estas ejercen sobre la molécula de DNA. Este efecto, que es mediado por radicales libres, no es, sin embargo, suficiente como para acortar el tiempo vital de la célula.

No obstante no debemos olvidar la importancia de las radiaciones ionizantes como mecanismo iniciador de radicales "in vivo" así como el estudio de sus efectos patogénicos. (R.N. Feinstein 1.963; G.O. Phillips 1.968).

Las radiaciones altamente energéticas aceleran la velocidad de producción de radicales e inician la lipidoperoxidación de las membranas

f) De forma similar al ozono reaccionan los óxidos de nitrógeno NO y NO<sub>2</sub> para rendir radicales libres que permanecen estables a concentraciones relativamente altas y dotadas de extraordinaria reactividad.

Estos agentes son considerados - como contaminantes y su concentración media en el aire es de 0.2 p.p.m.

Reaccionan con las oleofinas por simple adición y catalizan la isomerización cis-trans afectando de esta forma la estructura de los ácidos grasos insaturados en la membrana. (S.C.Chao y S. - Jaffee 1.972).

Pueden iniciar la autooxidación incluso a concentraciones inferiores a 0.1 p.p.m. Al igual que el ozono, parece ser que sus efectos fisiopatológicos esta, al menos parcialmente mediados por reacciones de iniciación. (J. Cn. Roehm y cols. 1.971; H.V. Thomas y cols. 1.968)

Otra evidencia a favor es el hecho de que la vitamina E, y otros agentes secuestradores de radicales, protegen a las ratas expuestas al  $\text{NO}_2$  - de sus efectos tóxicos. (J.N.Roehm y cols. 1.971).

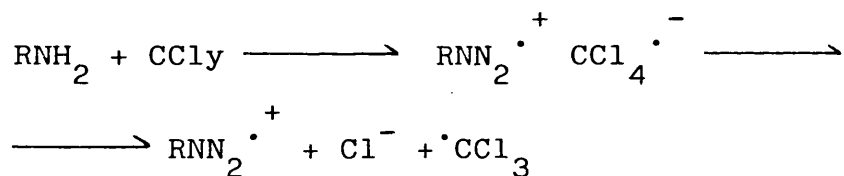
Finalmente, imágenes de resonancia paramagnética de electrones durante la interacción del  $\text{NO}_2$  y las oleofinas (R.M. Estefan y cols. 1.970; L. Jonkman y otros 1.971).

g) Las reacciones tóxicas desencadenadas por el Cloroformo o el Tetracloruro de carbono

(CCl<sub>4</sub>) también implican en ocasiones la presencia de radicales libres en las mismas.

Estas sustancias interaccionan en el hígado con diversos sistemas enzimáticos para producir dichos radicales. Su mecanismo de acción no está resuelto todavía, y Pryor sugiere un proceso de transferencia electrónica entre sitios enzimáticos dadores de electrones y el CCl<sub>4</sub> que actuaría como potente aceptor de los mismos. (W.A. Pryor 1.976).

Por otra parte las aminas que pueden actuar como dadores electrónicos dan lugar a reacciones de este tipo:



(C.J. Biaselle y J.G. Miller 1.974).

h) Para terminar con los diferentes procesos iniciativos en la formación de radicales haremos referencia a aquellas reacciones enzimáticas que pueden generar radicales que difunden posteriormente de la superficie enzimática antes de la reducción u oxidación de la misma. (I. Yamazaki 1.971). La importancia patológica de estas reacciones enzimáticas no está del todo clara, pero de cualquier forma este proceso debe ser raro, pues, de lo contrario, la vida

de los sistemas biológicos sería prácticamente imposible. El poder destructor o letal del oxígeno supera - ría, por otra parte, su utilidad como desagüe termodi - námico de electrones (I. Yamazaki 1.968), siendo difí - cil encontrar un sistema protector y eficaz contra es - te tipo de toxicidad enzimática.

Recientemente experiencias reali - zadas por Mc Cay y cols. han evidenciado la produc - ción de radicales hidróxilo en una serie de reaccio - nes que implican la participación del ion superóxido ( $O_2^\bullet$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y se sabe que el radical  $OH^\bullet$  es un poderoso oxidante que virtualmen - te puede atacar cualquier sustancia orgánica (Pryor 1.976).

Un sistema que requiere eirtroci - tos y xantina oxidasa produce  $O_2^\bullet$  pero no la lisis - eritrocitaria. Sin embargo, la presencia de iones  $Fe^{++}$  desencadena tanto la lisis celular como la producción de radicales libre que, a juzgar por la protección e - jercida por el etanol y otros agentes captadores, son del tipo  $OH^\bullet$ .

Por esta razón este sistema enzi - mático parece ser responsable de la iniciación de pro - cesos destructores celulares via radicales libres ge - nerados en el mismo.

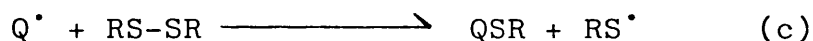
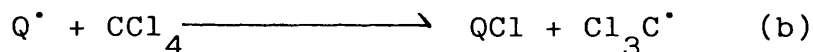
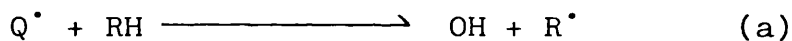


#### 4.5. Reacciones de Propagación.

Son reacciones en las que, al contrario de los procesos y terminación, se conserva constante el número de radicales libres que en ellas participan.

Existen cuatro tipos principales de reacciones de propagación de las que señalamos a continuación algunas de sus características.

En primer lugar las reacciones de TRANSFERENCIA ATOMICA.



( $Q^{\bullet}$  se refiere a un radical libre en general).

Esta es la reacción más frecuente que llevan a cabo los radicales libres y puede decirse que no existe sistema de radicales alguno en los que no se produzca por lo menos una transferencia atómica como parte de un proceso de propagación.

Los átomos de hidrógeno son fáciles y frecuentemente atacados por radicales debido, por -

una parte, a su univalencia y, por otra, porque están presentes en casi todas las moléculas orgánicas (ecuación a).

Factores que pueden influir y determinar la velocidad de este proceso son: La fuerza del enlace que se ha de romper, la fuerza del enlace que se ha de formar, los efectos polares, el efecto del solvente y el efecto estérico. Los dos primeros factores, que sumados determinan el calor producido por la reacción, son los más importantes. De hecho, cálculos cuasiempíricos, que predicen las velocidades de estas reacciones, han sido diseñados basados en la energía de disociación de los enlaces.

El calor de una reacción es, como se sabe, igual a la diferencia entre la energía del enlace que ha de romperse y la energía que se ha de formar,

$$H = E (\text{enlace que se rompe}) - E (\text{enlace que se forma})$$

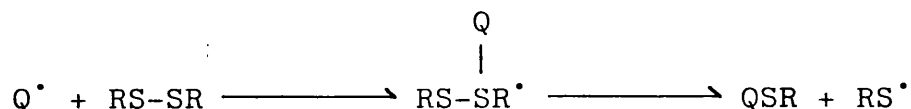
Por esta razón, si todos los demás factores permanecen constantes, los procesos de captación de hidrógeno ocurrirán en aquellas reacciones en las que la energía del enlace a formar sea alta, mientras que la energía del enlace a romper sea baja.

Esta combinación da lugar a un desprendimiento relativo de calor, a una energía de activación relativamente baja y a una constante de velocidad K relativamente alta.

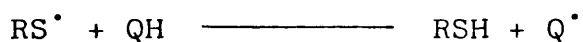
El resto de los factores, polar, -solvente, y efecto estérico, muestran escasa influencia significativa sobre la velocidad de estas reacciones aunque, en alguna de ellas, esta sea más notable y diferenciada.

Débito a la apetencia que muestran los radicales libres por los átomos univalentes, no es raro la frecuencia con que se dan las captaciones alógenas. (Ecuación b).

Por otra parte, los desplazamientos atómicos de los radicales libres sobre átomos de azufre, proceso de indudable importancia en muchos sistemas biológicos, ha cobrado en la actualidad considerable interés y se sabe que implican en su mecanismo de acción, un intermediario provisto de un octete adicional sobre el átomo de azufre.



Otras de las reacciones de propagación de importancia en biología, es la captación de hidrógeno por el radical  $RS^{\bullet}$ .



Esta abstracción, por parte del radical  $RS^{\bullet}$ , es reponsable y capaz del intercambio de hidrógeno entre sustancias orgánicas y parece útil - comprobar si esos radicales  $RS^{\bullet}$ , formados en los procesos biológicos normales, pueden difundir de su lugar de producción y desencadenar así reacciones patológicas en otras áreas celulares menos protegidas.

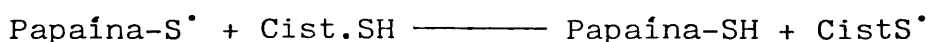
Existen pruebas evidente del papel que este tipo de reacciones desempeñan a nivel biológico, como es el caso de la papaína, una proteasa con un grupo tiól en su sitio activo y que es inactivado por radiación.

Por otra parte, si se irradia una solución de papaína, no muy concentrada, en presencia de cisteína, la enzima es inactivada por el grupo tiol del aminoácido cuando la proporción cisteína/papaína es 2 a 1. Por el contrario si esta proporción asciende hasta 15 a 1 grupo tiol, protege la enzima.

#### Inactivación

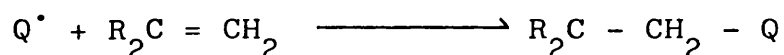


#### Protección



Es decir, que a bajas concentra -  
 ciones de cisteina, predomina la primera reacción, pe -  
 ro cuando existe un pool considerablemente alto de cis -  
 teina, la segunda reacción es la que prevalece. Bajo  
 estas circunstancias se puede afirmar que los radica -  
 les cisteinicos estan, sin duda, involucrados en las  
 reacciones de terminación de muchos procesos bioquími -  
 cos inducidos por radiaciones, así como en la protec -  
 ción enzimática.

El segundo tipo de propagación con -  
 siste en un PROCESO DE ADICION en el que los radicales  
 libres interaccionan con moléculas orgánicas portadoras  
 de cadena poliinsaturada a las que saturan.



Frecuentemente la adición y la abs -  
 tracción de hidrógeno ocurren con una constante de ve -  
 locidad tan similar que compiten entre ellos.

La adición de radicales metilo a -  
 una larga serie de alcanos, alquenos y derivados aromá -  
 ticos han permitido tabular las constantes de veloci -  
 dad de sus respectivas reacciones y predecir las velo -  
 cidades de ataque de estos radicales sobre dos substra -  
 tos diferentes ó bien, sobre dos lugares diferentes en  
 un mismo substrato.

Es de todos conocido el efecto ci-

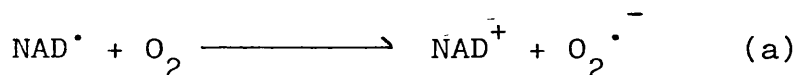
topatológico que se produce cuando una radiación ionizante incide sobre una célula viva. Hoy se sabe que esta sensibilidad celular a las radiaciones es consecuencia de la alteración de su aparato genético. Pues bien, una etapa clave y fundamental en su mecanismo de acción consiste en la adición de una especie química, con número impar de electrones y producida por radiolisis, a las bases heterocíclicas de DNA y RNA.

La constante de velocidad de esta adición es del orden de  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  (M. Ambar y P. Neta 1.967).

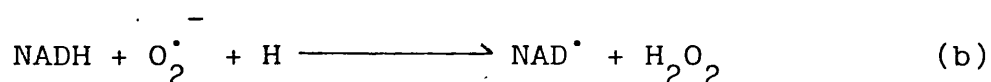
Por último haremos referencia a la TRANSFERENCIA ELECTRONICA que se produce, con frecuencia, entre metales de transición y compuestos peroxídicos y que además de la propagación, juega un papel muy importante en los procesos de iniciación.

Por ejemplo, el radical  $\text{NAD}^\bullet$  puede ser producido por la oxidación del  $\text{NADH}$  ó bien, por la reducción del  $\text{NAD}^+$ .

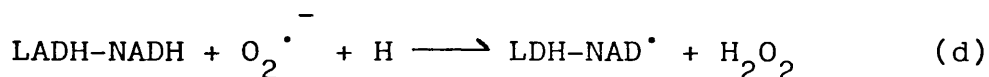
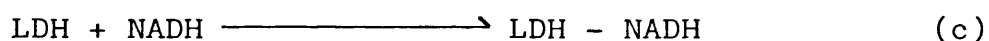
La oxidación del radical  $\text{NAD}^\bullet$  se produce por una simple y rápida transferencia electrónica cuya constante de velocidad  $k_{te}$  es  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .



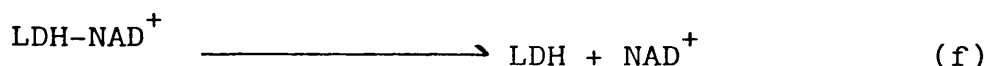
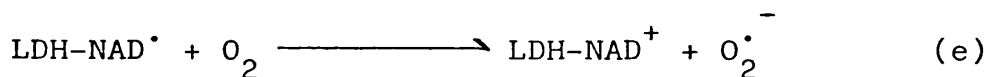
Por otra parte, y como revela el estudio del sistema NADH-superóxido, la oxidación del NADH es muchísimo más rápida cuando el cofactor está acoplado a la lactato deshidrogenasa. Este hecho se debe, como señaló Land a un cambio en las propiedades químicas del cofactor. (E.J.Land y A.J. Swallow 1.971).



$$K = 27 \text{ M}^{-1} \text{ sec.}^{-1}$$



$$K = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec.}^{-1}$$



La oxidación por parte del radical superóxido  $\text{O}_2^{\cdot -}$  del NADH no unido a la LDH tiene una constante de velocidad inferior a  $27 \text{ M}^{-1} \text{ sec.}^{-1}$  y su valor G (ó número de moléculas transformadas por 100 eV. de energía absorbida), para la desaparición del NADH es tan sólo de 0.4 (D.R. Storm y D.E. Koshland Jr. 1.972). Sin embargo, en presencia de la enzima el valor G para la desaparición de la misma asciende a 6-.

Como el valor G para la aparición

de  $O_2^{\cdot -}$  es sólo 6.5 la oxidación del NADH tiene que ser una reacción en cadena que comprenda los pasos anteriormente señalados.

Por otra parte datos preliminares indican que la constante de velocidad para la reacción (d) es del orden de  $10^5 M^{-1} sec.^{-1}$  ó por lo menos cuatro ordenes de magnitud mayor que la constante de la reacción (b).

Un ejemplo interesante de transferencia electrónica ocurre en el mismo NAD (E.J. Land y A.J. Swallow 1.968). En este caso la reducción del NAD se produce en dos pasos consecutivos y a partir de electrones hidratados ó  $CO_2^-$ .

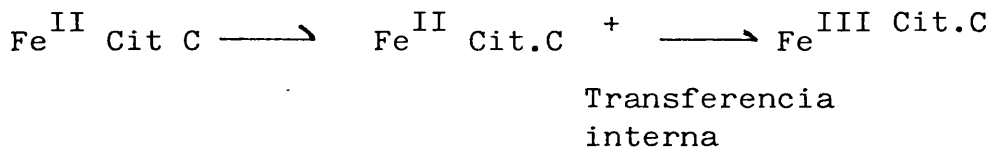
La adición electrónica inicial se produce sobre el grupo adenílico, sin embargo este electrón es transferido rápidamente al grupo nicotínico final de la molécula y la señal que en estas condiciones, aparece en el espectro de resonancia paramagnética de electrones es la de un radical libre nicotínico.

Se trata, como acabamos de ver, de una transferencia interna de electrones que también se produce en la reducción del ferricitocromo C, ion con un electrón desapareado sobre el anillo porfirínico.





El electrón es rápidamente transferido al átomo de hierro y se forma así la ferrihemoproteína.



4.6 Reacciones de Terminación.

Es relativamente escasa la información hasta ahora recogida sobre las reacciones de terminación.

Como dato orientativo diremos que en los sistemas complejos, como puede ser una célula viva, las reacciones de terminación suponen un proceso en el que participan más de un tipo distinto de radical libre y en el que varios mecanismos de terminación son posibles.

Para tratar de exponer, de forma simplificada, su concepto tomaremos como ejemplo la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, un proceso frecuente "in vivo".

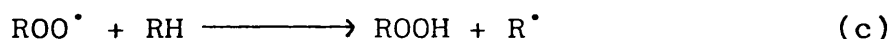
Fué Bateman quién describió el efecto de la presión de oxígeno sobre los distintos mecanismos de terminación de etilinooleato y cuyas

reacciones esquematizó de la siguiente forma (L. Bateman y cols. 1.951; L. Bateman y A.L. Morris 1.953):

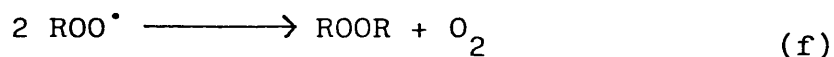
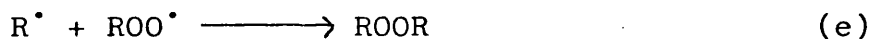
### Iniciación



### Propagación



### Terminación



El esquema se compone de una reacción de iniciación (a), dos reacciones de propagación (b y c) y tres reacciones de terminación (d, e y f) ó destructoras de radicales libres entre las que diferenciamos dos homoterminaciones y una terminación cruzada; d, f y e respectivamente.

La reacción (f) ha sido simplificada, ya que, transcurre a través de un tetróxido (ROOOOR) como producto intermediario que luego se descompone liberando dos radicales  $\text{RO}^\bullet$  y  $\text{O}_2$  en el solvente. Estos dos radicales se combinarán entre sí para formar el compuesto ROOR, ó bien, sufrir oxidacio-

nes posteriores.

El que siga uno u otro camino dependerá de entre otras, de la viscosidad del medio (J. A. Howard 1.973).

Estudiando detenidamente estas reacciones observamos como a bajas presiones de oxígeno la ecuación (b) es de naturaleza lenta  $\theta$  por lo tanto la concentración de  $R^\cdot$  resulta mayor que la de  $ROO^\cdot$ .

En estas circunstancias la reacción de terminación más lógica e importante es la (d).

Por el contrario, a presiones altas de oxígeno la ecuación (b) es rápida, acumulándose su producto  $ROO^\cdot$ .

En este caso la reacción de terminación más importante es la (f), ya que por motivos cinéticos la concentración de  $ROO^\cdot$  supera la de  $R^\cdot$ .

Por último, a concentraciones medias de oxígeno son probables tanto la reacción de terminación cruzada, como una de las dos homólogas. La estructura del substrato será ahora el factor determinante para que se produzca una u otra reacción. Por ejemplo, para el caso del etilinooleato, las reacciones (d) y (e) son responsables de su terminación

en un 50% cuando la presión de oxígeno es de 1 mm.

La importancia de la reacción (d) decrece con el aumento de la presión de oxígeno y es en estas circunstancias la reacción (f) la que ocupa su lugar junto a la reacción (e).

La reacción (f) por su parte, supera el 50% de reactividad en la autooxidación del etilinooleato, cuando la presión de oxígeno supera los 20 mm.

Podemos afirmar entonces que existen dos puntos a cuyas presiones de oxígeno la participación de uno y otro mecanismo de terminación es justo la mitad.

El primero de ellos es igual a 1 mm. de presión y coincide con la igualdad cinética de ambas reacciones (d) y (e).

El segundo de ellos, 20 mm. de presión, reúne por igual la participación de las reacciones (e) y (f).

Por otra parte estos mecanismos descritos entrañan algunas consecuencias patológicas de interés.

Así por ejemplo, en la reacción (d) aparecen enlaces neoformados con diversas biomoléculas que pueden resultar altamente destructivos para aquellos sistemas biológicos en los que éstos se establezcan de forma permanente ó definitiva.

A estos enlaces, denominados cruzados, se les achaca, en parte, la responsabilidad del proceso de envejecimiento celular. (J. Bjorksten 1968)

A pesar de que existe cierta evidencia para afirmar que este proceso de propagación - puede afectar al colágeno "in vivo", los resultados, hasta ahora obtenidos, se encuentran todavía en un punto conflictivo de discusión.

#### 4.7. Radicales Libres y Lipidoperoxidación.

##### La lesión de la membrana y sus consecuencias.

Un extenso número de agentes extraños, fármaco y venenos, así como, deficiencias nutricionales y varias enfermedades, pueden desencadenar el acúmulo anormal de grasa en el hígado.

Este acúmulo de grasa se compone en la mayoría de los casos de triglicéridos.

Por otra parte el hígado graso se acompaña en muchas ocasiones de necrosis hepatocelular. También es cierto que muchas de las causas desencadenantes de este proceso comparten una fisiopatología común. Así por ejemplo, la etionina, el tetracloruro de carbono, la deficiencia acetilcolínica, etc., producen un acúmulo de triglicéridos como consecuencia de un fallo en el transporte de estos desde el interior del hígado hasta el plasma sanguíneo, en su forma de lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL.

Es decir, que se llega al estado de hígado graso a partir de varias causas etiológicas que comparten un mismo mecanismo fisiopatológico.

Sin embargo, no puede afirmarse que su mecanismo bioquímico detallado sea el mismo, máxime cuando, este es, en la mayoría de los casos desconocido.

El estudio de los procesos patológicos orgánicos, en general, y del hígado en particular, implica muchos problemas difíciles de resolver.

A pesar de ello se conocen en la actualidad las bases bioquímicas de alguno de estos procesos patológicos y cuyo ejemplo es la lipidoperoxidación de la membrana celular.

Los lípidos de la membrana celu-

lar y del retículo endoplasmático son ricos en ácidos grasos polienuicos, candidatos excelentes a la descomposición peroxidásica.

Esta es la razón teleológica por la cual las células vivas están provistas de diversos agentes antioxidantes, así como otros tipos de mecanismos defensivos, para impedir que dicha oxidación - tenga lugar.

Pero puede ser que estos mecanismos se agoten ó se inhiban por diversas causas patogénicas, dejando vía abierta a la destrucción, por peroxidación, no sólo de la membrana celular sino también de las organelas intracelulares.

Células eritrocitarias y mitocondrias hepáticas son destruidas por un mecanismo similar.

La descomposición por peróxidos del retículo endotelial hepático se acompaña de la - pérdida en la actividad de algunas enzimas lisosomales y la lipidoperoxidación de los lisosomas produce la desintegración de los mismos.

La descomposición de los lípidos de la membrana celular hepática resulta en la interrupción del mecanismo responsable para la formación de -

VLDL en la célula, su funcionabilidad y su transporte al plasma sanguíneo..

Pero, como ésta, existen otras - muchas consecuencias por peroxidación lipídica, que - no vamos a explicar y que, de alguna forma, dejan entrever la importancia no sólo de su estudio bioquímico sino de su detección y prevención. (M. Eliakim eds. 1.973).

Hecha esta pequeña introducción sobre las posibles consecuencias de la lipidoperoxidación en la célula hepática, vamos a tratar de resumir alguno de sus mecanismos bioquímicos recientemente de lucidados.

A pesar de que la naturaleza y - propiedades químicas de los radicales libres, formados a partir de moléculas lipídicas, deben ser similares a las de aquellos formados a partir de otro tipo de moléculas químicas, tendremos que considerar, no - obstante algunas de las características inherentes a la naturaleza lipídica.

En primer lugar los lípidos son hidrófobos, o bien, anfipáticos, dando lugar a la for mación de radicales en soluciones no acuosas.

En segundo lugar los lípidos anfipáticos, componentes esenciales de las membranas ce

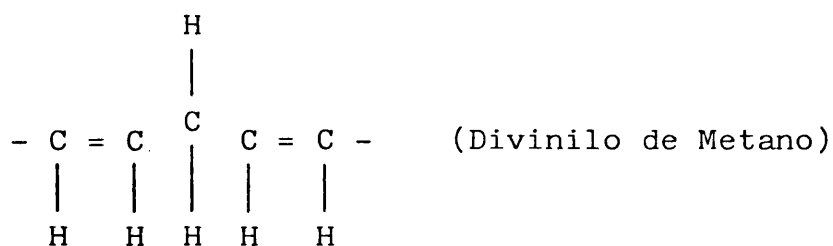


lulares estan dispuestos de forma y manera que permiten la interacción de sus moléculas individuales con lo cual contribuyen de forma considerable a la lesión celular.

Es lógico pues, centrar la atención sobre aquellos grupos anfipáticos más susceptibles a la agresión oxidativa y no sobre aquellos grupos hidrófobos, fuente de energía celular y cuya desestructuración no se acompaña de serias consecuencias para la célula.

Las cadenas lipídicas anfipáticas son importantes bajo el doble punto de vista de constituir el material estructural de la membrana y punto de partida de las reacciones encadenadas y propagadoras de radicales libres.

Partiendo de la base de que en un fosfoglicérido al menos una de sus cadenas hidrocarbonadas no está completamente saturada, y teniendo en cuenta que la estructura ó grupo "divinilo de metano", especialmente susceptible a la captación de hidrógeno se encuentra presente en todos los ácidos grasos poliinsaturados, es fácil comprender la formación de radicales libre, altamente estables, a partir de estos compuestos orgánicos, que en presencia de oxígeno desencadenan la puesta en marcha de típicas reacciones de autooxidación.

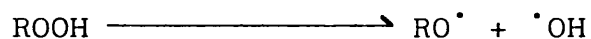


En la figura I-3 esquematizamos las reacciones encadenadas de autooxidación del ácido linoleico.

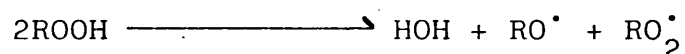
Algunas observaciones de interés fueron realizadas por Uri al respecto (Uri 1.961):

En primer lugar, la interacción entre  $R^\bullet$  y el oxígeno es tan rápida que resulta casi imposible la participación de este radical  $R^\bullet$  en las reacciones de terminación.

En segundo lugar, también resulta imposible la formación de radicales por descomposición de hidroperóxidos en tejidos, ya sea por la vía homolítica,

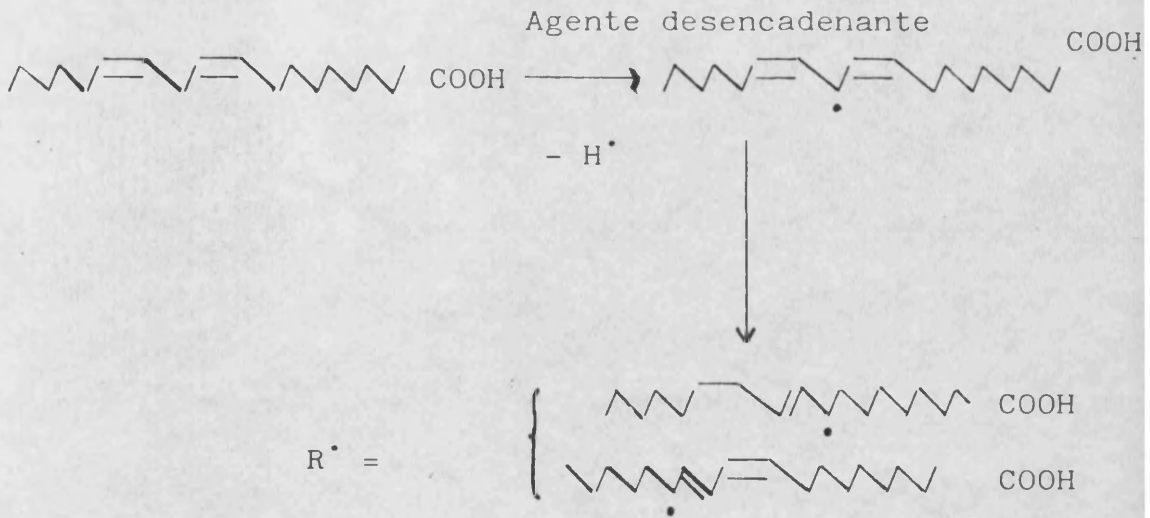


o bien, por la vía biomolecular,

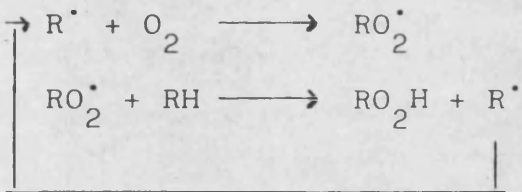


debido a la competición existente, entre una extensa variedad de productos oxidantes, por los hidroperóxidos.

### INICIACION



### PROPAGACION



### TERMINACION

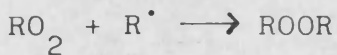
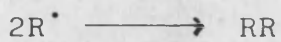


FIGURA I-3: Reacciones encadenadas de radicales libres en la autooxidación del ácido linoleico.

Por esta razón la iniciación más lógica a partir de hidroperóxidos se produce en presencia de iones metálicos y sobre todo, si ésta ocurre en un medio no polar, es decir, donde se localizarían fácilmente las cadenas de ácidos grasos y donde los quelantes metálicos podrían estar muy dispersos.

Las experiencias de Porter ilustran de forma clara la participación de iones metálicos en el proceso de autooxidación lipídica. (Porter y cols. 1.971 y 1.972).

Por otra parte, experiencias realizadas "in vitro", con homogenados tisulares ó suspensiones de organelas subcelulares, demuestran el poder estimulador del oxígeno para la producción de peróxidos. Sin embargo, y a pesar de que en este caso la medida del consumo de oxígeno no es indicación real de la formación de radicales libres, se han desarrollado varias técnicas para ofrecer una información más completa al respecto.

La reacción coloreada del ácido tiobarbitúrico, que indica la formación de dialdehído malónico, es una medida semicuantitativa de la ruptura de ácidos grasos con dos o tres dobles enlaces (Dahle y cols. 1.962; Bernheim y cols. 1.945). Se han utilizado también procedimientos idométricos para la determinación de la formación de peróxidos, así como la absorción de conjugados diénicos a 235 nm., cuya -

medida es un índice, no sólo de la aparición de peróxidos, sino también de los productos generados a partir de los radicales libres iniciales del proceso. (Swern 1.961).

Las distintas medidas utilizadas para la detección de estos peróxidos lipídicos, pueden considerarse hoy como numerosas, si bien, cualquiera que sea la técnica utilizada, se obtienen conclusiones comunes a todas ellas.

En primer lugar, existen diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad de las distintas preparaciones tisulares para la formación de radicales libres.

Por regla general los tejidos, como el cerebro, el hígado y el riñón, sufren una peroxidación rápida, mientras que el epitelio del intestino delgado presenta una peroxidación mucho más lenta. Es interesante el hecho de que los tejidos más susceptibles a la oxidación lipídica son aquellos cuyo "turn over" es más prolongado en comparación con aquellos tejidos menos susceptibles ó con un "turn over" más acortado.

Según las experiencias realizadas por Barber las requerimientos para dicha peroxidación tisular son el oxígeno, el hierro y el ácido ascórbico (Barber 1.966)

Recientemente, Mc Cay y sus colaboradores, propusieron una enzima microsomal, la NADPH oxidasa, como responsable en la iniciación de radicales libres destructores de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana citoplasmática, efecto que se potencia en las ratas alimentadas con una dieta pobre en tocoferol (Mc Cay 1.971). Esta es una de las pruebas de que la lipidoperoxidación ocurre también "in vivo".

A lo largo de mucho tiempo se ha intentado, con más o menos éxito, la demostración de este proceso destructivo en los organismos "in vivo" y hoy es un hecho que se apoya en múltiples experiencias.

Dam utilizando dietas pobres en autooxidantes observó la aparición de síntomas tóxicos como peroxidación, destrucción hepática de vitamina A y la decoloración uterina en la rata, clara evidencia de la formación encadenada de peróxidos (Dam y Grados 1.945)

Otros autores han demostrado el efecto tóxico que se produce después de la inyección de peróxidos lipídicos a muy baja concentración y todo parece indicar que dosis ligeramente más altas a las experimentadas serían incompatibles con la vida (Horgan 1.957).

También, y como desencadenantes de daño hepático en cuyo mecanismo de acción se postula la intervención de radicales libres via lipídoperoxidación, figura el etanol, que actúa fundamentalmente a nivel de los lípidos mitocondriales (Di Luzio 1.973), produciendo la acumulación progresiva de grasa y posterior necrosis alcohólica típica, el tetracloruro de carbono al que ya nos hemos referido, y las radiaciones ionizantes, cuya incidencia sobre preparaciones de ácidos grasos poliinsaturados produce la iniciación de radicales libres en cadena.

Un aspecto interesante al respecto, sea quizá, la inadecuada evaluación del efecto de estas radiaciones a dosis bajas, es decir, a aquellas dosis a las que se encuentran sometidos la mayoría de los organismos vivos.

Otro de los aspectos importantes, dentro de este apartado, es la contribución de la iniciación de radicales libres al proceso de envejecimiento.

Es curioso que el acúmulo de lipofucsina ó pigmento senil, es mucho mayor en aquellos tejidos durante cuya incubación se produce un máximo grado de peroxidación.

Parece ser, según se desprende de experiencias realizadas por Strehler, que estos

pigmentos fluorescentes se originan como consecuencia de la lipidoperoxidación lipídica y desnaturalización proteica.

Junto a esto cabe destacar el papel de los antioxidantes y agentes captadores de radicales libres en la prolongación de la longevidad de ciertos animales (Strehler 1.959).

En conclusión, parece bastante probable la hipótesis de que la formación de radicales libres tiene lugar "in vivo" y que durante dicho proceso son deteriorados los lípidos de las membranas celulares transmitiéndose este efecto citopatológico a moléculas vecinas como son las proteínas. Este proceso está relacionado con el aporte de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, así como con la tasa de autooxidantes ó captadores químicos y el buen funcionamiento de los mecanismos enzimáticos defensivos.

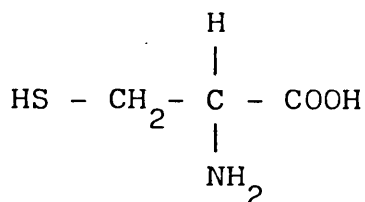
Finalmente, y entre las múltiples consecuencias citopatológicas de la lipidoperoxidación celular, se encuentra el envejecimiento, ampliamente relacionado con la puesta en marcha de reacciones iniciadoras y propagadoras de radicales libres. (Siakotos 1.973; Elden y Rizer 1.970)



## 5. LA L-CISTEINA.

### 5.1. Estructura.

La cisteina o ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico es un aminoácido sulfurado no esencial que forma parte y mantiene la estructura de muchas proteínas.



Grupo sulfhidrilo

L-Cisteina

Se le representa internacionalmente con el símbolo "Cys" o "C". Se presenta comercialmente en forma de polvo blanquecino o bien granular en su forma hidratada.

### 5.2 Propiedades Fisico-Químicas

Su peso molecular es de 121,1, se disuelve fácilmente en agua y debido a su rápida autooxidación en presencia de oxígeno, resulta muy inestable en soluciones acuosas, sobre todo a pH 7.0.

Sus pK a 25° C son los siguientes:

$$\text{pK}'_1 (-\text{COOH}) = 1.92$$

$$\text{pK}'_2 (-\text{NH}) = 8.35$$

$$\text{pK}'_R (-\text{SH}) = 10.46 \quad (\text{Dawson 1969})$$

Su grupo R, en este caso un grupo tiol o sulfhidrilo (-SH), es polar y responsable de las propiedades y características fisico-químicas de la cisteína.

Este grupo con características de ácido débil, tiende a perder con facilidad protones, por ionización, mucho más rápidamente que los grupos R de otros aminoácidos. A pH 7.0 se produce el 8% de su ionización. (Lehinger 1.976).

En disoluciones alcalinas se pierde azufre de la cisteína en una serie de reacciones complejas.

Cuando la cisteína se expone a concentraciones mínimas (trazas) de algunos iones de metales pesados, forma mercaptidos.

Llama la atención, que a pesar de sus carácter ácido débil, tiene un poder ácido mayor que los alcoholes, lo cual resulta extraño si tenemos en cuenta que el oxígeno es considerablemente más electronegativo que el azufre.

La energía del enlace S-H es igual a 89 Kcal/mol. y la longitud de este enlace es de aproximadamente 1.33 amstrongs ( $\overset{\circ}{\text{A}}$ ). La afinidad eléctrica del grupo SH es igual a 52 Kcal/mol .

La bioquímica del grupo tiol -  
ha sido estudiada fundamentalmente por Torchinsky -  
(Torchinsky 1.977).

Es un grupo extremadamente ac-  
tivo que se manifiesta por un extenso número de reac-  
ciones, enzimáticas o no, en las que interviene.

El grupo tiol de la cisteína -  
desempeña tres funciones importantes en la bioquímica  
de péptidos y proteínas. Estas son:

- a) Actúan con ligandos metáli-  
cos.
- b) Como centro de reacciones -  
de óxido-reducción y trans-  
porte de electrones.
- c) Como componente intramolecu-  
lar en la estructura tercia  
ria de las proteínas.

La cisteína se ha mostrado en  
ocasiones como un potente antioxidante y sustrato ra-  
dioprotector, al mismo tiempo que presenta interesan-  
tes propiedades autooxidativas.

En presencia de catalizadores  
apropiados (iones metálicos redox) sufre una autooxi-  
dación que resulta en la producción de agua oxigenada,

$H_2O_2$ , varios derivados oxidativos (cysteine sulphuric), ácidos sulfónicos, cistina, derivados oxidativos similares a la cistina y agua (Jocelyn 1.972). A pesar de ser una reacción bastante estudiada, la intervención de iones metálicos y los efectos de diversas soluciones sobre las constantes cinéticas han dado lugar a varias interpretaciones sobre su mecanismo de reacción.

Entre los muchos investigadores que trataron de vislumbrar el mecanismo de la oxidación de la cisteína, fue Gerwe quién comprobó por primera vez que la cisteína pura y libre de iones metálicos, era oxidada muy lentamente. (Gerwe 1.931).

Matheus y Walker demostraron que la oxidación de la cisteína se producía en medio alcalino pero no ácido. También comprobaron que a  $20^\circ C$  la máxima velocidad de reacción se alcanzaba con un  $pH = 8$  y concluyeron que la rápida oxidación de la cisteína únicamente se producía en el estado neutro y monoionizado de su molécula. (Matheus y Walker 1.909).

La oxidación más rápida de la cisteína en presencia de cistina fué apuntada, por primera vez, por Abderhalden y Wertheimer en 1.922 y un año más tarde publicaron la influencia catalítica de los iones metálicos sobre esta reacción. (Abderhalden y Wertheimer 1.922 y 1.923).

Estudios posteriores realizados por Robert implicaban al cobre como catalizador en la oxidación de la cisteína en soluciones alcalinas (Tarbel 1.961).

Esta reacción es, en la actualidad estudiada y cuantificada por varios procedimientos colorimétricos.

Así la oxidación de cisteína a cistina en presencia de cobre da lugar a la aparición de un color amarillo cuyo espectro se caracteriza por un pico ancho a 330 nm. y una depresión del mismo a 400 nm.

Por medio de análisis químicos y el espectro de resonancia paramagnética de electrones, se ha identificado este compuesto amarillo como un complejo formado por la cisteína y el cobre. La proporción cisteína/cobre en el mismo es de 2:1 .

Este complejo intermediario implica prácticamente a la totalidad del cobre presente en la solución, permanece invariable durante la oxidación de la cisteína en presencia de oxígeno molecular, y desaparece rápidamente al final de la reacción. En estos momentos no queda en la disolución cisteína en forma reducida y todo el cobre está en su forma  $\text{Cu}^{1+}$  .

En ausencia de oxígeno, por el contrario, la desaparición del complejo  $\text{Cis-Cu}^{2+}$  es extraordinariamente lenta ya que la reoxidación del ion  $\text{Cu}^{1+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  se realiza a partir de la cisteína.

En estas condiciones, la reducción del átomo de cobre depende de la disociación redox del grupo SH de la cisteína en el compuesto intermediario  $\text{Cis-Cu}^{2+}$  constituyendo de esta forma un factor limitante de su velocidad de recuperación a  $\text{Cu}^{2+}$ .

El diferente comportamiento observado por el complejo  $\text{Cis-Cu}^{2+}$  en presencia ó ausencia de oxígeno, es indicativo de que la reoxidación del cobre  $\text{Cu}^{1+}$  por el oxígeno molecular, reacción que produce peróxido de hidrógeno, es una reacción mucho más rápida que la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  por la cisteína. Por esta razón se considerará a esta última reacción como paso limitante en todo el proceso autooxidativo de la cisteína.

Se concluye en que la transferencia electrónica desde la cisteína al oxígeno tiene lugar en dos pasos sucesivos. El primero de ellos consiste en la transferencia de un electrón desde la cisteína al cobre. En el segundo este electrón es transferido desde el cobre hasta el oxígeno.

Ahora bien, esta segunda reacción es tan rápida, comparada con la primera, que el

cobre del complejo queda prácticamente en su estado oxidado a lo largo de toda la oxidación de la cisteina.

Cuando el electrón ha sido - transferido desde la cisteina en el compuesto intermedio hasta el oxígeno, esta que queda oxidada, - debería ser reemplazada rápidamente por una nueva molécula de cisteina reducida con el fin de mantener - la concentración del intermedio la molécula oxidada de cisteina abandonará el compuesto  $\text{Cis-Cu}^{2+}$  en forma de radical tílico que más tarde por dimerización formará cistina. (Cavallini y otros 1.969).

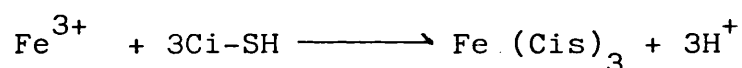
En 1.966, Jay E. Taylor estudiando la oxidación de L-Cisteina por el oxígeno en la solución y en presencia de hierro (III) llegó a las siguientes conclusiones.

1) La oxidación de la cisteina en presencia del ion férrico es una reacción de orden 0 en lo que respecta a ambos sustratos oxígeno y cisteina. Esta reacción es muy lenta en ausencia del ion metálico.

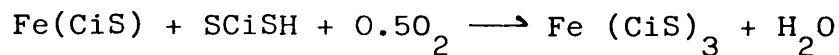
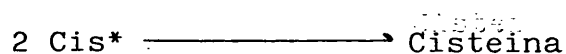
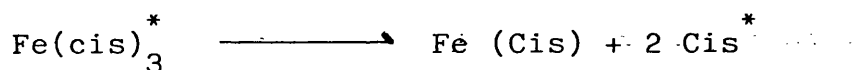
2) A bajas concentraciones de ion férrico el consumo de oxígeno con respecto a la cisteina era de 1:4, siendo el cistina el producto de esta oxidación.

3) Esta oxidación en presencia de hierro Fe III, alcanzaba su máxima velocidad catalítica a pH 8.10 y disminuía progresivamente ya fuera a un pH inferior o superior a este.

Durante esta oxidación tiene lugar la formación del complejo Cisteina-hierro (Cis-Fe III) de estructura octaédrica en el cual la cisteina actuaría como doble ligando.



Este complejo Cis-Fe III puede ionizarse debido a los grupos carboxilo y amino de la cisteina. Se sabe que una de estas formas ionizadas, designada como  $(\text{Fe}(\text{Cis})_3)^*$  es especialmente reactiva.



CiS representa a un intermedio que se combina consigo mismo para dar lugar a la cisteina.

Puede ser un radical, una especie ionizada ó una especie molecular dotada de una



reactividad poco usual.

Pero la cisteina, y más generalmente el grupo sulfidrilo, puede ser también oxidado por el peróxido de hidrógeno.

Este aspecto fué estudiado con detenimiento por Abderhalden y Wertheimer quienes observaron como la cisteina era oxidada inmediatamente previa disolución neutra con peróxido de hidrógeno. (Abderhalden y Wertheimer 1.923).

En 1.931, N. Wingate Pirie sumarizó estudios al respecto de la siguiente manera:

1) En presencia de cobre, la velocidad de oxidación de la cisteina por el peróxido de hidrógeno a pH 2.1. es proporcional a la concentración del cobre, e independiente de la concentración de cisteina.

2) En presencia del hierro la velocidad es, por el contrario, proporcional a las concentraciones tanto de hierro como cisteina y es ligeramente inhibida por un incremento en la concentración  $H_2O_2$ .

3) La velocidad de oxidación del glutation en presencia de cobre, es proporcional a la concentración de cobre y  $H_2O_2$  e independiente de la concentración de tripeptido.

4) Con hierro, se produce una especie de auto-inhibición y la velocidad de oxidación es inversamente proporcional a la concentración de glutathion; es por otra parte independiente del peróxido de hidrógeno (Pirie 1.931).

A pesar de que los productos finales de la autooxidación de la cisteína son bien conocidos, se ha apuntado la participación de radicales libres en dicho mecanismo autooxidativo.

Cavallini sugirió la intervención en el mismo de un radical tiílico, (Cavallini y cols. 1.969) mientras que para otros autores, se trataba de un proceso de transferencia electrónica con implicación de iones metálicos como el cobre.

Tomasi y Searle demostraron la producción de radicales hidróxilo a concentraciones bajas de cisteína. (Searle y Tomasi 1.982).

Por otra parte, incubando cisteína y siguiendo su autooxidación en presencia de bacterias se ha observado un efecto letal por parte de la cisteína que es estimulado en presencia de cobre u superóxido dismutasa. (Carlson 1.979; Nyberg 1.979).

En contraposición a estas experiencias, no podemos olvidar el papel de los tioles intracelulares como protectores celulares e importantes in-

termediarios en muchas reacciones enzimáticas del organismo.

Así, el grupo sulfidrilo de la cisteína puede actuar como inhibidor de la papaina a concentraciones bajas de aminoácidos pero se convierte en estimulador y protector de la enzima conforme aumenta su concentración con relación a ésta.

También se sabe el papel que juegan los tioles no proteicos (GSH y cisteína), en la protección de las células contra la irradiación. (Rink 1.973).

Se considera que ciertos tioles, no proteicos, son más importantes que los enzimas para entender el mecanismo de radioprotección. (Adams y otros 1.965).

Existe evidencia suficiente para correlacionar la variación de la radioresistencia durante el ciclo mitótico celular y la concentración de GSH y en general de los grupos tioles. (Stern 1.956; O'Hara y otros 1.970).

### 5.3. Metabolismo de la L-Cisteína.

#### 5.3.1. Generalidades.

La cisteína, como hemos visto, - -

pertenece al grupo de aminoácidos que contienen azufre en su molécula, forma parte de los doce aminoácidos sin sintetizados por el organismo y que participan en la biosíntesis de las proteínas.

Las necesidades de los aminoácidos sulfurados expresadas en mgr./día y Kgr. de peso corporal, disminuyen con la edad siendo para el lactante - de 45 mgr., en el niño de 10 a 12 años de 22 mgr. y en el adulto de 10 mgr.

El azufre, que se encuentra en el organismo fundamentalmente en forma de metionina o - cisteína y sus derivados, es fundamental para el mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas por medio de la cistina. Esta molécula es un dímero - constituido por la unión por un puente disulfuro o co valente de dos moléculas de cisteína.

La cisteína se encuentra elevada en las proteínas del pelo y uñas, denominada queratina, así como en la insulina y el glutatión de dos moléculas de extraordinaria importancia metabólica.

#### 5.3.2. Síntesis de Cisteína.

La vía biosintética de la cisteína tiene como punto de partida la activación de la metionina que cataliza la formación de S-adenosil L-metioni

na (SAM), principal dador de grupos metilo en el metabolismo de los mamíferos (Mudd y Cantoni 1.964). En esta reacción se consume una molécula de ATP. (Fig.I-4).

La mayoría de S-adenosil L-metionina formado, es utilizado en reacciones de transmetilación dando S-adenosil-L-homocisteina, reacción que es catalizada por la S-adenosil L-homocisteina sintetasa.

Es una reacción posterior la L-adenosil L-homocisteina se descompone enzimáticamente dando adenosina y L-homocisteina. Este paso es catalizado por la L-homocisteina sintetasa.

Esta última reacción es reversible, estando favorecida "in vitro", por la síntesis de S-adenosil-L-homocisteina, y desplazándose el equilibrio - "in vivo", hacia la hidrólisis con la eliminación de los productos de reacción. La homocisteina puede ser oxidada químicamente o enzimáticamente a homocisteina ó catalizada a sulfuro de hidrógeno y -cetobutirato.

En presencia de la enzima cistationina sintetasa, la homocisteina se condensa con una molécula de serina para formar cistationina en una reacción irreversible que requiere piridoxal fosfato.

La cistationina puede también ser sintetizada por la enzima anterior; pero en la dirección inversa, mejor que el -cetobutirato funciona

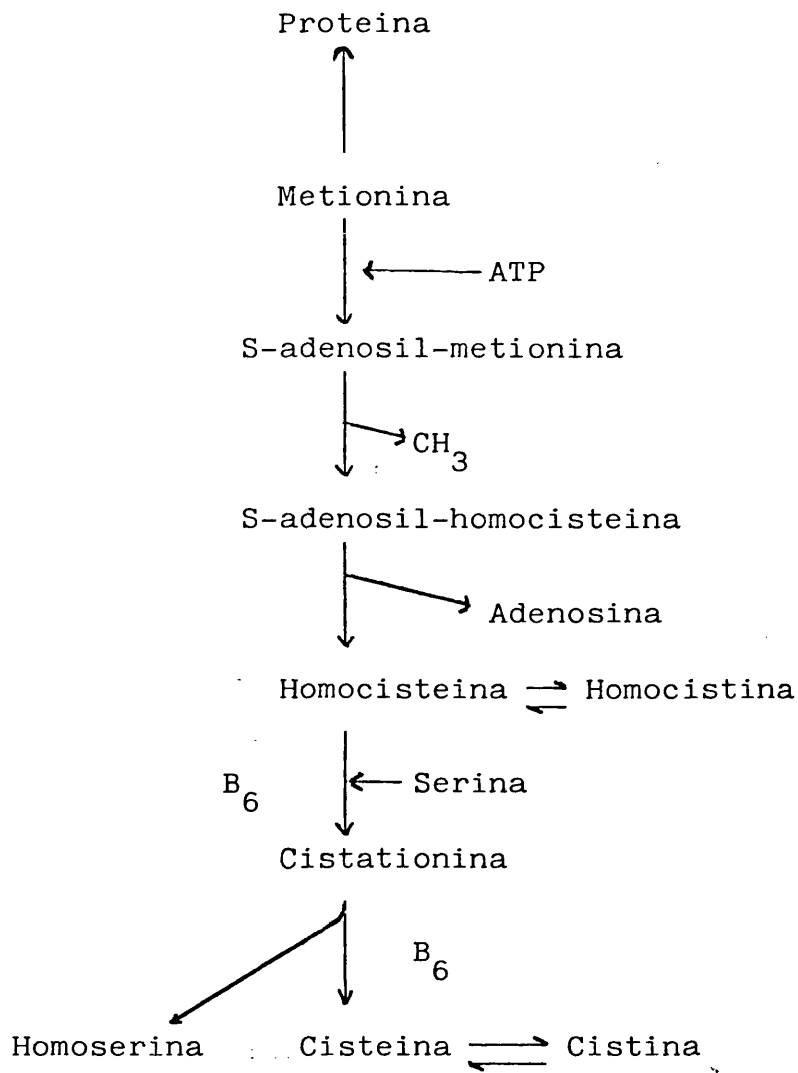


FIGURA I-4: Via biosintética de L-Cisteina.

como uno de los cosustratos la homoserina (Wong y cols. 1.968).

El último paso de la via biosintética de la cisteina comprende la transformación de la cistationina a cisteina por liberación de una molécula de homoserina reacción que es catalizada por la cistationinasa.

Esta biosíntesis de cisteina que se conoce como via de la transulfuración ó de la cistationina, fué la primera y definitiva via metabólica descubierta para este menester.(Greenberg 1.975).

El papel de esta via metabólica en la regulación del glutati6n así como las consecuencias de su ausencia en muchos tipos de células tumorales está cobrando en la actualidad gran interés.

Para algunos autores, la biosíntesis de cisteina, via cistationina, es de gran importancia para la síntesis y reserva hepática de tioles, en forma de glutati6n.(Reed and Orrenius 1.977).

### 5.3.3. Destinos Metabólicos de la L-Cisteina.

Como acabamos de exponer, el resul

tado final de las complejas reacciones descritas anteriormente, es la transferencia del átomo de azufre de la metionina a la cisteína.

Este aminoácido al igual que la metionina y la homocisteína es metabolizado de varias formas (Fig. I-5).

La oxidación de cisteína o cistina tiene lugar en muchos tejidos mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.



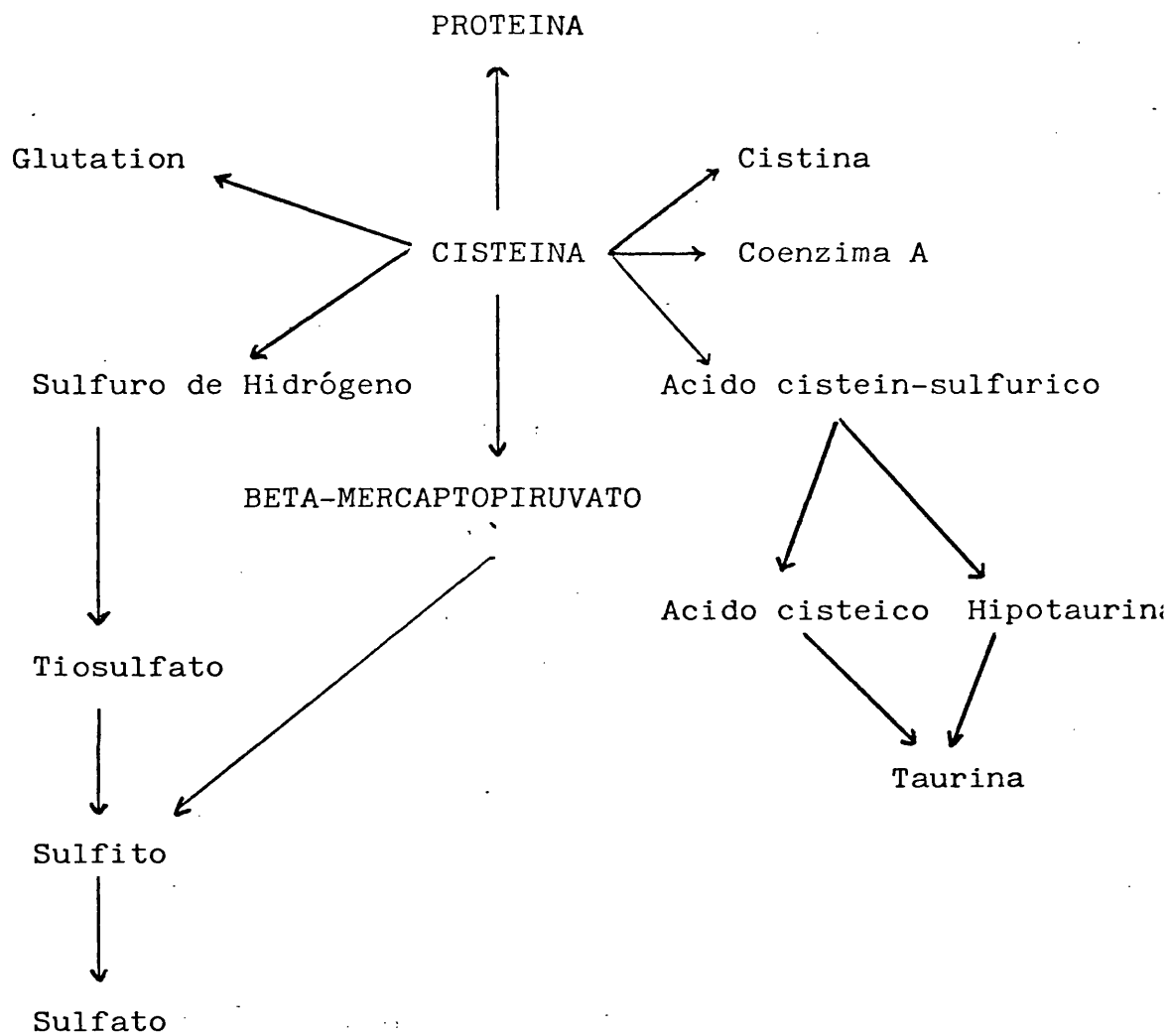


FIGURA I-5: Destinos metabólicos de la L-Cisteina.

Uno de los destinos más importantes de la L-cisteína es, quizá, su papel como precursor en la síntesis de glutatión. Tateishi y otros (1.974), - postularon que la síntesis de GSH "in vivo" está regulada por la disponibilidad de cisteína.

Los hepatocitos aislados de rata - sintetizan glutatión con gran facilidad sobre todo a - partir de aminoácidos sulfurados como metionina o cisteína (Reed y Beatty 1.978).

Viña y otros sugieren que la cistatiónina actúa como dador o liberador de cisteína para la síntesis de glutatión (Viña y cols. 1.978), que a - su vez servirá como reservorio de grupos tioles en forma de cisteína (Tateishi y otros 1.977).

La cisteína extracelular es captada por el hepatocito con facilidad pero no ocurre lo - mismo con el producto de su oxidación la cistina. Esto puede estar relacionado con el hecho de que la mayoría del "pool" cisteína-cistina en el plasma sanguíneo se encuentra en forma de cistina. (Crawhall y Segal 1.967).

La cisteína, que también es incorporada virtualmente a todas especies proteicas, es - precursora de la síntesis de coenzima A.

Además de estas reacciones anabólicas la cisteína es catabolizada por dos vías generales.

Una via comprende la oxidación del grupo sulfidrilo dando ácido cistein-sulfinico, siendo convertido este último compuesto en taurina, via ácido cisteico ó hipotaurina. (Young Maw 1.958).

Alternativamente la cisteina puede ser transaminada dando B-mercaptopiruvato o desulfurada a piruvato y SH<sub>2</sub> (Greenberg 1.964). Esta última sustancia es rápidamente oxidada a tiosulfato y sulfito en los tejidos de los mamíferos.

Finalmente, el sulfito es oxidado a sulfato inórgánico; el resto, como azufre neutro (aminoácidos) ó sulfato "etéreo" (esteroides conjugados, fenoles y así sucesivamente).

#### 5.4. Antecedentes acerca de la citotoxicidad de la cisteina.

A pesar de la extensa información existente acerca de la Bioquímica de los grupos tioles en general y de la cisteina en particular, no contamos con muchos datos sobre la citotoxicidad de este aminoácido.

Sin embargo, varios trabajos realizados durante los últimos cuatro años ponen de manifiesto el poder citotóxico de la cisteina bajo ciertas circunstancias experimentales.

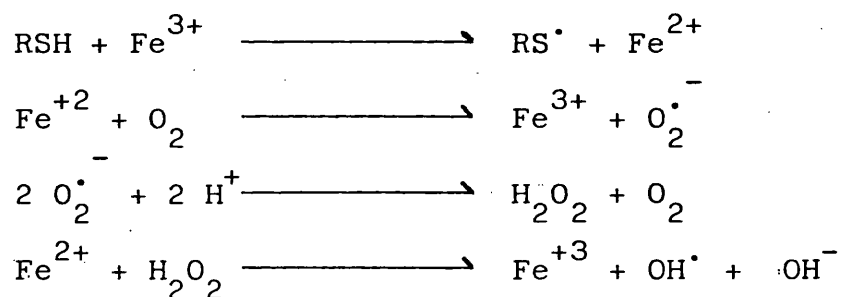
En 1.978, estudiando la estabilidad de la concentración del GSH en hepatocitos aislados de rata, por la técnica de Berry y Friend (1.969) y Krebs y otros (1.974), se demostró que el tripeptido tan solo descendía su concentración intracelular a un 70% de su valor normal después de 60 minutos de incubación en medio salino Krebs-Henselit. (Viña y otros 1.978).

Este descenso se puede impedir con la adición de metionina 0.2 mM u homocisteina 1 mM. Por el contrario la cisteina 0.25 mM, (la concentración aproximada tisular) no solo resulta ineficaz para el mantenimiento intracelular del GSH, sino que además reduce su concentración al 52% de su valor habitual. Este efecto es, por otra parte, proporcional a la concentración de este aminoácido. De tal forma que por encima de 2 mM de cisteina, desaparece casi la totalidad del glutatión en los hepatocitos aislados de rata. (Viña y otros 1.978).

Estos resultados eran contrarios de los esperados ya que, como sugirió Tateishi en 1.974 la cisteina es un factor limitante en la síntesis de GSH "in vivo", por lo que era de esperar que su incubación en presencia de hepatocitos aislados de rata mantuviera la concentración de GSH constante durante los 60 minutos de la misma.

En un congreso sobre GSH celebrado en Alemania, (1.978) H.A. Krebs apuntaba que el efecto citotóxico observado por la cisteína a altas concentraciones, podía estar relacionado con su rápida oxidación a cistina. Esta reacción, que es catalizada por trazas de iones metálicos presentes en la disolución ó quizá, por el sistema citocromo P-450, (Krebs 1.978), no solo produce cistina, como producto de su oxidación, sino también  $H_2O_2$ . (Harrison y Thurlow 1.926).

Por otra parte y en relación con estas conclusiones, sabemos desde 1.974 que la autooxidación de tioles puede producir el ion superóxido ( $O_2^-$ ) y que en presencia de hierro, se genera el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) a través de la reacción de Haber-Weiss, (Misra 1.974) como mostramos en el siguiente esquema,



En este mismo contexto, Ming Tien y otros, han estudiado la peroxidación de liposomas, a partir de cisteína, glutatión o ditioteitol y en presencia de hierro, llegando a la conclusión de que el  $H_2O_2$ , formado por la reducción directa del hierro, es el responsable de dicha peroxidación. Este proceso autooxidativo que puede llevar implícito la formación

de radicales  $\text{OH}^\bullet$ , es máximo en presencia de cisteína 0.25 mM y se incrementa con la adición de cobre  $\text{Cu}^{+2}$  al medio de incubación. (Tien y otros 1.982). Estas conclusiones se basaron fundamentalmente en el hecho de que la superoxidación dismutasa (SOD) no era capaz de evitar la lípido peroxidación a partir de cisteína, lo cual es indicativo de la no participación del radical superóxido en este proceso citotóxico.

Pero, también se han descrito efectos citotóxicos a partir de derivados cisteínicos. Así, por ejemplo, la depleción de GSH consecutiva a una dosis masiva de acetaminofen (Paracetamol) (0.5 gr/Kgr.) puede ser prevenida por la inyección intraperitoneal de metionina (1 gr/Kgr.) mientras que la misma dosis - de N-acetyl-cisteína favorece la disminución de la concentración del glutathion hepático. (Viña y otros - 1.980).

Este hecho coincide con los resultados de Thor, quién descubrió a la metionina como potente agente protector contra la citotoxicidad del bromo benzeno al mismo tiempo que demostró la poca eficacia de la cisteína para prevenir el descenso de GSH inducido por el mismo agente tóxico en los hepatocitos aislados (Thor y otros 1.978).

Por otra parte, realizando medidas isocitrato deshidrogenasa en plasma y basándose en exámenes histológicos en ratas, Mc Lean, y Day llegaron a

la injuria hepática inducida por el paracetamol.

Relacionadas también con la clínica, estan los hallazgos de Olney quien demostró que las altas dosis de cisteina resultaba en un alto índice de mortalidad en ratas jóvenes (Olney y Ho 1.970). Sin embargo, dosis subletales de cisteina inducian un síndrome neurodegenerativo diseminado, (Olney y HO 1.972) cuyo mecanismo citotóxico podría estar relacionado con la transformación química de la L-cisteina a derivados de caracter más ácido.

A este respecto, recientes experiencias realizadas en nuestro laboratorio sugieren como mecanismo de acción la rápida autooxidación de la L-cisteina a cistina y  $H_2O_2$  potente agente tóxico por se ó por los derivados químicos a que da lugar. En cualquier caso las dosis de cisteina o N-acetilcisteina utilizadas para inducir el descenso del GSH en el cerebro de la rata son inferiores a las utilizadas por Olney para causar el síndrome neurovegetativo en la misma.

Ya que las concentraciones fisiológicas de GSH son necesarias para mantener intacta la membrana celular, Viña y otros, destacan la importancia de esta depleción inducida para la comprensión del mecanismo citotóxico de la L-cisteina. (Viña y otros 1.982).

## 6. SUBSTRATOS CITOTOXICOS PRODUCIDOS EN EL METABOLISMO DEL OXIGENO.

### 6.1. Generalidades

Durante el desarrollo evolutivo de la vida en la tierra, el oxígeno ha permitido la obtención de la energía necesaria para los procesos biológicos, mediante la combustión de la materia orgánica. Sin embargo, esta ventaja de los sistemas anaeróbicos se encuentra en parte contrarrestada por los efectos nocivos que puede manifestar este gas.

El fenómeno de la toxicidad del oxígeno se describió por Bert hace aproximadamente un siglo ( Hitchcock 1.943 ).

Se sabe que esta toxicidad aparece en animales expuestos a presiones de oxígeno por encima de 2 ó 3 atmósferas, y los primeros síntomas manifiestos son la aparición de convulsiones generalizadas (Schilling y Adams 1.933; Stein y Sonnenschein 1.950; Van Den Brenk y Jamieson 1.964) seguida de una severa alteración pulmonar (Jamieson y Cass 1.967, Van den Brenk y Jamieson 1.962; Wood y Perkins 1.970).

Pero su carácter tóxico se desprende de su naturaleza físico-química, al poseer dos electrones desapareados y comportarse, por lo tanto, como biradical paramagnético.



La reducción completa de una molécula de oxígeno para la formación de  $H_2O$  se produce mediante un proceso secuencial univalente que requiere cuatro electrones.

Durante dicho proceso, se producen una serie de intermediarios caracterizados por su extrema reactividad y propiedades para los sistemas biológicos. Estos elementos intolerables para las células vivas, como son el radical superóxido  $O_2^-$  y el radical  $OH^\cdot$ , son acomodados en el interior de las mismas merced a la defensa catalítica de diversas enzimas encargadas de la captación ó metabolización de estos intermediarios (Fridowich 1.978).

Existe evidencia de la participación de estos radicales (intermediarios de la reducción del oxígeno) en procesos fisiológicos relacionados con la clínica. Así, por ejemplo, se sabe que el proceso de fagocitosis que llevan los leucocitos en el aparato respiratorio se produce mediante la liberación de especies derivadas del  $O_2$  como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ , y  $ClO^-$  (Klebanoff y Clark 1.978).

También, como describe Bannister, la aparición de intermediarios en la reducción del oxígeno se encuentra relacionada con procesos como la inflamación, uno de cuyos apartados más estudiados es la artritis reumatoide, así como en la síntesis de prostaglandinas y factores quimotácticos (Bannister y

Bannister eds. 1.980).

## 6.2. El radical superoxido $O_2^-$

La teoria de la toxicidad del oxígeno mediada por el radical superoxido establece que la formación de dicho radical  $O_2^-$  es el elemento responsable de daño biológico producido y que la enzima superoxido dismutasa, (SOD), actúa como defensa enzimática contra el mismo (Halliwell 1.982).

Sin embargo, no todos los autores lo consideran como radical tóxico debido, para algunos, a su escasa reactividad (Fee y Valentine 1.977; Valentine 1.979; Fee 1.980) así como a su capacidad para formar radicales hidroxilo,  $OH\cdot$ , por la reacción no catalizada de Haber-Weis en los sistemas biológicos -- (Youngman 1.981).

Debido a las leyes cuanticas, que dictaminan las restricciones en la configuración electrónica, se encuentra dificultada la reducción divalente del oxígeno y se favorece, por el contrario, su reducción univalente.

Sin embargo, y dado que ambas vías se llevan a cabo en el organismo vivo, las células han desarrollado una serie de enzimas oxidativas que permiten no solo la reducción divalente del oxígeno sino también la tetravalente así como otra serie de enzimas

defensivas a las que nos referimos más tarde.

El primer grupo de enzimas comprenden de las citocromo oxidases que utilizan la mayor parte del oxígeno que consumen las células respiratorias reduciéndolo a  $H_2O$  sin la liberación de  $O_2^{\cdot-}$  ó  $H_2O_2$  -- (Hill 1.981).

La estrategia de minimizar el -- problema de la toxicidad del oxígeno impidiendo la -- producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  ha sido muy utilizada.

Sin embargo y a pesar de todo, el  $O_2^{\cdot-}$  se produce en el interior de las células aunque resulte difícil cuantificar el grado de esta producción.

Tan solo se ha comprobado que, con la inhibición de la SOD en el estreptococo fecalis, el 17% del consumo de Oxígeno se transforma en  $O_2^{\cdot-}$  --- (Fridowich 1.978).

Las reacciones, que con más frecuencia genera el radical superóxido, son la autooxidación de hidroquinonas, de leucoflavinas, catocolaminas, tioles y tetrahidroproteínas, así como la oxidación espontánea de ferredoxinas reducidas como la hemoglobina y la mioglobina.

Otras series de enzimas entre las que se encuentran, la xantina oxidasa, aldehído oxidasa

sa y flavin deshidrogenasa producen también  $O_2^{\cdot-}$  .

El radical superoxido se ha detectado como intermediario en el mecanismo de acción de la galactosa oxidasa, indolamina dioxigenasa y nitropropano dioxigenasa.

Fragmentos de organelas intracelulares como las mitocondrias y cloroplastos producen -- también  $O_2^{\cdot-}$  .

Podemos concluir diciendo que el radical superoxido se produce durante la reducción biológica del oxígeno a pesar de no poder detallar la -- cuantía de su producción. El radical  $O_2^{\cdot-}$  es, hoy en -- día, tema de estudio para el bioquímico como lo fue en su día para el fisiquímico.

### 6.3. El peligro del radical superoxido.

El  $O_2^{\cdot-}$  formado experimentalmente a partir de métodos fotoquímicos, enzimáticos o por activación de fagocitos es capaz de la inactivación de virus inducción de lipidoperoxidación, y destrucción de -- membranas (con la pérdida del fluido intracelular y -- del potencial de membrana) degradación de DNA y de poli -- sacáridos, de células de cultivos (Halliwell 1.982).

No obstante existen distintas prue -- bas experimentales para afirmar que el  $O_2^{\cdot-}$  no es la --

única especie nociva para los organismos vivos aunque si desencadenante de otras especies igual o más tóxicas que esta. En otras muchas ocasiones se precisa la participación de ambas especies para ejercer su mecanismo tóxico.

#### 6.4. El radical Hidroxilo (OH•)

La toxicidad de este radical es -- tan reconocida que para numerosos autores representa el verdadero agente toxico intermediario en el metabolismo del oxigeno.

Numerosas pruebas experimentales -- apoyan esta hipótesis sin olvidar el poder citotóxico de su progenitor el radical superoxido.

Como ya hemos adelantado, mediante diversas publicaciones se pone de manifiesto que la toxicidad mediada por el  $O_2^{\cdot-}$  solo se manifiesta en presencia de  $H_2O_2$ , dejándo entrever la participación del radical hidroxilo su mecanismo de acción.

Este es uno de los mecanismos más importantes por el que se genera el radical OH• y que hemos presentado en la figura I-6, como reacción tipo Fenton, ya que precisa en general la participación de trazas de sales metabólicas, fundamentalmente de hierro (Gutteridge y otros 1.981). El segundo tipo de reacción que postula la formación de OH• a partir de

$O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  y en ausencia de sales metálicas (reacción de Haber-Weis) es muy lenta en comparación con ésta (Haber y Weis 1.934).

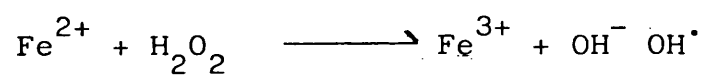
El superóxido  $O_2^{\cdot -}$  tiene la función de actuar como agente reductor del ion hierro en su forma  $Fe^{3+}$  para transformarlo en  $Fe^{2+}$ , ya que este electrón transferido desde el  $O_2^{\cdot -}$  hasta el hierro es el que utiliza el metal para reducir al peróxido de hidrógeno y formar así el radical  $OH^{\cdot}$ .

Por lo tanto la función del superóxido puede ser sustituida por otro agente reductor, y la capacidad de éste para la formación de  $OH^{\cdot}$  puede conocerse midiendo la producción de etileno a partir de metional (un indicador de la formación de  $OH^{\cdot}$ ) Entre ellos se encuentra el NADH NADPH y el ácido ascórbico (Winterbonrn 1.979).

#### 6.5. La toxicidad del radical $OH^{\cdot}$

El radical  $OH^{\cdot}$ , dotado de extraordinaria reactividad, está considerado como uno de los radicales más tóxicos para los organismos vivos tanto superiores como inferiores. Su formación en el citosol del hígado de la rata es del orden de  $10^{-12}$  -  $10^{-9}$  M.seg<sup>-1</sup>. (Chance y otros 1.979), tres órdenes de magnitud menor que lo estimado para la formación de peróxidos lipídicos (Chance y otros 1.979).

REACCION TIPO FENTON:



REACCION TIPO HABER-WEISS:

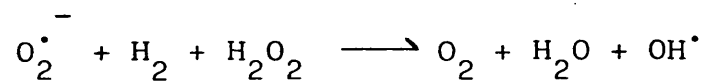


FIGURA I-6 : Dos tipos de reacciones generadoras -  
del radical  $\text{OH}^{\bullet}$  a partir de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$

La toxicidad del radical hidroxilo se apoya en dos líneas de investigación. Una de ellas se basa en el cultivo de células microbianas con concentraciones crecientes de sales ferrosas y  $H_2O_2$ . El resultado es la potenciación del efecto bacterizida manifestada por el hierro al reaccionar con el peróxido de hidrógeno según la reacción de Fenton y con la consecuente producción de  $OH\cdot$ .

Otra de las líneas experimentales consiste en el estudio de la eficacia de los diversos sistemas defensivos, o captadores, del radical  $OH\cdot$  para la prevención del efecto bacterizida. En éste último caso se comprueba que el aumento de agentes inhibidores de la acción tóxica del radical  $OH\cdot$  como son la tiourea metiltiourea, benzoato sódico, dimetilsulfoxido (DMSO), manitol, etc. inhiben, con distinto grado, el poder bacterizida inducido por el hierro y el  $H_2O_2$  (Repine y otros 1.981).

Últimas experiencias realizadas - por Grankvist demuestran la intervención de este tipo de radical en el mecanismo de acción química de la aloxana en la destrucción de islotes pancreáticos, lo cual se comprueba con el efecto inhibitor que se observa con la adición de catalasa o captadores específicos del  $OH\cdot$  (Grankvist 1.981).

#### 6.6 El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Con el estudio de fracciones sub-



celulares aisladas se han confeccionado diferentes tablas y clasificaciones sobre las fuentes enzimáticas y sus localizaciones intracelulares, generadores de peroxido de hidrogeno. Entre ellas se encuentran la - glicolato oxidasa (1.1.3.1.), L- $\alpha$ -hidroxiacido oxidasa (1.1.3.x.), L-glucolato oxidasa (1.1.3.8.), aldehido oxidasa (1.1.3.1.) xantina oxidasa (1.2.3.2.), -- D-aminoácido oxidasa (1.4.3.3), monoamino oxidasa -- (1.2.3.4.) NADH citocromo C-reductasa (1.6.99.3) NADPH citocromo C-reductasa (1.6.99.1), superoxido dismutasa (1.15.1.1.) etc.

A nivel mitocondrial, el  $H_2O_2$  se - produce a una velocidad que depende primordialmente de su estado metabólico. Esta producción, bajo condicio--nes fisiológicas, es mayor cuando el grado de reducción de los transportadores respiratorios es alto. (Loschen y otros 1.971; Boveris y Chance 1.973).

En presencia de sustratos ligados al NAD o succinato, la mitocondria del hígado de rata ó corazón de paloma generan entre 0.3 - 0.6 nanomoles  $H_2O_2$  / minuto y por gramo de proteina (Boveris y otros 1.972; Nohl y Hegner 1.978), lo cual representa aproximadamente el 2% del consumo total de oxigeno bajo estas condiciones (Chance 1.973).

Esta producción es incrementada - en presencia de antimicina e inhibida por la rotenona cuando el  $H_2O_2$  es generada a partir de sustratos ligaa

dos al NAD y es incrementada también en condiciones -  
alcalinas (Loshen y otros 1.971).

Sorprendentemente, no se observa -  
formación de  $H_2O_2$  en las mitocondrias cerebrales (Sor-  
gato 1.974).

El peróxido de hidrógeno también  
se forma en los peroxisomas del hígado y otros tejidos  
provistos de flavoproteínas, D-aminoácido oxidasa, L- $\alpha$ -  
hidroxiácido oxidasa y acil-CoA oxidasa.

Recientes experiencias realizadas  
por Lazarow y de Duve demostraron una dependencia de  
la formación de  $H_2O_2$  por el palmitoil CoA en peroxiso-  
mas aislados del hígado de rata, poniendo así de mani-  
fiesto el papel potencial de los ácidos grasos como  
sustratos para los peroxisomas (Lazarow y De Duve --  
1.976). El sustrato principal de los peroxisomas en -  
el hígado de rata es el ácido úrico que se forma conti-  
nuadamente por la vía de la degradación de las purinas.  
Su concentración en hepatocitos es de 70 - 100 micromo-  
lar (Boveris y otros 1.972; Eggleston y Krebs 1.974).

Una aproximación teórica mantiene  
que el 2% del  $H_2O_2$  formado en el interior de los pero-  
xisomas difunde al exterior de los mismos (Poole 1975)

La producción de  $H_2O_2$  en el retí-  
culo endoplasmático para la generación de  $H_2O_2$  que -

comprende la autooxidación de tioles (Misra 1.974) y otros constituyentes celulares reducidos. Sin embargo bajo condiciones fisiológicas esta aportación carece de importancia y sólo altas dosis de estos sustratos pueden originar consecuencias mas o menos graves para la función e integridad celular.

La producción de  $H_2O_2$  en las células vivas del organismo es mantenida merced a la tasa de catalasa y glutathion peroxidasa. Sin embargo un ligero aumento por enzima de la capacidad catalítica de estas enzimas es suficiente para la puesta en marcha de reacciones mediadas por radicales libres que producen  $O_2^-$  y  $OH\cdot$ .

## 6.7. Mecanismo de defensa contra la citotoxicidad del oxígeno.

### 6.7.1. Introducción.

Las células tisulares del organismo presentan fundamentalmente tres líneas de defensa - contra los intermediarios en el metabolismo del oxígeno.

La primera consiste en una respuesta sistémica en respuesta a las altas presiones parciales de  $O_2$ .

Un segundo mecanismo defensivo com

prende la actuación catalítica de enzimas mas o menos específicas contra aquellos agentes potencialmente tóxicos desencadenantes del daño celular.

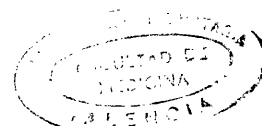
En tercer lugar existe un mecanismo puramente químico consistente en la interacción de diversos agentes quimicos y especificos con los grupos oxidrilos OH•, para los cuales no se ha descrito todavía mecanismo alguno, asi como agentes autooxidantes o quelantes del oxigeno.

#### 6.7.2. Respuesta sistémica a la citotoxicidad del oxigeno.

Esta constituye la principal medida tomada por los tejidos para impedir el aumento de la presión parcial de oxigeno, que es mantenida a presiones bastante bajas.

Esto se consigue en primer lugar por el sistema microvascular que es sensible a las altas presiones de este gas respondiendo con una vasoconstricción del flujo sanguíneo del órgano en cuestión.

Un segundo mecanismo sistémico se situa a nivel de la citocromo oxidasa cuya alta afinidad por el oxigeno es muy conocida (Hill 1.981).



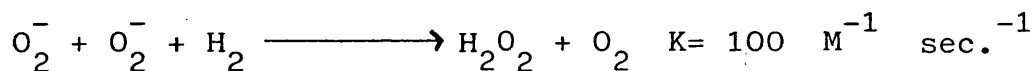
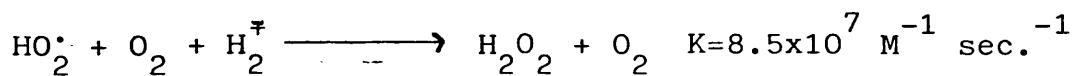
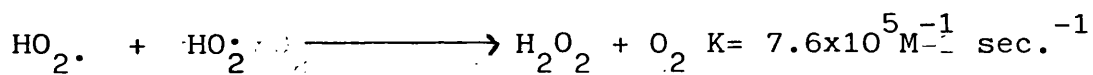
### 6.7.3. Mecanismos enzimaticos.

#### 6.7.3.1. La superoxido dismutasa (SOD).

La superoxido dismutasa constituye la defensa principal contra el radical superóxido.

Todas las células consumidoras de oxígeno, examinadas hasta el momento contienen enzimas que catalizan la reacción  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ . Estas enzimas con estructura de metaloproteína, que actúan con extraordinaria eficiencia catalítica, se denominan dismutasas.

Las reacciones de dismutación que catalizan son fundamentalmente las siguientes:



La SOD mantiene el nivel del radical superóxido a una concentración comprendida entre  $10^{-12}$  y  $10^{-11}$  M.

La concentración tisular de SOD en

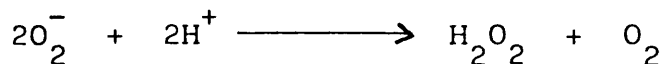
el hígado de rata se ha estimado en  $10^{-5}$  M es decir - siete órdenes de magnitud superior a la concentración de radical superóxido (Sies 1.978).

La Cobre y Zinc SOD, que se encuentra en el citosol de las células eucarióticas, es estructuralmente idéntica a las denominadas durante tanto tiempo como eritrocupreína, hepatocupreína, cerebro cupreína, etc.. Su actividad enzimática fué descubierta por Mc Cord y Fridovich en 1.969 (Mc Cord y Fridovich 1.969) Se localiza principalmente en eritrocitos así como en el espacio intermembranoso de las mitocondrias. Tiene un peso molecular de 33.000 y consta de 2 subunidades con un centro activo representado por el cobre y el zinc.

En adición a esta, y en la matriz mitocondrial, se encuentra una variedad de SOD que contiene manganeso similar a la encontrada en procariotes (Fridovich 1.974).

Por otra parte, se ha encontrado una SOD ferrocenozimática localizada en el espacio periplasmático de algunas bacterias (Gregory y Fridovich 1.973; Pieget y Michelson 1.974).

La reacción de dismutación, como hemos visto, da lugar a la formación de  $H_2O_2$  y  $O_2$  por medio de una reacción que ocurre espontáneamente y que también es catalizada por la superóxido dismutasa.



Por lo tanto, la SOD y la catalasa comparten una misma secuencia de reacciones químicas en las que dos moléculas de sustrato iguales son dismutados a diferentes estados de oxidación.

La actividad de la superoxido dismutasa está presente en aquellos compartimentos subcelulares donde la producción de  $\text{O}_2^-$  es posible.

Muchos autores han demostrado que la mayor parte de actividad SOD en el hígado de rata y pollo, se localiza en el citosol correspondiendo entre un 15% a un 20% de su actividad a la fracción subcelular asociada con la mitocondria (Pachenko y otros -- 1.975; Peeter-Joris y otros 1.975; Tyler 1.975).

Finalmente se ha demostrado recientemente la no existencia de SOD en las partículas peroxisómicas (Peeter-Joris y otros 1.975; Tyler 1.975).

#### 6.7.3.2. La Catalasa

La segunda enzima defensiva en la citotoxicidad del oxígeno, la catalasa ó  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreductasa (E.C. 1.11.1.6), fue una de las primeras enzimas aisladas con alto grado de pureza y su cristalización a partir de extractos de hígado de buey es uno de los primeros triunfos conseguidos por los bioquímicos

cós (Schonbaum and Chance 1.976)

La catalasa está presente virtualmente en todos los tipos de células de los animales - mamíferos. El rango de las diversas concentraciones - de esta enzima es muy amplio y es difícil indentificar una célula de mamífero sin actividad catalásica ( Theorell 1.951).

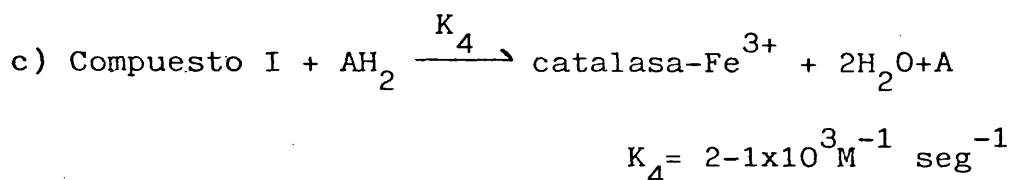
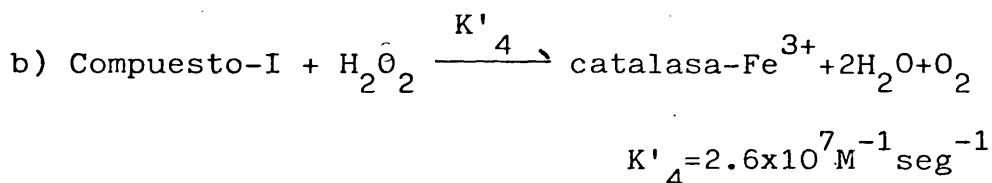
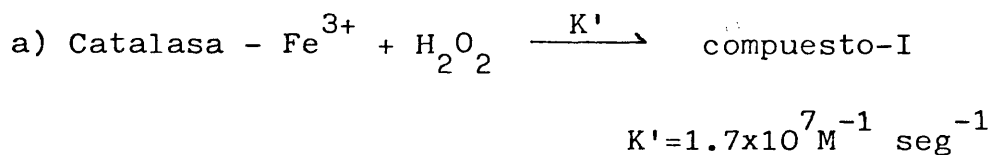
En muchos casos la catalasa se localiza en organelas subcelulares tales como los peroxisomas del hígado y riñón ó también en partículas mucho más pequeñas como son las microperoxisomas encontrados en una amplia variedad de células (Navikoff y --- otros 1.973).

Tiene un peso molecular de 240.000 y esta formada por 4 subunidades cuyo centro catalitico esta representado por una hemoprotoporfirina. Su - mecanismo químico-enzimático se divide en dos fases - una primera o catalítica y otra llamada peroxidásica.

La secuencia de reacciones consecutivas que explican este mecanismo, propuesto tiempo atrás (Chance 1.947), es todavía la descripción más - ajustada de la acción catalásica.

Este mecanismo consta de 3 reac--  
ciones consecutivas que exponemos a continuación:





Dada su complejidad estructural no es de extrañar que su biosíntesis se produzca por etapas. Esta síntesis es gobernada de forma autosómica - simple y en el hígado de rata se lleva a cabo en tres pasos sucesivos

- a) síntesis de subunidades apocatalasa de 60.000 daltons
- b) introducción del grupo hemo  $\gamma$
- c) formación de tetrámeros (De Duve 1.974).

El oligómero resultante es relativamente estable, una propiedad descubierta durante el aislamiento de esta enzima a partir de eritrocitos, hígado y bacterias (Schonbaum y Chance 1.976).

La disociación de la catalasa generalmente implica su desnaturalización irreversible, pero esto solo se consigue bajo condiciones extremadamente drásticas como son, por ejemplo pH inferior a 3 ó superior a 10 en presencia de detergentes o después de

una extensa modificación de su apoproteína (Schonbaum y Chance 1.976).

La concentración de catalasa, que varía según el tejido estudiado, se estima por lo general en  $10^{-5}$  M. por tejido total (Sies 1.978) siendo este valor tres órdenes de magnitud superior a la concentración tisular de  $H_2O_2$  ( $10^{-9}$  -  $10^{-7}$  M.)

Se encuentra en bacterias sobre todo aeróbicas (Callow 1.923). Su concentración en los peroxisomas depende de factores hormonales nutricionales y farmacológicos (Sroboda y Azarnoff 1.966; Hruban y otros 1.972), no obstante, la coordinación de la producción de esta enzima es muy probable que se produzca en los mismo peroxisomas (De Duve 1.973; Lazarow y De Duve 1.973).

Las alteraciones en el nivel de catalasa principalmente en eritrocitos, se conocen con el nombre de acatalasemia, y fueron observados por primera vez por Takahara en 1.952.

Etiológicamente, consiste en un defecto genético que da lugar a una disminución de la actividad catalásica en los eritrocitos, quedando reducida aproximadamente al 1% de la actividad normal o control (Aebi y otros 1.968).

Esta variante mutágena de catalasa

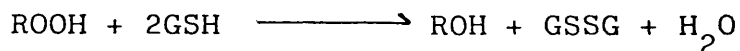
es termolabil con una vida media de 18 minutos a 37°C comparada con los 68 minutos que posee la catalasa normal o activa.

Este proceso observado sobre todo en eritrocitos se contraresta con un aumento de la síntesis de catalasa hepática del 40% comparado con el control (Aebi y otros 1.968).

#### 6.7.3.3. La glutatión peroxidasa.

Otras de las enzimas implicadas en la defensa contra intermediarios en el metabolismo del oxígeno es la glutatión peroxidasa.

Esta enzima, descubierta en 1.957 (Mills 1.957), cataliza la reacción entre hidroperóxidos y glutatión reducido (GSH), para formar glutatión oxidado mas el producto resultante de la reducción del hidroperóxido.



$$K = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$$

Esta enzima se encuentra principalmente en hígado y eritrocitos, donde fué descubierta por primera vez; tiene una actividad moderada en el corazón y pulmón y muy baja actividad en músculo (Chow y

Tappel 1.972; Mills 1.960). Es específica para el dador de hidrógenos, en este caso el GSH pero no lo es para el hidroperóxido que podrá ser  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxidos orgánicos, entre los cuales se encuentran aquellos de derivados de ácidos grasos, nucleótidos o derivados esteroideos.

La química y propiedades de la glutathion peroxidase fueron revisadas en estos últimos -- años (Flohé 1.971; Ganther y otros 1.976).

Contiene selenio en su estructura (Flohé y otros 1.973) y es posible que forme parte del sitio catalítico de la enzima. Contiene su estructura cuatro subunidades así como cuatro átomos de selenio por molécula enzimática, siéndo su peso molecular de 76.000.

Su distribución subcelular es complementaria a la localización de catalasa; dos tercios de glutathion peroxidasa se encuentran en el citosol y un tercio en la mitocondria, no encontrándose ésta en los peroxisomas (Flohé y Schlegel 1.971).

El nivel de glutathion peroxidasa - en los tejidos esta expuesto a cambios que responden al suministro de sustrato, como son los hidroperóxidos lipídicos (Reddy y Tappel 1.974) o bien la administración de oxígeno al 80 - 90% durante 14 días -

(Kimball y otros 1.976).

El gen regulador de su síntesis - parece encontrarse en el cromosoma 21 (Sinet y otros 1.975).

Alteraciones en la actividad de - ésta enzima se observan en casos de deficiencia en -- selenio, ya que este metal parece fundamental para -- su actividad enzimática.

Existe una variedad enzimática -- selenio-independiente que ha sido identificada como - una glutathion transferasa B (Prohaska y Ganther 1.977)

La distribución de ésta última, - así como de la selenio dependiente varia ampliamente según el órgano y la especie animal estudiada (Lawrence y Burk 1.978).

#### 6.7.4. Mecanismo químico defensivo contra radicales libres tipo OH•

Consiste como, ya hemos adelantado, en la interacción de estos agentes químicos de naturaleza orgánica con los grupos oxidrilos generados como consecuencia de la reducción de una molécula de  $H_2O_2$ . Entre ellos se encuentran el etanol, (Beauchman y Fridowich 1970) el benzoato y manitol (Fong y otros - 1.973) tiourea, dimetiltiourea y dimetil sulfido -

(Repine y otros 1.981). Todos ellos actúan como quelantes de los radicales libres tipo OH•.

Otro grupo de agentes se refiere a aquellos con capacidad antioxidante como el  $\alpha$ -tocoferol y el B-caroteno, que cuentan con la ventaja de estar localizados en aquellas áreas de la membrana celular donde se produce con más frecuencia la peroxidación lipídica (Chance y otros 1.979).

MATERIAL Y METODOS

## 1. MATERIALES

### 1.1 Animales de experimentación

Se han utilizado, para la realización de éste trabajo, ratas de la raza Wistar con un peso que ha oscilado entre 130 - 180 gramos que en su mayoría pertenecían al sexo masculino.

Fueron alimentadas con una dieta standard para ratas y ratones comercializada por Oxoid Limited (Londres, Gran Bretaña).

### 1.2. Aparataje

#### 1.2.1. Bomba Peristáltica

Para la preparación de las células se utilizó una bomba peristáltica del tipo MHRE, de --  
Wartson (Marlow) Limited Marlow Bucks. Gran Bretaña.

En Valencia utilizamos una bomba --  
tipo Sage Modelo 375 A.

#### 1.2.2. Respirador

Para conseguir un intercambio ga--  
seoso adecuado entre el líquido de perfusión y la mez-  
cla  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  se usó un respirador de cristal especialmen-  
te diseñado para las perfusiones de hígado.



### 1.2.3. Baño

Se utilizó un baño con agitación - marca HETO tipo O.I.T. 623.

### 1.2.4. Centrifuga

Para la preparación de células aisladas de hígado así como para la precipitación de proteínas desnaturalizadas con perclórico etc. se ha utilizado una centrifuga de laboratorio marca Sorvall tipo GLC 1.

### 1.2.5. Espectómetro.

Para la determinación de GSH utilizamos en el laboratorio de Oxford un espectrofotómetro Beckman - Guilford.

En Valencia realizamos este mismo tipo de análisis con un Varian 635. Ambos permiten registrar fielmente cambios de absorbancia del orden de 0.005 unidades.

Para la medida de metabolitos presentes a muy baja concentración utilizamos en Oxford un Aminco-Chance ó bien un Perkin Elmer en Valencia.

Estos espectrofotómetros son de gran sensibilidad permitiéndo el registro de cambios -

de absorbancia del orden de 0.0001 unidades.

1.2.6. Espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones. (R.P.E.)

Los espectros de resonancia paramagnética de electrones fueron registrados en un Varian E 104 de banda X con sistema de adquisición de datos incorporando E 935 (Fig. M.1).

Los registros se realizaron con un campo magnético de 3385 G una frecuencia de modulación de 100  $\text{KH}_2$  una amplitud de modulación de 1.0 G, un poder de microonda de 10 mW y frecuencia de 9.460  $\text{KH}_2$  y un promedio de scans de 0.5 a 16.5 minutos con objeto de obtener una estimación cualitativa y cuantitativa sobre el producto de aducción que se forma durante la autooxidación de la cisteína.

Este aparato, perteneciente al departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Oxford (South Park Oxford OXI 3QR) consta de tres unidades: una cavidad electromagnética y de la muestra (Fig.M.2), una cavidad de control dotado de pequeño monitor osciloscópico y un servoregistro automático (Fig. M.3) y una pantalla osciloscópica con sistema adquisidor de datos (Fig. M.4).

Para posteriores caracterizaciones

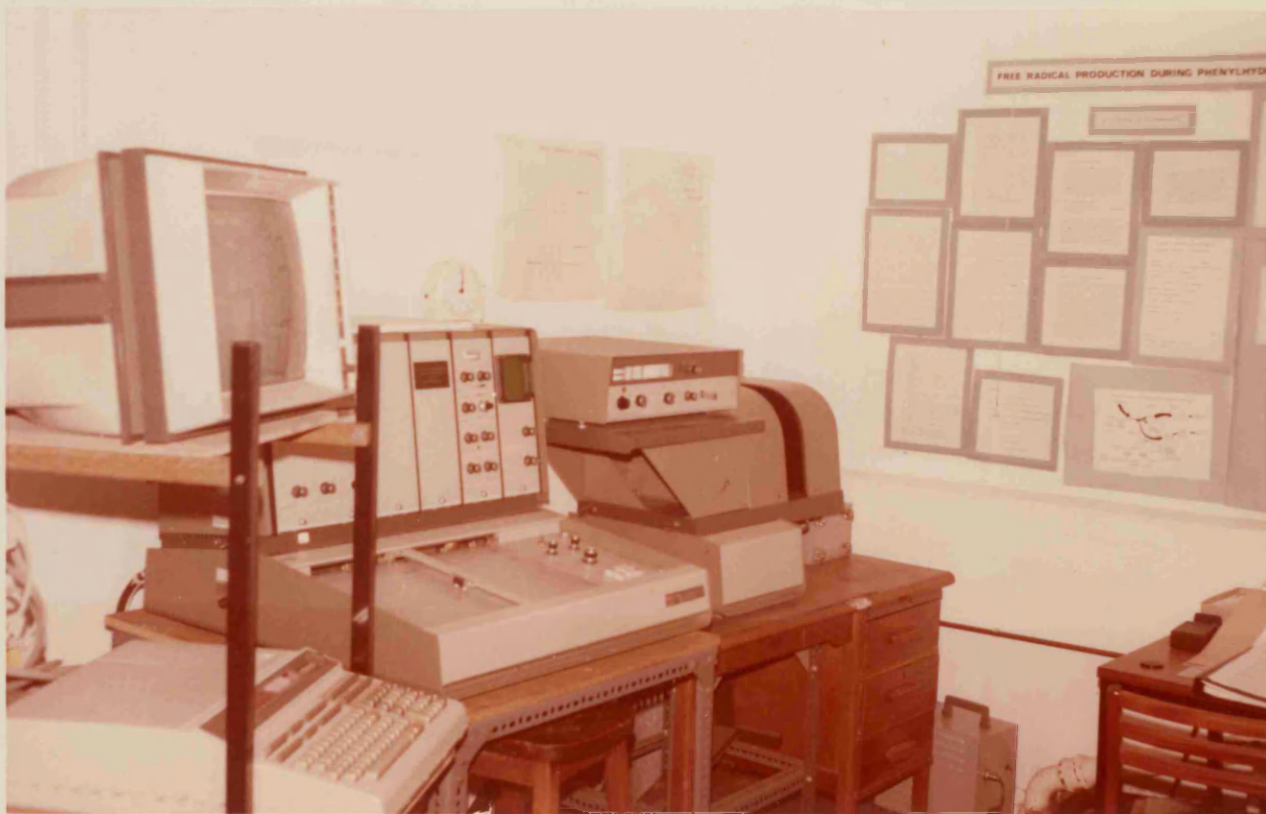


FIGURA M-1 : ESPECTROFOTOMETRO DE RESONANCIA  
PARAMAGNETICA DE ELECTRONES.



FIGURA M-2 : CAVIDAD ELECTROMAGNETICA Y DE LA MUESTRA

FIGURA M-3 : UNIDAD DE CONTROL CON MONITOR OSCILOSCO-

PICO Y SERVOACTUADOR AUTOMATICO.



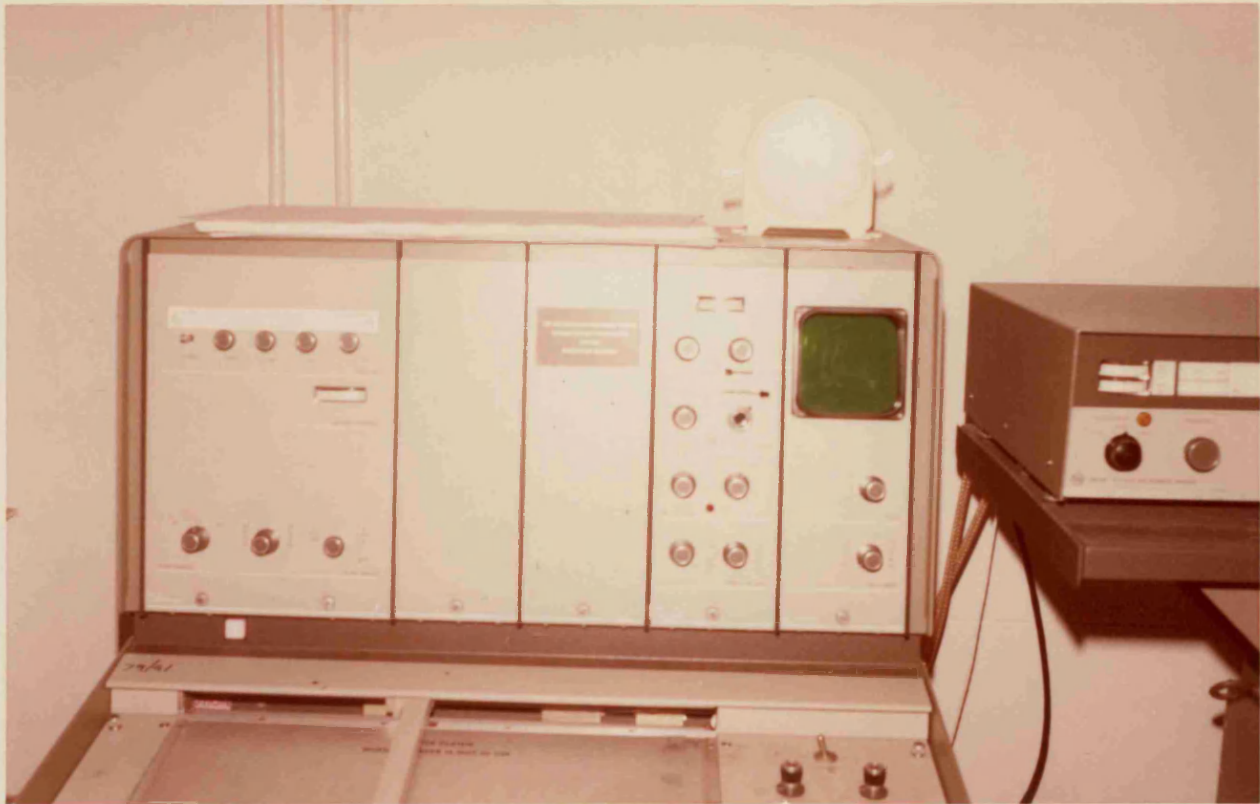


FIGURA M-3 : UNIDAD DE CONTROL CON MONITOR OSCILOSCO-  
PICO Y SERVOREGISTRO AUTOMATICO.



FIGURA M-4 : PANTALLA CON SISTEMA ADQUISIDOR DE DATOS.

de los picos obtenidos se utilizó resonancia nuclear paramagnética.

#### 1.2.7. Consumo de Oxígeno.

La medida del consumo de oxígeno se realizó utilizando doble instrumentación. Por una parte un electrodo tipo Clark y por otra el aparato de Warburg tipo towson and Mercer LTD. Croydon England, que se utilizó para la medida manométrica del oxígeno consumido por los hepatocitos.

#### 1.3. Reactivos

Enzimas y coenzimas han sido obtenidas purificadas de la casa Boehringer Coop. Manhein.

La Superoxido Dismutasa fué suministrada por el Dr. J.V. Bannister del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Oxford y purificada a partir de eritrocitos según el método descrito por Bannister y otros 1.972.

La Cisteína se obtuvo de la casa BDH, Poole, Dorset Inglaterra y Merck Darmstadt, Alemania.

El Ferricitocromo C (tipo III) metionina y metilglioxal se obtuvieron de la casa Sigma (London) Chemical Co., Poole, Dorset, Inglaterra.

El ácido dieltiltriamino pentaacético (DETAPAC) procedió de la compañía química Aldoich Gillengham, Inglaterra.

El Spin-trap ó estabilizador de radicales 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-oxido (DMPO) fué preparado y purificado por el método de Bonnet y otros 1.959 (Fig. R-3).

## 2. METODOS

### 2.1. Preparación de células aisladas de hígado.

Una de las primeras técnicas que permitieron obtener células vivas relativamente íntegras fué la preparación de cortes de tejidos. Esta técnica permitió a Krebs y Henseleit (1.932) estudiar la síntesis de urea: sin embargo no es adecuada para el estudio de ciertos procesos metabólicos como la glucogénesis, ya que ciertos componentes esenciales para el metabolismo hepático se pierden durante el proceso de preparación de cortes de tejidos (Ross y otros 1.967) Krebs (1.970).



Un método alternativo para estudios metabólicos hepáticos consiste en la perfusión de órganos aislados. Los primeros investigadores que usaron en ratas las perfusiones de hígado fueron Corey y Britton (1.951). La técnica de Miller y otros (1.951) con las modificaciones introducidas por Mortimore (1.961) Schihassek (1.962) fué la que permitió que Hems y otros (1.966) estudiaran cuantitativamente la glucogénesis por primera vez.

El método de la perfusión de hígado presenta dos inconvenientes fundamentales:

1.- El hecho de que solamente se pueda hacer una experiencia con cada rata.

2.- La inevitable falta de uniformidad entre unas experiencias y otras.

Las células hepáticas aisladas solucionan ambos inconvenientes, ya que se pueden hacer numerosas experiencias partiéndolo de un solo animal para preparar células hepáticas aisladas intactas es necesario utilizar un método enzimático, basado en la digestión del tejido conectivo del hígado mediante la acción de la colagenasa.

La técnica utilizada por nosotros es la descrita por Berry y Friend (1.969), que consiste en perfundir el hígado con la solución de colagenasa-

sa. Así, se produce un contacto íntimo entre la trama de colágeno y la enzima sin dañar substancialmente al hígado. Por lo tanto, éste método aprovecha las vías naturales de perfusión del hígado para ponerlo en contacto con la solución de colagenasa, lo que produce -- una digestión enzimática "in vitro" del conectivo hepático (Fig. M-5).

No describimos la técnica de obtención de hepatocitos aislados de rata ya que éste método ha sido detalladamente expuesto en otras tesis y tesis de este Departamento (Viña 1.978, Saez 1.980).

## 2.2 Condiciones Experimentales para las Incubaciones con Hepatocitos Aislados de Rata

Se han utilizado matraces Erlenmeyer de 25 ml. de volumen, normales o provistos de recipiente cilíndrico en su interior para la medida del CO<sub>2</sub> desprendido por las células o bien para llevar a cabo experiencias anaeróbicas.

Durante la preparación de las células aisladas pipeteamos en cada matraz pequeños volúmenes de sustratos determinados.

En todos los matraces se añade -- 1 ml. de albúmina 2.5% dializada, libre de oleato e iones metálicos. De esta forma aseguramos la distribución homogénea de las células en el medio y favorecemos el

FIGURA M-5 : PERFUSION DEL HIGADO DE LA RATA.

mantenimiento de su integridad.

Cada matraz contiene 2 ml. de células aisladas, lo que equivale aproximadamente a 80 mgr. de hepatocitos y un volumen previamente calculado de solución salina Krebs-Henseleit hasta alcanzar un volumen total de 4 ml.

La cisteína, al contrario del resto de sustratos incubados, no se preparó mas que unos segundos antes de introducir los hepatocitos en su correspondiente matraz. Se disolvió en agua destilada a 1°C. y se calculó la cantidad en mililitros necesaria de NaOH para obtener una disolución 160 mM a pH 7.4

Debido a la rápida autooxidación de la cisteína, (ver figuras R.1 y R.8) es importante añadir el aminoácido (0.1 ml.) inmediatamente antes de la adición de las células.

Una vez pipeteados todos los sustratos y las células en el interior del matraz, el medio de incubación (4ml. volumen final) se gasea durante 15 segundos con una mezcla  $\text{CO}_2 / \text{O}_2$  al 5% y se introduce en el baño termostato a 37°C.

Conectado al sistema de agitación automático los matraces a excepción del "tiempo cero" (o valor inicial) son incubados durante 30 minutos.

En éste matraz el ácido perclorico se añade al mismo tiempo que se pipetea las células - actuando como control de las concentraciones iniciales de los distintos metabolitos en las células hepáticas.

Transcurrido el tiempo de incubación, todas las reacciones se paran mediante la adición del ácido perclorico al 20% siguiendo el mismo orden con que fueron introducidos previa adición de células en el baño.

Obtenemos entonces un precipitado de proteínas que descartamos por centrifugación separando el sobrenadante ácido correspondiente.

Este sobrenadante será tratado de diferente forma según el tipo de análisis que siga a la incubación celular.

Para la determinación de la actividad lactatodeshidrogenasa (LDH) el sobrenadante se separa de las células por simple centrifugación rápida del medio de incubación sin más adiciones ni neutralizaciones.

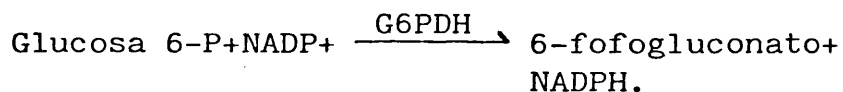
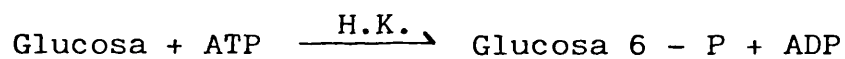
## 2.3. Determinación enzimática de metabolitos

### 2.3.1. Determinación del glutathion reducido por el método enzimático.

Este método descrito por Backer en 1.951, se basa en la reacción catalizada por la glioxa lasa I y que comprende la interacción entre el metil--glioxal y el GSH presente en la muestra. El producto - de ésta reacción, el S-lactiol glutation absorbe luz - ultravioleta de logitud de onda 240 monometros.

2.3.2. Determinación de la concen-  
tración de adenosin tifosfa  
to (ATP).

Se ha utilizado, para la determinación de ATP en los hepatocitos aislados de rata el mé-todo descrito por Lamprecht y Trantschold (1.963) basado en las siguientes reacciones acopladas.:



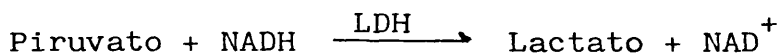
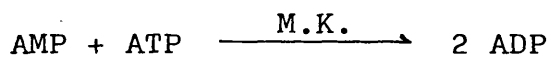
HK = Hexokinasa (E.C. 2.7.1.1.)

G6PDH = Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49)

La aparición de NADPH se sigue es-  
pectrofotometricamente con luz visible de longitude -  
onda igual a 340 nanometros.

2.3.3 Determinación de la concentración de adenosis difosfato (ADP) y adenosis monofosfato (AMP) .

El fundamento de este método analítico se basa también en tres reacciones acopladas que describiremos a continuación.



M.K. = Miokinasa

P.K. = Piruvatokinasa

LDH = Lactato deshidrogenasa.

PEP = Fosfoend piruvato.

Se ha seguido para sus determinaciones el método de Adam 1.963, que basado en las --- reacciones anteriores mide la desaparición de NADH a 340 nanometros, en el espectro de luz visible.

2.3.4. Determinación de la actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH) .

Se midió la actividad LDH en los -

sobrenadantes de las incubaciones, previa centrifugación rápida del componente celular, por el método descrito por Bergmeyer y otros en 1.963, a 25°C pH 7.0 - en tampó fosfato 0.1 Molar.

#### 2.4. Resonancia paramagnética de electrones (r.p.e.) y la técnica del Spin-trap.

La resonancia paramagnética de electrones es el método menos ambiguo para la detección e identificación de radicales libres (Schaich y Borg 1.980).

Es, por lo tanto, el método de elección para el estudio de procesos mediados por radicales libres. Sin embargo bajo ciertas circunstancias la producción de radicales libres pudo tener representación en el espectro de resonancia paramagnética de electrones. Esto se debe generalmente a razones cinéticas (alta reactividad, vida media corta, baja concentración) o efectos de relajación.

Muy pocas reacciones con radicales en su mecanismo de acción que se producen en los sistemas biológicos tienen vida media suficientemente larga para dar concentraciones estacionarias por encima de los límites de detección necesarios para el espectro de r.p.e. ( $10^{-8}$  M,) (Schwartz y otros 1.972).

Por otra parte, la necesidad de --

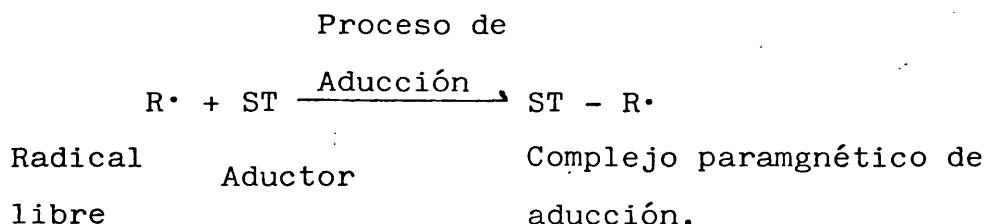


los sistemas biológicos para trabajar entre límites relativamente estrechos de temperatura y pH, ha condicionado el desarrollo de nuevas técnicas de e.p.r. para el estudio de aquellas reacciones en los sistemas biológicos con radicales libres en sus mecanismos de acción.

Entre ellas se encuentra la técnica del Spin-trapping ó captación de electrones paramagnéticos.

Esta técnica consiste en la adición de compuestos nitrosos al medio donde se generan los radicales libres altamente reactivos. (Lagercrantz y Forschult 1.968).

Spin-trapping es el nombre que recibe la reacción entre un radical libre, altamente reactivo R• con un captador diamagnético ST para formar un complejo de aducción mucho menos reactivo, y por lo tanto estable, el producto ST - R.



Para la caracterización del producto de aducción en nuestras experiencias se incubó una solución de cisteina 120 mM con tampon fosfato pH 7.4 50 mM y en presencia de 5,5 - dimetil 1 - pirrolina

N-oxido (DMPO) 100 mM durante 3 horas para permitir la completa autooxidación del aminoácido. El producto formado se extrajo con cloroformo y se pasó por una columna de Gel de Silice 60 en cloroformo/metanol (14:1).

RESULTADOS

1. EFEECTO DE LA ADICION DE CISTEINA SOBRE LA CONCENTRACION DE GSH EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

En 1978, Viña y otros observaron que la concentración de glutathion reducido (GSH) en los hepatocitos aislados de rata, disminuía progresivamente a lo largo de la incubación de los mismos. El estudio del mantenimiento del GSH intracelular a partir de los aminoácidos precursores del tripéptido, les condujo a una inesperada observación que revelaba el fracaso de la cisteína (0,5 mM - 2 mM) para el mantenimiento del glutathion intracelular dentro de sus límites fisiológicos. De tal forma, que cuando los hepatocitos aislados de rata, alimentada o en ayunas, eran incubados en medio Krebs - Henseleit y en presencia de cisteína 0,5 mM se aprecia un descenso en la concentración de GSH con respecto a su valor inicial.

Por otra parte, la adición de cisteína a concentraciones progresivamente crecientes se correspondía con la depleción también progresiva del glutatión reducido en los hepatocitos aislados de rata, siendo éste, en ocasiones, no detectable a concentraciones de cisteína entre 3 y 4 mM.

La cisteína es un aminoácido limitante de la biosíntesis del glutatión "in vivo" (Tateishi 1974). Era pues una sorpresa que la cisteína disminuyera la concentración de GSH en hepatocitos aislados.

Naturalmente, este hecho podía suponer una posible citotoxicidad de la cisteína cuando se añade a altas concentraciones en suspensiones de hepatocitos.

Esta hipótesis fue la idea directriz del trabajo realizado en la presente Tesis.

2. EFFECTO DE LAS TRAZAS DE COBRE SOBRE LA  
DISMINUCION DEL GSH CAUSADA POR LA  
CISTEINA.

Una de las posibles explicaciones para entender la disminución del GSH causada por la cisteína era que este aminoácido se autooxidase rápidamente dando lugar a productos tóxicos que fuesen los responsables directos de la acción tóxica.

Si esto era así, trazas de metales pesados deberían potenciar el efecto tóxico de la cisteína, ya que éstos catalizan la autooxidación de tioles (Cavallini y otros 1968; Taylor y otros 1969; Warburg 1949).

La tabla R-1 muestra que la

adición de sulfato de cobre ( $\text{SO}_4\text{Cu}$ ) a concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) es suficiente para potenciar notablemente el efecto citotóxico de la cisteína.

En efecto, la adición de cisteína 4 milimolar (mM) en un medio de Krebs - Henseleit libre de contaminación con metales pesados causa una disminución del GSH del 31 %. Sin embargo, la adición de  $\text{SO}_4\text{Cu}$  8  $\mu\text{M}$  al medio de incubación disminuye la concentración de glutatión en un 64 % con respecto al valor del control, comprobándose así que la autooxidación de la cisteína es impotente para la disminución del GSH intracelular debida a este aminoácido.

Por otra parte, la adición de un potente quelante de metales pesados, el EGTA, al medio de incubación que contiene cisteína y cobre, recupera el nivel de glutatión hasta alcanzar el 68 % del control. Este efecto se consiguió a concentraciones de EGTA 0,5 mM.

TABLA R-1

EFEECTO DE TRAZAS DE COBRE SOBRE LA DISMINUCION DEL  
GSH CAUSADA POR LA CISTEINA.

ADICIONES	GSH µmoles/gr.células	% DEL VALOR CONTROL
CONTROL	3.45 ± 0.63 (7)	100
Cys 4 mM	2.40 ± 0.70 (8)	69
SO <sub>4</sub> Cu 8 µM	3.05 ± 0.66 (4)	88
Cys 4 mM + SO <sub>4</sub> Cu 8 µM	1.26 ± 0.70 (5)	36

Cys: Cisteina.



3. EFEECTO DEL CLORURO AMONICO (ClNH<sub>4</sub>)  
SOBRE EL NIVEL DE GLUTATION EN LOS  
HEPATOCITOS AISLADOS DE LA RATA.

Dada la importancia que tienen los niveles fisiológicos de glutatión para el metabolismo celular (Sies y Wendel 1978), decidimos programar una serie de experiencias destinadas al estudio del efecto que la disminución de glutatión tendría sobre el funcionamiento metabólico de la célula.

Los hepatocitos aislados de la rata se incubaron en presencia de cisteína 4 mM, que como sabemos disminuye la concentración de GSH intracelular, y además se añadió lactato 10 mM y piruvato 1 mM, como precursores de la síntesis de glucosa, y ClNH<sub>4</sub> 10 mM para estimular la síntesis de urea.

Como resultado de estas experiencias, observamos que la disminución del glutathion causada por la cisteína se agravaba cuando se incubaban los hepatocitos con cisteína y  $\text{ClNH}_4$ .

En efecto, la tabla R-2 muestra que la disminución de GSH causada por la cisteína 4 mM es del 88 % con respecto al control, mientras que cuando se añade  $\text{ClNH}_4$  10 mM la disminución del tripéptido aumenta hasta alcanzar el 93 % .

El cloruro amónico es una sustancia tóxica conocida y capaz por si sola de producir daño celular. Por esta razón incubamos  $\text{ClNH}_4$  como único substrato en presencia de hepatocitos aislados de rata. Como muestra la tabla R-2, la adición de este substrato a aquellas concentraciones utilizadas para estimular la síntesis de urea (10 mM), deja a los hepatocitos con el 64 % del glutathion que tiene el control.

No obstante la disminución de GSH observada con cisteína sólo o en presencia de cloruro amónico es mucho mayor; 11,6 % y 6,6 % respectivamente.

TABLA R-2

EFFECTO DEL  $\text{ClNH}_4$  SOBRE EL NIVEL DE GLUTATION EN  
HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA INCUBADOS CON CISTEINA.

ADICIONES	GSH $\mu\text{moles/gr.células}$	% DEL VALOR CONTROL
CONTROL	$3.00 \pm 0.14 (4)$	100
Cys 4 mM	$0.35 \pm 0.05 (4)$	11.6
$\text{ClNH}_4$ 10 mM	$1.94 \pm 0.35 (4)$	64
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$	$0.20 \pm 0.22 (4)$	6.6

Cys: Cisteina.

4. EFEECTO DE LA CISTEINA 4 mM Y EL  $\text{ClNH}_4$  10 mM SOBRE EL CONTENIDO DE ATP EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA ALIMENTADA Y EN AYUNAS DE 48 HORAS.

La tabla R-3, muestra el efecto de potenciación de la toxicidad de la cisteína por el cloruro amónico medido por los niveles de ATP intracelular y por la cantidad de LDH liberada al medio de incubación por las células.

Cuando se incuban hepatocitos aislados con cisteína 4 mM, el nivel de ATP baja a 2,41 micromoles/ gr. de células, es decir un 6,5 % de descenso con respecto al control cuando los hepatocitos se obtienen a partir de una rata alimentada.

Sin embargo, cuando se incuban con cisteína y cloruro amónico el nivel de ATP baja a 1,89 micromoles/ gr. de células, es decir, un 27 % menos que el control (2,58 micromoles/gr.).

Igualmente, en hepatocitos de rata en ayunas, la concentración de ATP baja cuando se incuban las células con cisteína (1,74 micromoles/gr.) pero baja mucho más cuando esta incubación se realiza en presencia de  $\text{ClNH}_4$  (0,43 micromoles/gr.)

En este caso, los descensos con respecto al control (2,24 micromoles/gr.) son de un 23 % cuando se incuba sólo con cisteína y un 81 % cuando se añade  $\text{ClNH}_4$  al medio de incubación.

Un buen indicador de las lesiones celulares es la liberación de enzimas citosólicas al medio de incubación.

Cuando se incuban hepatocitos con cisteína 4 mM, la liberación de LDH es un 73 % mayor que la del control cuyo valor en unidades internacionales es de 1,83.

Cuando, por el contrario se incuban las células en presencia de cisteína y cloruro amónico los valores de LDH suben hasta el 538 % del valor control que corresponde a la cantidad de LDH

liberada por las células incubadas en ausencia de sustratos (1,83 U.I./ml sobrenadante).

Si expresamos estos porcentajes en función de la cantidad total de LDH liberada por las células tratadas con digitonina (Zurendonk y Tager 1974) y que resultó ser de 15 U.I./ml de sobrenadante, obtenemos un 12 % para el control, un 21 % en presencia de cisteína, y un 78 % en presencia de cisteína más  $\text{ClNH}_4$ , indicando por lo tanto, un gran aumento de la toxicidad por el cloruro amónico.

Por otra parte, la adición de  $\text{ClNH}_4$  como único sustrato al medio de incubación, no muestra signos de toxicidad, ya sea medido por el nivel de ATP o por la liberación de LDH por las células aisladas de hígado.

---

TABLA R-3

EFFECTO DE LA CISTEINA Y EL  $\text{ClNH}_4$  SOBRE EL CONTENIDO DE ATP Y LA LIBERACION DE LDH EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA ALIMENTADA Y AYUNADA (48 H.)

	ALIMENTADA		AYUNADA			
	ATP $\mu\text{moles/gr. célula}$		ATP $\mu\text{moles/gr. células}$	%	LDH U.I./ml sobrenadante	% SOBRE CONTROL
CONTROL	2.58 $\pm$ 0.10 (3)		2.24 $\pm$ 0.24 (4)	100	1.83 $\pm$ 0.44 (6)	100
Cys 4 mM	2.41 $\pm$ 0.05 (3)		1.74 $\pm$ 0.17 (4)	77	3.18 $\pm$ 0.17 (4)	73
$\text{ClNH}_4$ 10 mM	2.49 $\pm$ 0.40 (2)		2.07 $\pm$ 0.20 (6)	92	—	—
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM	1.89 $\pm$ 0.08 (2)		0.43 $\pm$ 0.10 (5)*	19	11.69 $\pm$ 2.48 (5)**	538

\*  $< 0.0005$

\*\*  $< 0.005$

La liberación total de LDH por los hepatocitos tratados con Digitonina fué de 15 U.I./ml sobrenadante.

5. EFFECTO DEL  $\text{SO}_4\text{Cu } 8\mu\text{M}$  SOBRE LA DISMI-  
NUCION DEL ATP Y LA LIBERACION DE LDH  
INDUCIDA POR LA CISTEINA Y EL  $\text{ClNH}_4$   
EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

En la tabla R-4 representamos los resultados de una experiencia significativa en la que se observa el efecto que tiene la autooxidación de la cisteina, catalizada por trazas de cobre, y en presencia de  $\text{ClNH}_4$ .

Como indican los valores de esta tabla, el efecto tóxico, medido por el nivel de ATP y LDH liberada por los hepatocitos, y provocado por la cisteina y el  $\text{ClNH}_4$ , se ve agravado en presencia de  $\text{SO}_4\text{Cu } 8\mu\text{M}$ .

En estas condiciones, la concen-



tración de ATP disminuye hasta el 3 % del valor control y la liberación de LDH (10,03 U.I./ml sobrenadante) es aproximadamente 10 veces superior a la liberación de esta enzima por las células incubadas en ausencia de substratos (1,08 U.I./ml sobrenadante).

Con este resultado, se pone una vez más de manifiesto la importancia catalítica de los metales pesados en el mecanismo citotóxico provocado por las altas concentraciones de cisteína alterando la integridad de los hepatocitos aislados de la rata.

TABLA R-4

EFFECTO DEL  $\text{SO}_4\text{Cu}$  SOBRE LA DISMINUCION DEL ATP Y LIBERACION DE LDH INDUCIDA POR LA CISTEINA Y EL  $\text{ClNH}_4$   
 EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.  
 (EXPERIENCIA SIGNIFICATIVA).

ADICIONES	ATP $\mu\text{moles/gr. células}$	% DEL VALOR CONTROL	LDH U.I./ml sobrenadante	% SOBRE EL CONTROL
Control	1.98	100	1.08	100
Cys 4 mM	1.40	70	2.00	85
Cys 4 mM + $\text{SO}_4\text{Cu}$ 8 $\mu\text{M}$	1.16	58	7.70	612
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM	0.24	12	5.02	364
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + $\text{SO}_4\text{Cu}$ 8 $\mu\text{M}$	0.06	3	10.03	828

Cys: Cisteina.

6. EFFECTO DEL LACTATO Y OTROS ESTIMULADORES DE LA NEOGLUCOGENESIS SOBRE LA DISMINUCION DE LOS NUCLEOTIDOS ADENILICOS EN HEPATOCITOS AISLADOS INCUBADOS CON CISTEINA Y  $\text{ClNH}_4$ .

El efecto citotóxico provocado por la cisteína y el cloruro amónico sobre los hepatocitos aislados de rata, y medido por la disminución del ATP intracelular, se acompaña también de la disminución de los nucleótidos adenílicos totales, es decir, de la suma de ATP, ADP y AMP.

Este descenso es aproximadamente del 25 % en presencia de cisteína y un 63 % en presencia de cisteína y cloruro amónico con respecto al control.

La disminución del ATP es mucho mayor cuando la cisteína y el cloruro amónico se incuban juntos observandose un incremento considerable del defecto de la cisteína en presencia de la sal.

Esta diferencia, entre el efecto de la cisteína sólo y en presencia de  $\text{ClNH}_4$ , que resulta menor a nivel de los nucleótidos totales, es igualmente significativa.

De los substratos estudiados el lactato fue uno de los más eficaces en la protección contra el efecto de la cisteína. Con oleato el efecto protector es menor y el resto de substratos, estimuladores de la neoglucogénesis, no son capaces de mantener los niveles de ATP por encima del 30 % de su valor control. (lisina y AMP c.).

Por otra parte, el etanol, que inhibe la neoglucogénesis a partir de lactato (Krebs y otros 1969), mantiene los niveles de nucleótidos adenílicos a pesar del efecto de la cisteína y el  $\text{ClNH}_4$ . En comparación con los valores de ATP y nucleótidos totales obtenidos en presencia de cisteína y cloruro amónico, la recuperación de estos valores con etanol es del 100 %.

Se descarta, por lo tanto, la posible inhibición de la síntesis de glucosa como causa de la disminución de los niveles de ATP, ADP y AMP provocada por la cisteína y el  $\text{ClNH}_4$ .

EFFECTOS DEL LACTATO Y OTROS ESTIMULADORES DE LA NEOGLUCOGENESIS  
 EN TUBOS AISLADOS INCUBADOS CON CISTEINA Y  $\text{ClNH}_4$ .

ADICIONES	NUCLEOTIDOS
	ATP
Control	2.04 $\pm$ 0.18
Cys 4 mM	1.47 $\pm$ 0.20
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM	0.28 $\pm$ 0.05*
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Lact 10 mM	1.66 $\pm$ 0.08*
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Lys 2 mM	0.28 $\pm$ 0.03
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM Di but. AMPc 0.2 mM	0.42 $\pm$ 0.13
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Oleato 1 mM	0.67 $\pm$ 0.20
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Lact 10 mM + Lys 2 mM + Di but. AMPc 0.2 mM + Oleato 1 mM	2.43 $\pm$ 0.04*
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Lact 10 mM + Lys 2 mM + Di But AMPc 0.2 mM + Oleato 1 mM + Etanol 10 mM	2.74 $\pm$ 0.10*

\* P 0.0005

Los resultados se expresan con media  $\pm$  D.S. de tres experiencias.

Lact : Lactato

Cys : Cisteina

Lys : Lisina

Di but AMPc : Dibutiril AMPc

5 SOBRE LA DISMINUCION DE LOS NUCLEOTIDOS ADENILICOS EN HEPATOCI-

ADENILICOS umoles/gr.células

NUCLEOTIDOS ADENILICOS

ADP	AMP	TOTALES
0.99 ± 0.15	0.21 ± 0.01	3.23 ± 0.32
0.62 ± 0.05	0.35 ± 0.05	2.44 ± 0.28
0.60 ± 0.10	0.32 ± 0.03	1.20 ± 0.08
0.68 ± 0.09	0.27 ± 0.07	2.61 ± 0.12
0.53 ± 0.12	0.29 ± 0.03	1.10 ± 0.17
0.61 ± 0.11	0.46 ± 0.02	1.35 ± 0.23
0.45 ± 0.07	0.38 ± 0.05	1.51 ± 0.27
0.65 ± 0.10	0.38 ± 0.05	3.37 ± 0.10
0.53 ± 0.07	0.57 ± 0.03	3.84 ± 0.16

as realizadas para cada valor.

7. EFFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS (1 mM) Y  
EL ETANOL (10 mM) SOBRE LA DEPLECION  
DE NUCLEOTIDOS ADENILICOS CAUSADA POR  
LA CISTEINA Y EL  $\text{ClNH}_4$ .

Estudiando el efecto de otros substratos metabólicos sobre la acción citotóxica de la cisteína, pudimos comprobar la protección que ofrecen los ácidos grasos insaturados, así como el efecto que el etanol tenía sobre esta protección (TABLA R-6).

El efecto del etanol es, no obstante, superior al de los tres ácidos grasos probados, linoleico, linolénico y araquidónico, siendo ambos efectos aditivos.

Así, si la cisteína y el cloruro amónico disminuyen el ATP hasta 0,14 micromoles/gr.

el etanol mantiene este valor en 1,40 micromoles, es decir, un 60 % del valor control (2,35 micromoles) comparado con el 18 % que se obtiene en presencia de cisteína y el 6 % en presencia de cisteína y  $\text{ClNH}_4$ .

Con la adición conjunta de ácidos grasos (1 mM) y etanol (10 mM), los niveles de ATP se mantienen entre el 60 y el 80 % del control, mientras que a nivel de los nucleótidos totales la recuperación es prácticamente del 100 % .

El efecto del etanol resultó ser independiente de su metabolismo a juzgar por la nula influencia que el pirazol, un potente inhibidor de alcohol deshidrogenasa (L.F., T.K.; Theorell, H 1969): tuvo sobre el mismo.

---



TABLA R-

EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS Y EL ETANOL SOBRE LA DEPI

NUCLEOTIDOS ADE

ADICIONES	ATP
Control	2.35 ± 0.06
Cys 4 mM	0.44 ± 0.16
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM	0.14 ± 0.08*
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Etanol 10 mM	1.42 ± 0.18**
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Linoleico 1 mM	1.08 ± 0.03
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Linolenico 1 mM	0.80 ± 0.10
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Araquidonico 1 mM	0.75 ± 0.04
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Etanol 10 mM + Linoleico 1 mM	1.52 ± 0.09*
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Etanol 10 mM + Linolenico 1 mM	1.90 ± 0.17*
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Etanol 10 mM + Araquidonico 1 mM	1.88 ± 0.18*

R-6

DEPLECIÓN DE NUCLEOTIDOS ADENILICOS CAUSADA POR LA CISTEINA Y EL  $\text{ClNH}_4$ .

ADENILICOS umoles/gr. células

ADP	AMP	NUCLEOTIDOS ADENILICOS TOTALES
0.80 $\pm$ 0.21	0.22 $\pm$ 0.02	3.37 $\pm$ 0.25
0.61 $\pm$ 0.18	0.42 $\pm$ 0.11	1.47 $\pm$ 0.08
0.53 $\pm$ 0.15	0.38 $\pm$ 0.12	1.05 $\pm$ 0.13
0.73 $\pm$ 0.19	0.41 $\pm$ 0.04	2.56 $\pm$ 0.07
0.65 $\pm$ 0.17	0.45 $\pm$ 0.07	2.37 $\pm$ 0.24
0.63 $\pm$ 0.21	0.49 $\pm$ 0.09	1.92 $\pm$ 0.18
0.58 $\pm$ 0.21	0.51 $\pm$ 0.11	1.88 $\pm$ 0.27
0.60 $\pm$ 0.20	0.45 $\pm$ 0.03	2.67 $\pm$ 0.17
0.64 $\pm$ 0.20	0.58 $\pm$ 0.02	3.12 $\pm$ 0.21
0.62 $\pm$ 0.22	0.55 $\pm$ 0.04	3.05 $\pm$ 0.25

8. EFEECTO DE LA CATALASA (250 U./ml) SOBRE LA CONCENTRACION DE GSH Y LIBERACION DE LDH EN LOS HEPATOCITOS INCUBADOS CON CISTEINA Y  $\text{ClNH}_4$ .

La cisteína se oxida rápidamente en medio acuoso a cistina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Warburg 1949; Harrison y Thurlow 1926). Este último substrato puede ser responsable de los efectos citotóxicos (disminución de la concentración de GSH, aumento en la liberación de LDH y disminución de los niveles de ATP) que aparecen cuando las células se incuban con altas concentraciones de este aminoácido.

Una lógica experiencia en base a estos previos conocimientos, es la incubación de cisteína sólo y en presencia de cloruro amónico más la adición de catalasa (250 U./ml) para medir, trans-

curridos los 30 minutos de la incubación, la liberación de LDH por los hepatocitos y la determinación de la concentración de glutatión reducido intracelular.

En la TABLA R-7 se comprueba que cuando solo se incuba catalasa en presencia de hepatocitos, los valores con respecto a los respectivos controles son practicamente equiparables.

Con cisteína 4 mM, el valor de LDH liberado por las células es un 73 % superior al del control y la disminución de glutatión reducido es del 90 % .

Cuando la cisteína se incuba en presencia de catalasa, el valor de LDH liberado se aproxima al valor control y el GSH se mantiene al 52 % del control ascendiendo su valor un 42 % por encima del valor que se obtiene con cisteína solamente.

Con  $\text{ClNH}_4$  y cisteína, se observa un considerable incremento, en terminos de LDH liberado, con respecto al control. Es decir, que cuando la liberación de LDH citosólica por las células incubadas en ausencia de substrato era 1,83 U.I./ml de sobrenadante, la adición de cisteína y cloruro amónico ascendía a 11,69 U.I.

Este incremento observado para la LDH, se observa también en el caso del GSH que, si

bien no es precisamente inferior al valor que arroja la cisteína sólo, si alcanza límites de clara intoxicación para la célula hepática.

Como muestra la TABLA R-7, el efecto protector de la catalasa se reproduce aún en presencia de  $\text{ClNH}_4$  10 mM, disminuyendo la cantidad de LDH liberada y manteniendo la concentración de glutathion por encima del 50 % del control.

En otras ocasiones, el efecto de la catalasa sobre la depleción de GSH provocado por la cisteína y el cloruro amónico fué mucho más efectivo.

TABLA R-7

EFFECTO DE LA CATALASA (250 U./ml) SOBRE LA CONCENTRACION DE GSH Y LIBERACION DE LDH EN LOS HEPATOCITOS  
INCUBADOS CON CISTEINA Y  $\text{Cl}_4\text{NH}_4$

ADICIONES	GSH $\mu\text{moles/gr. células}$	% DEL CONTROL	LDH U.I./ml sobrenadante	% SOBRE EL CONTROL
Control	1.61 $\pm$ 0.22 (7)	100	1.83 $\pm$ 0.44 (6)	100
Catalasa (250 U./ml)	2.24 $\pm$ 0.27 (5)	139	1.58 $\pm$ 0.73 (3)	-
Cys 4 mM	0.15 $\pm$ 0.08 (6)	9.3	3.18 $\pm$ 1.07 (4)	73
Cys 4 mM + Catalasa (250 U./ml)	0.84 $\pm$ 0.25 (6) *	52	1.23 $\pm$ 0.13 (2)	-
Cys 4 mM + $\text{Cl}_4\text{NH}_4$ 10 mM	0.17 $\pm$ 0.10 (4)	10	11.69 $\pm$ 2.48 (5) **	538
Cys 4 mM + $\text{Cl}_4\text{NH}_4$ 10 mM + Catalasa (250 U./ml)	0.89 $\pm$ 0.22 (4) *	55	1.28 $\pm$ 0.12 (3) ***	-

\* P 0.0125

\*\* P 0.01

\*\*\* P 0.005

9. EFEECTO DE LA CATALASA (250 U./ml)  
SOBRE LA LIBERACION DE LDH POR LOS  
HEPATOCITOS INCUBADOS EN PRESENCIA  
DE CISTEINA;  $\text{ClNH}_4$  y  $\text{SO}_4\text{Cu}$ .

Observado el efecto protector de la catalasa, quisimos comprobar si éste se reproducía en presencia de cobre  $8 \mu\text{M}$  ya que, como sabemos, la adición de metales pesados a soluciones que contienen cisteína cataliza la autooxidación de este aminoácido aumentando, por lo tanto, la velocidad de producción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En la TABLA R-8 se muestran los valores de LDH en U.I./ml de sobrenadante que se encuentran en los sobrenadantes de las células hepáticas incubadas bajo diversas circunstancias.

El valor mas alto se encuentra en las incubaciones realizadas con cisteína 4 mM,  $\text{ClNH}_4$  10 mM y  $\text{SO}_4\text{Cu}$  8  $\mu\text{M}$ , siendo éste de 10 U.I./ml de sobrenadante. Sin embargo las incubaciones que se llevaron a cabo con 250 U.I./ml de catalasa, disminuan las unidades de LDH liberadas al medio extracelular, protegiendo a las células contra el efecto de la cisteína sólo o en presencia de aquellos substratos que potencian la citotoxicidad de este aminoácido.

Como muestra la TABLA R-8, la recuperación de los niveles normales de LDH cuando se añade catalasa al medio de incubación es del 100 %.

---



TABLA R-8

EFFECTO DE LA CATALASA (250 U./ml) SOBRE LA LIBERACION DE LDH POR LOS HEPATOCITOS INCUBADOS EN PRESENCIA DE CISTEINA  $\text{ClNH}_4$  Y  $\text{SO}_4\text{Cu}$ .

ADICIONES	LDH U.I./ml sobrenadante	%SOBRE EL CONTROL
Control	1.83 $\pm$ 0.44 (6)	100
Cys 4 mM	7.62 $\pm$ 2.84 (3)	316
Catalasa (250 U./ml)	1.58 $\pm$ 0.73 (3)	-
Cys 4 mM + Catalasa (250 U./ml)	1.23 $\pm$ 0.13 (2)	-
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM	8.22 $\pm$ 3.28 (6)	349
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Catalasa (250 U./ml)	1.28 $\pm$ 0.12 (3)	-
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + $\text{SO}_4\text{Cu}$ 8 $\mu\text{M}$	10.36 $\pm$ 2.88 (5)	466
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + $\text{SO}_4\text{Cu}$ 8 $\mu\text{M}$ + Catalasa (250 U./ml)	1.54 $\pm$ 0.98 (2)	-

10. EFEECTO DE LA ADICION DE PEROXIDO DE  
HIDROGENO ( $H_2O_2$ ) A LAS INCUBACIONES  
DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

El efecto de la catalasa sugiere la participación de  $H_2O_2$  en el mecanismo de acción citotóxica de la cisteína.

La cisteína se oxida a cistina y  $H_2O_2$ , pudiendo ser este último substrato el responsable de la depleción del glutatión reducido así como del resto de efectos observados en los hepatocitos aislados de rata incubados en presencia de cisteína a concentraciones suficientemente altas (Krebs y otros 1978; Flohe y otros 1971; Pierce y Tappel 1978).

En base a estos hechos decidimos comprobar el efecto del peróxido de hidrógeno

sobre la integridad y niveles de substratos importantes para el metabolismo celular.

Sin embargo, los resultados fueron algo inesperados al comprobar que la adición de  $H_2O_2$  1 y 2 mM al medio de incubación, como único substrato, no se acompaña de la depleción masiva de GSH y ATP ni tampoco de la liberación de LDH por parte de las células. Es decir, que el agua oxigenada, por si sólo, no es responsable del daño celular que se produce cuando los hepatocitos se incuban con cisteína.

Por el contrario, si añadimos cisteína y  $H_2O_2$  en un mismo matraz se produce la disminución del glutatión reducido obteniendo un valor de 1,07 micromoles/gr. de células comparado con el valor del control que resultó igual a 1,82 micromoles/gr. Es decir, la disminución del glutatión es del 40 %

Una disminución similar se observó en los niveles de ATP y liberación de LDH (Estos resultados pertenecientes a experiencias realizadas en nuestro laboratorio, no han sido presentados en esta Tesis.)

Sin embargo, resulta difícil saber qué proporción de este efecto corresponde a la cisteína y qué proporción se debe a la combinación de la cisteína y el peróxido de hidrógeno. Por otra parte, el fracaso del  $H_2O_2$  para reproducir el efecto citotóxico

de la cisteína y la aparición del mismo cuando ambos substratos se incuban al mismo tiempo, sugiere la formación de otros radicales, altamente reactivos, a partir del  $H_2O_2$  (Haber y Weiss 1934)

En relación con estos resultados se encuentra el efecto del etanol que protege los niveles de nucleótidos adenílicos en las células incubadas con cisteína sólo o con  $ClNH_4$  (TABLAS R-5 y R-6).

11. EFECTO DEL ETANOL EN PRESENCIA DE  
CISTEINA Y  $\text{ClNH}_4$  SOBRE LA CONCEN-  
TRACION DE ATP EN LOS HEPATOCITOS  
AISLADOS DE LA RATA.

Ante los resultados obtenidos y descritos en el apartado anterior, decidimos reproducir el efecto del etanol en ausencia de otro tipo de sustratos (lactato, lisina, oleato y ácidos grasos) y comprobar que éste era capaz, por sí mismo, de recuperar los niveles de ATP que son disminuidos por el efecto de la cisteína o la cisteína y el  $\text{ClNH}_4$ .

En la TABLA R-9, mostramos el efecto de este alcohol incubado en presencia de dichos sustratos.

Cuando las células se in-

cubán en ausencia de substratos, la concentración de ATP es de 2,24 micromoles/gr. de células. En presencia de cisteína 4 mM, esta concentración baja a 1,07 micromoles, lo cual equivale al 47 % del control.

Con cisteína 4 mM y etanol 10 mM, el ATP se mantiene en 1,51 micromoles/gr., es decir un 20 % más que en el caso de la cisteína.

Cuando la cisteína se acompaña de la adición de cloruro amónico 10 mM, el nivel de ATP disminuye hasta 0,32 micromoles, lo que representa el 14 % del valor control. A pesar de ello, este efecto se contrarresta con la adición de etanol que, en estas mismas condiciones, mantiene el nivel del ATP en 1,06 micromoles, es decir, el 47 % del control con una recuperación del 33 %.

TABLA R-9

EFFECTO DEL ETANOL EN PRESENCIA DE CISTEINA Y  $\text{ClNH}_4$   
 SOBRE LA CONCENTRACION DE ATP EN LOS HEPATOCITOS -  
 AISLADOS DE RATA.

ADICIONES	ATP $\mu\text{moles/gr. células}$	% DEL CONTROL
Control	$2.24 \pm 0.08$ (6)	100
Cys 4 mM	$1.07 \pm 0.40$ (5)	47 P < 0.01
Cys 4 mM + Etanol 10 mM	$1.51 \pm 0.11$ (5)	67 P < 0.15
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM	$0.32 \pm 0.09$ (6)	14 P < 0.0005
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Etanol 10 mM	$1.06 \pm 0.08$ (3)	47 P < 0.0005

12. EFFECTO DE TRES ENZIMAS DETOXIFICANTES  
CONTRA LA ACCION CITOTOXICA DE RADICA-  
LES LIBRES.

Los resultados expuestos hasta aqui, sugieren la posible participación de radicales libres en la citotoxicidad mediada por la cisteína 4 mM.

Si el  $H_2O_2$  está implicada en la misma a juzgar por el efecto protector de la catalasa, y el etanol también protege frente a la acción de la cisteína, parece probable que el radical responsable de este efecto sea del tipo  $OH\cdot$  producido a partir de  $H_2O_2$ .

Pero, dado que en dicha formación pueden intervenir otros radicales o catalizadores de la misma, como el radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , decidimos plantear una experiencia en la que probamos tres



sistemas enzimáticos implicados en la defensa contra los radicales libres relacionados con el metabolismo - del oxígeno, es decir, catalasa 250 U./ml. superóxido-dismutasa 25U./ml. y peroxidasa 1,25 U./ml. más amino-furazone 1mM.

Como muestra la TABLA R-10 de los tres sistemas comprobados solo la catalasa y la peroxi-dasa muestra un efecto protector frente a la citotóxi-cidad de la cisteína y del  $\text{ClNH}_4$ .

Por el contrario, la superóxido --dismutasa no presenta efecto protector, manteniéndose valores bajos de ATP y altos de LDH, tanto cuando las células son incubadas con cisteína, como cuando se añaa--de  $\text{ClNH}_4$  10 mM al medio de incubación.

Esta experiencia demuestra una vez más que el mecanismo citotóxico de la cisteína se pro-duce por la generación de radicales  $\text{OH}\cdot$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a juzgar por el efecto protector de la catalasa y la peroxidasa.

El efecto de la SOD no descarta la participación del radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en dicho me-canismo, si bien éste no es el agente agresor directo en el efecto citotóxico desencadenado por la autooxida-ción de la cisteína. Su intervención, como discutire--mos más adelante, podría ser de catalizador, al compor-tarse como dador de electrones en medios acuosos.

TABLA R-10

EFFECTO DE TRES ENZIMAS DETOXIFIZANTES CONTRA LA ACCION  
 CITOTOXICA DE RADICALES LIBRES.  
 (EXPERIENCIA SIGNIFICATIVA).

ADICIONES	ATP µmoles/gr.células	LDH U.I./ml sobr.
Control	2.44	3.11
Cys 4 mM	0.58	9.32
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM	0.03	12.80
Catalasa (250 U./ml)	2.42	3.01
Cys 4 mM + Catal. (250 U./ml)	2.47	3.21
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + Cat. (250 U./ml)	1.96	3.71
POD 125 U/ml + Aminofurazona 1 mM	2.42	3.32
Cys 4 mM + POD 125 U./ml + Aminofurazona 1 mM	2.47	3.22
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + POD 125 U./ml + Aminofurazona 1 mM	1.71	4.22
SOD 25 U./ml	2.44	3.62
Cys 4 mM + SOD 25 U./ml	0.13	8.32
Cys 4 mM + ClNH <sub>4</sub> 10 mM + SOD 25 U./ml	0.03	15.10

Cat : Catalasa  
 POD : Peróxidasa  
 SOD : Superóxido dismutasa.

13. EFFECTO DE LA CISTEINA,  $\text{ClNH}_4$  Y  $\text{SO}_4\text{Cu}$  SOBRE  
LA CONCENTRACION DE ATP Y LA LIBERACION -  
DE LDH EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA IN  
CUBADOS BAJO CONDICIONES ANAEROBICAS.

Para comprobar que el efecto cito--  
tóxico observado era producto de la autooxidación de la  
cisteina, nos planteamos una experiencia anaeróbica que  
impidiera la oxidación espontánea de éste aminoácido y  
estudiar el efecto que esto tenía sobre la integridad -  
celular.

Para ello utilizamos matraces espe--  
ciales, provistos de un espacio cilindrico en cuyo inte  
rior colocamos fósforo amarillo.

Las células mas los sustratos, a --  
excepción de la cisteina, se pipetearon fuera de éste -

espacio y fueron gaseados con CO<sub>2</sub> al 5% y N<sub>2</sub> al 95%

La cisteina fué incubada con nitrógeno y fósforo durante 10 minutos antes de su utilización. Llegado el momento este aminoácido se inyecta, - a través de los tapones de goma de los matraces correspondientes, al medio de la incubación.

Una experiencia de éste tipo, mostramos en la TABLA R-11 donde se puede observar la caida brusca del ATP intracelular como consecuencia de la atmósfera anaeróbica creada.

Sin embargo, la liberación de LDH por parte de las células no aumenta en presencia de -- cisteina, -- cloruro amónico o sulfato de cobre con res-- pecto al control incubado sin substratos.

La oxidación rápida de la cisteina es, por lo tanto, un factor decisivo para la producción del efecto citotóxico observado.

TABLA R-11

EFEECTO DE LA CISTEINA,  $\text{ClNH}_4$  Y  $\text{SO}_4\text{Cu}$  SOBRE LA CONCENTRACION DE ATP Y LA LIBERACION DE LDH EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA INCUBADOS BAJO CONDICIONES ANAEROBICAS.

(EXPERIENCIA SIGNIFICATIVA).

ADICIONES	ATP $\mu\text{moles/gr.células}$	LDH I.U./ml sobr.
Tiempo cero	2.50	0.38
Control	0.73	0.60
Cys 4 mM	0.21	0.62
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM	0.19	0.56
Cys 4 mM + $\text{SO}_4\text{Cu}$ 20 $\mu\text{M}$	0.44	0.60
Cys 4 mM + $\text{ClNH}_4$ 10 mM + Catalasa (250 U./ml)	0.28	0.60



14. EFFECTO DE LA CATALASA SOBRE EL CONSUMO -  
DE OXIGENO DURANTE LA AUTOOXIDACION DE -  
LA CISTEINA.

En la Figura R-1 mostramos una gráfica representativa de la rápida oxidación de la cisteína (50 micromoles) en presencia de  $\text{SO}_4\text{Cu}$   $1.75 \mu\text{M}$  con la formación de cisteína mas  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En ésta reacción y de acuerdo con lo previamente calculado se consumieron 12.5 micromoles de  $\text{O}_2$ .

Así mismo también mostramos con -- trazo oscuro, el oxígeno, que se consume por unidad de tiempo en presencia de cisteína 50 micromoles y catalasa 1000 U.I.

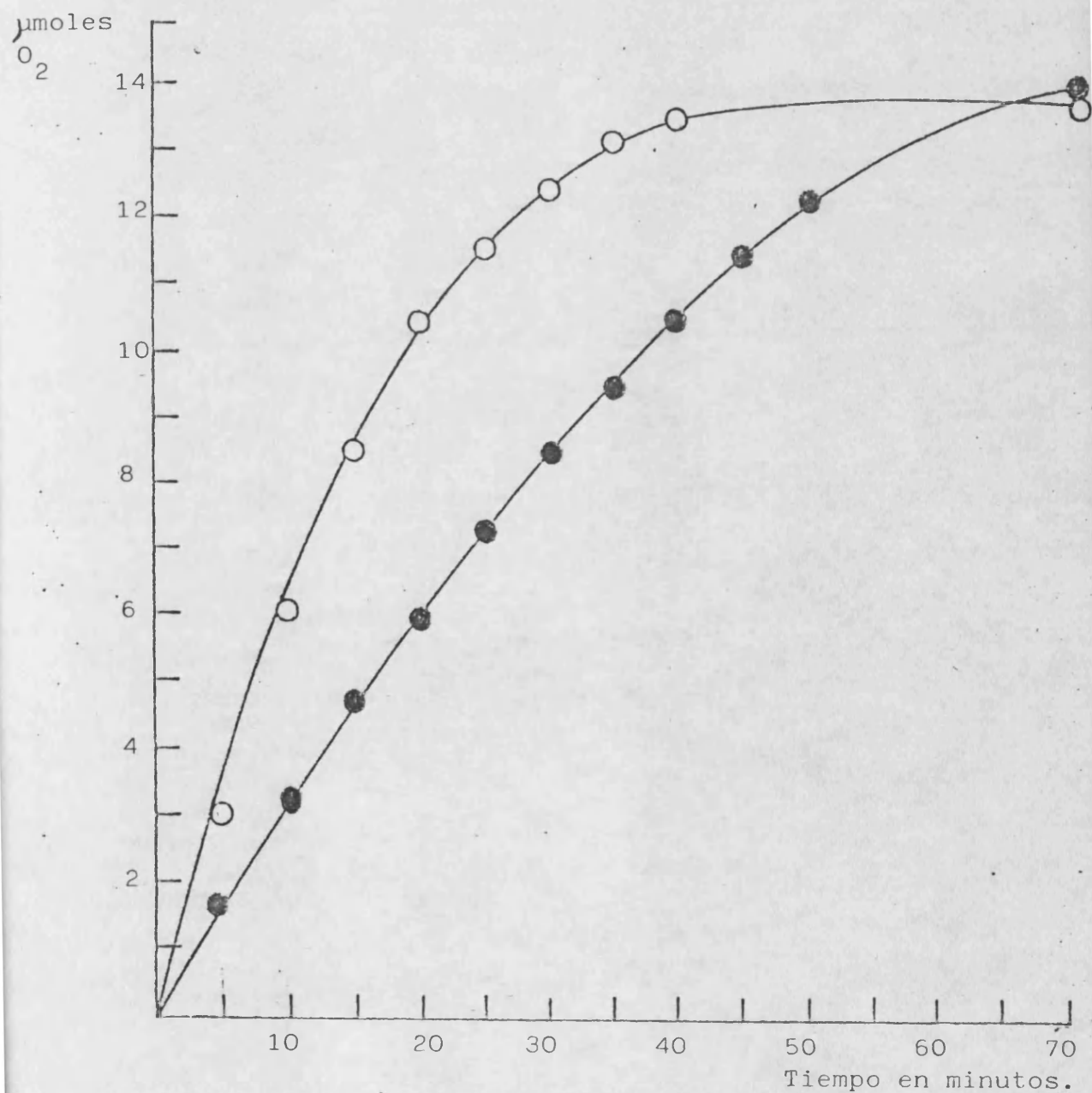
Como muestras ambos trazados (con y sin catalasa) el punto final de ambas reacciones es el mismo, es decir 12.5 micromoles de oxígeno consumidos durante la oxidación de la cisteína.

Sin embargo, en presencia de catalasa la velocidad inicial de ésta reacción es aproximadamente la mitad de la que se alcanza en ausencia de la enzima.

Este efecto inhibitor es debido a la ruptura del agua oxigenada por la acción de la catalasa que devuelve la mitad de las moléculas de oxígeno, consumidas en la oxidación de la cisteína, al medio.

FIGURA R-1

EFFECTO DE LA CATALASA SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO DURANTE LA AUTOOXIDACION DE LA CISTEINA.



○ — Cisteina + Cobre  
● — Cisteina + Cobre + Catalasa.



15. ESPECTRO DE RESONANCIA PARAMAGNETICA  
DE ELECTRONES OBTENIDO A PARTIR DE LOS  
PRODUCTOS DE LA OXIDACION EXPONTANEA  
DE LA CISTEINA.

La oxidación espontánea de la cisteína en presencia del 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-óxido (DMPO) y en tampón fosfato 50 mM y pH 7,4, da lugar a la formación de dos tipos de aducciones paramagnéticas señaladas como A y B, cuyo espectro representamos en la FIGURA R-2 (a, i).

La simulación computarizada de ambos componentes por separado y en función de su contribución porcentual al espectro total, da como resultado la proporción de 30 % para el componente A y 70 % para el B (FIGURA R-2 a ii, a iii).

El espectro computarizado, resultante de la combinación de dichas proporciones, está de acuerdo con el espectro experimental obtenido (FIGURA R-2 a<sub>v</sub>)

Los parametros obtenidos de ambos componentes por r.p.e. son: Componente A:  $g = 2,0050$  ,  $a_N = a_H = 14,9$  G ; Componente B:  $g = 2,0047$  ,  $a_N = 15,3$  G  $a_H = 17,2$  G (Swartz y otros 1972; Gordy 1980)

Los parámetros obtenidos para el componente A son idénticos a los previamente publicados para el complejo de aducción paramagnético del radical hidroxilo (DMPO-OH) (Finkelstein y otros 1980).

Este componente se confirmó ser el producto de aducción paramagnética DMPO-OH (FIGURA R-3 A), ya que su imagen espectroscópica desaparece en presencia de catalasa, mientras que en presencia de etanol aparece un nuevo componente de aducción C en el espectro de resonancia paramagnética (FIGURA R-2 b<sub>i</sub>). En este caso, la simulación computarizada dió una composición proporcional de 15 % para el componente A, 45 % para el B y 40 % para el C.

El producto de aducción C, que aparece en presencia de etanol, tiene los mismos parámetros ( $g = 2,0053$   $a_N = 15,8$  G y  $a_H = 22,9$  G) que los publicados con anterioridad para el compuesto paramag-

nético DMPO-1-hidroxietyl (Finkelstein 1980). Esta aducción, se forma a partir de la reacción de los radicales OH· y el etanol (FIGURA R-3 C).

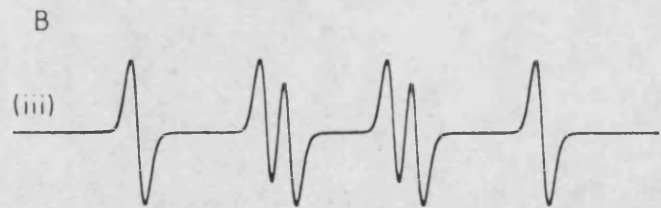
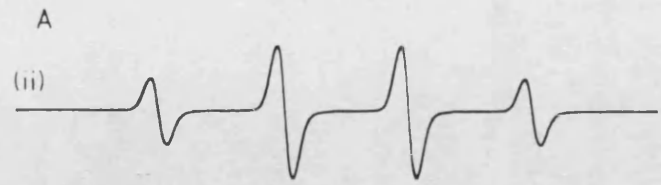
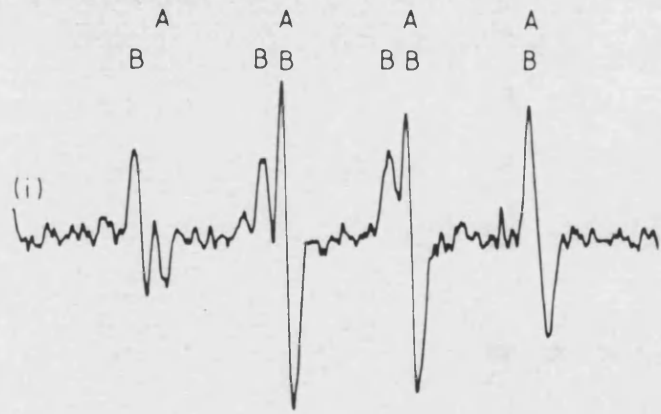
Por el contrario, no disponemos de información suficiente, utilizando r.p. e., para la identificación del componente B en función de sus parámetros. Este componente junto con el componente A, no se producía a partir de metionina, (FIGURA R-2 b,v), indicando que se trata de una aducción paramagnética de un derivado tiólico tipo DMPO-Cys (FIGURA R-3 B), lo cual se confirmó utilizando espectroscopia de masas y resonancia magnética nuclear (r.m.n.) del derivado hidroxilamino (DMPO gem. dimetilo 0,75 y 0,95 p.p.m.; DMPO vic. metileno 1,2 p.p.m. DMPO proton 1,65; cisteina-metina 2,55 p.p.m. y cisteina metileno 2.25 p.p.m.)

FIGURA R-2

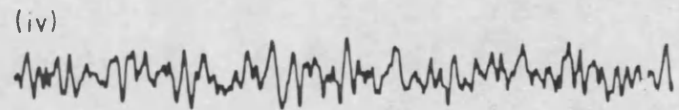
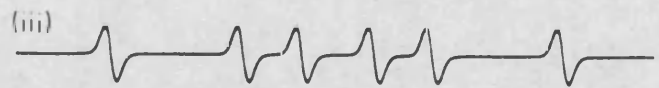
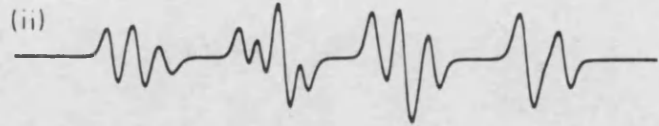
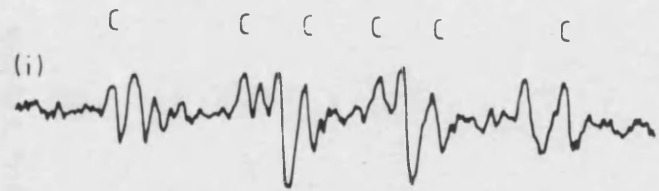
ESPECTRO DE RESONANCIA PARAMAGNETICA DE ELECTRONES OBTENIDO A PARTIR DE LOS PRODUCTOS DE LA OXIDACION EXPONTANEA DE LA CISTEINA EN PRESENCIA DE DMPO Y TAMPOS FOSFATO 50 mM pH 7.4

- 2a,i Espectro experimental compuesto por dos componentes A y B.
- 2a,ii Simulación computarizada del compuesto de aducción A en i
- 2a,iii Simulación computarizada del compuesto de aducción B en i
- 2a,iv Simulación computarizada de la composición proporcional de ambos compuestos de aducción A y B.
- 2b,i Espectro obtenido en presencia de etanol al 10%
- 2b,ii Simulación computarizada de componentes A y B en la Figura 2a,i y el nuevo componente C en 2b,i
- 2b,iii Simulación computarizada del componente C.
- 2b,iv Espectro obtenido a partir de metionina 1mM.

a)



b)

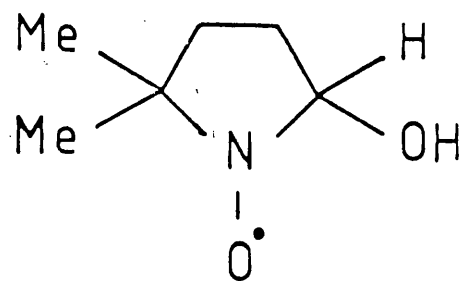


0.2 sec | 1000

FIGURA R - 3

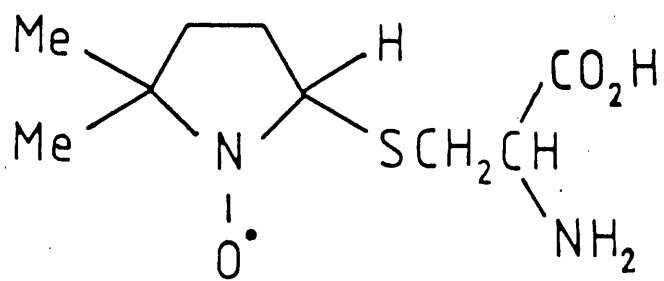
ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS COMPUESTOS

- A DMPO - OH
- B DMPO - Cys
- C DMPO - (I-Hidroxietyl)



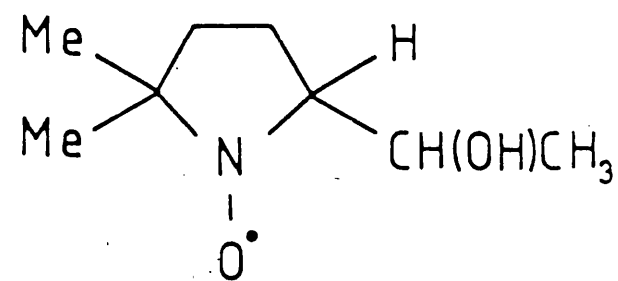
DMPO-OH

A



DMPO-Cys

B



DMPO-(1-Hydroxyethyl)

C

16. EFECTO DE CONCENTRACIONES PROGRESIVAS  
DE CISTEINA SOBRE LA PRODUCCION DE  
DMPO-OH Y DMPO-CYS.

El aumento de la concentración inicial de cisteína produce un incremento en el cociente DMPO-Cys/DMPO-OH

Como puede observarse en la FIGURA R-4, cuanto mayores son las concentraciones iniciales de cisteína, el componente DMPO-OH se hace menos visible en relación con el complejo de aducción DMPO-Cys. Por el contrario, a pequeñas concentraciones del aminoácido es el radical OH· el detectado con mayor claridad.

Esto se debe a las propiedades que tiene la cisteína de captar radicales OH· produciéndose así más radicales tiólicos.



FIGURA R - 4

EXPECTRO DE R.P.E. A PARTIR DE DIVERSAS CONCENTRACIONES DE CISTEINA EN TAMPON FOSFATO 50mM, pH 7.4 y DMPO 100 mM.

- a) 120 mM
- b) 10 mM
- c) 1 mM
- d) 120  $\mu$ M

a



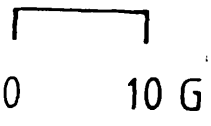
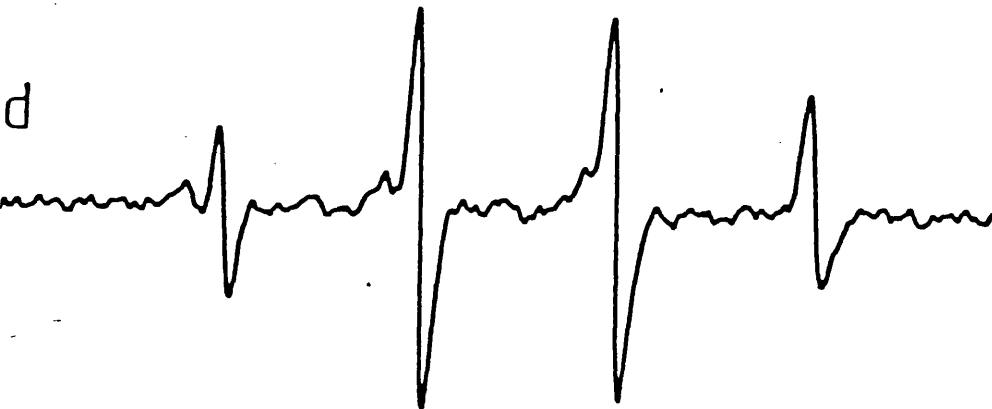
b



c



d



DPPH

17. EFEECTO DEL COBRE 10  $\mu\text{M}$ , HIERRO 10  $\mu\text{M}$   
Y DETEPAC 1 mM SOBRE LA FORMACION DE  
DE LOS COMPUESTOS DE ADUCCION PRODUCI-  
DOS EN LA OXIDACION EXPONTANEA DE LA  
CISTEINA.

La producción de ambos componentes paramagnéticos aumenta considerablemente en presencia de los metales pesados  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en solución acuosa (FIGURA R-5 b).

Sin embargo, sólo el componente de aducción DMPO-Cys reduce de tamaño e incluso desaparece en presencia de un agente quelante muy potente como el ácido dietilotriamino pentaacético (DTPAC) (FIGURA R-5 a).

Estas observaciones su-

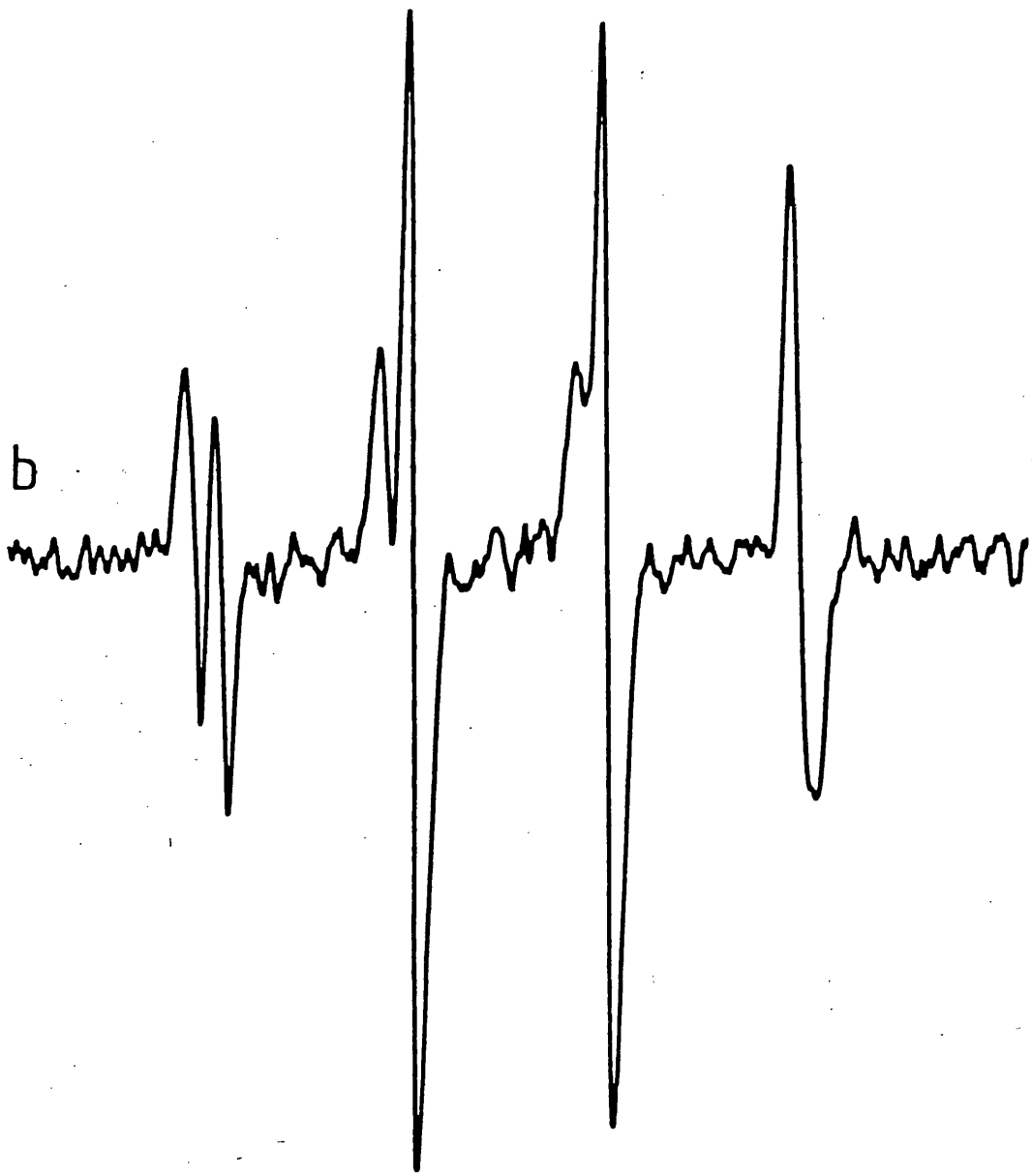
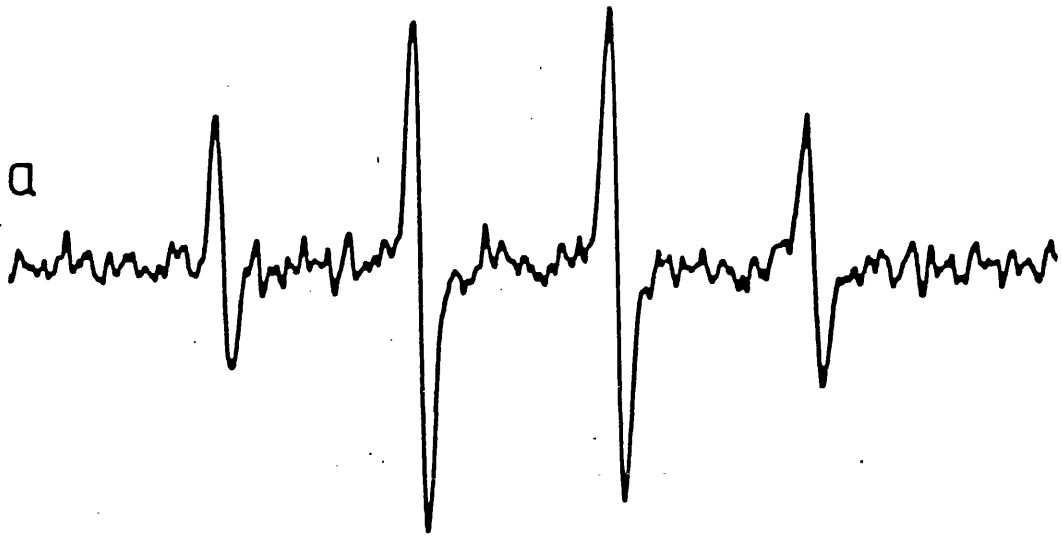
gieren que la autooxidación de la cisteína (1 mM) está catalizada por iones metálicos con propiedades redox.

Por otra parte el efecto del DETEPAC sugiere también que el agente reductor y productor de radicales  $\text{OH}\cdot$  en una posible reacción de Fenton, podría no ser necesariamente un ion metálico.

FIGURA R - 5

EFFECTO DEL COBRE HIERRO Y DETAPAC SOBRE LA FORMACION DE LOS COMPUESTOS DE ADUCCION PRODUCIDOS EN LA OXIDACION EXPONTANEA DE LA CISTEINA.

- a) Cisteina 1mM en tampon fosfato 1mM y -- DMPO 100mM  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  10  $\mu\text{M}$ , y - DETAPAC 1 mM.
  
- b) Cisteina 1 mM en ausencia de DETAPAC.



0 10 G

DPPH

18. EFEECTO DE VARIAS CONCENTRACIONES DE  
 $H_2O_2$  SOBRE LA PRODUCCION DE DMPO-CYS  
EN LA AUTOOXIDACION DE LA CISTEINA.

La adición de peróxido de hidrógeno a la solución de cisteína en tampón fosfato, produce un aumento de ambas aducciones paramagnéticas (FIGURA R-6).

La representación gráfica de esta producción paramagnética se muestra en la FIGURA R-6 b.

A altas concentraciones de  $H_2O_2$  aparece un incremento del componente DMPO-Cys frente al DMPO-OH de tal forma que cuando las concentraciones de este substrato son progresivamente crecientes, también lo es la aparición del compuesto DMPO-Cys.

TABLA R - 6

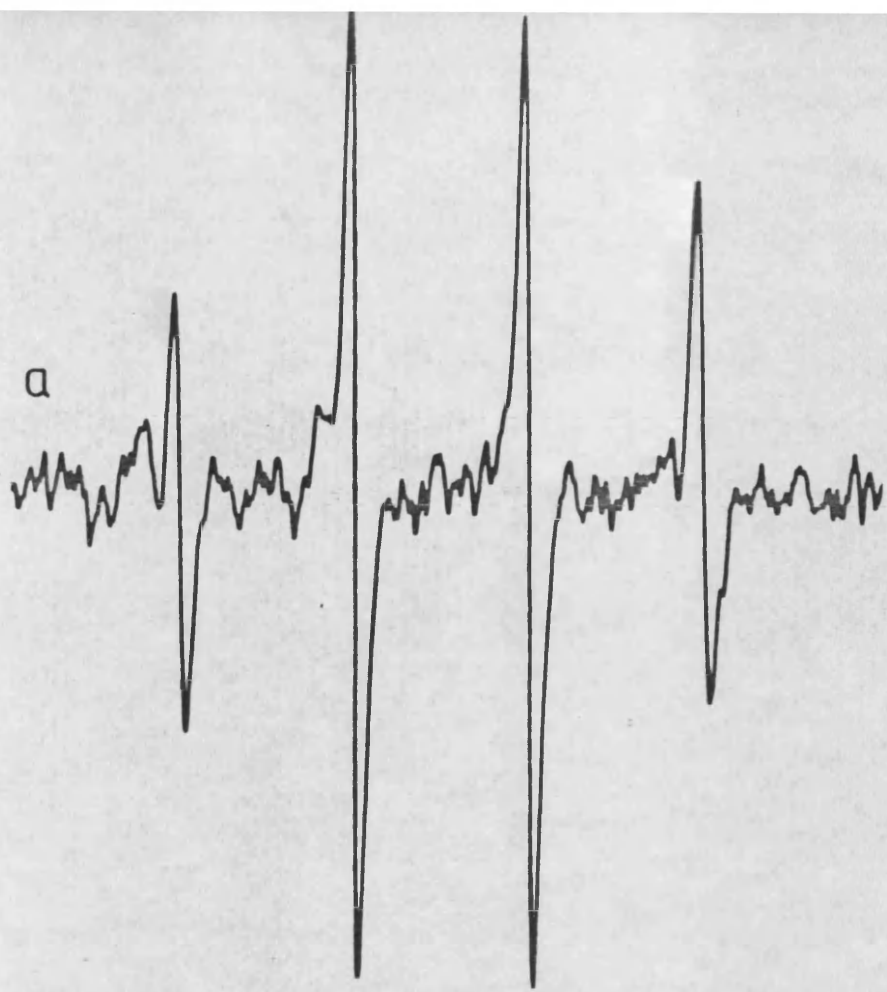
EFEECTO DE VARIAS CONCENTRACIONES DE  $H_2O_2$  SOBRE LA PRODUCCION DE DMPO - Cys.

ARRIBA:(a) Imagen espectroscópica mostrando el aumento del componente DMPO - Cys.

ABAJO: (b) Formación de DMPO-Cys ( M) por unidad de tiempo y en presencia de  $H_2O_2$  a las siguientes concentraciones: 1= 5mM  
2= 2mM  
3= 1mM  
4= 0.5 mM  
C= control.



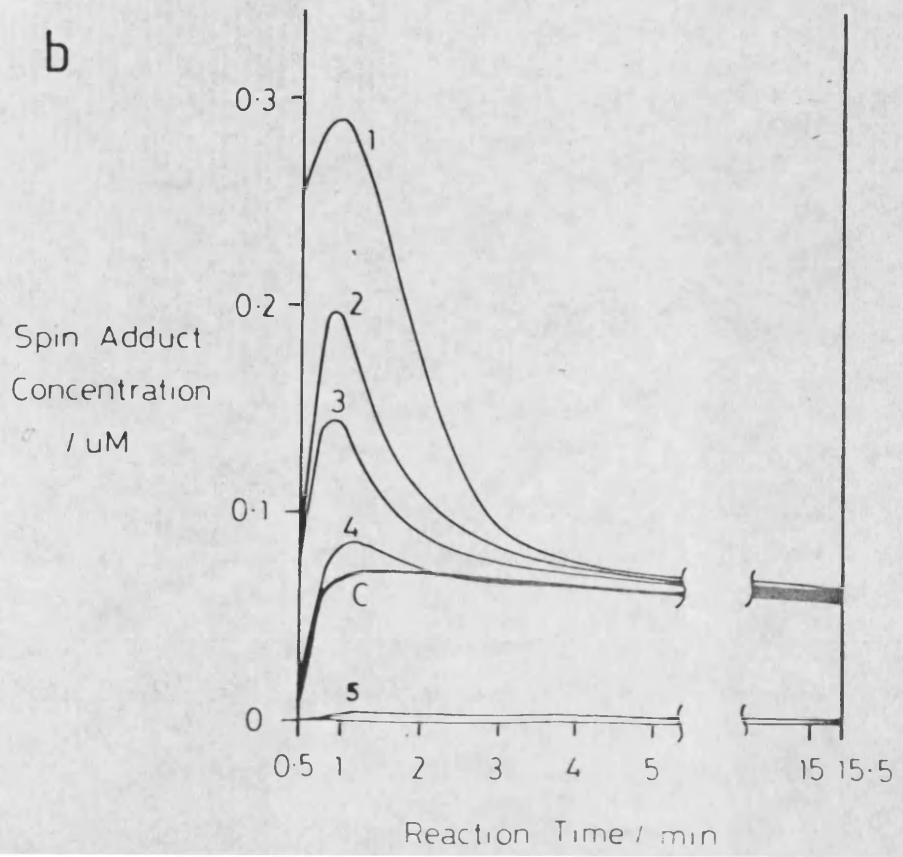
a



0 10 G

DPPH

b



19. EFEECTO DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA Y CATALASA SOBRE LA PRODUCCION DE DMPO-CYS Y DMPO-OH EN LA AUTOOXIDACION DE LA CISTEINA.

Al igual que los ensayos anteriores, la autooxidación de cisteína 1 mM se produjo en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 y DMPO 100 mM.

La superóxido dismutasa cobre/zinc (Cu/Zn) 0,5 mgr/ml estimula la formación de ambos compuestos DMPO-Cys y DMPO-OH (FIGURA R-7 a), mientras que la catalasa (250 U./ml) demostró tener efectos inhibidores de esta formación (FIGURA R-7 b)

Cuando estas dos enzimas son añadidas juntas a la misma muestra de cisteína en tampón fosfato y DMPO, se observa cierta producción,

tanto de DMPO-Cys como de DMPO-OH.

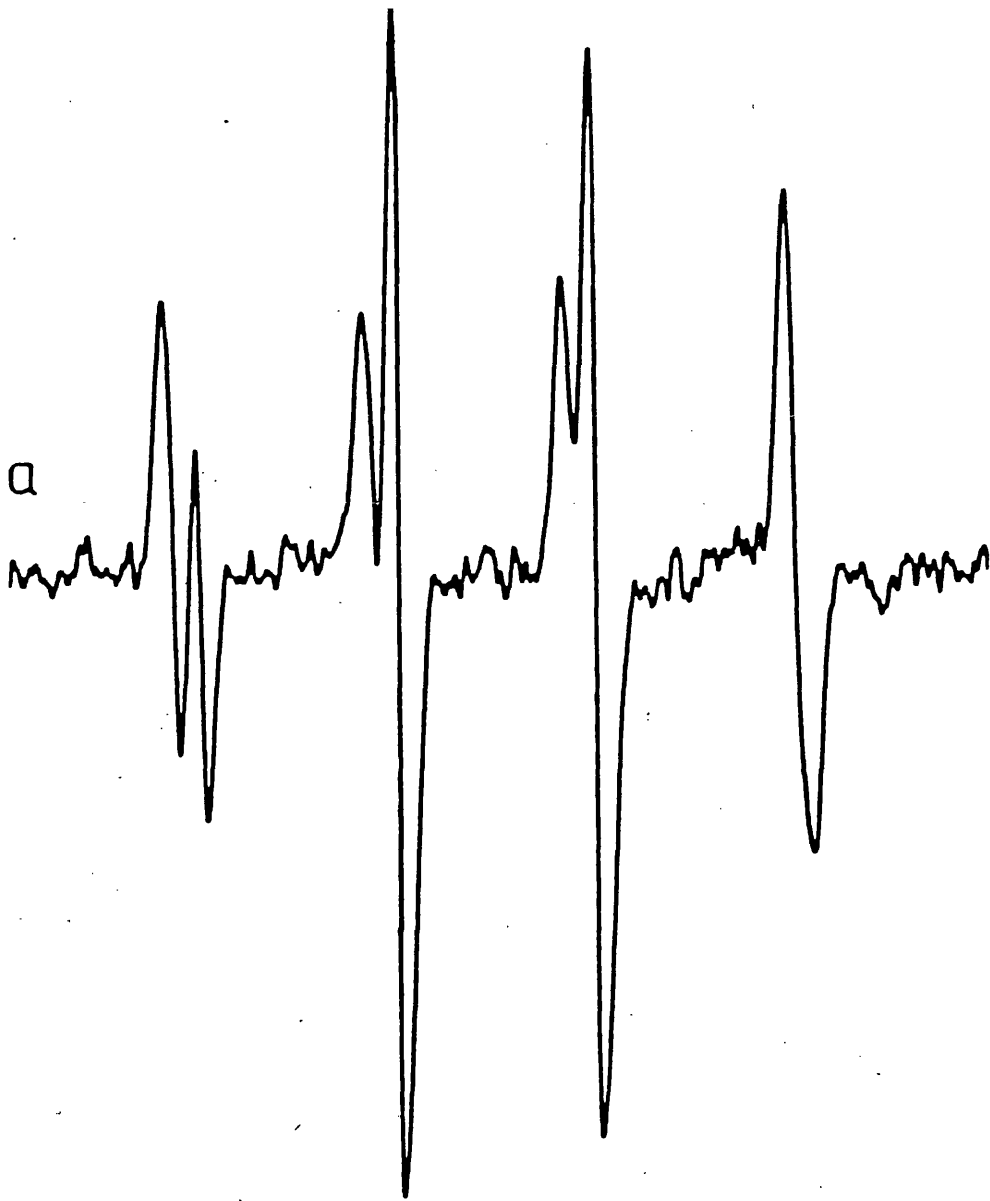
Este efecto sinérgico de la superóxido dismutasa y la catalasa juntas, sugieren la estimulación de la formación de estos compuestos de aducción debido a la rápida producción de  $H_2O_2$  como resultado de la dismutación del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Estos resultados apuntan hacia la participación del ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en el mecanismo de autooxidación de la cisteína que debido a la baja reactividad con el DMPO no pudo ser detectado en el espectro de r.p.e. (Finkelstein y otros 1980).

FIGURA R - 7

EFEECTO DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA Cu/Zn Y CATALASA SOBRE LA PRODUCCION DE DMPO-Cys Y DMPO-OH A PARTIR DE -- CISTEINA 1mM EN PRESENCIA DE DMPO 100 mM Y TAMPON FOSFATO 50 mM pH 7.4

- a) Superoxido dismutasa (SOD) Cu/Zn 0.5 --- mgr/ml.
- b) CATALASA 250 U./ml.
- c) SOD 0.5 mgr./ml + CATALASA 250 U/ml.



0 10 G

DPPH

20. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO EN LA  
AUTOOXIDACION DE LA CISTEINA Y FACTORES  
QUE LO AFECTAN.

El consumo de oxígeno a partir de cisteína 120 mM aumenta considerablemente frente al control cuando este aminoácido se autooxida en presencia de los metales pesados cobre o hierro (FIGURA R-8 abajo).

Entre los agentes que muestran un efecto inhibitorio de este consumo se encuentran, la catalasa, la superóxido dismutasa, el etanol (FIGURA R-8 abajo), el DETAPAC y DMPO (FIGURA R-8 arriba).

Llama la atención, que el comportamiento de la superóxido dismutasa, que si bien

produce un aumento de ambos complejos de aducción DMPO-Cys y DMPO-OH, tiene un efecto inhibitor sobre el consumo de oxígeno en la autooxidación de la cisteína.

Este efecto paradójico, puede ser explicado por la reacción de dismutación que devuelve oxígeno al medio de incubación.

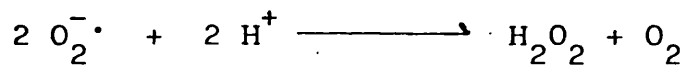


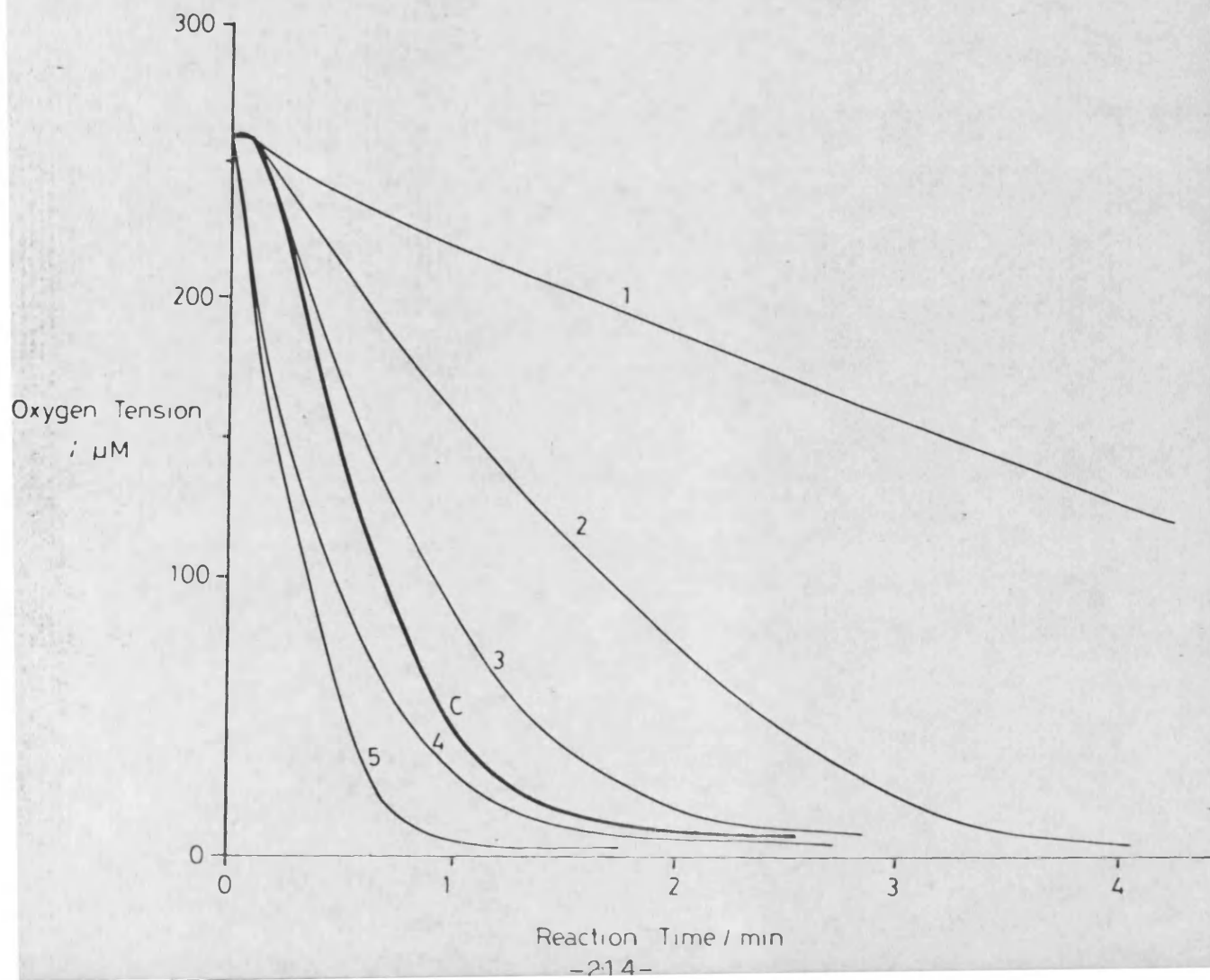
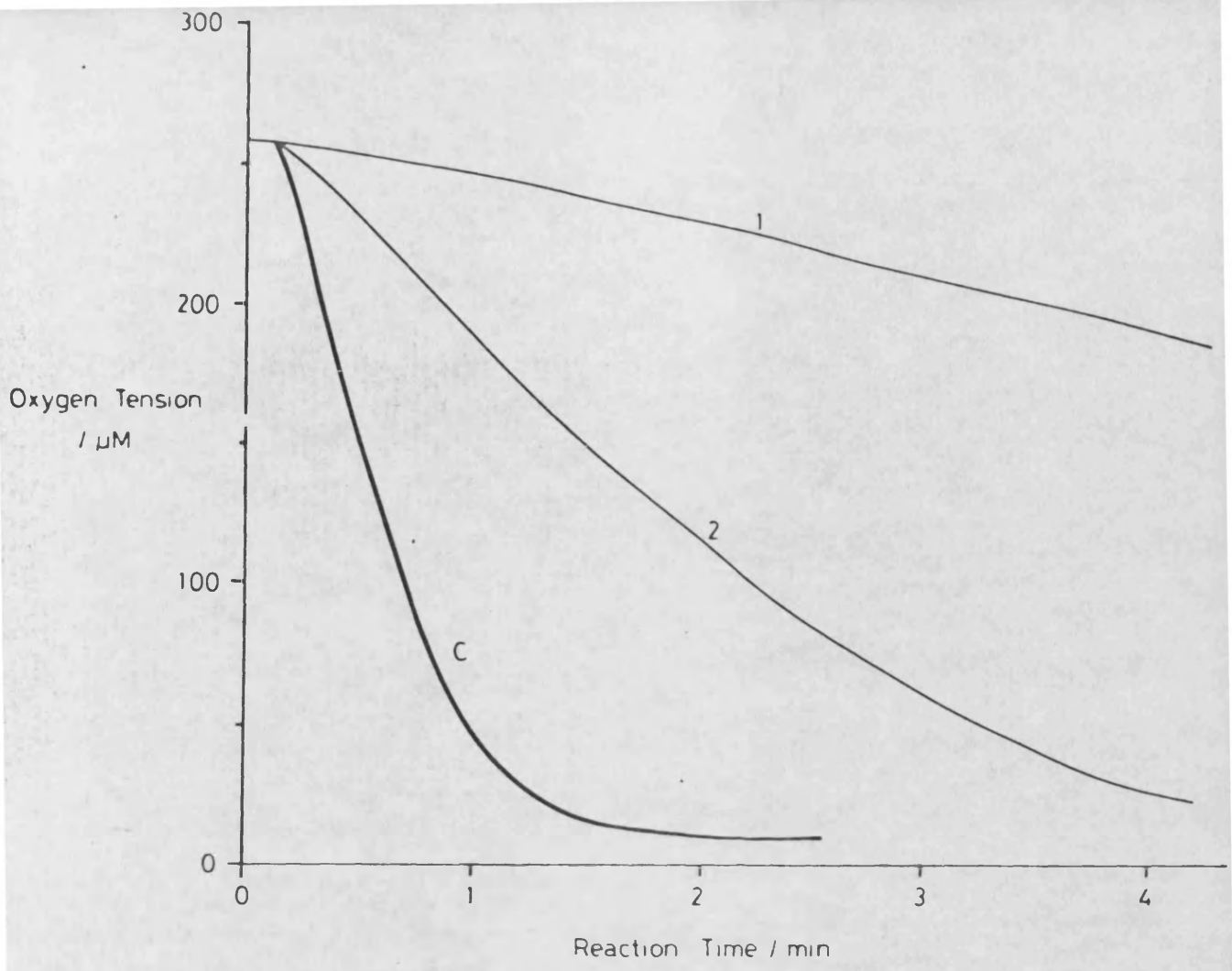
FIGURA R - 8

CONSUMO DE OXIGENO DURANTE LA AUTOOXIDACION DE CISTEINA 120 mM EN TAMPON FOSFATO 50 mM pH 7.4

ARRIBA: 1, Efecto del DETAPAC 1mM  
2, Efecto del DMPO 100 mM  
3, Control ( 120 mM cisteina)

ABAJO: 1, Efecto del etanol al 10%  
2, Efecto de la catalasa 250 U/ml.  
3, Efecto de la SOD Cu/Zn 1 mgr/ml.  
4, Efecto del hierro  $Fe^{3+}$  10  $\mu$ M.  
5, Efecto del cobre  $Cu^{2+}$  10  $\mu$ M.  
C, Control (120 mM Cisteina).





21. REDUCCION DEL CITOCROMO C POR LA CIS-  
TEINA EN TAMPON FOSFATO 50 mM pH 7,4.  
EFFECTO DE ALGUNOS SUBSTRATOS SOBRE ES-  
TA VELOCIDAD DE REDUCCION.

Los resultados obtenidos a partir de la reducción del citocromo C por la oxidación espontánea de la cisteína, se corresponden con los obtenidos con la medida del consumo de oxígeno de esta misma reacción.

Como podemos apreciar en la FIGURA R-9 arriba, se produce cierta reducción del citocromo C en condiciones anaeróbicas, si bien es cierto que ~~esta es~~ mucho más rápida en presencia de oxígeno.

En el medio de esta

misma figura, representamos el efecto catalizador del cobre y el hierro con velocidades de reducción del citocromo C por encima del control.

Sobre esta misma gráfica puede observarse el efecto inhibitor del DETAPAC, demostrándose una vez más la importancia de los metales pesados en la oxidación de la cisteína.

La superóxido dismutasa incrementa ligeramente la velocidad de reducción por encima del control con cisteína, mientras que la catalasa sólo o en presencia de superóxido dismutasa, disminuye la misma (FIGURA R-9 abajo).

FIGURA R - 9

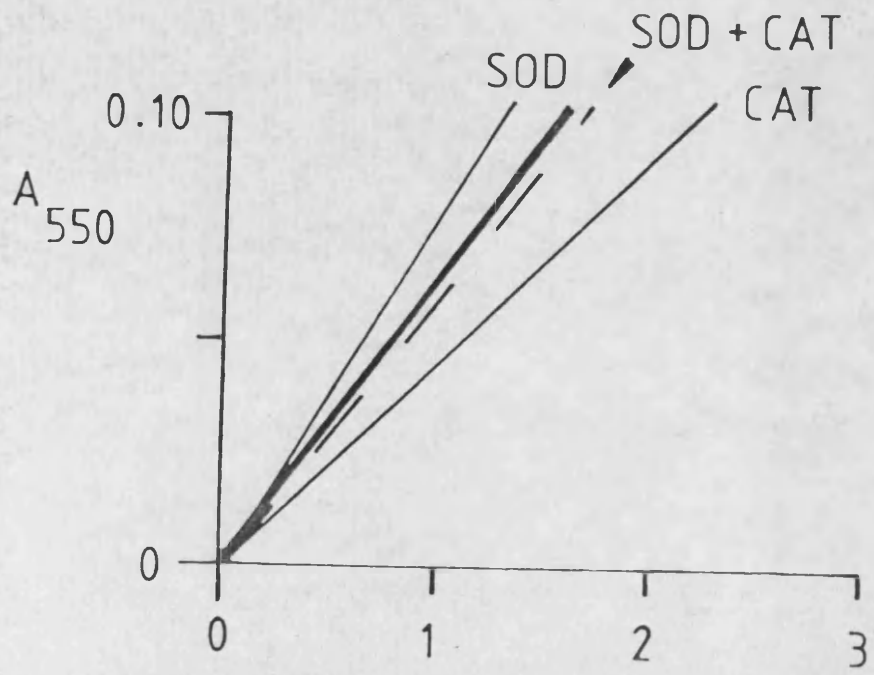
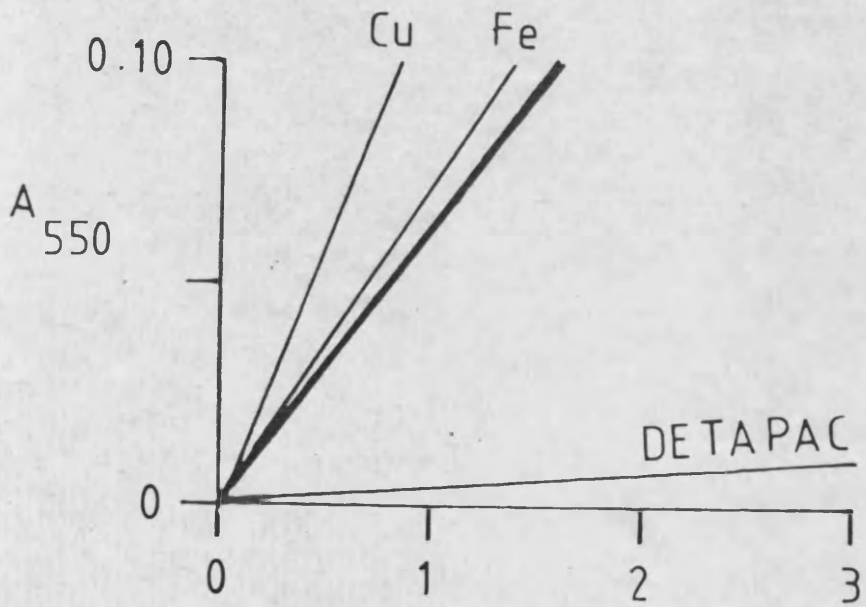
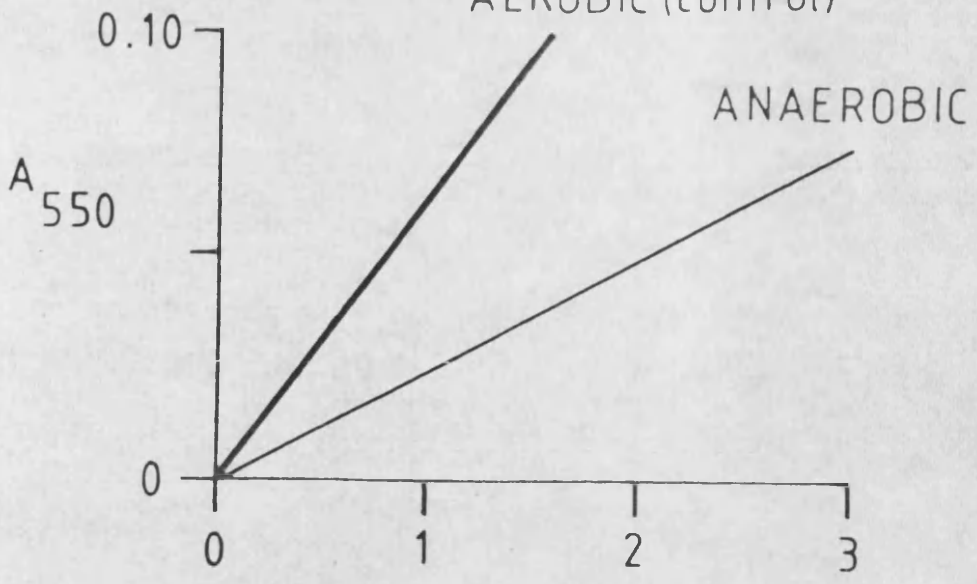
REDUCCION DEL CITOCROMO C POR LA CISTEINA 1mM EN TAMPON  
FOSFATO 50 mM Y pH 7.4

ARRIBA: Condiciones aeróbica y anaeróbica.

MEDIO: Efecto del Cobre , hierro y DETAPAC

ABAJO: Efecto de SOD, Catalasa y SOD + Catalasa

AEROBIC (control)



Time (min.)

22. ESPECTRO DE R.P.E. PRODUCTO DE LA  
AUTOOXIDACION DE CISTEINA EN PRE-  
SENCIA DE HEPATOCITOS AISLADOS DE  
RATA.

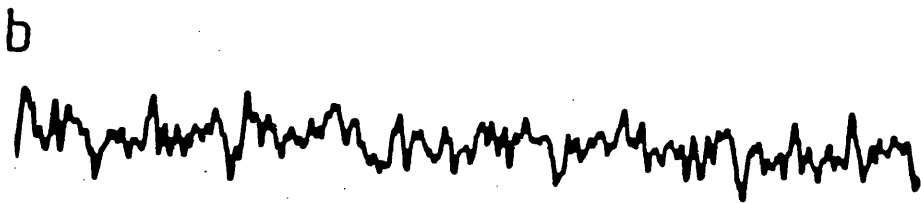
En la FIGURA R-10, mostramos el efecto que la autooxidación de la cisteína tiene sobre los hepatocitos aislados de rata medido por r.p.e.

La primera imagen (a), repite el el espectro de r.p.e., representado anteriormente, producto de la oxidación espontánea de la cisteína. La imagen (b), corresponde al ruido de fondo de los hepatocitos expuestos al espectro de r.p.e. Cuando los hepatocitos y la cisteína se estudian conjuntamente al espectro de r.p.e. se observa la desaparición del compuesto DMPO-OH y la disminución en un 30% del compuesto DMPO-Cys, lo cual sugiere la captación de radicales OH $\cdot$  y SG $\cdot$  por los hepatocitos en presencia de cisteína 1 mM. (imagen c).

FIGURA R - 10

ESPECTRO POR R.P.E. DE LA AUTOOXIDACION DE LA CISTEINA  
EN PRESENCIA DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

- a) R.P.E. a partir de cisteina 1mM en tampon fosfato 50 mM pH 7.4 y DMPO 100 mM.
- b) Imagen de R.P.E. obtenida a partir de hepatocitos aislados de rata y DMPO 100 mM.
- c) R.P.E. a partir de cisteina en presencia de hepatocitos aislados de rata.



0 10 G

DPPH



DISCUSSION

## 1. LA AUTOOXIDACION DE LA CISTEINA

### 1.1. Introducción

En el presente trabajo confirmamos la observación realizada por Viña, Hems y Krebs acerca del efecto que tienen las concentraciones progresivamente crecientes de cisteína sobre el glutathion reducido de los hepatocitos aislados de la rata (Viña y otros 1978).

Este efecto fué considerado como tóxico a juzgar por las alteraciones que se producen en la célula debido no sólo a la acción directa de la cisteína, sino también como consecuencia de la disminución del glutathion reducido en los hepatocitos, ya que el mantenimiento de sus niveles fisiológicos es esencial para las funciones metabólicas e integridad celular (Sies y Wendel 1978).

### 1.2. Efecto del Cloruro Amónico.

Estudiando el efecto que la disminución del GSH tendría sobre otros procesos metabólicos celulares (neoglucogénesis, ureogénesis), pudimos comprobar que el efecto de la cisteína es potenciado por el  $\text{ClNH}_4$  10 mM. De tal forma que cuando las células se incuban con cisteína, baja dramáticamente la concentración de GSH y ATP siendo ésta disminución

todavía mas acentuada en presencia de  $\text{ClNH}_4$ .

Así mismo el aumento en la liberación de LDH por parte de las células cuando estas se incuban en presencia de cisteína y cloruro amónico, indica la extensión de la lesión a nivel de la membrana. (TABLA R-2 y R-3).

En aquellas situaciones más tóxicas, la disminución de la concentración del ATP se acompaña también de la pérdida de los nucleótidos adenílicos totales (TABLA R-5 y R-6).

Este hecho podría explicarse por la demanda de ATP que supone la síntesis de urea a partir de  $\text{ClNH}_4$  no pudiendo ser reemplazados los niveles de éste nucleótido en condiciones citotóxicas, como son las altas concentraciones de cisteína, donde se ve comprometida la membrana celular y, por lo tanto, el gasto de ATP a través de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es máximo.

Sin embargo la formación de urea a partir de  $\text{ClNH}_4$ , como único substrato, es muy pequeña.

Por otra parte, el poco efecto que presenta la ornitina, que estimula la síntesis de urea (Krebs y otros 1974), como potenciador de la acción de la cisteína y el cloruro amónico, apuntan hacia otros

mecanismos citotóxicos.

El efecto del  $\text{ClNH}_4$  también puede interpretarse como un desacoplamiento del cociente  $\text{NAD}/\text{NADH}_2$  a nivel del estado redox mitocondrial. Esto se evita mediante la acción de aquellos substratos antagonistas que disminuyen este cociente tanto a nivel mitocondrial como citosólico, como por ejemplo son los ácidos grasos y el etanol (TABLA R-5 y R-6).

Como indican estas tablas, el efecto de los ácidos grasos es sinérgico con el efecto del etanol. Los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico mantienen los valores de ATP de cinco a ocho veces superior en comparación con el valor obtenido en presencia de cisteína y cloruro amónico. Los valores obtenidos con ácidos grasos más etanol, son superiores a los valores de ATP obtenidos por cada grupo por separado.

Por otra parte, el efecto protector de la catalasa 250 U./ml, que también se observa en presencia de cisteína y  $\text{ClNH}_4$ , indica que incluso en presencia de la sal, la autooxidación de la cisteína a cistina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un factor determinante en el mecanismo de acción citotóxico de la cisteína (TABLA R-7 y R-8).

A este respecto, es necesario apun-

tar la posible interacción entre los iones  $\text{Cl}^-$  y los radicales  $\text{OH}^\bullet$  procedentes de la ruptura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de metales pesados o cualquier otro agente reductor, para formar el radical libre  $\text{Cl}^\bullet$  (Janzen 1976). No obstante, la aparición de efectos similares en presencia de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  indica que el catión es la parte responsable de la potenciación del efecto de la cisteína en la molécula de cloruro amónico.

Sin embargo, el efecto protector del etanol 10 mM sobre los niveles de ATP y nucleótidos adenícos totales, podría explicarse por sus propiedades como captador de radicales  $\text{OH}^\bullet$  (Beauchamp y Fridowich 1970; Fridowich 1974) (TABAS R-5, R-6 y R-9).

Por otra parte, el hecho de que el pirazol, potente inhibidor de la alcohol deshidrogenasa (Li y Theorell 1969), no modifique su efecto protector sobre la toxicidad de la cisteína, demuestra que este efecto es debido al etanol en sí y no a los productos de su metabolismo. (Las experiencias sobre el efecto del sulfato amónico y el pirazol no se muestran en la presente Tesis).

### 1.3. Papel del Cobre sobre la Autooxidación de la Cisteína.

Se sabe que los grupos tioles se oxidan rápidamente en presencia de metales pesados

(Tien y otros 1982; Pirie 1932; Taylor y otros 1966; Cavallini y otros 1969)

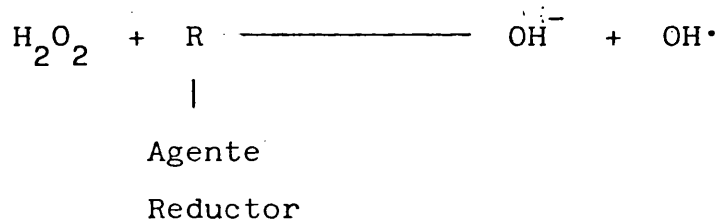
También es conocida la oxidación de la cisteína a cistina y  $H_2O_2$  (Harrison y Thurlow 1926) así como el poder catalizador del cobre en esta reacción (Warburg 1949).

En nuestras experiencias, el efecto catalizador de las trazas de cobre ( $SO_4Cu$  8  $\mu M$ ), se corresponde con un aumento de la respuesta de las células al efecto citotóxico de la cisteína, que se traduce por una mayor depleción de GSH intracelular, mayor disminución de ATP y un aumento en la liberación de LDH citoplasmática. (TABLAS R-1, R-4 y R-8)

La catalasa incubada con los hepatocitos aislados de la rata, protege contra a la acción de la cisteína sola y en presencia de  $ClNH_4$  o  $SO_4Cu$ . (TABLAS R-7 y R-8)

Sin embargo, la adición de peróxido de hidrógeno no reproduce el efecto citotóxico observado en los hepatocitos incubados con cisteína 4 mM, siendo necesaria la adición conjunta de  $H_2O_2$  y cisteína para reproducir en parte dicho efecto. Por lo tanto, el peróxido de hidrógeno puede no ser el agente causante de esta citotoxicidad, dejando este papel a los radicales  $OH\cdot$  que podrían ser generados a partir de  $H_2O_2$  en una reacción tipo Fenton con participación

de algún agente reductor.



De acuerdo con esta teoría está el efecto protector que presenta el etanol 10 mM sobre todo a nivel de ATP y liberación de LDH por parte de las células incubadas con cisteína.

El ion superóxido, que a juzgar por la reducción del citocromo C en presencia de cisteína esta implicado en el proceso de autooxidación de la misma (FIGURA R-9), no es en este caso el agente desencadenante de la lesión celular, ya que la superóxido dismutasa no evita esta lesión sino que potencia el efecto citotóxico de la cisteína (TABLA R-10 y FIGURA R -7).

Por otra el consumo de oxígeno en la oxidación de la cisteína aumenta en presencia de cobre o hierro y disminuye en presencia de quelantes de metales pesados, catalasa, etanol y superóxido dismutasa (FIGURA R-1 y R-8).

Finalmente se demuestra por medio de una experiencia anaeróbica, la importancia de la oxidación de la cisteína para el desencadenamiento de

su mecanismo citotóxico.

Como muestra la TABLA R-11, la incubación de células y cisteína en condiciones anaeróbicas se acompaña de la bajada de los niveles de ATP debido a la falta de oxígeno en el medio de incubación, mientras que no hay liberación de LDH por parte de las células, indicando la ausencia del daño celular.

#### 1.4. Productos de la Autooxidación de la Cisteína.


A pesar de estar bastante bien definidos los productos de la autooxidación de la cisteína, no se ha dilucidado todavía la participación de radicales libres en su mecanismo de oxidación.

Cavallini y otros sugirieron la participación de radicales tiilicos (Cavallini y otros 1969), mientras para otros se trata de una transferencia de dos electrones en presencia de substratos prooxidantes como los metales pesados.

Tomasi y Searle demostraron la producción de radicales hidroxilo durante la oxidación de bajas concentraciones de cisteína (Tomasi y Searle 1982 ).

Como resultado de experiencias realizadas con resonancia paramagnética de electrones,





hemos podido demostrar la presencia de radicales libres tipo tiilico ( $RS\cdot$ ) e hidroxilo ( $OH\cdot$ ) como producto de la oxidación espontánea de la cisteína en tampón fosfato 50 mM y pH 7,4.

En la FIGURA R-4, se puede observar el efecto de las concentraciones crecientes de cisteína sobre el cociente DMPO-Cys/DMPO-OH. El aumento del componente de aducción DMPO-Cys a altas concentraciones de cisteína, se atribuye a las propiedades de este aminoácido para captar radicales  $OH\cdot$  y producir de esta forma más radicales  $RS\cdot$ .

La producción de ambos radicales se ve considerablemente aumentada en presencia de metales pesados, catalizadores de la oxidación de la cisteína, como son el cobre y el hierro (FIGURA R-5 a y b).

Por otra parte, el quelante de metales pesados DETAPAC, la catalasa y el etanol inhiben la formación de radicales libres a partir de cisteína.

Adicionalmente, la superóxido dismutasa Cu/Zn estimula la formación de radicales, existiendo una dependencia dioxigénica en el proceso de autooxidación. Estos hechos implican la intervención del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en este proceso oxidativo. Un efecto similar de potenciación por parte de la SOD se ha observado en los trabajos de Carlson y Nyberg (1979) en la destrucción de bacterias utilizando cisteína.

Este efecto podría explicarse por la rápida dismutación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  para formar  $H_2O_2$ . Por esta misma razón, se explica el efecto inhibitorio de la enzima sobre el consumo de oxígeno en la oxidación de la cisteína, ya que la reacción de dismutación devuelve oxígeno al medio (FIGURA R-8 arriba).



La falta de evidencia espectroscópica para el radical superóxido puede ser debido a razones cinéticas (baja reactividad de este radical para el compuesto DMPO y rápida interacción con otros intermediarios de este proceso con una vida media muy corta), (Finkelstein y otros 1.980).

Hemos postulado un mecanismo para la oxidación de cisteína que representamos en la FIGURA D-1. Un esquema más simplificado se muestra en la FIGURA D-2.

Las reacciones de propagación se han postulado a partir de la reacción de iniciación. Las reacciones 2 y 3 dan lugar a la formación de sulfonato de cisteína, mientras que las reacciones 4 a 6 producen cistina y peróxido de hidrógeno como productos finales respectivos de sus reacciones.

El análisis de estos productos - dió como resultado la formación de cistina, sulfonato

de cisteína y sulfonato de cisteína.

La formación de sulfinato y sulfonato de cisteína aumenta aproximadamente un 20% con la disminución de la concentración inicial de cisteína, es decir, con el aumento del cociente  $O_2/Cisteína$ .

A concentraciones suficientemente altas de cisteína el producto predominante es la cistina.

Por otra parte, el que domine una u otra reacción de propagación dependerá de la reactividad del radical  $RS\cdot$ .

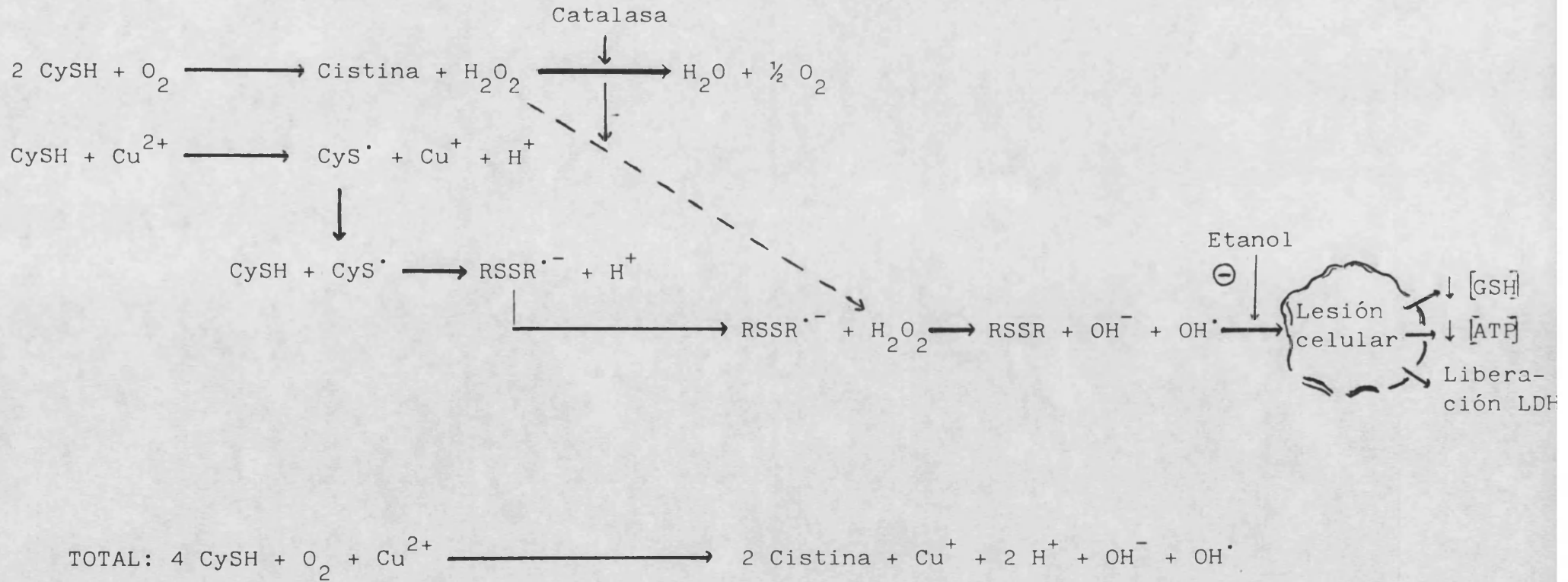
A pesar de que el mecanismo de acción propuesto presenta un número variado de radicales libres, sólo dos de ellos ( $RS\cdot$  y  $OH\cdot$ ), han podido ser detectados. Esto es debido a la reactividad individual de cada uno de ellos con el compuesto estabilizador DMPO, la velocidad de su producción y su competencia por el DMPO, así como otros componentes del medio.

Finalmente, hemos de considerar el factor biológico existente cuando la oxidación espontánea de la cisteína se produce en presencia de células incubadas en solución salina Krebs-Henseleit. Así pues, hemos de ser cautos a la hora de extrapolar los resultados obtenidos con r.p.e. en ausencia de patocitos aislados de rata. Así por ejemplo, a partir -



FIGURA D-2

MECANISMO DE ACCION PROPUESTO PARA EL EFECTO CITOTOXICO DE LA CISTEINA SOBRE LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA EN AYUNAS DE 48 HORAS E INCUBADOS EN KREBS-HENSELEIT A 37°C.



del efecto del DETAPAC, podría deducirse que la producción del radical  $\text{OH}^\bullet$  no tiene nada que ver con la participación de metales pesados ni con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que dicho quelante no es capaz de inhibir la formación del complejo DMPO-OH y si, la del complejo DMPO-Cys.

Por el contrario, en presencia de hepatocitos hemos podido comprobar, no solo el efecto que el cobre tiene como estimulador de la citotoxicidad de la cisteína, sino también la protección que se observa tanto en presencia de catalasa como de etanol, potente captador de radicales  $\text{OH}^\bullet$ . Por lo tanto, en presencia de células aisladas es muy probable la formación del radical hidróxilo a partir del peróxido de hidrógeno y metales pesados según una reacción tipo Fenton, aunque no descartamos la ruptura del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por otro agente reductor capaz de ceder electrones como por ejemplo el compuesto  $\text{RSSR}^\bullet$  (FIGURA D-1 reacción 7).

## 2. INTERACCION DE LA CISTEINA CON LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

### 2.1. Pruebas de la viabilidad metabólica de los hepatocitos y el efecto de la cisteína.

A lo largo de las incubaciones con hepatocitos aislados de rata, hemos podido demostrar

la alteración funcional de los mismos en base a su - capacidad para mantener sus niveles fisiológicos de - glutatión reducido y ATP. Las pruebas de viabilidad - funcional se realizaron, en principio, midiendo la exclusión de azul tripano por los hepatocitos. A pesar de ser una técnica muy utilizada decidimos comprobar este resultado con la medida de la actividad lactato deshidrogenásica en el sobrenadante de las incubaciones celulares, es decir, cuantificando el índice de - lesión de la membrana celular en función de la cantidad de enzima liberada por los hepatocitos.

Los resultados obtenidos por ambas técnicas fueron perfectamente equiparables. En - ausencia de substratos los niveles de ATP y la cantidad de LDH liberada se mantienen constantes. En todos los casos se observa una cierta cantidad de LDH liberada que es equiparable a la proporción de células que captan azul tripano. Esta proporción es aproximadamente del 20% en el medio de incubación.

La liberación de LDH se corresponde en la mayoría de los casos analizados, con los niveles de GSH y ATP de tal forma que, cuando por efecto - de la cisteína disminuyen los valores de GSH y/o ATP con respecto a sus controles, también aumentan la liberación de LDH por parte de las células al medio de incubación.

Por otra parte, en presencia de

substratos protectores de este efecto deplecionador, el índice de liberación enzimática disminuye.

El estado funcional de la célula se pone en peligro después de bajar el GSH por debajo del 50% de su nivel fisiológico (Gillette y otros - 1.975). La importancia de las propiedades metabólicas y de tóxicos que tiene el glutatión en la célula lo convierten en una molécula indispensable para el normal funcionamiento de la misma.

Pero además de todas las propiedades que revisamos en la introducción de este trabajo, existen numerosas pruebas experimentales que evidencian su importancia y que estudian las consecuencias de la depleción del GSH en las células y otros órganos.

La hipótesis de que la deficiencia de glutatión no es compatible con la supervivencia de las células es hoy bastante aceptada (Högberg y otros 1.977). Según trabajos realizados por estos autores la incubación de hepatocitos aislados deplecionados de GSH en un medio libre de aminoácidos a 37° C se sigue de la lisis de los mismos. En un primer estadio, después de la depleción del GSH, las células pierden su capacidad para resintetizar glutatión a partir de metionina cuando este aminoácido se añade al medio de incubación. Un segundo estadio se caracteriza por el acúmulo de aldehído malónico en el interior de las células, lo que indica que se está produciendo la lipoperoxidación de sus membranas.



Por último, y durante el tercer estadio se produce la lisis celular.

Brodie y cols. demostraron que - la depleción del reservorio de glutatión en el hígado se acompaña de la necrosis hepática (Gillette y otros 1.975).

Si bien no existe prueba directa de que la disminución del GSH tenga efecto alguno sobre la función metabólica de la célula, en nuestras - experiencias comprobamos la disminución de la velocidad de ureogénesis y gluconeogénesis en presencia de cisteína 4 mM. Este efecto podría ser atribuido tam - bién a la disminución de la concentración del ATP, - así como la capacidad para su síntesis.

Existen pruebas experimentales - que demuestran la alteración de la respuesta respira - toria de las mitocondrias cuando la concentración de ATP celular está por debajo del 35% de su nivel fisiológico. A este nivel, la generación de energía via - respiración por parte de la mitocondria está alterada (Farber 1.973).

Por otra parte y como proponen - Dickson y Pogson, el contenido de ATP puede ser utili - zado como índice de la capacidad metabólica de los he - patocitos durante el tiempo de incubación (Dickson y Pogson 1.977).

En las TABLAS R-4, R-5, R-6 y R-9, puede observarse una disminución de la concentración de ATP hasta valores por debajo del 20% en presencia de cisteína o cisteína más cloruro amónico y cobre. Sin embargo si bien es cierto que esta molécula es importante para el suministro energético del metabolismo celular, no parece haber una relación directa entre la disminución de este nucleótido y la integridad celular. En este caso, la alteración de la membrana por un agente externo sí puede estar relacionada con el gasto de ATP que se produce en el mantenimiento de la permeabilidad celular. Sería pues un efecto secundario a la depleción del glutatión reducido y alteración de la membrana por parte de la cisteína.

## 2.2. Importancia de la situación nutricional del animal sobre la citotoxicidad de la cisteína.

El papel que juega el estado nutricional de la rata sobre el efecto citotóxico de la cisteína, puede verse claramente en la TABLA R-3 donde los niveles de ATP en las células de ratas alimentadas ad libitum son más resistentes al efecto deplecionador de la cisteína y el cloruro amónico, manteniéndose los valores de este nucleótido por encima del 70% de su valor inicial.

Un efecto similar se observa con

el glutation reducido cuya concentración en las células de rata normalmente alimentada es superior al de las ratas ayunadas.

Así, mientras los hepatocitos de células procedentes de rata alimentada contienen 4,38  $\mu$ moles de GSH/grs.células, en los de rata en ayunas - de 48 horas se cuantifica aproximadamente un 75 a 60% de este valor, es decir entre 3,30 y 2,63  $\mu$ moles de GSH/grs.células. Por lo tanto, es de esperar que las células con mayor contenido en glutation tengan mayor poder detoxificante siendo más resistentes al efecto de la cisteína.

Además de los niveles altos de GSH y ATP, las células alimentadas presentan también un mayor contenido lipídico que permite a la célula - un mejor recambio de los mismos en aquellas situaciones en que se ven amenazadas los ácidos grasos de la membrana celular. Es decir, las células alimentadas serán también más resistentes al efecto de la cisteína, el  $\text{ClNH}_4$  y  $\text{SO}_4\text{Cu}$  debido a su reserva lipídica intracelular. Ello se deduce de los resultados obtenidos sobre la captación de azul tripano o bien de LDH liberada que siempre es inferior en la rata alimentada.

Otro factor de importancia, lo constituye el medio en el que se lleva a cabo las incubaciones celulares.

Para nuestras experiencias, utilizamos el medio salino Krebs-Henseleit con calcio y añadimos distintos tipos de albumina a las incubaciones (Krebs y Henseleit 1.932).

La albumina la añadimos para asegurar la buena distribución de células, evitando así que estas se aglutinen además de su efecto protector sobre todo en presencia de oleato y otros substratos que sirven como fuel en la respiración de las células hepáticas aisladas (Krebs y otros 1.974).

En definitiva, el tratamiento de los animales así como de las células extraídas de los mismos es un factor clave en la reproducción de los efectos observados.

Esta es la razón, por la cual Beatty y Reed (1981) no observaron la depleción de GSH u otros signos de daño celular en hepatocitos aislados de la rata incubados con cisteína 3 mM. Esto se explica en parte, por la diferencia de las condiciones en que se llevaron a cabo dichas experiencias.

Así por ejemplo, Beatty y Reed utilizaron suero de feto de terrero que contiene según Krebs, Cornell, Lund y Hens, 18 mM de lactato y sólo 12,3 mM de bicarbonato además de otras concentraciones anormales de diversos substratos.

En las TABLAS R-5 y R-6 se encuentra el efecto protector debido al lactato sobre la citotoxicidad de la cisteína.

Por otra parte, estas condiciones pueden enlentecer la autooxidación de la cisteína, y de hecho, ambos autores han obtenido una velocidad de oxidación de cisteína de 30 nanomoles/minuto.

En nuestras experiencias, por el contrario, esta velocidad es superior a los 200 nanomoles/minuto, siendo la rápida oxidación de la cisteína indispensable para el desencadenamiento de su citotoxicidad.

La albumina, que no fué utilizada por Beatty y Reed en sus experiencias, juega también un importante papel en la oxidación espontánea del aminoácido al contener la fracción V de la misma 17  $\mu$ moles/ml. de cobre (Solución al 10%).

Después de una prolongada diálisis, este valor tan sólo se redujo al 10  $\mu$ moles de cobre/ml. Es lógico pensar que la albumina al mismo tiempo que facilita la distribución homogénea de las células facilite la oxidación de la cisteína.

### 2.3. El efecto de los radicales libres sobre los hepatocitos.

El efecto de los radicales libres sobre los sistemas biológicos, es en la actualidad, tema de estudio de muchos autores y ocupa un lugar destacado en el campo de la toxicología. Están dotados de alta reactividad siendo ésta la causa de su efecto citotóxico.

Las imágenes de los radicales detectados por r.p.e. se ven aumentadas en presencia de cobre o hierro y como muestra la FIGURA R-10 son captados por los hepatocitos aislados de la rata, desapareciendo la imagen de la aducción DMPO-OH y reduciéndose la señal DMPO-Cys aproximadamente en un 30%. Los hepatocitos aislados no presentan imagen alguna y sí un ruido de fondo que se muestra en la misma figura.

El efecto de estos radicales, producidos a partir de la oxidación de la cisteína, se traduce a nivel de las células hepáticas por una depleción de GSH, una disminución de ATP y una liberación masiva de LDH por parte de las mismas. Es decir, tanto el funcionamiento metabólico como la integridad celular se ven comprometidas en presencia de cisteína y otros agentes potenciadores de su efecto como son el  $\text{ClNH}_4$  y el  $\text{SO}_4\text{Cu}$ . El efecto citotóxico del radical OH· sobre los sistemas biológicos es muy conocido -

(Winterbourn 1.979; Repine y otros 1.981; Youngman - 1.981; Simon y otros 1.981).

A pesar de no haber sido posible la detección del radical superóxido  $O_2^-$  no se descarta su participación en este mecanismo citotóxico de la cisteína, sobre todo debido a su propiedad para producir también radicales  $OH^\cdot$  (Halliwell 1.982).

### 3. CONSIDERACIONES ACERCA DE LA ADMINISTRACION DE CISTEINA A ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y SERES HUMANOS. CONSECUENCIAS PRACTICAS.

Los resultados obtenidos con cisteína en presencia de hepatocitos han sido también comprobados "in vivo" mediante la inyección intraperitoneal de altas dosis de este aminoácido en ratas y posterior determinación del GSH y el ATP hepático utilizando la técnica de Freeze-Clamped, TABLA D-1.

Así, la inyección intraperitoneal de 1 gr. de cisteína/Kgr.peso corporal, produce la depleción tanto del GSH como del ATP en el hígado de la rata, (TABLA D-1). Esta disminución, se mantiene hasta 6 horas después de la administración de cisteína.

La concentración de ATP, se mantiene baja a las dos horas de la inyección y se recupera lentamente. Por el contrario, esta disminución de

TABLA D-1

EFFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE CISTEINA (1 gr./Kgr. peso corporal) SOBRE EL CONTENIDO DE GSH Y NUCLEOTIDOS ADENILICOS EN EL HIGADO DE LA RATA.

HRS. DESPUES DE LA INYECCION	$\mu$ moles/gr. tejido				
	GSH	ATP	ADP	AMP	N.A.TOTALES
Control	5.9 $\pm$ 0.3 (10)	2.53	0.94	0.21	3.68
2	2.7 $\pm$ 0.7 (6)	1.20 $\pm$ 0.22 (3)	1.71 $\pm$ 0.07(3)	0.88 $\pm$ 0.22 (3)	3.78 $\pm$ 0.08 (3)
4	2.9 $\pm$ 0.5 (5)	1.39 $\pm$ 0.18 (3)	1.95 $\pm$ 0.14(3)	0.85 $\pm$ 0.05 (3)	4.19 $\pm$ 0.22 (3)
6	2.32 $\pm$ 0.6 (4)	1.93 $\pm$ 0.20 (3)	1.96 $\pm$ 0.18(3)	0.55 $\pm$ 0.06 (3)	4.43 $\pm$ 0.22 (3)



los niveles de ATP se acompañan de un aumento de las concentraciones de ADP, AMP y nucleótidos totales. Las variaciones de los nucleótidos adenílicos, que sufren los hepatocitos cuando se incuban en presencia de cisteína 4 mM han sido representadas gráficamente en función del tiempo (FIGURA F-3 y TABLA D-2)

Se sabe por otra parte, que dosis altas de cisteína pueden ser tóxicas para las ratas (Birnbbaum y otros 1957; Olney y otros 1971).

Tambien es conocido, como indicabamos anteriormente, el poder bactericida de la cisteína incubada en presencia de cobre y en una atmósfera rica en oxígeno (Carlson y otros 1979; Nyberg y otros 1979), así como su poder destructor de liposomas (Tien y otros 1982) con  $H_2O_2$  como intermediario común en ambos procesos destructivos.

Por otra parte, se han publicado algunos trabajos acerca de la toxicidad producida a partir de derivados farmacológicos de la cisteína. Así, en la intoxicación consecutiva a una ingesta masiva de paracetamol, se administra N-acetilcisteína como antídoto (Prescott 1977 y 1980; Vale y otros 1979; Piperino 1976). Este tratamiento es frecuentemente seguido de un cuadro de insuficiencia hepática en aquellos pacientes tratados con N-acetilcisteína.

Se sabe que la inyección intraperitoneal de acetaminofen (paracetamol, 0,5 gr./Kgr.) a

TABLA D-2

EVOLUCION EN EL TIEMPO DE LA CONCENTRACION DE NUCLEOTIDOS ADENILICOS EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS INCUBADOS CON CISTEINA 4 mM.

TIEMPO DE INCUBACION EN MINUTOS	$\mu\text{moles/gr.células}$			
	ATP	ADP	AMP	N.A. TOTALES
0	1.99 $\pm$ 0.11(3)	1.20 $\pm$ 0.04(4)	0.30 $\pm$ 0.04(4)	3.48 $\pm$ 0.07(3)
5	1.20 $\pm$ 0.15(4)	1.47 $\pm$ 0.21(3)	0.64 $\pm$ 0.10(4)	3.27 $\pm$ 0.31(3)
10	0.52 $\pm$ 0.13(4)	1.59 $\pm$ 0.07(3)	0.93 $\pm$ 0.20(4)	3.03 $\pm$ 0.30(3)
20	0.34 $\pm$ 0.11(4)	1.23 $\pm$ 0.20(3)	1.19 $\pm$ 0.25(4)	2.68 $\pm$ 0.17(3)
30	0.11 $\pm$ 0.05(4)	0.91 $\pm$ 0.18(3)	0.39 $\pm$ 0.13(4)	1.34 $\pm$ 0.21(3)

FIGURA D-3

EVOLUCION EN EL TIEMPO DE LA CONCENTRACION DE NUCLEOTIDOS ADENILICOS EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS INCUBADOS CON CISTEINA 4 mM.

$\mu\text{moles}$   
gr.

2  
ATP

1,5

ADP

1

0,5

AMP

5

10

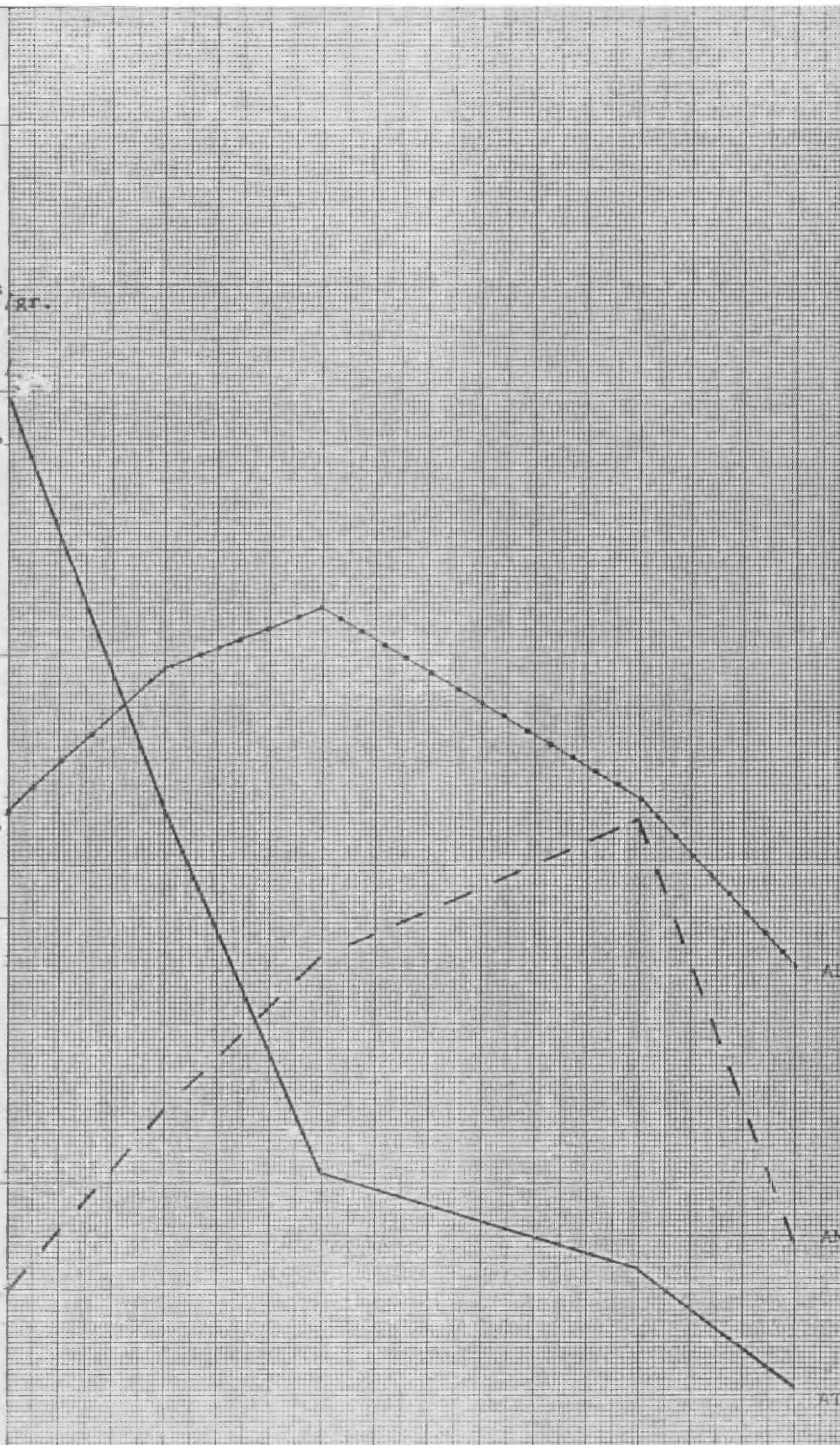
15

20

30

- 249 -

T



ratas, provoca la disminución del GSH por debajo de - sus niveles fisiológicos.

Este efecto que se agrava con la administración de N-acetilcisteína puede prevenirse - mediante la inyección de metionina (1 gr./Kgr.)(Viña y otros 1.980). Otros autores han demostrado que la metionina es mejor antídoto que la cisteína en procesos tóxicos que se acompañan de la disminución del - GSH tanto a nivel celular (Thor y otros 1.978) como - orgánico (Mc Lean y Day 1.975).

Por su parte Olney demostró el efecto letal producido por la cisteína administrada a dosis altas a ratas jóvenes mientras que la administración de dosis subletales les producía un síndrome neurovegetativo diseminado (Olney y Ho 1.972).

Nosotros hemos observado la producción de radicales libres, durante la oxidación de la cisteína y el efecto citotóxico que estos producen sobre los hepatocitos aislados de rata. Por todo ello, sugerimos la reconsideración de la utilización de cisteína y sus derivados en animales de experimentación y como agente terapéutico en seres humanos.

CONCLUSIONES

1. La incubación de hepatocitos aislados de rata con cisteína, a concentraciones de 1 mM o mayores, induce la depleción de GSH y ATP, así como la liberación de enzimas citosólicas en las células, lo cual indica un efecto citotóxico por parte de este aminoácido.
2. Este efecto citotóxico se potencia en presencia de cloruro amónico y trazas de ion cobre.
3. La catalasa protege contra la citotoxicidad de la cisteína. Los hechos expuestos indican que el efecto tóxico de la cisteína es consecuencia de su autooxidación.
4. La autooxidación de la cisteína conduce a la formación de agua oxigenada y de radicales libres tipo hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y tiilo ( $\text{RS}\cdot$ ).
5. La aparición de estos radicales libres está potenciada por trazas de metales pesados (Cu y Fe) e inhibida por quelantes de metales pesados (DETAPAC).
6. La catalasa inhibe la formación de los radicales libres producidos por la oxidación espontánea de la cisteína.

7. De lo anteriormente expuesto, podemos deducir que los radicales libres son los responsables de la citotoxicidad de la cisteína ya que estos radicales se captan por los hepatocitos aislados de la rata.
  
8. Los hechos enumerados en la presente Tesis pueden tener considerable aplicación práctica ya que la cisteína o sus derivados se usan como antídotos contra la intoxicación por paracetamol y como agentes mucolíticos. Un exceso de estos farmacos pueden tener consecuencias lesivas para el hígado u otros organos.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABDERHALDEN E.; WERTHEIMER E.: Arch. Ges. Physiol. (Pflüger's) 197, 131 (1.922) 199, 336 (1.923). Cita do por Taylor Yan Wang en Fe III Catalyzed Oxida - tion of Cyteine.
- 2.- ADAMS G.E.; BOAG S.W.; CURRANT J.; MICHAEL B.D. en Pulse radiolisis pg. 131. Eds. M. Ebert y otros - Academia Press Londres y Nueva York (1.965).
- 3.- ADAMS, G.E.; ARMSTRONG, R.; CHARLESBURY, A.; MICHAEL B.D. AND WILSON, R.L.: Trans. Faraday Soc. 65, 732 (1.969). The Production Of Free Radicals During The Autoxidation Of Cysteine And Their Effect Isolated Rat Hepatocytes, Biochm. Biophys. Act. 719, 24-31 - (1.982).
- 4.- AEBI H.; SUTER H. AND FEINSTEIN R.N: Biochem. Genet 2, 245-257 (1.968): "Activity and Stability Of Cata - lasa in blood and tissues of normal and acatalase - mic mice".
- 5.- AEBI, H.; SUTER, H.: "Protective Function of redu - ced glutathione (GSH) against, the effect of pro - oxidative substances and of irradiation in the red cells" (1.974). En: Proceedings of the XVI Confe - rence of the German Society of biologicas Chemis - try. Ed.: Flohé y otros. Thieme. Stuttgart (1.974).
- 6.- ALLEN J.E.; D.B.P. GOODMAN; A. BESARADS, AND H. - RASMUSSEN: Biochim-Biophys. Acta 320, 708 (1.973).

Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology".  
Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic Press  
New York 1.976.

- 7.- ANBAR M., NETA P.: Int. J. Appl. Radiat. Isotop.  
18, 493 (1.967): Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by Willian A. -  
Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 8.- ATKINSON, D.E.: Biochemistry 7, 4030-4034 (1.968).  
"The Energy charge of the adenylate pool as a regu-  
latory parameter. Interaction with feed-back modi-  
fiers".
- 9.- BACQ, Z.M.; GOUTIER, R.: "Mechanisms of action of  
sulfur containing radioprotectors". En: Recovery  
and repair mechanisms in radiobiology. Simposia  
in Biology n° 20 pg. 241; Brookharen (1.967).
- 10.- BAILEY P.S.; KELLER J.E.: J.Org. Chem. 33, 2680  
(1.968): Ozonation of Amines. III. t-Butylamine.
- 11.- BANNISTER W.H.; Y BANNISTER, J.V.; eds. "Psiolo-  
gical and clinical aspects of superoxide and su-  
peroxide dismutase". (1.980). New York: Elsevier.
- 12.- BARBER A.A.: Lipids 1, 146 (1.966). Citado por -  
Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. -  
Edited by Willian A. Pryor. Academic Press New -  
York (1.976)

- 13.- BARBERANA, y BERNHEIM: Advan. Gerontol. Res. 2 355 (1.967). Lipid Peroxidation: ist measurement, occurrence and significance in animal tissue.
- 14.- BARRON, E.S.G.: The effect of X rays on systems of biological importance. En: Radiation Biology pag. 283. Ed.: A: Hollaender. McGraw Hill, Nueva York (1.950).
- 15.- BARTON, J.P.; Y PACKER, J.E.: Int. J. Radiat. - Phys. Chem. 2 159-166 (1.970). Citado por Sáez en: "The Production of Free Radicals during the Auto-oxidation of Cysteine and their effect Isolated Rat Hepatocytes. Biochem. Biophys. Act. 719 24-31,(1982).
- 16.- BATEMAN L., GEE G., MORRIS A.L. y WATSON W.: Discuss. Faraday Soc. 10 250 (1.951). The Velocity coefficients of the Chain propagation and termination reactions in olefin oxidation in liquid systems.
- 17.- BATEMAN L., y MORRIS A.L.: Trans. Faraday. Soc. 49 1026 (1.953). The Autoxidation of 2: 6-Dimehyl -hepta-2: 5-Diene.
- 18.- BEATTY P.; REDD, D.: Arch. Biochem and Biophys. - 204, 80-87 (1.980). Involvement of the Cystathionine Pathway in the Biosynthesis of Glutathione - by isolated Rat. hepatocytes.

- 19.- BEATTY P. Y DONALD J. REED: Biochem. Pharmacology 30, 1227-1230 (1.981). Influence of Cysteine upon the Glutathione status of isolated rat hepatocytes.
- 20.- BEAUCHAMP, C. Y FRIDOVICH, I.: J. Biol.Chem. 245: 4641-4646, (1.970). A mechanism for the production of Ethylene from methional.
- 21.- BEINHERT H., y PALMER G.: Advan. Enzymol. 27, 105, (1.965). Citado por Pryor en: "Free Radicals in - Biology". Vol. I. Edited by Willian A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 22.- BEINERT H.: En: "Biological Application of Electron Spin Resonance" (H.M. Swartz, J.R. Bolton, - and D.C. Borg eds.) pg. 351, Wiley (Interscience). New York, (1.972).
- 23.- BENSON S.W.: J. Chem. Phys. 40, 1007 (1.964). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". - Vol.I. Edited by Willian A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 24.- BENSON S.W.: J. Chem. Phys. 40 1007 (1.964). Kinetics of Phyrolysis of Alkyl Hydroperoxides and their O-O Bond Dissociation energies.
- 25.- BENSON S.W.: "Thermochemical Kinetics". Wiley, New York 1.968.

- 26.- BERGMAYER, H.V.; GAWETA, K. Y GRASSL, M.: In -  
 Methods of enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.V.  
 eds.) Academic Press, New York, 2 ind. ed. pg.  
 481 (1.963).
- 27.- BERNHEIM F. BERNHEIM M.L.C. Y WILBUR K.M.: J.  
 Biol. Chem. 174, 257 (1.945). The reaction bet-  
 ween thiobarbituric and the oxidation products  
 of certain lipids.
- 28.- BERNINI, L. Y COL.: Brit. J. Hematol. 10, 171  
 (1964). Survival of <sup>51</sup>C labelled red cells in  
 subjects with talasemia-trait or G6PD deficiency  
 or both abnormalities.
- 29.- BERRY, M.N. FRIEND, DS.: J. Cell. Biol., 43, 506-  
 -520, High Yield preparation of isolated rat li-  
 ver parenchymal cells.
- 30.- BIELSKI, B.H.J. Y ALLEN A.O.: J. Phys. Chem. 81  
 1048-1050 (1.977). Citado por Sáez en: "The -  
 Production of Free Radicals during the Autooxi-  
 dation of Cysteine and their effect Isolated rat  
 Hepatocytes. Biochem. Biophys. Act. 719 24-31,  
 (1.982)
- 31.- BIELSKI, B.H.J. Y SHINE, G.G. En: Oxygen Free -  
 Radicals and Tissue Damage. Ciba Foundation Symp.  
 Nº. 65, pg. 43-47. Excerpta Medica, New York -  
 (1.979).

- 32.- BIRNBAUM, S.M.; WINTA, W. Y GREENSLEIN, J.P.:  
Arch. Biochem. Biophys. 73 428-436 (1.957).  
Toxicity of relatively low doses of Cysteine  
on Rats.
- 33.- BJORKSTEN, J.: J. Amer. Geriat. Soc. 16 408 -  
(1.968). Citado por Pryor en: "Free Radicals in  
Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor. -  
Academic Press New York 1.976.
- 34.- BLOIS, M.S.; H.W. BROWN; R.M. LEMMON; R.O. LIND-  
BLOM Y M. WEISSBLUTH eds.: "Free Radicals in  
Biologicas Systems". Academic Press, New York -  
(1.961).
- 35.- BONNET, R.; BROWN, R.F.C.; SUTHERLAND, I.P. Y -  
TODD, A.: J. Chem. Soc. 2094 (1.959). Experiments  
Towards the synthesis of amins. Part. II. The Pre-  
paration and Reactions of  $\Delta^1$ -Pyrroline 1-Oxides.
- 36.- BOVERIS, A.; OSHIMO N. Y CHANCE B.: Biochem. J.  
128 617-630, (1.972). The Cellular production of  
hydrogen peroxide.
- 37.- BOVERIS, A. Y CHANCE, B.: Biochem J. 134 707-716  
(1.973). The Mitochondrial generation of hidrogen  
peroxide. General properties and effect of hyper-  
baric oxygen.

- 38.- BROWN, I.W. Jr.; Y B.G. COX eds.: "Hyperbaric Medicine". Nat. Acad. Sci. Nat. Res. Counc. - Washintong, D.C. 1.966. Citado por Pryor en : "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by - Willian A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 39.- BURKHARTER: J. Phys. Chem. 73 2703 (1.969). - Radica-Radical Reactions in different solvents Propyl, Cyclohexyl and Benzyl Radicals.
- 40.- CALLOW A.B.: (1.923). On Catalase in bacteria - and its relation to anaerobiosis. J. Pathol. - Bacteriol. 26 320-325.
- 41.- CARLSSON, GUNWAR, P.D. GRANBERG; GORANK. NYBERG Y MAJ-BRITT K. EDLUND.: Applied and Environmental Microbiology 37, nº 3 383-390 (1.979). - Bactericidat effect of Cyteine Exposed to atmospheric Oxygen.
- 42.- CAVALLINI, D.; C.DE MARCO; S. DUPRE Y G. ROTILIS: Arch. Biochem. Biophys. 130 354-361, (1.969). The copper catalysed the oxidation of Cyst. to cystine.
- 43.- CHAO S.C. y JAFFES: J. Chem Phys. 56, 1987, - (1.972). Gas-Phase Reaction of. NO<sub>2</sub> and Ethylene at. 25° C.



- 44.- CHANCE B.: Acta Chem. Scand. 1 236-267 (1.947).  
An Intermediate compound in the catalasehydrogen peroxide reaction.
- 45.- CHANCE B.: En: "Free Radicals in Biological Systems". M.S. Blois, Jr. et. al. eds. p.1. Academic Press New York (1.961).
- 46.- CHANCE B.; BOVERIS, A.; OSHIMO N. Y LOSCHEM G.:  
The nature of the catalase intermediate in its biological function. En: "Oxidases and Related Redox Systems". Edited by T.E. King H.S. Hason and M. Morrison Baltimore: University Park Press (1.973) pg. 350-353.
- 47.- CHANCE B.; SIES, H. Y BOVERIS, A.: Physiol. Rev. 59, nº 3 (1.979). Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs.
- 48.- CHASSEAUD, L.F.: Biochem. J. 131, 765 (1.973). - Distribution of enzymes that catalyse reaction of glutathione with unsaturated compound.
- 49.- CHASSEAUD, L.F.: Proceedings of the XVI Conference of the German Society of Biological Chemistry. (1.974). Eds. Folie y otros. Thieme. Stuttgart. Glutathione-S-transferases.
- 50.- CHIO K.S. y TAPPEL A.L.: Biochemistry 8 2821 (1969) Synthesis and characterization of the fluorescent

products derived from imalonaldehyde and amino acids.

- 51.- CHOW, C.K. Y A.L. TAPPEL: Lipids 7, 518-524, - (1.972). An enzymatic protective mechanism VS.- Lipid peroxidation damage to lings of oxygen ex posed rats.
- 52.- COREY, E.L.; BRITTON, S.W.: Amer. Physiol. 131, 783 (1.951). Citado por: Hems, R. y otros (1968), en Biochem. J. 101, 284.
- 53.- CRAWHAL, J.C. Y SEGAL S.: Biochem. J. 105. 891- -896 (1.967). The intracellular ratio of cysteine and cystine in varions tissues.
- 54.- DAHLE L.K., HILL E.G. Y HOLMAN R.T.: Arch. Bio - chem. Biophys. 98, 253-261 (1962). The thiobarbi turic acid reaction and the autoxidation of polyn saturated falty acid methyl esters.
- 55.- DAMAH.YYGRANADOSCH: Acta Physiol. Scand. 10, - 162 (1.945). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. O. Edited by Willian A. Pryor. Academic Pres New York 1.976.
- 56.- DAWSON R.M.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT W.H. Y JONES K.M. Eds. "Data for Biochemical Research" 2nd edition. Clarendon Press Oxford (1.969).

- 57.- BEARDEN, J.C. y ODUSINA, A.: Mech. Ageing Develop 2, 309 (1.973). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 58.- DE DUVE: J. Histochem. Cytochem. 21, 941-948 (1.973). Biochemical Studies on the occurrence, biogenesis and life history of mamalian peroxisomes.
- 59.- DE DUVE, G.: En: "Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems". (R.G. Thurman et al, eds.)pg. 161, Academic Press New York (1.974).
- 60.- DICKSON A.J.; POGSON C.I.: Febs Letters 83, 27 (1.977). The Metabolic integrity of hepatocytes in sustained incubations.
- 61.- DI LUZIO, N.R.: Fred. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 32, 1875, (1.973). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 62.- DOUZE, J.M.C.: Hexagon Roche 9, n° 6 18-24 (1981) Oxigen Life saver or cause of death?
- 63.- EGGLESTON L.V. Y H.A. KREBS: Biochem J. 138, 425-435. Regulation of the pentose phosphate cycle.
- 64.- EIBEN, R.W. FESSENDEN: J. Phys. Chem. 72 3387 -

(1.968). Electron Spin Resonance Studies of Radio-lytically Produced Radicals in Aqueous Nitroalkane Solutions.

- 65.- ELDEN, H.R. Y RIZER, R.L.: Comunicación presentada en el Congreso de 1.970 de la Sociedad Gerontológica. Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol.I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 66.- ELIAKIM, M. ESHCHAR J. Y ZIMMERMAN H.J. Eds.: - "International Symposium on Hepatotoxicity". Academic Press Inc. Nueva York (1.973).
- 67.- ERNEST, M.J. Y KIM, K.M.: J. Biol Chem. 248, 1550 (1.973). Regulation of rat liver glucogen synthetase. "Reversible inactivation of glycogen synthetase by sulphidryldisulfide exchange".
- 68.- ESTEFAN R.M., GUASE, E.M.; ROWLANDS, J.R.: Environ. Res. 3, 62 (1.970). Electron spin resonance and optical stuchez of the interaction between  $\text{NO}_2$  - and insaturated lipid components.
- 69.- EVANS, T.A.C. Y R.N. FEINSTEIN Eds.: "Implications - of Organic Peroxides in Radiobiology". Radiat. - Res. Supple. 3 Academic Press. New York 1.963.
- 70.- FEE, J.A., Y VALENTINE J.S.: En: Michelson A.M. - Mc Cord J.M. and Fridovich I. eds. "Superoxide and

Superoxide Dismutases". Academic Press New York (1.977).

- 71.- FARBER, En: Ped. Proc. 32, 1534- 1539 (1.973).  
ATP and cell integrity.
- 72.- FEE, J.A. En:"Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase". (Bannister W.H. and Bannister J.V. eds.) pg. 41-48, Elsevier/ North-Holland Amsterdam. New York (1.980).
- 73.- FEINSTEIN R.N., Ed. Implications of Organic Peroxides in Radiobiology Radiat. Res Suppl. 3 Academic Press. New York 1.963.
- 74.- FINKELSTEIN, E.; ROSEN, G.H.; Y RANCSMAN, E.J.:  
J. Amer. Chem.Soc. 102, 4994-4999. Spin Trapping. Kinetics of the Reaction of Superoxide and Hydroxyl Radicals with nitrones.
- 75.- FINKELSTEIN, E.; ROSEN, G.M.; Y RAUCHMAN, E.J.:  
Arch. Biochem. Biophys. 200, 1-16. Citado por Sáez en: "The Production of Free Radicals during the Autooxidation of cysteine and their effect - Isolated Rat Hepatocytes. Biochem. Biophys. Act. 719 24-31, (1.982).
- 76.- FISHER H.F., E.E. CONN, B. VENNESLAND Y F.H. - WESTHEIMER.: J. Biol. Chem. 202 687. (1953). Citado por Pryor en : "Free Radicals in Biology".

Vol.I. Edited by William A. Pryor. Academic Press  
New York 1.976.

- 77.- FLOHE, L.: KLIM. Wochenschr. 49; 669-683 (1.971).  
Die Glutathionperoxidase. Enzymologie und Biolo -  
gische Aspekte.
- 78.- FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Y SCHOCK H.H.: Febs Lett  
32 132-134 (1.973). Glutathione Peroxidase: A Se-  
leno-enzyme.
- 79.- FLOHE, L. Y SCHLEGEL, W.: Glutathione Peroxidase  
IV Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 352, 1401-1410.  
(1.971).
- 80.- FLOHE, L.; EISELE, B. WENDEL, A.: Hoppe-Syeler's Z.  
Physiol. Che. 352, 151-158 (1.971). Glutathione-  
-Peroxidase. I. Reindarstellung und Molekularger-  
vichtsbestimmungen.
- 81.- FONG, K.L.; Mc CAY, P.B.; POYER, J.L.; KEELE, B.B.;  
Y MISRA H.: J. Biol. Chem. 248, 7792-7797 (1.973).  
Evidence that peroxidation of lysosomal membranes  
is initiated by hidroxyl free radicals produced du-  
ring flavin enzyme activity.
- 82.- FRANKS, F.; M. GENT Y B. ROBERTS: J. Appl. Chem. -  
15 243 (1.965). Quantitatise study of the oxidati  
ve discoloration of Ethyl linoleate. III. Some -

Kinetics aspects of the early stages of the hydroperoxidation reaction.

- 83.- FRIDOWICH I.: Science 201, 875-880, (1.978). The Biology of oxigen radicals.
- 84.- GATUHER H.E.; HAFEMAN D.G.; LAWRENCE R.A.; SERFASS R.E. Y HOEKSTRA, W.G.: Selenium and Glutathione peroxidase in health and disease. a review. En: "Trace elements in human health and desease - essential and toxic elementes". Edited by A.S.- Prasad and D. Oberleas. New York. Academic (1976) Vol. 02. pg. 165-235.
- 85.- GERVE, E.G.J.: Biol chem. 92, 399(1.931). Citado por Taylor E. Jhonson F. Yan and Yin Liang Wang in "The Iron (III). Cataluzed oxiadion of Cysteine by Molecular oxygen in the aqueous phase. An example of two-thirds-order reaction". J.Am. Soc. 88, 8 (1.966).
- 86.- GOLDSTEIN B.D.; LODI C.; COLLISON C. Y BALCHUM O.J.: Arch. Environ. Health 18, 631 (1.969). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". - Vol, I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 87.- GOLDBERG L.: Biochemical Journal 83, 291 (1.962). Biochemical. Changes in the Tissues of animals.

Injected with Iron.

- 88.- GOLDBERG, L.: Nature 179, 734 (1.957). Cited by Pryor in: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic Press - New York 1.976.
- 89.- GORDY, W.: "Theory and Applications of electron Spin Resonance". Techniques of Chemistry Vol. - XV (W. West ed.). Wiley-Interscience, New York (1.980).
- 90.- GRANKVIST, K.: Biochem. J. 200, 685-690 (1.981). Alloxan-induced luminol luminescence as a tool for investigating mechanisms of radical-mediated diabetogenicity.
- 91.- GREENBERG, D.M.: Ann. Rev. Biochem 33 , 633-666 (1.964). Amino acid metabolism.
- 92.- GREENBERG, D.M.: Biosynthesis of cysteine and cystine. In: Metabolic Pathways Vol. VII: Metabolism of sulphur compounds. Green D.M. (ed.) - pg. 505-528. Academic Press New York (1.975).
- 93.- GREGORY, E.M. Y FRIDOVICH, I.: J. Bacteriol. - 114, 1193-1197 (1.973). Oxygen toxicity and the Superoxide dismutase.



- 94.- GUILLETTE, J.R.; MITCHELL, J.R.; BRODIE, B.B.:  
Ann. Rev. Pharmacol. 14, 271-289 (1.975). Bio-  
chemical mechanism of drug toxicity.
- 95.- GUTTERIDGE, J.M.C.; ROWLEY, D.A.; HALLIWELL, B.:  
Biochem. J. 199 263-265 (1.981). Superoxide-de-  
pendent formation of hydroxyl radicals in the -  
presence of iron salts.
- 96.- HABER, F. Y WEISS: Proc. Roy. Soc. (London). -  
A 147, 332-351 (1.934). The Catalytic descompo-  
sition of hydrogen peroxide by iron salts.
- 97.- HALLIWELL, B.: Biochem J: Letters 205, N° 2 -  
462-463 (1.982). Superoxide Dependent formation  
of hydroxyl radicals in the presence of iron -  
salts is a feasible source of hydroxyl radicals  
in vivo.
- 98.- HALLIWELL, B.: Tibs 7, N° 8 (1.982). Superoxide  
and hiperoxide dependent formation of hydroxyl  
radicals are important in oxigen toxicity.
- 99.- HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B.; BJORKHEM, I. Y -  
DANIELSSON H.: En: "Molecular Mechanisms of -  
oxygen activation". (O.Hayaishi ed.) pg. 20. -  
Academic Press, New York (1.974).
- 100.- HARTER, P.; WEBER, V.: Proceedings of the XVI  
Conference of the German Society of Biological

Chemistry. Pg. 29. Ed. Flohé y otros. Thieme. Stuttgart (1.974). "The tiol disulfide exchange reaction of asymmetric disulfides of cysteine and cysteine peptides with GSH."

- 101.- HARRINGTON, C.R.; MEAD, T.H.: Biochem. J. 29, 1602 (1.935). Synthesis of glutathione.
- 102.- HARRISON, D.C.; THURLOW, S.: Biochem. J. 20, 218-231 (1.926). The secondary oxidation of some substances of physiological interest.
- 103.-HEMS, R; ROSS, B.D.; BERRY, M.N.; KREBS, H.A.: Biochem J. 101, 284 (1.966). Gluconeogenesis in the perfused rat liver.
- 104.- HIATT, R.: En: "Organic Peroxides". (D.Swern ed.) Vol. II. pg. 1 Wiley. (Interscience) New York, - 1.971.
- 105.- HILL, H.A.O.: Phil. Trans. R.Soc. Lond. B. 294 119-128 (1.981). Oxygen Oxidases and the essential trace metals.
- 106.- HITCHOCK, M.A. Y F.A.; BERT, P.: "Barometric - Pressure: Researches in Experimental Physidogy". Translated by M.A. and F.A. Hitchcock columbers, O.H.: College Book, Co. 1943, pg. 709-851.

- 107.- HOGBERG, J.; KRISTOFERSON, A.: Eur. J. Biochem. 74, 77 (1.977). A. Correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes.
- 108.- HORGAN, V.J.: Biochem. Journal, 67 551 (1.957). Toxicity of Autoxidized Squalene and Linoleic acid of simpler Peroxides in relation to toxicity of Radiation.
- 109.-HOPKINS, F.G.: J.Biol.Chem.84, 269 (1.929). Cited por Meister, A., Tate, S., en Annu. Rev. Biochem. 927, 559 (1.976).
- 110.- HOPKINS, F.G.: Biochem. J. 15, 286 (1.921). Cited por Meister, A. Tate, S. Annu. Rev. Biochem 927, 559 (1.976).
- 111.- HOWARD, J.A.: En: "Free Radicals". (J.K.Kochied) Vol.2. pg. 3 Wiley (Interscience), New York 1973.
- 112.- HRUBAN, Z.E.; VIGIL, E.L.; SLESERS, A. Y HOPKINS E.: Lab. Invest. 27, 184-191 (1.972). Microbodies. Constituent organelles of animal cells.
- 113.-INGOLD, K.V.: "Lipids and their oxidation". (H.W. Schulz, E.A. Day and R.O. Sinnuber eds.) pg. 93. Avi. Publ. Westport. Connecticut (1.962).

- 114.- JAFFE, E.R.: Blood 35, 116 (1.970). Hereditary hemolytic disorders and enzymatic deficiencies in human erythrocytes.
- 115.- JAMIESON, D.; Y CASS, N.: J. Appl. Physiol. 23 235-242 (1.967). CNS and pulmonary damage in - anesthetized rats exposed to hyperbaric oxygen.
- 116.- JANZEN, E.G.; EVANS, C.A.: J. Amer. Chem. Soc. 95, 8205 (1.973). Rate Constants for spin Trapping tert-Butoxy radicals as studied by electron spin resonance.
- 117.- JANZEN, E.G.: Accounts Chem.Res. 2, 279 (1.969). Cited by Pryor in: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 118.- JANZEN 1.976: In Pryor: "Free Radical in Biology". Vol. 4. pg. 132. "Review of spin trapping in Biology".
- 119.- JOCELYN, P.E.: Radioprotection by thiols and disulphides. In: "Biochemistry of the SH group". pg. 323. Academic Press (1.972).
- 120.- JONKMAN, L.; MULLER, H.: J. Am. Chem. Soc. 93 5833-5838 (1.971). Electron Spin resonance - study of nitroxides formed in the reaction of nitrogen dioxide and nitrogen oxide with styrene.



- 121.- KHANDIVALA, A.; GEE, J.B.L.: Science 182, 1364 (1.973). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol I. Edited by William A. Pryor. - Academic Press New York 1.976.
- 122.- KIMBALL, R.E.; REDDY, K.; PIERCE, T.H.; SCWARTZ, L.W.; MUSTAFA, M.G. Y CROSS, C.E.: Am. J. Physiol 230, 1425-1431 (1.976). Oxygen toxicity: augmentation of antioxidant defense mechanism in rat lung.
- 123.-KLEBANOFF, S.J.: J.Exp. Med. 126, 1063 (1.967), - Iodination of Bacteria: A. Bactericidal Mechanism.
- 124.- KLEBANOFF, S.J. Y CLARK, R.A.: "The neutrophil: Function and clinical disorders". Amsterdam: - North-Holland. (1.978).
- 125.- KLIEGEL, W.; LIEBIGS, J.: Ann. Chem.733, 192 - (1.970). Citado por Thornalley, P.J. en: "Free Radical Introduction during Phenylhydrazine oxidation". Tesis Doctoral. Inorganic Chemistry - Laboratory, University of Oxford South Parks - Road OXI 3OR. Inglaterra.
- 126.- KNOWLES, P.F.; MARSH, D.; RATLLE, H.W.E.: "Magnetic Resonance of Biomolecules". Eds. by Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons.- (1.976).
- 127.- KOSOWER, E.M.: "Molecular Biochemistry". Mc Gray

Hill Ed. New York (1.962).

- 128.- KREBS, H.A.; HENSELEIT, K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 (1.932). Untersuchungen über die Handstoff Bildung in Tierkörper.
- 129.- KREBS, H.A.: Brit. Med. Bull. 9, nº 2, pg. 97-104 (1.953). Some aspects of energy transformation in living matter.
- 130.- KREBS, H.A.; FREEDLAND, R.A.; HEMS, R. Y STUBS, M.: Biochem. J. 112, 117-124 (1.969). Effect of Ethanol on gluconeogenesis from lactate.
- 131.- KREBS, H.A.; CORNELL, N.W.; LUND, P.; HEMS, R.: Alfred Benzon Symp. 6, 726-750 (1.974). Isolated liver cells as experimental material.
- 132.- KREBS, H.A.; HEMS, R.; VIÑA, J.: En: "Functions of glutathione in liver and Kidney". Ed. by H. Sies and A. Wendel Springer Verlag. Berlin--Heidelberg- New York (1.978).
- 133.- LAND, E.J.; SWALLOW, A.J.: Biochem. Biophys., Acta 162, 327 (1.968). One-Electron reactions in Biochemical Systems as studied bu pulse radiolysis.
- 134.- LAMPRECHT, W.; Y TRANTSCHOLD, I.: En: "Methods of Enzymatic Analysis". pg. 453 (1.963). -

Ed. Por Bergmeyer, H.V. New York y Londres. -  
Academis Press.

- 135.- LAWRENCE, R.A. Y BURK, R.F.: J. Nutr. 108, 211-  
-215 (1.978). Species, tissue and subcellular -  
distribution of non se-dependent glutathione pe  
roxidase activty.
- 136.- LAZAROW, P.B. Y DE DUVE, C.: J.Cell.Biol. 59 -  
491-506 (1.973). The synthesis and turnover of  
rat liver peroxisomes IV. Biochemical pathway  
of catalase synthesis.
- 137.- LAZAROW, P.B. Y DE DUVE, C.: Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 73, 2043-2046 (1.976). A fatty acyl-  
-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes:  
enhancement by clofibrate a hypolipidemic drug.
- 138.- LEHNINGER, A.L.: "Bioquimica. Las bases molecu-  
lares de la estructura y función celular". Ed.-  
Omega, S.A. pg. 305-326; 385-406.
- 139.- LIPMAN, F.: Advanc. Enzymol. 1, 99 (1.941). Ci-  
tado por Krebs, H.A. en British Medical Bulletin  
Vol. 9 nº 2, pg. 97-104 (1.953). Some Aspects of  
Energy Transformation in living matter.
- 140.- LI, T.K.; THEORELL, H.: Acta Chem. Scand. 23,  
892 (1.969). Human liver alcohol dehydrogenase:  
inhibition by pyrasole and pyrazole analogs.

- 141.- LITTLE, C.; O'BRIEN, P.J.: Biochem, Biophys. Res Commun 31, 145-150 (1.968). Citado por Sies, H. y Wendel, A. en : "Functions of glutathione in liver and Kidney". Springer-Verlag. Berlin (1978)
- 142.- LO, W.B. Y BLACK, H.S.: Nature 246, 489 (1.973). Inhibition of carcinogen formation in skim irradiated with ultraviolet light.
- 143.- LOSCHEM, G.; FLOHE, L.; CHANCE, B.: Febs. Leh. 18 261-264, (1.971). Respiratory chain linked  $H_2O_2$  production in pigeon heart mitochondria.
- 144.- MANNERVIK: Biochem. Soc. Trans. 3 615 (1.977). Glutathione-dependent enzymes with regulatory properties.
- 145.- MASON, R.J.; STOSSEL, T.P.; VAUGHAN, M.: J. - Clin. Invest. 51 2399 (1.972). Lipids of alveolar macrophages polymorphonuclear leukocytes and their Phagocytic vesicles.
- 146.- MASON, R.P.; COLIN, F. CHIGNELL: Pharmacological Reviews 33, 189 (1.982). Free Radical in Pharmacology and Toxicology-Selected Topics.
- 147.- Mc Cay, J.L.; POYER, P.M.; PFEIFER, H.E.; MAY Y GILLIAM, J.M.: Lipids 6 297 (1.971). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I, Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.



- 148.- Mc CORD, J.M.; FRIDOVICH, I.: J. Biol. Chem. - 244, 6049-6055 (1.969). Superoxide Dismutase. - An enzymic function for ~~exitro~~cuprein (hemocu - prein)
- 149.- Mc KNIGHT, R.C. Y F.E. HUNTER, Jr.: Biochim. Biophys. Acta 98, 640 (1.965). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by Willian A. Pryor. Academic Press New York - 1.976.
- 150.- Mc LEAN, A.E.M. Y DAY, P.A.: Biochem-Pharmac 24 37 (1.975). Citado por Viña, J.; Romero, F.J.; Estrela, J.M. y Viña, J.R. en: Effect of acetaminophen (paracetamol) and its antagonists on glutathione content in rat liver. Biochem. Pharmacol, 29 1968-1970 (1.980).
- 151.- MATHEUS, A.P. Y WALKER, S.: Ibid. 6, 21 289 (1909) Citado por Taylor-Yang-Wang Fe (III) Catalyzed - Oxidation of cysteine by O<sub>2</sub> in the aqueous phase. An example of a two-thirds order reaction. J. Am. Soc. 88 1663-1667 (1.966).
- 152.- MEAD, F.J.: En: "Autoxidation and Autoxidants" - (W.O. Lundberg, ed.). Vol. I. pg. 299. Wiley Intersciencia N.Y. (1.961).
- 153.- MEISTER, A.: Science 180, 33 (1.973). En: The -

Enzymology of amino acid transport. Transport in kidney and probably other tissues is mediated by a cycle of enzymic reactions involving glutathione.

- 154.- MEISTER, A.; TATE, S.: Annu. Rev. Biochem. 927, 559 (1.976). Glutathione and related -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization.
- 155.- MEISTER, A.: The Enzymes 10, 671 3<sup>o</sup> edición - (1974). Citado por Meister, A.; Tate, S. en: - Glutathione and related -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. Annu. Rev. Biochem. 927, 559 (1.976).
- 156.- MICHAELIS, L.: Cold. Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 7, 33 (1.939). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 157.- MILLER, L.L.; BLY, C.G.; WATSON, M.L.; BALE, W. F.: J. Exp. Med. 94, 431 (1.951). The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A. Direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-3-C<sup>14</sup>.
- 158.- MILLS, C.G.: J. Biol. Chem. 229, 189 (1.957). Hemoglobin, I. Glutathione peroxidase an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from -

oxidative breakdown.

- 159.- MILLS, G.C.: Arch. Biochem. Biophys, 86 1-5 - (1.960), Glutathiones peroxidase and the reduction of hydrogen peroxide in animal tissues.
- 160.- MISRA, H.P.: J. Biol. Chem. 249, 2151-2155 (1974) Generation of superoxide radical during the auto oxidation of thiols.
- 161.- MORTIMORE, G.E.: Amer. J. Physiol. 200, 1315 (1961) Effect of insulin on potassium. Transfer in isolated rat liver.
- 162.- MUDD, S.H. Y CANTONI, G.L.: Biological transmethylation, methyl-group neogenesis and other "one carbon" metabolic reactions dependent upon tetrahydrofolic acid. En: Florkin, M. and Stotz, E.H. eds. "Comprehensive Biochemistry", Elsevier. - Amsterdam. pg. 1-47 (1.964).
- 163.- NOHL, H. Y HEGNER, D.: Eur. J. Biochem. 82, 563-567 (1.978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo.
- 164.- NOOMAN, T.R.; FENN, W.O. Y HAEGE, L.: Amer. J. Physiol. 132, 474-488 (1.941). The distribution of injected radioactive potassium in rats.
- 165.- NOVIKOFF, A.B., NOVIKOV, P.M. QUINTANA, N. Y

- DAVIS, C.: J. Histochem. Cytochem. 21 1010-1020 (1.973). Studies on microperoxisomes. IV. Interrelations of microperoxisomes, endoplasmic reticulum and lipofuscin granules.
- 166.- GORAN K. NYBERG; GUNNAR P.D. GRANDBERG; JAN CARLSSON: Applied and environmental microbiology 38, 29-34 (1.979). Bovine Superoxide Dismutase and Copper Ions Potentiale.
- 167.- O'HARA. H.; TERASIMA, T.: Expt. Cell. Res. 58, 182 (1.970). Homogenous differentiations of mammalian cells.
- 168.- OKADA, S.: "Radiation Biochemistry". Vol I. pg. 51. Academic Press. New York, 1970.
- 169.- OLNEY, J.W.; HO, O.L.; RHEE, V.; SCHAINKER, B.: Brain Res. 45, 309 (1.972). Cysteine induced Brain Damage.
- 170.- ORD, M.G.; STOCKEN, L.A.: The Biochemical lesions in vivo and in vitro. En: "Mechanisms in Radiobiology". pg. 259 Eds. M. Errera, A. Forsberg. Academic Press. New York, 1961.
- 171.- ORLOWSKY, M.; MEISTER, A.: Proc. Nat. Ac. Sci. USA 67, 1248 (1.970). The  $\gamma$ -glutamyl cycle. A possible transport system for aminoacids.

- 172.- ORLOWSKI, M. Y KARKOWSKY, A.: Int. Rev. Rev. - Neurobiol. 19, 75 (1.976). Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system.
- 173.- PACHENKO, L.F.; BRUSOV, O.S.; GERASIMOV, A.M. Y LOKTAERA, T.D.: Febs. lett. 55, 84-87 (1.975). Intermitochondrial localization and release of - rat liver superoxide dismutase.
- 174.- PACKER, L.; DREAMER, D.W.; HEATH, R.L.: Advan. Gerontol. Res. 2 77 (1.967). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by - William A. Pryor. Academic Press New York 1976.
- 175.- PEETERS-JORIS, C.; VANDEVOORDE A.M. Y BAUDHUIN, P.: Biochem, J. 150, 31-39 (1.975). Subcellular localización of superoxide dismutase in rat liver.
- 176.- PHILLIPS, G.O.: Ed. "Energetics and mechanisms in radiation Biology". Academic Press, New York - (1.968).
- 177.- PIEGET, K. Y MICHELSON, A.M.: Biochimie 56, 1255-1267 (1.974). Iron-containing superoxide dismutase from luminous bacteria.
- 178.- PIERCE, S.; TAPPEL, A.L.: Biochem. Biophys. Acta 523, 27 -36 (1.978). Glutathione peroxidase -

activites from rat liver.

- 179.- PIPERMO, D.A.; BERSSENBRUEGGE, D.A.: Lancet 2, 738 (1.976). Citado por Viña y otros 1980. en: Biochem. Pharmacol, 29, 1968-1970, Effect of - Acetaminophen (paracetamol) and its antagonist on glutathione (GSH) content in rat liver.
- 180.- PIRIE, N.: Biochem, J. 30, 1565 (1.931). The - oxidation of sulphhydryl compounds by hydrogen peroxide. I. Catalysis of Oxidation of Cysteine and Glutathione by Iron and Copper.
- 181.- POOLE, B.: J. Theoret, Biol. 51, 149-167 (1975) Diffusion effects in the metabolims of hydrogen peroxide by rat liver peroxisomes.
- 182.- PORTER Y COLS. 1971 y 1972.: Citado por Porter N.A.; Weber, B.A. y Khan, J.A.; J. Am. Che. Soc. 102, 5597-5601 "Autoxidation of polyunsaturated lipids. Factors controlling the steochemistry of product hydroperoxides".
- 183.- POYER, J.L. Y Mc CAY, P.B.: J. Biol. Chem, 246, 263 (1.971). Citado por Pryor en: "Free Radi - cals in Biology". Vol.I. Edited by Willian A. Pryor, Academic Press New York 1.976.
- 184.- PRESCOTT, L.F.; PARK, J.; BALLANTYNE, A.; -

- ADRIAENSSENS, P. Y PROUDFOOT, A.T.: Lancet 2, 432 (1.977). Citado por Viña y otros. Biochem. Pharmacol. 29, 1968-1970. Effect of Acetaminophen (paracetamol) and its antagonists on glutathiones (GSH) content in rat liver.
- 185.- PRESCOTT, L.F.; ILLINGWORTH, R.N.; CHRITCHLEY, J.A.; PROUDFOOT, A.T.: British Medical Journal Jan. 1980. Intravenous N-acetylcysteine: Still the treatment of choice for paracetamol poisoning.
- 186.- PRIVETT, O.S. Y BLANK, M.L.: J. Amer. Oil.Chem. Soc. 39 , 465 (1.962). Citado por Pryor en: - "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor, Academic Press New York 1976.
- 187.- PROHASKA, J.R. Y GAUTHER, H.E.: Biochem. Biophys Res. Commun 76. 437-445 (1.977). Glutathiones peroxidase activity of glutathione S-transferase - purified from rat liver.
- 188.- PRYOR, W.A.: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor, Academic Press New York 1.976.
- 189.- PRYOR, W.A.: Chem. Eng. News 46, 70 (1.968). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". - Vol.I. Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1976.

- 190.- PRYOR, W.A.; KNEIPP, K.G.; MORKVED, E.H.; Y -  
STANLEY, J.P.: Radiat. Res. 53, 181 (1973). Ci-  
tado por Pryor en: "Free Radicals in Biology".  
Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic -  
Press New York 1.976.
- 191.- PRYOR, W.A.: Abtr. Int. Conf. Org. Free Radicals  
1974, Sirmione, Italy (1.974). Citado por Pryor  
en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited  
by William A. Pryor. Academic Press. New York -  
1.976.
- 192.- REED, D.J.; ORRENIUS, S.: Biochem. Biophys. Res.  
Commun, 77 1257- 1264 (1.977). The role of me-  
thionine in glutathione Biosynthesis by isola -  
ted hepatocytes.
- 193.- REED, D.J. Y BEATTY, P.W.: The role of the Cysta  
thionine Pathwayni glutathione regulation by iso  
lated hepatocytes. En: "Function of glutathione  
in liver and Kydney". Edited by Sies H. y Wendel,  
A. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York -  
1.978.
- 194.- REED, P.W.: J. Biol. Chem. 244, 2459 (1.969). Ci  
tado por Pryor en: "Free Radicals in Biology".  
Vol. I. Edited by William A. Pryor. Academic -  
Press. New York 1.976.



- 195.- REDDY, J.K. Y TAPPEL, A.L.: Effect of dietary -  
selenium and autooxidized lipids on the gluta -  
thione peroxidase system of gastrointestinal -  
tract and other tissues in the rat.
- 196.- REICH, L. Y STIVALA, S.A.: "Autooxidation of -  
hydrocarbons and Polyolefins". Ed. Dekker, New  
York (1.969).
- 197.- REPINE, J.E.; FOX, R.B. Y BERGER, E.N.: J.Biol.  
Chem. 256, nº 14, pg. 7094-7096 (1.981). Hydro-  
gen Peroxide kills staphylococcus aureus by Reac -  
ting with staphylococcal Iron to form hydroxyl  
radical.
- 198.- REVEL, J.P.; BALL, E.G.: J. Biol. Chem. 243 nº 3  
577-582 (1.959). The reaction of glutathione -  
with aminoacids and related compounds as cataly -  
sed by gamma-glutamyl transpeptidase.
- 199.- RINK, H.: Thiols compounds in radiation biology.  
En: Glutathione. En: "Proceedings of the XVI -  
Conference of the German Society of Biological  
Chemistry" Ed. Flohé y otros. pg. 206, Thieme  
Stuttgart (1.973).
- 200.- ROELIM, J.N.; HADLEY, J.C. Y MENZEL, D.B.: Arch.  
Intern. Med. 128, 88 (1.971). Citado por Pryor  
en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited  
by William A. Pryor. Academic Press New York -  
1.976.

- 201.- ROSS, B.D.; HEMS, R.; KREBS, H.A.: Biochem.J. 102. 942 (1.967). The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver.
- 202.- SAEZ, G.: "Estudio de la síntesis de glutatión en el citosol del hígado, riñón y cerebro de la rata". Tesina de Licenciatura. Facultad de Medicina de la Univ. de Valencia año 1.980.
- 203.- SAMUELSSON B.: En: "Lipid Metabolism" (S.J. - Wakil ed.). pg. 107. Academic Press, New York (1.970).
- 204.- SCAINO, J.C. E INGOLD, K.V.: J. Amer. Chem. Soc. 98, 4727 (1976). Kinetic Applications of electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. 25. Radicals formed by spin Trapping with Di-tert-butyl Thioketone.
- 205.- SCHAFFER, K.; BONIFACIO, M.; BAHNEMANN, D. Y ASMUS, K.D.: J. Phys. Chem. 82, 2777-2780 (1978) Citado por Sáez (1.982) en: "The Production of Free Radicals during the Autooxidation of Cysteine and their effect isolated rat Hepatocytes. - Biochem, Biophys. Act. 719 24-31.
- 206.- SCHAICH, K.M. Y BORG, D.C.: En: "Autoxidation in food and Biological Systems" (M.G. Sinec and M. Kavel eds.) Plenum Press, New York, pg. 43-70 - (1.980).

- 207.- SCHIHASSEK, H.: Biochem. Z, 336, 460 (1.962).  
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der  
isoliert perjunjierten ratten leber.
- 208.- SCHILLING, C.W. Y ADAMS, B.H.: USA, Nav. Med.  
Bull, 31, 112-121 (1.933). A study of the con-  
vulsive seizures caused by breathing oxygen at  
high pressure.
- 209.- SCHONBAUM, G.R. Y CHANCE, B.: Catalase en: "The  
Enzymes" (2<sup>a</sup> ed.) edited by Boyer, P.D. New -  
York. Academix Vol. XIII, pg. 363-408 (1.976).
- 210.- SCHUBERT, C.C. Y PEASE, R.N.: J. Amer. Chem. Soc.  
78, 2044-5553 (1.956). The Oxidation of lower -  
Paraffin hydrocabous. I. Room temperature reac -  
tion of Methane, Propane, n-Butane and Isobutane  
with Ozonized Oxygene.
- 211.- SCHULTZ, H.W.; DAY, E.A. Y SINNHUBER, R.O. Eds.:  
"Lipids and their oxidation". Avi. Publ. Westport  
Connecticut. 1962.
- 212.- SCHUVARTZ, H.M.; BOLTON, J.R. Y BORG, D.C.: En: -  
Biological applications of electron spin resonan-  
ce, Wiley-Interscience, New York (1.972).
- 213.- SIAKOTOS, A.N. Y KOPPANG, N.: Mech. Ageing. De-  
velop. 2 177 (1.973). Citado por Pryor en: -

"Free Radicals in Biology". Vol.I. Edited by William A. Pryor, Academic Press New York - 1.976.

- 214.- SIES, H. Y WENDEL, A.: Functions of glutathione in liver and Kidney. Edited by Sies, H. and Wendel, A. Springer Verlag, Berlin, Heidilberg, - New York (1.978).
- 215.- SIES, H.; BARTOLI, G.H.; BURK, R.F. Y WAYDHAS, C.: Eur. J. Biochem. 89, 113-118, (1.978&. Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatuent durging dung oxidations and in seleniom deficiency.
- 216.- SIMON, R.H.; SCOGGIN, C.H.; PATTERSON, D.: J. - Biol. Chem. 256 N° 14 7181-7186 (1981). Hydro - gen peroxide causes the fatal injury to human - fibrobiase.
- 217.- SINET, P.M.; MICHELSON, A.M.; BAZIN, A.; LEJEUNE, J. Y JEROME, H.: Biochem Biophys. Res. Commun 67, 910-915 (1975). Increase in glutathiones peroxi-dase activity in erythrocytes fron trisomy 21 - subjects.
- 218.- SMALLER, B.; REMKO, J.R. Y AVERY, E.C.: J. Chem. Phys. 48, 5174 (1.968). Electron Paramagnetic resonance studies of transient Free Radicals produced by Pulse Radiolysis.

- 219.- SMITH, K.C.; HANNAWALT, P.C.: "Molecular Photobiology". Academic Press, New York (1.969).
- 220.- SORGATO, M.C.; SARTORELLI, L.; LOSCHEN, G. Y - AZZI, A.: Febs. lett. 45, 92-95 (1974). Oxygen radicals and hydrogen peroxide in rat brain.
- 221.- SOSNOVSKY, G.; Y RAWLINSON, D.J.: Organic Peroxides. (D. Swern ed.) Vol. II. pg. 153, Wiley - (Interscience). New York (1.971).
- 222.- SOUTTER, L.P. Y JUDAH, J.D.: Ion transport in - liver kidney. En: "Transport and Accumulation - in Biological Systems". Ed. Harris, E.J. pg. - 347-367 Hurd. Edition, Butterworths, London, - University Press Baltimore (1.972).
- 223.- SPIALTER, L.;PAZDERNIK, L.;BERNSTEIN, S.;SWANSIGER, W.A.; BUELL, G.R. Y FREEBURGER, M.E.: Advan. - Chem. Ser. 112, 65 (1.972). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by - William A. Pryor. Academic Press New York 1976.
- 224.- STEIN, S.N. Y SONNENSCHNIG, R.R.: J. Aviat. Med. 21, 401-404, (1.950). Electrical activity and - oxygen tensions of brain during hyperoxic convul - sions: experimental methods and results.
- 225.- STERN, H.: Science 124, 1292 (1.956). Sulphydryl groups and cell division.

- 226.- STORM, D.R. Y KOSHLAND, D.E. Jr.: J. Amer. Chem. Soc. 94 5805-5815 (1.972). Effect of Small Changes in Orientation on Reaction rate.
- 227.- STREHLER, B.L.; MARK, D.; MILDRAN, A.S. Y GEE, M.V.: J. Gerontol, 14, 430 (1.959). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. - Edited by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 228.- SVOBODA, D.J. Y AZARNOFF, D.L.: J.Cell. Biol. 30, 442-450 (1.966). Response of hepatic microbodies to a hypolipidemic agent, etylchlorophenoxyisobutyrate (CPIB).
- 229.- SWARTZ, H.M.: En: Biological Applications of - electron spin resonance, pg. 155. Swartz, H.M. Bolton, J.R., and Borg, D.C. (eds.). Wiley-Interscience. New York and London (1.972).
- 230.- SWERN, D.: En: "Autooxidation and Antioxidants". (W.O. Lundberg ed.) Vol. I. pg. 36-39, Wiley - (Interscience). New York (1.961).
- 231.- TAKAHARA, S.: Lancet, 2, 1101-1104 (1.952). Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood. (acatalasemia).
- 232.- TAPPEL, A.L.: "Autooxidation and Autoxidants". - (W.O. Lundberg ed.).Vol. I. pg. 325. Wiley -

(Interscience) New York (1.961).

- 233.- TAPPEL, A.L.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 203, 12 -  
(1.972). (Introducción). Citado por Pryor en :  
"Free RADicals in Biology". Vol. I. Edited by  
William A. Pryor. Academic Press New York -  
1.976.
- 234.- TARBELL, D.S.: "Organic Sulfur compounds". Vol.  
I. N. Khanrash, Ed. Pergamon, Press New York,  
N.V. pg. 97 (1.961).
- 235.- TATE, S.S.; MEISTER, A.: J. Biol. Chem. 250, -  
4619 (1.975). Identity of maleate-stimulated  
glutaminase with -glutamyl transpeptidase  
in rat kidney.
- 236.- TATEISHI, H.; HIGASHI, T.; SHINYA, S.; NARUSE,  
A.; SAKAMOTO, Y.: J. Biochem (Tokyo). 75, 93-  
-103 (1.974). Studies on the regulation of -  
glutathione level in rat liver.
- 237.- TATEISHI, H.; HIGASHI, T.; NARUSE, A.; NAKASHI-  
MA, K.; SHIOZAKI, H.; SAKAMOTO, Y.: J. Nutr. 107  
51-60 (1.977). Rat liver glutathione. Possible  
role as reservoir of cysteine.
- 238.- TAYLOR, J.E.; YAN, J.F. Y WANG, J.: J. Am.Chem.  
88, 1663-1667. The Iron III-Catalyzed oxidation

of Cysteine by molecular oxygen in the aqueous phase. An example of a two-thirds order reaction.

- 239.- THEORELL, H.: The Iron-containing enzymes B. - Catalases and peroxidases. Hydroperoxidases. En: The Enzymes edited by. Summer, J.B. and Myrbäck, K. New York. Academic Voll. pg. 397-427 (1.951).
- 240.- THOMAS, H.V.; MUELLER, P.K.Y LYMAN, R.L.: Science 159, 552 (1.968). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol I. Edite by William A. Pryor. Academic Press New York 1.976.
- 241.- THOR, P.; MOLDEUS, R.; HERMANSON, J.; HOGBERG, D.; REED, J. Y ORRENIUS, S.: Archs. Biochem. - Biophys. 188, 122 (1.978). Toxicity of bromobenzene in hepatocytes isolated from Phenobarbital and diethylmaleate-treated rats.
- 242.- Tien M.; BUCHER, J.R. Y AUST, S.D.: Biochem. - Biophys. Res. Commun. 107, nº 1 279-285 (1.982). Thiol-Dependent Lipid Peroxidation.
- 243.- TIEXTA, F.: Biochem. Biophys. Acta 220, 449 - (1.970). Disulfide reduction in rat liver II. - Chromatographic separation of nucleotide dependent disulfide reductase and GSH-disulfide transhydrogenase activities of the high-speed supernatant fraction.



- 244.- TOMASI, A. Y SEARLE, A.J.F.: J. Inorg. Biochem. "En prensa.". Citado por Sáez, G.; Thornalley, P.J.; Hill, H.A.O.; HEMS, R.; y Bannister, J.V. The production of the radicals during the auto-oxidation of Cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. Biochemica. Biophysica. Acta. 719, 24-31 (1.982).
- 245.- TOMIZAWA, H.M.; HALSEY, Y.D.: J. Biol. Chem. 234 307 (1.959). Isolation of an insulindegrading - enzyme from beef liver.
- 246.- TOMIZAWA, H.M.: J. Biol. Chem. 237, 428, (1.962) Mode of action of an insulin desgrading enzyme from beef liver.
- 247.- TOMIZAWA, H.M.: J. Biol. Chem. 237, 3393 (1962) Properties of glutathione insulin transhydrogenase from beef liver.
- 248.- TORCHINSKY, Y.M.: "Sulphur in Proteins". Pergamon Press Oxford, pg. 294 (1.977).
- 249.- TURRO, N.J.: "Molecular Photochemistry". Benjamin New York (1.965).
- 250.- TYLER, D.D.: Biochem. J. 147 493-504. (1.975). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver.

- 251.- URI, N.: En: "Autoxidation and Autoxidants".  
(W.O. Lundberg, ed.). Vol. I, pg. 55 Wiley,  
(Interscience), New York, 1961.
- 252.- VALE, J.A.; MEREDITH, T.J.; CROME, P.; HELLI-  
WELL, M.; VOLANS, G.N.; WIPDOP, B.; GONLDING,  
R.: British Medical Journal. December (1.979).  
Intravenous N.acetylcysteine: The Treatment of  
choice in paracetamol poisoning.
- 253.- VALENTINE, J.S.: En: "Biochemical and Clinical  
Aspects of Oxygen". Pg. 659-677, Academic Press  
New York (1.979).
- 254.- VAN DEN BRENK, H.A.S.; JAMIESON, D.: Aust. J. -  
Exp. Biol. Med. Sci. 40, 37-50 (1.962). Pulmonar  
y damage due to high presure oxygen breathing  
in rats.
- 255.- VAN DEN BRENK, H.A.S.; JAMIESON, D.: Biochem.  
Pharmacol, 13, 165-182 (1.964). Brain damage -  
and paralysis animals exposed to high pressure  
oxygen. Pharmacological and Biochemical observ  
vations.
- 256.- VANDERWERF, P.; STEPHANI, R.A.; MEISTER, A.:  
Proc. Nat. Acad, Sci. USA, 74, 1026 (1.974).  
Acummulation of 5-oxoprolin in mouse tissues  
after inhibition of 5-oxoprolisiase and admi-  
nistration of amioacids: evidence for function

of the glutamyl cycle.

- 257.- VARANDANI, P.T.: Biochem. Biophys. Acta 320, 249 (1.973). Sequential degradation of insulin by rat liver homogenates at physiologic concentrations of insulin and in the absence of exogenous glutathione.
- 258.- VIÑA, J.: Metabolismo del glutati6n y del 6cido formiminoglutamico en hepatocitos aislados de rata. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia A6o 1.977.
- 259.- VIÑA, J.; HENS, R.; KREBS, H.A.: Biochem. J. 170, 627-630 (1.978). Maintenance of glutathione in isolated hepatocytes.
- 260.- VIÑA J.; ESTRELA, J.M.; ROMERO, F.J.; VIÑA, J.R.: Biochem. Pharma 29 1968-1970 (1.980). Effect of acetaminophen (paracetamol) and its antagonists on hepatic glutathione.
- 261.- VIÑA, J. Y COLS.: Involvement of gamma glutamyl transpeptidase in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. Biochem. J. - 194, 99-102. (1.981).
- 262.- VIÑA, J. ROMERO, F.J.; SAEZ, G.T.; PALLARDO, F. V.: Effect of cysteine and N-acetylcysteine on GSH content of brain of adult rats. Experientia

1983. (Aceptado "en prensa").
- 263.- VOGT, M.T; FARBER, E.: Arch. Biochem. Biophys. 141, 162 (1.970). Citado en Farber, E. Fed. - Proc. 32, 1534-1539 (1.973). ATP and cell integrity.
- 264.- WALLING, C.: "Free Radicals in Solution". Wiley New York (1.957).
- 265.- WARBURG, O.: En: "Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action". pg. 34-35 (1.949). Oxford University Press. London.
- 266.- WATEN, W.A.: "The chemistry of Free Radicals". 2ª ed, Oxford Univ. Press. London and New York. (1.948).
- 267.- WOTERS, W.A. Y MAYO, F.R.: "Vistas in Free Radical Chemistry". W.A. Waters ed. pg. 1 Pergamon Oxford (1.959).
- 268.- WHITE, H.M.; BAILEY, P.S.: J. Org. Chem. 30, 3037 (1.965). Ozonation of Aromatic Aldehydes.
- 269.- WILLS, E.D.: Biochem. J. 113, 315 (1.969). - Lipid Peroxide Formation in microsomes.
- 270.- WINTERBOURN, C.C.: Biochem, J. 182, 625-628

(1.979). Comparison of superoxide with other -  
reducing agents in the biological production of  
hidroxyl radicals.

- 271.- WITZLEBEN, C.L. Y BUCK, B.E.: Clin. Toxicol. 4  
579 (1.971). Citado por Pryor en: "Free Radicals  
in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor  
Academic Press. New York 1.976.
- 272.- WONG, P.W.K.; SCHWARZ, V.; LOMVOWER, C.H.: Pediat  
Res. 2 149-160 (1.968). The Byosynthesis of cys-  
tathionine in patients with homocystenuria.
- 273.- WOOD, J.D. Y PERKINS, G.F.: Aerosp. Med. 41, -  
869-872 (1.9705. Factors influencing hyperten -  
sion and pulmonary edema produced by hyperbaric  
oxygen.
- 274.- YAMAZAKI, I.; YAMAZAKI, H.; TAMURA, H.; OHNISHI,  
T.; NAKAMURA, S.; IYAMAGI, T.: Advan. Chem. 77  
290 (1.968). Citado por Yamazaki I. En: "Peroxi  
dase. In Molecular Mechanisms of Oxygen Activa-  
tion" Edited By O. Hayaishi, New York Academic  
(1.974). pg. 535-558.
- 275.- YAMAZAKI, I,: Advan. Biophys. 2, 33 (1.971). Ci  
tado por Pryor en: "Free Radicals in Biology".  
Vol. I. Edited By Willian A. Pryor, Academic -  
Press New York 1.976.

- 276.- YOSHIDA, A.: Science 179, 532 (1.973). Hemolytic anaemia and G6P deficiency.
- 277.- YOUNG L. AND NAW G.A.: "The metabolism of sulfur compounds". Methuen & Co. London (1.958).
- 278.- YOUNGMAN, R.J.; ELSTNER, E.F.: Febs. lett. 129 nº 2, 265-268 (1.981). Oxygen species in paragnat toxicity: The crypto-OH Radical.
- 279.- ZELAC, R.E.; CROLNROY, H.L.; BOLCH, W.E.; DUNAVANT, B.G.; BEVIS, H.A.: Environ. Res. 4, 262-325 (1.971). Citado por Pryor en: "Free Radicals in Biology". Vol. I. Edited by William A. Pryor, Academic Press New York 1.976.
- 280.- ZURBAREV, V.E.; BELOVSKI, V.M.; BUGAENKO, L.T.: Russ. Chem. Rev. 48, 729 (1.979). Citado por Thornalley, P.J. en: "Free Radical introduction during Phenylhydrazine oxidation". Tesis Doctoral. Inorganic Chemistry Laboratory; University of Oxford. South Park Road OX1 3OR. Inglaterra.