



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

ESTUDIO POR
RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELÉCTRICA
DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR
DEL HIDRURO DE SILICIO EN RATAS.

T E S I S

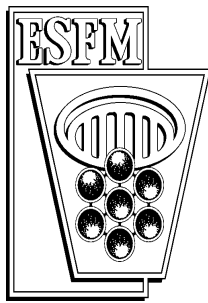
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
LICENCIADO EN FÍSICA Y MATEMÁTICAS

P R E S E N T A :

VÍCTOR MANUEL TORRES PUENTE

MÉXICO, D. F.

2007



Agradecimientos

Al Doctor Daniel Ramírez Rosales por la dirección de esta tesis.

A la Doctora Martha Rosales por la preparación de las muestras estudiadas y por la literatura proporcionada.

Al Doctor Jesús Real Bermúdez por sus valiosas sugerencias en la escritura del presente trabajo.

A mis sinodales y al grupo de mediciones magnéticas de la ESFM.

Introducción

El estudio de radicales libres (RL) y aductos formados en los sistemas biológicos, es un tema que actualmente ocupa la atención de los investigadores tanto en campos de la medicina, química, nutrición, fisiología y la física entre otras.

Esto se debe a que, en los sistemas biológicas, los RL funcionan como intermediarios en reacciones de oxido-reducción esenciales para la vida; pero dada su configuración electrónica, los radicales libres tienen el inconveniente de ser especies químicas altamente reactivas y de corta vida (≈ 1 ns). Estudios recientes muestran que el envejecimiento y ciertas enfermedades crónico - degenerativas están ligadas al exceso de RL [1]. Sin embargo, los seres vivos también poseen un sistema de defensa capaz de contrarrestar la acción dañina de los RL, el sistema antioxidante [2]. Los antioxidantes (AOX) son un conjunto heterogéneo de sustancias tales como vitaminas, minerales, pigmentos naturales y enzimas cuya función es eliminar la actividad reactiva de los radicales libres, ejemplos de estos son el *selenio*, *zinc*, *cobre*, *glutathione*, el *ácido ascórbico* (vitamina C), el *alfatocoferol* (vitamina E) o enzimas tales como la *catalasa*, la *superóxido dismutasa* y ciertas *peroxidasas*.

Recientemente, se sintetizó un compuesto que presenta características antioxidantes llamado *hidruro de silicio* (H^-), formado con base en iones hidruro sujetos a una matriz de silicio. Los estudios que avalan sus propiedades antioxidantes son aún escasos y no han sido realizados en órganos vitales, lo cual origina incertidumbre en cuanto a su eficacia y es hoy en día tema de discusión.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propone estudiar el efecto antioxidante del compuesto H^- en un órgano vital como es el hígado, se selecciono este por ser un sitio donde se llevan a cabo las principales funciones metabólicas como de detoxificación. Para inducir hepatotoxicidad, se usó tetracloruro de carbono (CCl_4), el cual es una sustancia generadora de RL

cuyo mecanismo esta bien documentado [3]. Se utilizaron como medio animal ratas de cepas Wistar y Sprague-Dawley.

Para determinar la producción de RL se utilizó de la técnica de resonancia paramagnética electrónica (RPE), la cual nos permitirá identificar y cuantificar la cantidad de RL formados en el hígado cuando las ratas son tratadas con CCl_4 y después de ser tratadas con H^- , puesto que la técnica se aplica a moléculas, iones o átomos que poseen electrones desapareados y que resulta apropiada para el estudio de RL asi como de aductos.

Con esto se pretende verificar si el efecto antioxidante del H^- se conserva en hepatocitos en animal integro y contar así con un fármaco que pueda ser usado contra la hepatotoxicidad asociada al daño por radicales libres, tal es el caso de intoxicación por paracetamol [4].

Índice general

Agradecimientos	i
Introducción	ii
Índice de abreviaturas	ix
1 Antecedentes	1
1.1 Hepatotoxicidad.	1
1.2 El hígado.	2
1.2.1 Funciones del hígado.	3
1.2.2 Transformaciones metabólicas.	3
1.2.3 Factores que predisponen al hígado a sufrir toxicidad. .	3
1.2.4 Compuestos que causan daño hepático.	4
1.2.5 Antioxidantes endógenos.	6
1.3 Capacidad antioxidante del H^-	7
2 Justificación	9
3 Objetivos	10
3.1 Objetivo general.	10
3.2 Objetivos particulares.	10
4 Metodología	11
4.1 Pretratamiento de animales.	11
4.2 Protocolo establecido.	12
4.3 Detección experimental con RPE.	12
5 Resultados y discusión	14
5.1 Espectros del grupo control.	15

5.1.1	Grupo control Wistar.	15
5.1.2	Grupo control Sprague-Dawley.	18
5.2	Espectros del grupo CCL_4	19
5.2.1	Grupo CCL_4 Wistar.	19
5.2.2	Grupo CCL_4 Sprague-Dawley.	21
5.3	Espectros del grupo $H^- + CCL_4$	22
5.3.1	Grupo $H^- + CCL_4$ Wistar.	22
5.3.2	Grupo $H^- + CCL_4$ Sprague-Dawley.	24
5.4	Espectros de bilis.	25
5.5	Análisis cuantitativo.	27
6	Conclusiones	31
	Bibliografía	32
	Apéndice	35
A	Teoría de RPE.	35
A1	Principio básico de RPE.	36
A2	Hamiltoniano de espín.	36
A3	Término Zeeman electrónico.	37
A4	Término de campo cristalino.	38
A5	Término de interacción hiperfina.	41

Índice de figuras

1.1	Esquema del hígado.	2
1.2	Estructura del cloruro de vinilo.	4
1.3	Estructura de la dimetilformamida.	4
1.4	Estructura del tetracloruro de carbono.	5
1.5	Metabolismo del CCl_4 [6].	5
1.6	Estructura conceptual del hidruro de silicio, la cual posee iones hidruro colocados intersticialmente en una estructura de silses- quioxano.	7
4.1	Diagrama general para la obtención de muestras.	13
5.1	Espectro general de RPE mostrando un radical libre [20]. . . .	14
5.2	Espectro general de RPE del grupo control en ratas Wistar sin perfundir.	15
5.3	Estructura del grupo hemo.	16
5.4	Espectro de RPE del complejo hemo-nitrosilo.	17
5.5	Espectro general de RPE del grupo control de ratas Wistar per- fundidas.	17
5.6	Espectro general de RPE del grupo control Sprague-Dawley. .	18
5.7	Espectro general de RPE del grupo CCl_4 normal Wistar. . . .	19
5.8	Espectro general de RPE del grupo CCl_4 perfundido Wistar. .	20
5.9	Espectro general de RPE del grupo CCl_4 Sprague-Dawley. . . .	21
5.10	Espectro general de RPE del grupo $\text{H}^- + \text{CCl}_4$ normal Wistar.	22
5.11	Esquema de la neutralización de RL debido a H^-	22
5.12	Espectro general de RPE del grupo $\text{H}^- + \text{CCl}_4$ perfundido Wistar.	23
5.13	Espectro general de RPE del grupo $\text{H}^- + \text{CCl}_4$ Sprague-Dawley.	24
5.14	Espectro de RPE de bilis respecto a Knecht [17].	25

5.15	Espectro general de RPE de bilis.	26
5.16	Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en el hígado de ratas Wistar sin perfusión.	27
5.17	Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en el hígado de ratas Wistar con perfusión.	28
5.18	Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en el hígado de ratas Sprague-Dawley.	29
5.19	Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en bilis de ratas Sprague-Dawley.	30
A1	Efecto Zeeman y transición dipolar magnética de un electrón en un campo magnético externo H.	36
A2	Parte angular de las funciones de onda de un electrón 3d.	39
A3	Efecto del campo cristalino en niveles energéticos de orbitales d.	40
A4	Interacción dipolar magnética entre μ_S y μ_N	42

Índice de tablas

5.1	Valores de g y Γ obtenidos para el grupo control cepa Wistar. . . .	15
5.2	Valores de g y Γ obtenidos para el grupo control Sprague-Dawley. .	18
5.3	Valores de g y Γ obtenidos para el grupo CCL_4 Wistar.	19
5.4	Valores de g y Γ obtenidos para el grupo CCL_4 Sprague-Dawley. .	21
5.5	Valores de g y Γ obtenidos para el grupo $H^- + CCL_4$ Wistar. . . .	23
5.6	Valores de g y Γ obtenidos para el grupo $H^- + CCL_4$ Sprague-Dawley.	24
5.7	Valores de g y Γ obtenidos para bilis en los tres grupos.	25
A1	Valores posibles de espín en complejos de Fe^{2+} y Fe^{3+}	41

Índice de abreviaturas

AOX	Antioxidante
CCl₄	Tetracloruro de Carbono
CYP450	Citocromo P-450
GSH	Glutation reducido
H⁻	Hidruro de Silicio
ORP	Potencial de Oxido-Reducción
PBN	Phenyl-N-t-butylnitron
RL	Radical(es) libre(s)
ROS	Especies Reactivas al Oxígeno
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
SH	Grupos Tioles
Xb	Xenobiotico

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Hepatotoxicidad.

Los xenobióticos (del griego *Xeno*: extraño y *biótico*: vida) son compuestos ajenos al organismo, siendo predominantemente sintetizados por el hombre en el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años [5].

Uno de los agentes físicos por los que se transforman químicamente estos compuestos son la fotodegradación por radiaciones solares, mientras que la oxidación, reducción e hidrólisis es por enzimas producidas por microorganismos. Pero debido a su estructura inusual, algunos xenobióticos (Xbs) persisten mucho tiempo en la biosfera sin alterarse y por eso se dice que son resistentes a la biodegradación, llegando a ser dañinos para la salud. La razón fundamental de que muchos compuestos sintéticos no sean fácilmente biodegradables radica en la gran estabilidad de su estructura química. Muchos compuestos sintéticos tienen estructuras químicas distintas a las de compuestos naturales, sin embargo algunas estructuras pueden ser semejantes a las naturales pero tener modificaciones químicas que los hacen muy estables. Esto hace que las capacidades degradativas de los seres vivos actúen más lentamente o no se lleven a cabo.

Con respecto a la salud humana, los Xbs, manifiestan toxicidad hacia ciertas células. Este hecho es un fenómeno complejo que implica diferentes causas, entre las que se encuentran:

1. Propiedades físico-químicas de los Xbs ($\log P$ o coeficiente de penetración; peso molecular, pK_a o constante de acidez, etc.) que rigen

su capacidad de absorción y distribución en ciertos tejidos, y

2. La capacidad del tejido en cuestión para reparar un daño o lesión particular originado por el Xb.

Puesto que el hígado es un lugar primario de biotransformación de compuestos extraños, también es vulnerable a ellos. Muchos de estos compuestos son detoxificados y eliminados por el hígado, principalmente como conjugados, algunos se concentran a niveles tóxicos, y otros son bioactivados a reactivos intermediarios que pueden ocasionar daño en el hígado u otros órganos llegando a generar hasta cáncer.

1.2 El hígado.

El hígado es un órgano glandular en forma de cuña, blando y de color castaño rojizo formado por dos lóbulos. A él le llega sangre por la vena porta, esta vena transporta los compuestos absorbidos en el intestino y el estómago, incluyendo así a los Xbs. La unidad funcional del hígado está formada por tres vasos (vena porta, arteria hepática y conducto biliar) y los hepatocitos que lo rodean. Los vasos van del espacio periportal (EP) al área centrolobular (AC). En el EP existe una mayor concentración de oxígeno, por lo que los Xbs que se bioactivan por medio de oxigenación son más peligrosos en esta área. En el AC la concentración de oxígeno es menor y como la concentración de citocromo P-450 (CYP450) es alta, se pueden dar con facilidad reacciones de reducción catalizadas por esta enzima. Los Xbs que se bioactiven en estas condiciones pueden producir daño en esta región (ej. CCl_4).

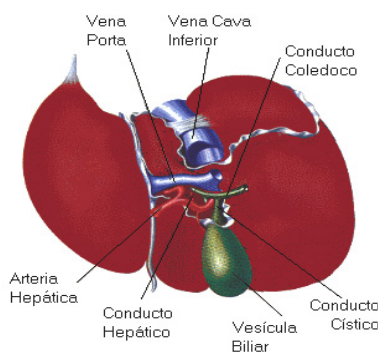


Figura 1.1: Esquema del hígado.

1.2.1 Funciones del hígado.

El Hígado tiene tres tipos de funciones básicas que son:

1. Vasculares (*Almacenamiento y filtración.*)
2. Metabólicas (*Metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas.*)
3. Secretoras y excretoras encargadas de formar bilis.

El hígado es un órgano muy propenso a sufrir daños por la exposición a ciertos agentes tóxicos debido a que los dos sistemas circulatorios pueden llevar al hígado sustancias tóxicas o que se bioactiven en este órgano. El tejido hepático posee una *elevada capacidad de regeneración*, las células necróticas se eliminan y las que quedan se dividen rápidamente.

1.2.2 Transformaciones metabólicas.

Las transformaciones metabólicas de los Xbs que tienen lugar en el hígado están principalmente asociadas a las enzimas microsómicas, es decir, a las enzimas que se encuentran en el retículo endoplasmático como el CYP450.

Entre las reacciones catalizadas por enzimas microsómicas se encuentran:

Oxidación Reducción Hidrólisis

Desalquilación Desaminación

1.2.3 Factores que predisponen al hígado a sufrir toxicidad.

En resumen, los factores cuya combinación exponen al hígado a la toxicidad son:

- Recibe una gran cantidad de sangre que puede ser portadora de tóxicos, sobre todo la vena porta que transporta los Xbs absorbidos en el tracto gastrointestinal.
- La elevada capacidad de biotransformación y diversas concentraciones de oxígeno hacen que tengan lugar tanto reacciones de reducción como de oxidación de diversos Xbs.
- La función excretora y secretora que hace que se concentren los Xbs.

1.2.4 Compuestos que causan daño hepático.

El **cloruro de vinilo** [$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCl}$] es un químico sintético que se polimeriza para la obtención de policloruro de vinilo (PVC). A temperatura ambiente, es un gas incoloro, de olor dulce y poco soluble en agua. Es rápida y eficientemente absorbido en humanos y animales por inhalación y vía oral, y se biotransforma rápidamente en sus metabolitos solubles en agua, por lo que se excreta rápidamente.

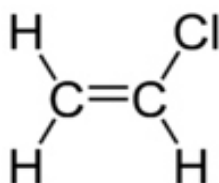


Figura 1.2: Estructura del cloruro de vinilo.

Los **solventes orgánicos** son componentes de pinturas, plásticos, pegamentos y muchos otros productos industriales. La dimetilformamida es muy utilizada en la manufacturación de productos de poliuretano y fibras acrílicas. El trinitrotolueno (TNT) y algunos insecticidas clorados, son ampliamente usados en la industria y en la agricultura. Los hidrocarburos halogenados suprimen la excreción biliar de sustancias al interferir con los procesos productores de energía de las células. Esta supresión puede ser también causada por una inhibición de la biotransformación o por la administración de anestésicos.

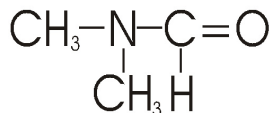


Figura 1.3: Estructura de la dimetilformamida.

Los **metales pesados** y sus derivados tienen afinidad por grupos sulfhidrilo libres del GSH, aminoácidos y proteínas (enzimas). La exposición a los metales pesados (como el Hg) puede reducir drásticamente la reserva de grupos SH disponibles y producir estrés oxidativo. La unión de metales pesados a SH de proteínas puede también causar inhibición no competitiva de muchas enzimas.

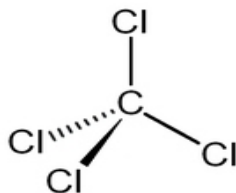
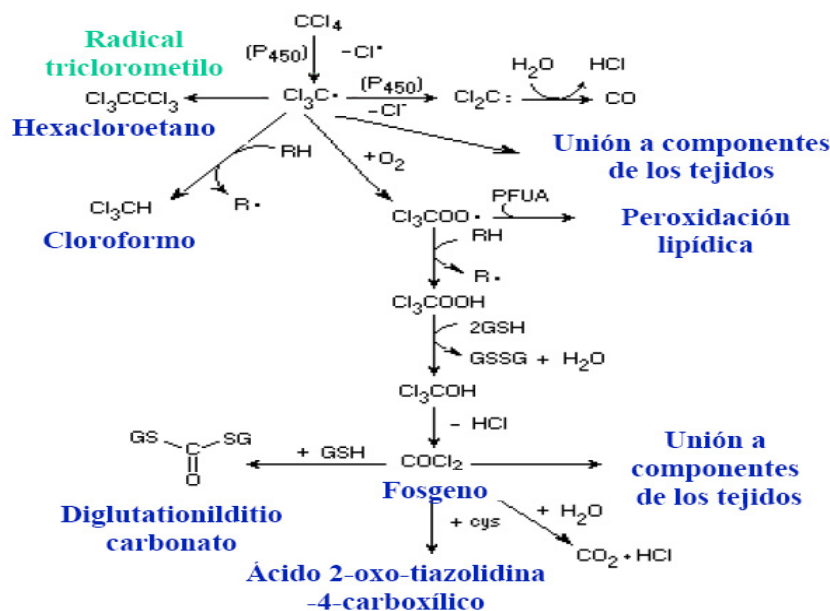


Figura 1.4: Estructura del tetracloruro de carbono.

El **tetracloruro de carbono** (CCl_4) pertenece al grupo de los hidrocarburos halogenados, es poco soluble en agua y su descomposición térmica produce fosgeno (Cl_2CO), el cual es un producto tóxico a nivel respiratorio. Se usa como disolvente (aceites, grasas, ceras y limpieza en seco) y, aunque se usa poco por sus propiedades cancerígenas, es quizás el hepatotóxico mejor estudiado y conocido entre aquellos Xbs que se sabe causan daño hepático. Es por ello que se ha tomado a esta sustancia como agente hepatotóxico productor de radicales libres en el presente trabajo. En la figura 1.5 se detallan los efectos hepatotóxicos que se producen como consecuencia del metabolismo de dicho compuesto.

Figura 1.5: Metabolismo del CCl_4 [6].

1.2.5 Antioxidantes endógenos.

Algunos antioxidantes endógenos, son los producidos por el organismo entre los que se encuentran varios tipos de enzimas. Los antioxidantes exógenos (externos al cuerpo) son aportados por la dieta. En las células vivas, existen varios tipos de defensa, tanto enzimáticas como no enzimáticas contra el daño causado por RLs y ROS. Estos sistemas son capaces de interactuar directamente con las especies reactivas, interferir con los procesos oxidativos o reparar el daño que ya ha ocurrido.

Sistemas protectores enzimáticos.

Los radicales anión superóxido son detoxificados y puestos bajo control a través de la acción de la superóxido dismutasa, una familia de metaloenzimas. Estas tres catalizan al superóxido generado de peróxido de hidrógeno. En las células eucariotas existen tres tipos: enzima-cobre y zinc, ambas citosólicas, y una mitocondria con manganeso. El hecho de que estas enzimas estén presentes a altas concentraciones en todos los tejidos aunado a su alta eficiencia catalítica implica un alto grado de protección celular contra radicales anión superóxido en condiciones normales. En el hígado, la concentración estable tiene un nivel aproximado de $10^{11} \sim 10^{12}$ mol/litro. Diferentes sistemas enzimáticos son capaces de detoxificar peróxidos de hidrógeno. En las peroxisomas, la catalasa, una hemoproteína tetramérica, cataliza la desproporción de H_2O_2 . El selenio citosólico que contiene glutatión peroxidasa, una proteína tetramérica, cataliza la reducción de OH con la glutatión tripéptida (GSH).

Sistemas protectores no enzimáticos.

Entre los antioxidantes celulares de bajo peso molecular se tiene al glutatión, que juega un papel central. Este tripéptido que tiene un tiol está presente, en casi todas las células a altas concentraciones. Aparte de funcionar como co-sustrato de las glutatión peroxidasas y transferasas, el glutatión puede reaccionar directamente con radicales libres tales como el O_2^- , $\cdot OH$, $RO\cdot$ y $ROO\cdot$. En tales reacciones, los grupos tioles pierden un átomo de hidrógeno, resultando entonces en la generación de un radical til. También, dentro de este grupo encontramos a los ascorbatos y a los ácidos úrico y taurino.

1.3 Capacidad antioxidante del H^- .

El hidruro de silicio es un coloide organosilíceo que tiene aniones hidruro colocados intersticialmente (figura 1.6) [7]. El arreglo estructural del ion hidruro es el de una estructura orbital $1s1s'$ con dos orbitales s ortogonales, en donde el $1s'$ es el mas libre. La habilidad innata del ion hidruro para donar su electrón $1s'$ permite su papel integral en reacciones bioquímicas y facilita su uso como “celda de combustible” bioquímica. Publicaciones recientes sobre el H^- han mostrado que el compuesto no es tóxico y que es seguro para el consumo humano [8]. Algunas características del compuesto son [9]:

- Permitir la liberación sostenida del ion hidruro en un ambiente acuoso por largo tiempo.
- Actuar como un efectivo antioxidante.
- Moderar la reducción *in vivo* de la producción de ácido láctico después de realizar ejercicio.
- Crear un aumento *in vitro* en la producción de ATP en la mitocondria.

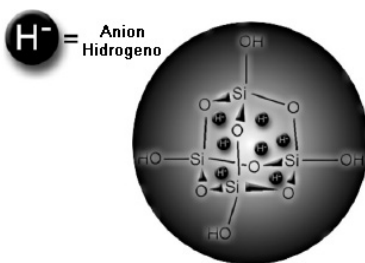


Figura 1.6: Estructura conceptual del hidruro de silicio, la cual posee iones hidruro colocados intersticialmente en una estructura de silsesquioxano.

El valor relativo de hidrogeno de una sustancia (rH) definido como:

$$rH = -\log P_O \quad (1.1)$$

siendo P_O la presión de oxígeno, es un valor propuesto por Clark en 1923 y derivado de la ecuación de Nernst [10]. Este valor se calcula del pH así

como del ORP. Los valores de rH van, desde 0 hasta 42, siendo 28 el punto medio. Los valores proximos a 42 indican un máximo poder oxidativo y aquellos proximos a 0 indican un máximo poder reductor o antioxidante. El H^- ha demostrado tener un valor rH de 10, mostrando asi su habilidad de ser un agente reductor más efectivo en comparación con la vitamina C (rH 23), ubiquinona (rH 19), y β -caroteno (rH 26). Asimismo, aumenta el pH de una solución alcalina a casi 8.7. Esta combinación de potencial reductor y pH lo hace un increíble agente reductor, lo que le permite asumir numerosos papeles como antioxidante.

Una publicación del año 2001 de un estudio clínico, evidencia la capacidad de este compuesto para reducir significativamente el acido láctico después de hacer ejercicio en un 50% [11]. Pruebas de viabilidad y citotoxicidad muestran que el hidruro de silicio no disminuye la actividad intracelular esterasa, o induzca a tener un ambiente citoplasmático tóxico [12]. Hay un sin fin de usos de compuestos basados en hidruros tales como el hidruro de silicio, puesto que no impone directamente un efecto negativo a la viabilidad celular. Usos particulares incluyen suplementos nutricionales como antioxidantes y entre ellos se encuentran productos comerciales tales como el Mega- H^{MR} .

Capítulo 2

Justificación

En los últimos años, se han investigado los AOX en relación con su papel dentro de enfermedades tales como las cardiovasculares, numerosos tipos de cáncer, SIDA, e incluso otras asociadas directamente con el proceso de envejecimiento, como las cataratas y Alzheimer entre otras, así como otras alteraciones del sistema nervioso [14]. Aunque estudios epidemiológicos indican que la ingesta de alimentos ricos en AOX disminuye el riesgo de ciertas enfermedades, se ha demostrado que la suplementación a altas dosis con preparados de AOX incluso puede resultar perjudicial [15, 16]. Todavía no se existen estudios que demuestren si es conveniente o no la suplementación diaria, ya que por el momento se desconoce cuáles son las dosis adecuadas y si existen efectos colaterales a largo plazo.

Es por eso que nuestro interés radica en evaluar y monitorear los efectos antioxidantes que el H^- tiene a tiempos cortos en el hígado, órgano en el cual se producen múltiples reacciones químicas que favorecen la producción de RLs. A pesar de que ya existen estudios sobre las propiedades antioxidantes del H^- , estos son escasos, por lo que entonces la validez de su funcionamiento aún está en duda. Bajo estas circunstancias es que nos proponemos realizar el presente trabajo.

Para esto, se empleó la técnica de RPE, la cual nos ayudó a identificar y cuantificar la cantidad de radicales libres producidos en ratas pretratadas con CCl_4 , para después determinar si el tratamiento de dichas ratas con H^- disminuye la cantidad de RL. Lo anterior nos permitió verificar si el H^- posee actividad antioxidante en animal integro, contribuyendo de esta forma con más estudios que permitan establecer mejor su mecanismo de acción.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto antioxidante del H^- como hepatoprotector en ratas pretratadas con CCl_4 mediante la técnica de RPE.

3.2 Objetivos particulares.

- Identificar la producción de RL en el hígado de dos cepas de ratas, Wistar y Sprague-Dawley, tratadas con CCl_4 e $H^- + CCl_4$.
- Observar la producción de RL en bilis en ratas por RPE.
- Identificar y asignar cada una de las señales de RPE al radical o aducto formado.
- Cuantificar los RL a través del análisis estadístico de la intensidad relativa de las señales de RPE.
- Evaluar la producción de RL en las muestras de hígado de ratas tratadas con una dosis de H^- de 220 mg/Kg la cual induce menor peroxidación lipídica.

Capítulo 4

Metodología

Para llevar a cabo los objetivos planteados previamente, en el presente trabajo se utilizaron hígados de dos cepas de ratas, Wistar y Sprague-Dawley obtenidas de los bioterios de la Escuela Superior de Medicina y de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas respectivamente. Para cada especie se tuvieron tres grupos de estudio, llamados control, tetracloruro de carbono (CCl_4) e hidruro de silicio + tetracloruro de carbono ($H^- + CCl_4$). El CCl_4 utilizado fue del tipo comercial de la marca Quimicos Monterrey, el H^- fue proporcionado por el Doctor Juan Aceves del laboratorio de Fisicoquímica de la UNAM quien lo sintetizó de acuerdo al método de Stephanson [7]. Se utilizaron 3 ratas hembra por grupo y el tratamiento experimental duro seis días, excepto para el grupo CCl_4 .

4.1 Pretratamiento de animales.

Al grupo control se le administró aceite de oliva en relación 1:1 con la dosis de CCl_4 ; al grupo CCl_4 se le administró 0.15 y 0.2 mL/Kg de peso y para el grupo $H^- + CCl_4$, 220 y 200 mg de H^- /Kg de peso, para la cepa Sprague y Wistar respectivamente. Todas las dosis fueron administradas vía intraperitoneal. Para los animales que fueron tratados con H^- y CCl_4 , este último fue administrado en el sexto día una hora después de administrar H^- .

4.2 Protocolo establecido.

24 hs después de la última administración de los compuestos, las ratas se sacrificaron en una cámara de éter y se procedió de dos formas: Para la cepa Wistar se tomaron solamente muestras de hígado, un conjunto directamente, y otro con perfusión. La perfusión de hígados se llevó a cabo con solución salina isotónica (0.9% p/v) con el propósito de limpiar al hígado de hemoglobina. Por otra parte, las ratas de la cepa Sprague-Dawley primeramente fueron anestesiadas con 0.05 mL de Nembutal para posteriormente extraer su bilis la cual fue colectada en tubos eppendorf y a la cual se le agregó 50 μ l de 2,2'-dipyridyl (DP; 30 mM) y ácido batocuproínico-disulfónico (BC; 30 mM) para evitar la producción de RL *in situ* de las trazas de iones metálicos. Además de lo anterior, se agregó 10 mM de PBN. Posteriormente se sacrificaron las ratas para tomar las muestras de hígado. Para este grupo no se consideró necesaria la perfusión debido a que las intensidades relativas de RPE de estas muestras fueron muy bajas. Todas las muestras de ambas cepas fueron inmediatamente colocadas en tubos eppendorf y conservadas en hielo seco hasta el momento de ser analizadas. El estudio en bilis se realizó con el fin de identificar radicales libres intermediarios del metabolismo hepático *in vivo* y tener así un segundo criterio de evaluación [17, 18]. El uso de PBN se consideró idóneo debido a que es un atrapador de RL ligados al carbono, además de que es barato y de los más usados en la literatura. En la figura 4.1 podemos observar el procedimiento general seguido para la obtención de muestras en ambas cepas de ratas.

4.3 Detección experimental con RPE.

Para la obtención de espectros se utilizó un equipo de RPE JEOL modelo JES-RE3X conectado a una estación de trabajo HP-9000, la cual cuenta con un software de adquisición de datos y tarjeta de I/O, a través del cual el equipo fue configurado de la siguiente forma: Frecuencia de modulación: 100 KHz y tiempo de barrido de 2 min. Este tiempo se consideró adecuado puesto que no se observó diferencia al correrlos por más tiempo. Las muestras fueron caracterizadas a baja temperatura (77 K), haciendo uso de un dewar con nitrógeno líquido [19] y con una frecuencia de microondas promedio de 9.06877 GHz (Banda X) con una potencia de 1 mW.

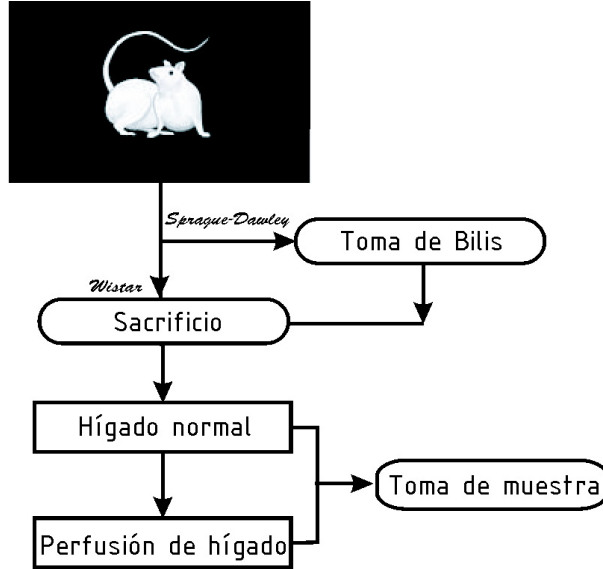


Figura 4.1: Diagrama general para la obtención de muestras.

Para la obtención de datos de las muestras, se tomó en cuenta la corrección debida a la descalibración del espectrómetro. De la condición de resonancia, dada por $h\nu = g\beta H$ (*ver apéndice*), al sustituir los valores de las constantes se tendrá que:

$$g = 7.144775175 \times 10^{-8} \frac{\nu}{H} [s \cdot mT] \quad (4.1)$$

con lo cual podemos calcular los valores de g . Obsérvese que este valor depende tanto del valor de campo magnético H , así como de la frecuencia ν .

Al medir una sustancia estándar tal como lo es el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), cuyo valor de $g=2.0037$ y con una frecuencia $\nu = 9.04718$ GHz, de la ecuación (4.1) se tendrá entonces que esta sustancia presentará una señal en $H=322.6035$ mT. Al no presentarse este valor en los espectros obtenidos, se hizo una corrección lineal para obtener los valores de H verdaderos (en el espectrometro, la señal de DPPH fue de 318 mT). Esta corrección lineal es posible gracias a la electrónica del equipo.

Como ejemplo de lo anterior veamos que si una señal se presenta en $H=329.1413$ mT en el espectro, su valor verdadero será de $H=333.9060$ mT. Luego, si este valor es medido a $\nu = 9.0471$ GHz, entonces por (4.1), su valor $g=1.9358$.

Capítulo 5

Resultados y discusión

Un espectro típico y estándar de RPE de un radical libre lo podemos observar en la figura 5.1 en la cual se aprecia el significado de sus ejes. Dada la sencillez del modelo, todos los espectros del presente trabajo se analizarán sin pérdida de generalidad y mostrando en el ángulo inferior izquierdo la escala de campo magnético utilizada para los cálculos y análisis.

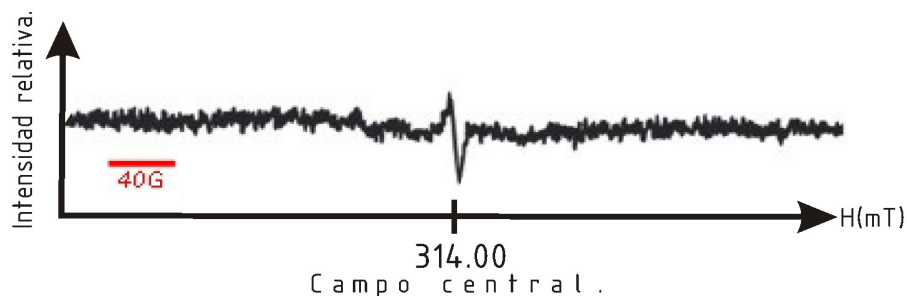


Figura 5.1: Espectro general de RPE mostrando un radical libre [20].

El análisis de espectros se llevó en cuatro grupos de animales con objeto de observar claramente las diferencias encontradas en cada serie, estas serán *control*, CCl_4 , $H^- + CCl_4$ y *bilis*. Para cada espectro se mostrará una tabla con los valores de g o factores espectroscópicos calculados, valores Γ o valores pico a pico del ancho de cada señal (en gauss) e intensidades relativas con sus desviaciones estándar de la media (en unidades arbitrarias). Los números entre paréntesis para los valores de g indican variación entre espectros normales y perfundidos. Asimismo, en cada parte se describen las diferencias entre las dos cepas de ratas utilizadas.

5.1 Espectros del grupo control.

5.1.1 Grupo control Wistar.

Este grupo presentó en general un espectro de RPE como el que se muestra a continuación:

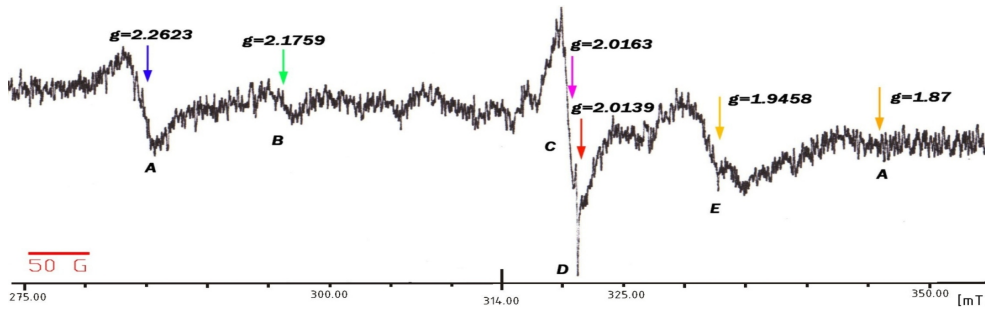


Figura 5.2: Espectro general de RPE del grupo control en ratas Wistar sin perfundir.

Este espectro presenta al menos 5 señales principales que fueron denotadas por letras de la A a la E, cuyas características se presentan en la tabla 5.1 para ambos grupos.

Tabla 5.1: Valores de g y Γ obtenidos para el grupo control cepa Wistar.

Señal	Nombre	g	Γ [G]	I normales [ua]	I perfundidos [ua]
A	CYP450	2.26(23)	25.35	621±88	586±41
B	Fe	2.175(9)	23.21	250±2	228±11
C	Hb-NO	2.01(63)	19.46	1244±143	1296±60
D	RL	2.01(39)	1.78	1003±11	1013±73
E	Fe-S	1.94(58)	45.35	690±60	563±10

La señal A es asignada a un ion Fe^{3+} con espín electrónico bajo ($S = 1/2$). Esto se atribuye a que en el hígado se encuentran hemoproteínas, estas enzimas tienen en su sitio activo un grupo *hemo*, el cual es una estructura plana formada por la protoporfirina IX y un átomo de hierro en el centro. Este puede formar hasta seis enlaces, cuatro con las cadenas polipépticas, un quinto con un residuo de *histidina* o *cisteína* y el último enlace con oxígeno

o agua, dependiendo estos dos últimos de la hemoproteína de la cual se trate (figura 5.3).

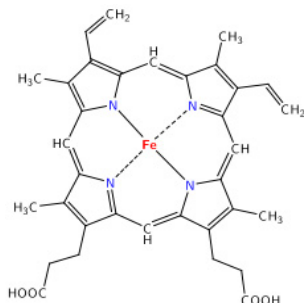


Figura 5.3: Estructura del grupo hemo.

Por tanto, la señal A, cuyo valor de $g = 2.2623$ es debida a la presencia de CYP450, pues estas hemoproteínas se encuentran principalmente en el hígado y son las encargadas de metabolizar una gran cantidad de xenobioticos. Estudios de RPE de CYP450 han mostrado una señal rómbica con valores en $g = 2.41, 2.26$ y 1.87 para este tipo de enzimas [21], por lo cual, la señal A es el rasgo principal del espectro rómbico, y la señal con valor de $g = 1.87$ es la componente que se encuentra a la derecha del rasgo principal, además se esperaría una señal más a la izquierda con $g = 2.41$. Sin embargo, esta no se alcanza a ver debido a que está fuera del intervalo analizado.

Por lo anterior, no debe confundirse a las señales A y al conjunto B con un espectro de la coenzima-A dehydrogenasa [22], pues, esta por contener un ion cobre, se descarta, dado que las señales en conjunto a la derecha de la marca B no presentan la periodicidad de interacción hiperfina propia del ion Cu^{2+} . Con esto aseguramos entonces que las señales B son generadas por iones Fe^{3+} bajo distintos ambientes cristalinos y de bajo espín asociados a distintos tipos de citocromo tales como el cit a, cit b o cit c.

La señal C, la más intensa y con valor de $g = 2.0163$ es bastante conocida y esta bien identificada como la resultante de la interacción Fe-NO, a través del grupo *hemo* que se encuentra en las muestras. Este último es llamado *complejo hemo-nitrosilo*, el cual tiene como espectro característico, el mostrado en la figura 5.4 [23].

Por otra parte, en la señal C encontramos superpuesta la señal D con $g = 2.0139$, esto es, un radical libre, especie resultante de las reacciones biquímicas que se llevan a cabo. Este tipo de RL son estables, es decir, son

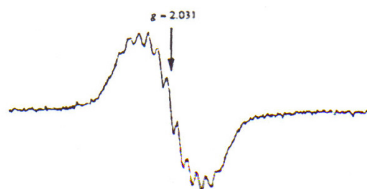


Figura 5.4: Espectro de RPE del complejo hemo-nitrosilo.

RL que se han adherido a alguna molécula como el hemo-nitrosilo. La magnitud de la intensidad de esta señal es de interés central, pues es aquí donde pondremos nuestra atención para monitorear los cambios en la producción de RL.

Finalmente para la señal E no se ha encontrado una caracterización aislada debido al gran número de componentes que podemos encontrar en el hígado, aunque se atribuye a proteínas con centro Fe-S debido a que el valor de $g=1.94$ es muy cercano al citado en otras fuentes [24].

La figura 5.5 muestra ahora el espectro de RPE del grupo control perfundido, el cual es muy semejante al de los hígados sin perfundir pues sólo se observa una pequeña disminución en la intensidad de las señales (tabla 5.1), pues durante la perfusión, parte de la hemoglobina fue eliminada del tejido; esta última, al ser también una hemoproteína, contribuye en la intensidad de señales observadas debido al grupo hemo. Sin embargo, de aquí podemos ya concluir que el hecho de perfundir o no el tejido no representa una diferencia significativa en la intensidad de las señales, puesto que también son debidas a otro tipo de proteínas tales como el CYP450 que se encuentran en el tejido.

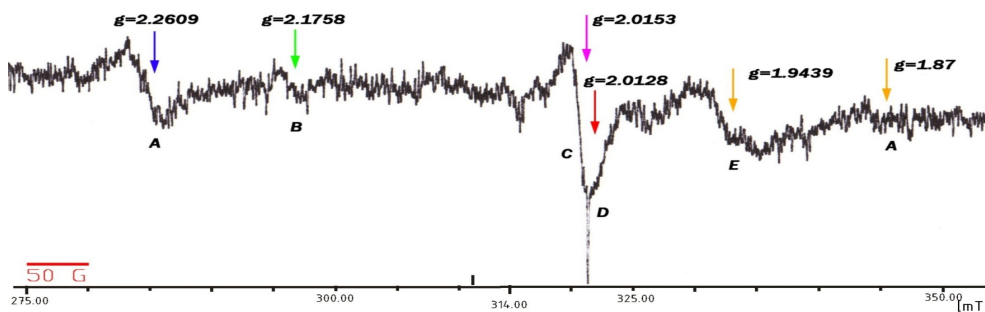


Figura 5.5: Espectro general de RPE del grupo control de ratas Wistar perfundidas.

5.1.2 Grupo control Sprague-Dawley.

Para este grupo, se obtuvo el espectro presentado en la figura 5.6.

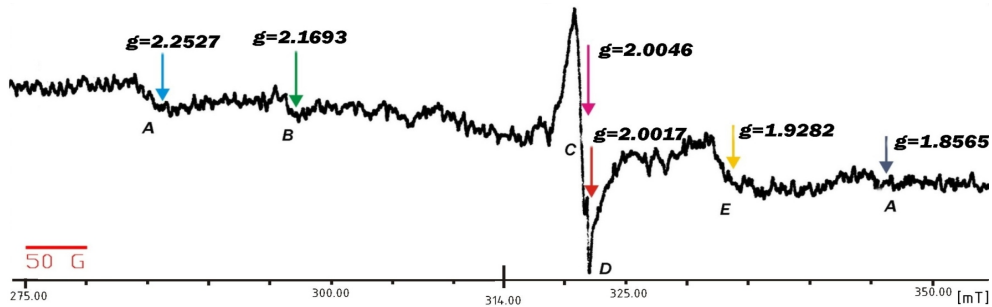


Figura 5.6: Espectro general de RPE del grupo control Sprague-Dawley.

Los datos obtenidos de este espectro se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2: Valores de g y Γ obtenidos para el grupo control Sprague-Dawley.

Señal	Nombre	g	Γ [G]	I normales [ua]
A	CYP450	2.2527	37.85	562
B	Fe	2.1639	24.28	249 ± 35
C	Hb-NO	2.0046	17.14	1773 ± 186
D	RL	2.0017	1.42	582 ± 45
E	Fe-S	1.9282	55.35	718 ± 98

Este espectro mostró semejanza con respecto al de control de la cepa Wistar en cuanto a forma general del espectro así como en la localización de señales. Los valores de g variaron en un 0.42% al comparar con los de control Wistar, lo cual indica la presencia de los mismos componentes, esto es, CYP450 ($g=2.25$, $g=1.85$), Fe^{3+} en sus distintos ambientes cristalinos ($g=2.16$), complejo hemo-nitrosilo ($g=2.0046$), RL ($g=2.0017$) y otras especies. Se observa también la diferencia entre intensidades en casi todas las señales con respecto al grupo de ratas Wistar, pues dado que el área bajo la curva de un espectro de RPE es proporcional al número de entes resonantes, se infiere entonces que la cepa Sprague presenta un metabolismo distinto al de Wistar. Para esta cepa no se realizaron perfusiones al no encontrarse diferencia significativa en la intensidad de señales.

5.2 Espectros del grupo CCl_4 .

5.2.1 Grupo CCl_4 Wistar.

El espectro obtenido de las ratas Wistar tratadas con CCl_4 se presenta a continuación:

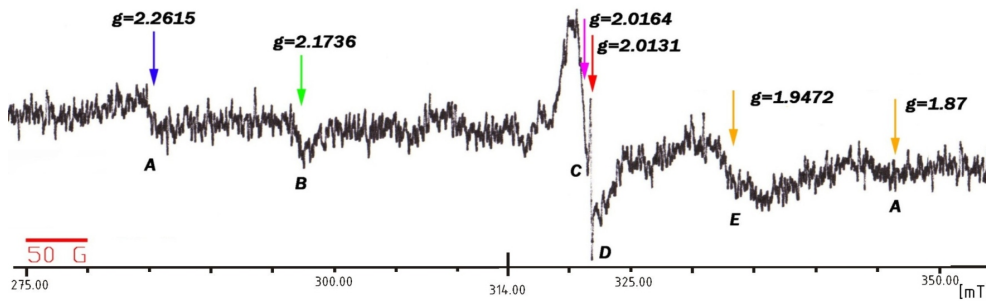


Figura 5.7: Espectro general de RPE del grupo CCl_4 normal Wistar.

los valores característicos de este tipo de espectros están dados en la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Valores de g y Γ obtenidos para el grupo CCl_4 Wistar.

Señal	Nombre	g	Γ [G]	I normales [ua]	I perfundidos [ua]
A	CYP450	2.26(15)	21.0	199±22	173±2
B	Fe	2.17(36)	9.6	178±25	187±4
C	Hb-NO	2.01(64)	23.0	1106±105	1053±88
D	RL	2.013(1)	1.1	1232±61	1194±50
E	Fe-S	1.94(72)	57.1	418±68	454±59

En la figura 5.7 se aprecia de manera inmediata la disminución de intensidad en la señal A en comparación con las de control (figura 5.6). Esto se debe a que el CCl_4 es metabolizado por el CYP450 al cual fueron asignadas estas señales. Como se muestra en la figura 1.5, la primera reacción del metabolismo del CCl_4 es catalizada por el CYP450 dando como producto el radical triclorometil, el cual puede enlazarse covalentemente al CYP450 [25] y por lo tanto formar un aducto, lo cual origina que el hierro no tenga el mismo ambiente químico y por lo tanto, la intensidad de la señal A disminuya.

Otro aspecto importante en la figura 5.7 es el aumento de la intensidad en la señal D en un 22.79% con respecto al control Wistar, esto es debido a un aumento en la producción de RL ya que cuando el CCl_4 es metabolizado (figura 1.5) produce el radical *triclorometil* que, al reaccionar con el oxígeno, forma el radical *peroxitriclorometil*, siendo este es el más propenso a detectarse via RPE y responsable de la lipoperoxidación, produciéndose así una mayor cantidad de RL [26].

La figura 5.8 muestra el espectro de RPE del grupo CCl_4 perfundido en el cual se observa las mismas señales solo que ahora con menor intensidad.

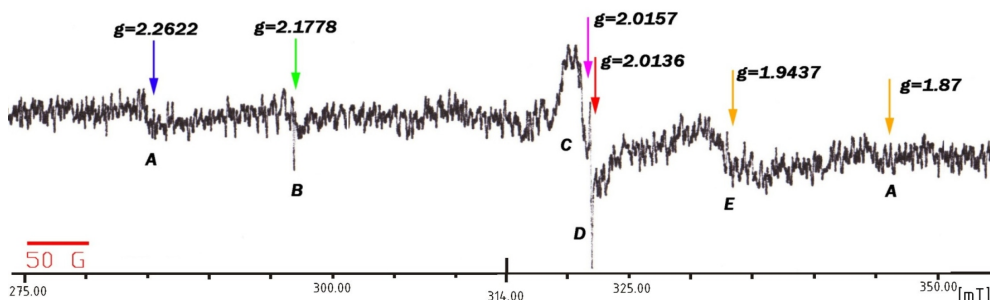


Figura 5.8: Espectro general de RPE del grupo CCl_4 perfundido Wistar.

Por lo anterior, podríamos concluir entonces que el CCl_4 es metabolizado al radical triclorometil y peroxitriclorometil los cuales originan cambios en las señales de RPE, esto de acuerdo a lo reportado [1, 26], ya que para asegurar que sea debido a este tipo de radicales, sería necesario emplear un atrapador de radicales, tal como el PBN, cuando las ratas son tratadas con el CCl_4 .

5.2.2 Grupo CCl_4 Sprague-Dawley.

Para este caso, se obtuvo el espectro presentado en la figura 5.9.

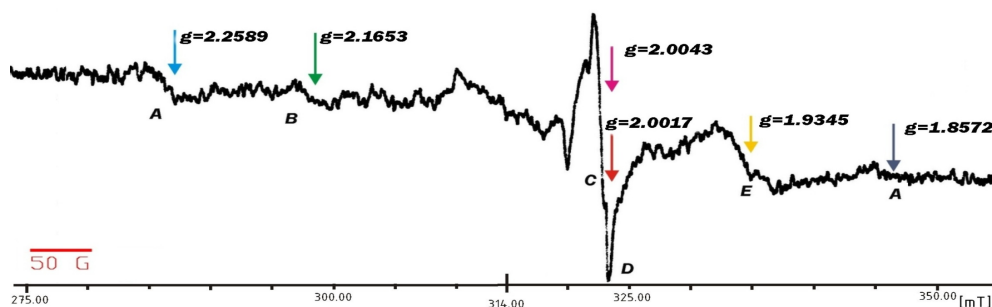


Figura 5.9: Espectro general de RPE del grupo CCl_4 Sprague-Dawley.

cuyas características están indicadas en la tabla 5.4. Primeramente, como

Tabla 5.4: Valores de g y Γ obtenidos para el grupo CCl_4 Sprague-Dawley.

Señal	Nombre	g	Γ [G]	I normales [ua]
A	CYP450	2.2589	27.85	297 ± 7
B	Fe	2.1653	29.28	226 ± 1
C	Hb-NO	2.0043	16.06	1600 ± 42
D	RL	2.0017	1.42	729 ± 72
E	Fe-S	1.9345	40.35	509 ± 61

en el caso anterior, se encontró una pequeña diferencia en los valores de g para todas las señales con variación del 0.11%. Análogo a Wistar, el comportamiento entre control y CCl_4 presenta una disminución en las señales A, B, C y E lo que esta de acuerdo a lo presentado en la sección 5.2.1, es decir, disminución de la intensidad de señales debido a la producción de aductos por CYP450. También se observó un ligero aumento en la señal de RL (D) debido a la lipoperoxidación, lo cual también esta de acuerdo a lo establecido en 1.2.4 y 5.2.1. Por todo lo anterior y debido a que la intensidad de señales varió con respecto a la cepa utilizada, se confirma entonces una diferencia de la capacidad metabólica entre las cepas Wistar y Sprague; aunque la presencia y respuesta de complejos, es semejante en ambas.

5.3 Espectros del grupo $H^- + CCl_4$.

5.3.1 Grupo $H^- + CCl_4$ Wistar.

El espectro general obtenido presenta una nueva variante en comparación a los dos anteriores.

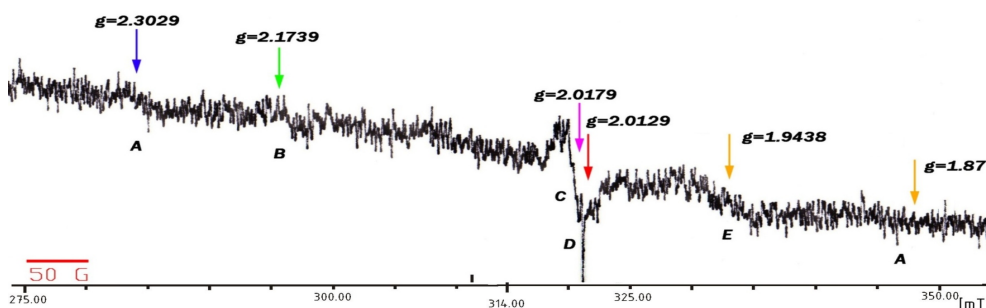


Figura 5.10: Espectro general de RPE del grupo $H^- + CCl_4$ normal Wistar.

Las señales A, B y E prácticamente han desaparecido, sus intensidades son muy pequeñas en comparación a todos los casos anteriores, esto puede ser debido a la formación de complejos entre el hidruro de silicio con las hemoproteínas, principalmente con el CYP450; esto es de gran importancia, ya que al inhibir al CYP450, el CCl_4 no sería metabolizado y por tanto, los radicales producto de su metabolismo ya no se originarían. Lo anterior produce una disminución del 28.63 y 32.31% en la intensidad de las señales C y D como se observa en la figura 5.10. Esto se debe a que hay una menor cantidad de radicales porque el hidruro de silicio los ha neutralizado, ya que se ha reportado [9] que puede atrapar radicales como el anion superoxido o el radical hidroxilo, esquematicamente como se observa en la figura 5.11.

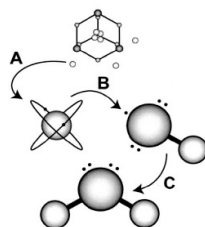


Figura 5.11: Esquema de la neutralización de RL debido a H^- .

El esquema presentado en la figura 5.11 indica que en una solución acuosa, los aniones hidruro se disocian (A) en la solución donando así su electrón $1s'$ (B) al electrón desapareado de las especies radicales. El producto de esta reacción (C) produce nuevos productos de las especies posradicales neutralizadas.

Cual sea el mecanismo de acción del H^- : inhibición de CYP450 o atrapador de RL, podemos observar que el H^- tiene un efecto hepatoprotector al actuar como antioxidante disminuyendo así la cantidad de RL.

Los valores de g obtenidos para este último espectro se presentan en la tabla 5.5.

Tabla 5.5: Valores de g y Γ obtenidos para el grupo $H^- + CCl_4$ Wistar.

Señal	Nombre	g	Γ [G]	I normales [ua]	I perfundidos [ua]
A	CYP450	2.(3029)	30.00	183 ± 16	251 ± 26
B	Fe	(2.1739)	19.64	165 ± 6	115 ± 7
C	Hb-NO	2.017(9)	22.85	789 ± 92	983 ± 125
D	RL	2.0129	1.94	834 ± 58	604 ± 136
E	Fe-S	1.94(38)	57.67	322 ± 8	325 ± 30

El espectro de $H^- + CCl_4$ perfundido no presenta ninguna característica nueva con respecto al no perfundido.

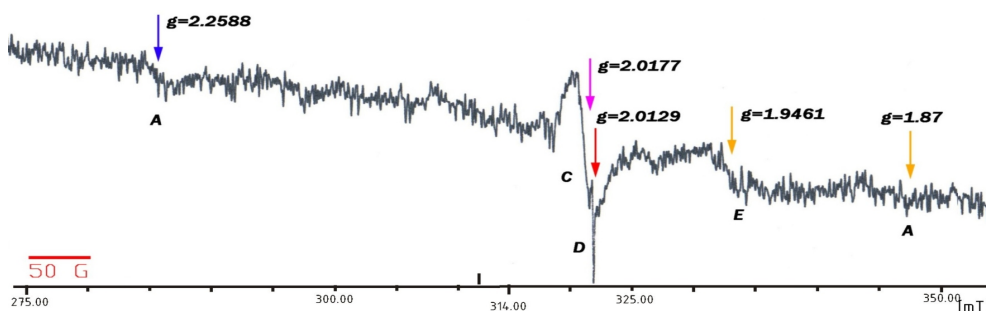


Figura 5.12: Espectro general de RPE del grupo $H^- + CCl_4$ perfundido Wistar.

5.3.2 Grupo $H^- + CCl_4$ Sprague-Dawley.

La figura 5.13 nos muestra el espectro obtenido para el presente caso.

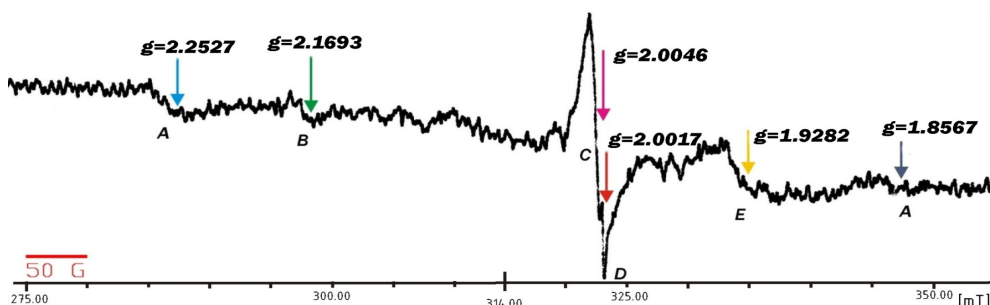


Figura 5.13: Espectro general de RPE del grupo $H^- + CCl_4$ Sprague-Dawley.

La tabla de resultados 5.6 a continuación presenta las cantidades obtenidas en cada señal del espectro mostrado en la figura 5.13.

Tabla 5.6: Valores de g y Γ obtenidos para el grupo $H^- + CCl_4$ Sprague-Dawley.

Señal	Nombre	g	Γ [G]	I normales [ua]
A	CYP450	2.2527	34.99	297 ± 7
B	Fe	2.1693	20.71	226 ± 1
C	Hb-NO	2.0046	16.06	1600 ± 42
D	RL	2.0017	1.96	729 ± 72
E	Fe-S	1.9282	40.35	509 ± 509

Nuevamente, se hace presente la semejanza entre los espectros de hígado de las cepas Wistar y Sprague en cuanto a localización de señales y forma general del espectro. Se observa una disminución en las intensidades de las señales A, B y E en comparación con CCl_4 -Sprague, con lo que la presencia de H^- lleva a cabo su efecto hepatoprotector por lo mencionado en 5.3.1.

5.4 Espectros de bilis.

Por último, se presentan los espectros de bilis obtenidos de la cepa Sprague-Dawley. Estos solamente presentaron una señal que corresponde a la detección de RL, lo cual no coincide con lo publicado por otros autores puesto que estos presentan espectros como el que se muestra en la figura 5.14 [17, 18].

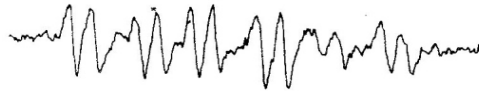


Figura 5.14: Espectro de RPE de bilis respecto a Knecht [17].

A pesar de que se llevaron a cabo numerosos experimentos con el fin de lograr lo anterior, no se obtuvieron resultados semejantes a los de la figura 5.14. Los espectros de este grupo presentaron el comportamiento de la figura 5.15 donde podemos observar los tres grupos analizados.

La tabla 5.7 presenta los datos obtenidos de estos tres grupos.

Tabla 5.7: Valores de g y Γ obtenidos para bilis en los tres grupos.

Grupo	g	Γ [G]	Intensidad [ua]
Control	2.0016	0.9	1906 ± 215
CCl_4	1.9998	0.7	1656 ± 233
$H^- + CCl_4$	2.0024	0.9	1747 ± 42

Aquí se observa que los valores de g obtenidos en bilis difieren en tres centésimas con respecto a los obtenidos de hígados de la cepa Sprague-Dawley, con lo cual podemos asegurar que se tienen en efecto RL en el valor aproximado de $g=2.04$. Dado que se esperaba un espectro de doce líneas (fig 5.14) y con ello saber que tipo de complejos se pueden obtener de bilis, se deja abierta aún la investigación para conocer las características exactas que nos puedan llevar a tales resultados, pues a pesar del uso de PBN y compuestos de forma semejante a lo publicado para todos los grupos, solamente se obtuvo un pico como respuesta en los mismos.

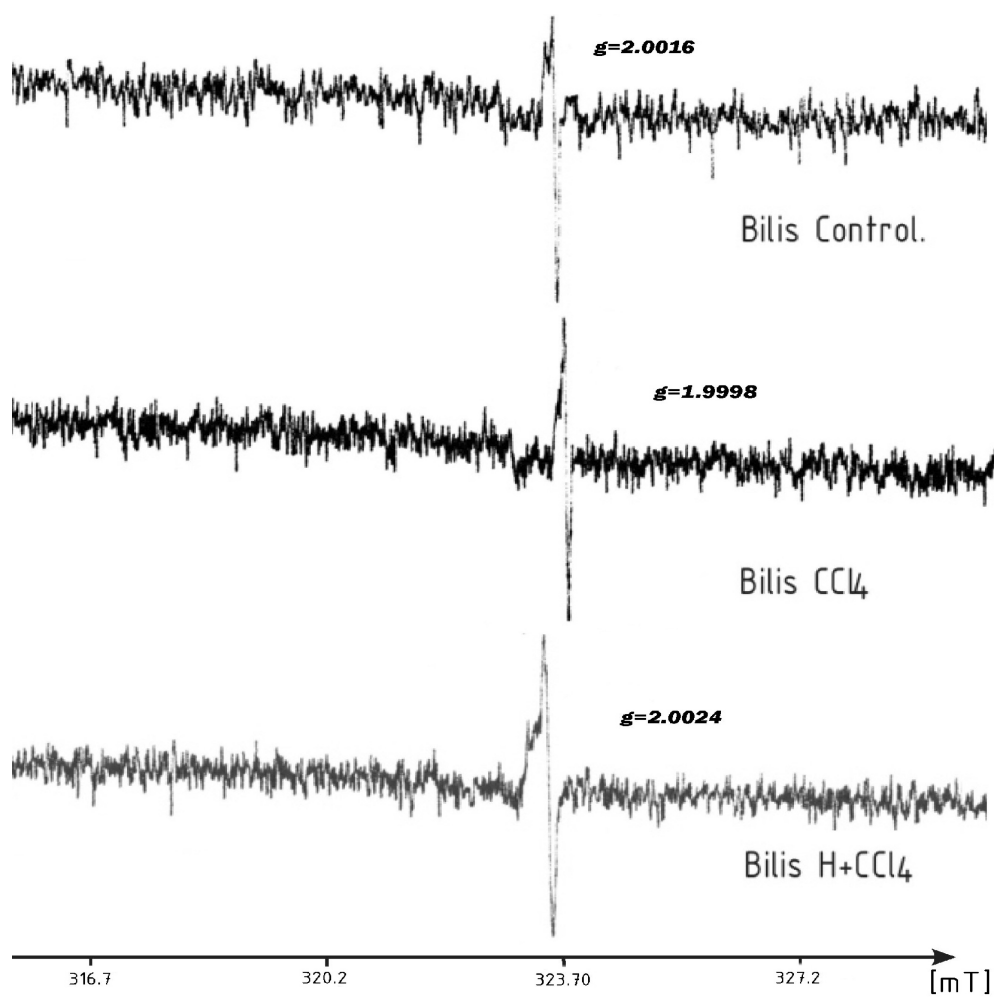


Figura 5.15: Espectro general de RPE de bilis.

5.5 Análisis cuantitativo.

Se determinó la magnitud de las intensidades obtenidas para todas las señales y en todos los espectros con el fin de comparar las diferencias entre señales y grupos. Una gráfica de barras nos ayuda a observar el comportamiento general de los valores de estas intensidades. Primeramente, para los hígados sin perfundir, la figura 5.16 nos muestra el comportamiento general con base en los resultados de la tablas 5.1, 5.3 y 5.5.

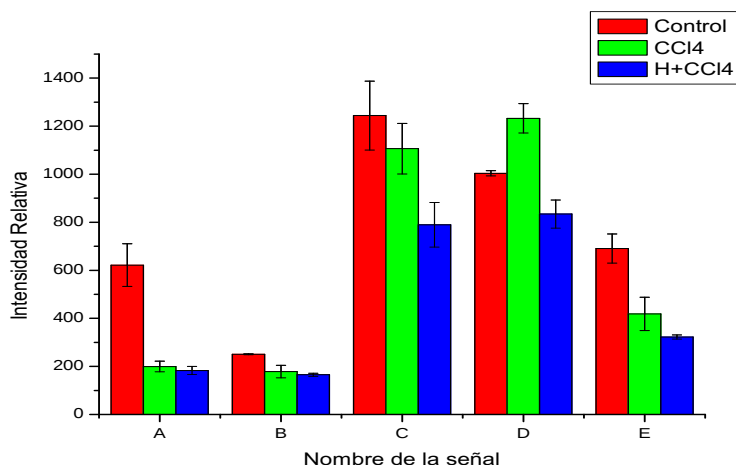


Figura 5.16: Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en el hígado de ratas Wistar sin perfusión.

Como se observa, la intensidad para la señal A asignada al ion hierro del CYP450 disminuye significativamente entre las muestras obtenidas de ratas del grupo control en comparación con las que fueron tratadas con $H^- + CCl_4$, indicando esto que el hierro puede estar enlazándose covalentemente al $\bullet CCl_3$ o formando complejos con el H^- disminuyendo su intensidad en ambos casos.

El conjunto B tan solo muestra una ligera disminución en la intensidad de la señal la cual es debida a iones Fe, lo cual correlaciona la disminución observada para señales A. El conjunto C, propio de la señal Fe-NO muestra un comportamiento semejante al del conjunto A, la señal fue más intensa en los controles en comparación con las muestras obtenidas de ratas pretratadas con CCl_4 y con $H^- + CCl_4$ lo cual indica que CCl_4 e H^- no solo interaccionan con el grupo hemo del CYP450 sino también con el de otras proteínas como puede

ser la hemoglobina y la oxido nítrico sintasa, ya que la intensidad de la señal con H^- disminuyó 28.66% en comparación con la de CCl_4 . La intensidad de las señales del conjunto D asignadas a RL fueron diferentes dependiendo del tratamiento dado a las ratas. En esta señal podemos observar que la intensidad de la señal de las ratas tratadas con CCl_4 es mayor en comparación con las de control, lo cual esta de acuerdo a lo reportado ya que la cantidad de RL incrementa. Si comparamos la intensidad de la señal de las muestras de las ratas tratadas con CCl_4 y las que fueron tratadas con $H^- + CCl_4$ observamos que la intensidad de la señal es mucho menor en un 32.31%, lo cual indica que el H^- actúa como atrapador de RL ejerciendo así un efecto hepatoprotector ante la administración de CCl_4 . La señal E, que se atribuyo a proteínas con centros de Fe-S, presenta efectivamente un comportamiento análogo a la señal B es decir se presentan enlaces covalentes con $\bullet CCl_3$ o formación de complejos con H^- .

Para los hígados perfundidos se obtuvo la gráfica 5.17, nuevamente con referencia en las tablas 5.1, 5.3 y 5.5:

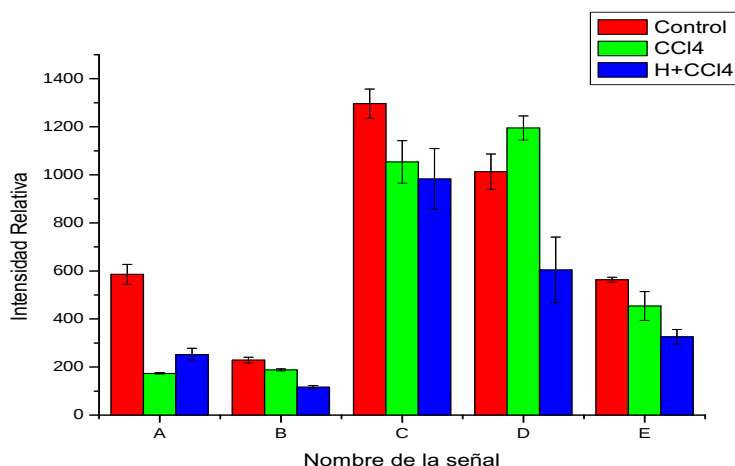


Figura 5.17: Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en el hígado de ratas Wistar con perfusión.

La tendencia numérica muestra un comportamiento semejante al de los hígados sin perfusión, observándose solamente una ligera disminución de la señal E con respecto a las especies de control.

Por otra parte, para los espectros de hígado de la cepa Sprague-Dawley se obtiene la gráfica 5.18 con base en las tablas 5.2, 5.4 y 5.6.

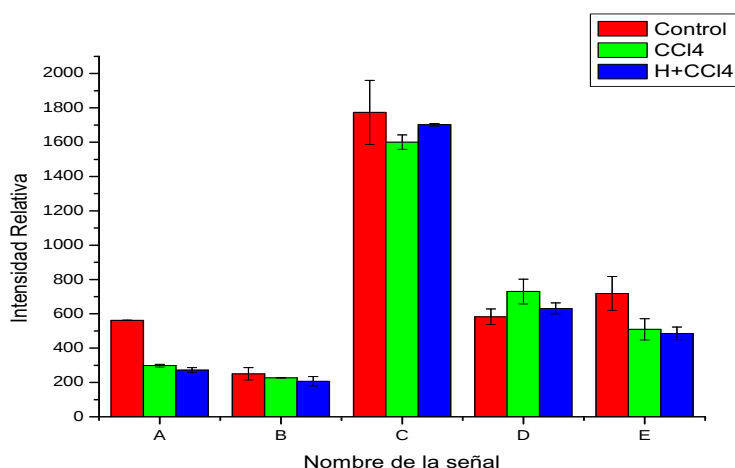


Figura 5.18: Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en el hígado de ratas Sprague-Dawley.

En la gráfica 5.18 se puede observar en las señales A, B y E una tendencia decreciente, que es común en todas las gráficas. En cambio, la señal C (complejo hemo-nitrosilo) muestra un comportamiento extraño, pues primero, la presencia de CCl_4 disminuye la intensidad de la señal y luego, la presencia de $H^- + CCl_4$ la aumenta. Sin embargo, debido a sus desviaciones, es posible el hecho de que estas intensidades sean iguales. Por otra parte, en la señal D (RL), se observa una disminución aparente en la intensidad de la señal debida a $H^- + CCl_4$ al comparar con la señal de CCl_4 aunque nuevamente sus desviaciones se traslapan. Así pues, al no tener clara una diferencia de estos resultados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor sobre las señales C y D de los 3 grupos estudiados. Los resultados, con un nivel de confianza del 95% (es decir: nivel de confianza = $(1-\alpha)\%$; $\alpha = 0.05$), indicaron que no hay diferencia significativa entre las medias poblacionales para esta señal. Lo mismo sucede para la señal D empleando el mismo α . Por lo anterior, podemos decir entonces que no se observa efecto alguno del hidruro de silicio en el hígado de la cepa Sprague-Dawley en cuanto a disminución de radicales libres.

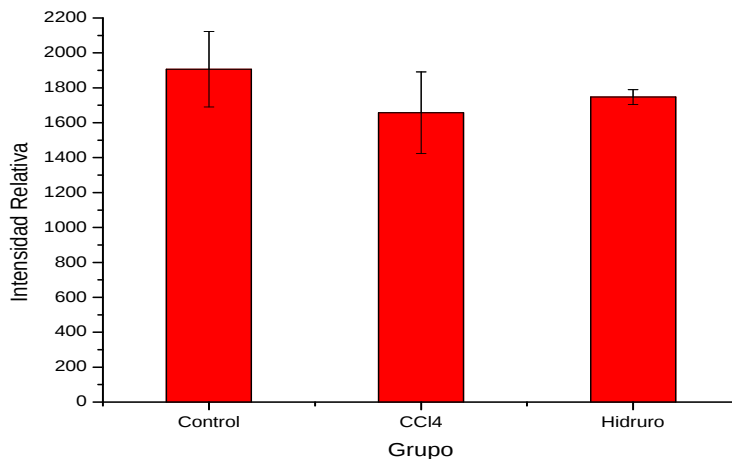


Figura 5.19: Gráfico comparativo de intensidades de señales de RPE en bilis de ratas Sprague-Dawley.

Por otra parte, la gráfica 5.19 presenta ahora los resultados obtenidos de bilis con respecto a la tabla 5.7. Como puede notarse, se tiene un caso semejante al de hígados de cepa Sprague-Dawley, pues al considerar sus desviaciones estándar de la media, obtenemos el caso en el que son prácticamente iguales los resultados en los 3 grupos. Para asegurar lo anterior, también aquí se realizó un análisis ANOVA de un factor con un $\alpha = 0.05$, mostrando en efecto, que no hay diferencia significativa en las medias poblacionales, por lo cual, tampoco se observó diferencia en bilis de la cepa Sprague-Dawley con respecto a la producción de RL al administrar CCl_4 o H^- .

Capítulo 6

Conclusiones

1. En los espectros de hígado de ratas Wistar y Sprague-Dawley se encontraron señales que corresponden a CYP450 ($g=2.262$), el grupo *hemo-nitrosilo* ($g=2.016$) y, junto a este, un radical libre ($g=2.013$) que se atribuye al peroxitriclorometil. Lo anterior esta de acuerdo con lo publicado en la literatura [21, 23].
2. La administración de CCl_4 disminuye las intensidades de la señales debidas al CYP450 y al grupo *hemo-nitrosilo* en un 12.97% y 11.08% respectivamente, esto debido a los enlaces covalentes que se metabolizan, y se aumenta la producción de RL en un 22.79%.
3. Al disminuir notablemente todas las señales en el espectro del grupo $\text{H}^- + \text{CCl}_4$, se atribuye que la presencia de H^- inhibe el metabolismo de CCl_4 por el CYP450 o atrapa RL, lo cual implica una menor producción de radicales libres, con esto entonces, H^- sirve como hepatoprotector en ratas Wistar.
4. No se observó variación en la intensidad de las señales de la cepa Sprague-Dawley (excepto A) debido a la diferencia de capacidades metabólicas entre ambas cepas. Lo anterior fue respaldado con un análisis ANOVA de un factor con un $\alpha = 0.05$.
5. De los espectros de bilis de rata Sprague-Dawley se corroboro la presencia de RL al arrojar el valor promedio de $g=2.0016$ que el encontrado en hígado. Sin embargo tampoco se observó diferencia de intensidades en todos los grupos.

Bibliografía

- [1] Slater, Trevor. *Free-Radical mechanism in tissue injury*. Biochem. J. 222; pp 1-15; 1984.
- [2] Bassenge, E.; Sommer, O.; Schwemmer M.; Bunger, R. *Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279: H2431-H2438; 2000.
- [3] Recknagel, Richard O.; Glende Eric A.; Dolak James A. and Waller Robert L. *Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity*. Pharmac. Ther. Vol. 43, pp 139-154; 1989.
- [4] Davidson D.G. Eastham W.N. *Acute liver necrosis following overdose of paracetamol*. Br. Med. J; 5512: 497-9; 1966.
- [5] Katzung Bergtram G. *Farmacología básica y clínica*. Editorial Manual Moderno. 1995.
- [6] Marquardt Hans, Schäfer Siegfried, McClellan Roger. *Toxicology*. Academic Press; 1999.
- [7] Stephanson, C.J.; Flanagan, G.P. *Synthesis of a novel anionic hydride organosiloxane presenting biochemical properties*. Int. J. Hydrogen Energy 28(11):1243-1250; 2003.
- [8] Carlisle, E. M.; *The Nutritional Essensiality of Silicon*. Nutr. Rev. 40:193-197; 1982.
- [9] Stephanson, C.J.; Flanagan, G.P. *Antioxidant Capacity of Silica Hydride: A combinational Photosensitization and Fluorescence detection assay*. Free Radical Biology and Medicine 35(9):1129-1137; 2003.

-
- [10] Timm, John A. *Química General*, McGraw-Hill, 1992.
- [11] Purdy-Lloyd KL, Wasmund W, Smith L, Raven PB.; 4:153. *J. Med Food*; 2001.
- [12] Bottirolli G, Croce AC, Balzarini P, Locatelli D, Baglioni P, Lo Nostro P, Monici M, Patesi R.; *Photochem Photobiol* 66:374-83; 1997.
- [13] A. Carrington and A. D. McLachlan, *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper and Row, New York; 1979.
- [14] Christen Y. *Oxidative stress and Alzheimer disease*. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2): 621S-629S; 2000.
- [15] Hurrell R. *Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability*. *J Nutr* 133 (9): 2973S-7S; 2003
- [16] Hunt J. *Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets*. *Am J Clin Nutr* 78 (3 Suppl): 633S-639S. PMID 12936958; 2003.
- [17] Kathryn T. Knecht & Ronald P. Mason. *Drug Metabolism and Disposition* 16(6):813-817; 1988.
- [18] Christopher H. Kennedy, Kirk R. Maples & Ronald P. Mason. *Pure & Appl. Chem.* 62(2):295-299; 1990.
- [19] Jeol, *Instructions ESR Data System*, Ed. Jeol, LTD, Tokyo, Japan; 1992.
- [20] Méndez Chávez Francisco Javier. *Detección directa de radicales libres por RPE en un modelo experimental de choque séptico*. Tesis de Licenciatura ESFM-IPN. Octubre 2006.
- [21] Arthur G. Roberts, A. Patricia Campbell & William M. Atkins. *Biochemistry*: 44, 1353-1366; 2005.
- [22] B. Commoner, J. J. Heise, B. B. Lippincott, R. E. Norberg. *Science* 120, 57; 1957.
- [23] Walee Chamulitrat, Sandra J. Jordan, Ronald P. Mason, Keiko Saito and Richard G. Cutler. *Journal of biological Chemistry*. Vol 268, No.16, pp. 11520-11527; 1993.

-
- [24] Enno K. Ruuge, Irina V. Zabbarova, Olga V. Korkina, Andrei N. Khatkevich, Vladimir L. Lakomkin, Alexander A. Timoshin. *Oxidative Stress and myocardial Injury: Spin-trapping and low temperature EPR study*. Current Topics in Biophysics 26(1), 145-155; 2001.
- [25] E. Becker, B. Messner, and J. Berndt. *Two mechanisms of CCl₄-induced fatty liver. Lipid peroxidation or covalent binding studied in cultured rat hepatocytes*. Free Radic. Res. Commun: 3, 299-308; 1987.
- [26] Hans Jürgen Ahr, Laurence John King, Wolfgang Nastainczyk and Volker Ullrich. *The mechanism of cloroform and carbon monoxide formation from carbon tetrachloride by microsomal cytochrome P-450*. Biochemical Pharmacology, Vol 29, 2855-2861. 1980.

Apéndice

A Teoría de RPE.

La resonancia paramagnética electrónica es un método espectroscópico. Zavoisky fue el primero en hacer uso de ella para detectar electrones desapareados en sistemas físicos. Esta basado en el principio de que el electrón posee espín que le da un momento magnético tal que, al colocarlo en un campo magnético externo, el electrón se orienta con respecto a este en direcciones específicas. El uso de esta técnica en sistemas biológicos se empezó a llevar a cabo desde el momento en que se observó que ciertos fenómenos bioquímicos generaban RL o que los compuestos que se trabajaban incorporaban iones metálicos con capas semillenas. Dado que nuestra investigación concierne en observar como se producen radicales libres en el hígado, la técnica resulta apropiada para llevar a cabo nuestros objetivos. A continuación se presentan los fundamentos teóricos en los que se sustenta.

A1 Principio básico de RPE.

Para el caso más simple del espín de un electrón libre, $m_J = m_S = \pm 1/2$, solamente dos niveles Zeeman son posibles de acuerdo con la ecuación:

$$E_{m_s} = g_e \beta_e m_s H \quad (A1)$$

donde g_e es el factor espectroscópico para un electrón libre con la corrección de la electrodinámica cuántica o en general, el factor de Landé; β_e es el magnetón de Bohr y m_s la proyección del espín del electrón. El comportamiento gráfico de ésta ecuación se puede observar en la figura A1.

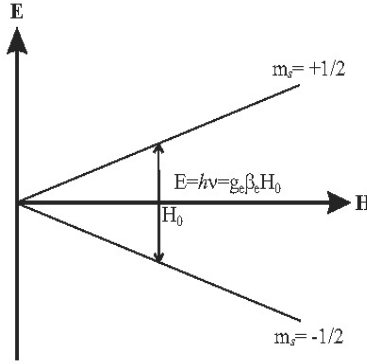


Figura A1: Efecto Zeeman y transición dipolar magnética de un electrón en un campo magnético externo H .

Una transición ΔE puede ser inducida entre estos niveles aplicando un campo magnético oscilante $\mathbf{H}_1(t)$ de frecuencia ν_0 perpendicular a $\mathbf{H}_0$ tal que se cumpla la llamada *ecuación de resonancia* dada por la expresión:

$$\Delta E = h\nu_0 = g_e \beta_e H_0 \quad (A2)$$

Si se sustituye $g_e = 2.0023$, $\beta_e = 9.2741 \times 10^{-21}$ erg/gauss, $h = 6.6262 \times 10^{-27}$ erg·seg, encontramos que

$$\nu_0/H_0 = 2.8025 \text{ MHz/G.}$$

A2 Hamiltoniano de espín.

En un ion paramagnético, como sabemos, sus niveles de energía son discretos. Estos niveles energéticos son los valores propios (eigenvalores) del

operador hamiltoniano el cual representa la energía electrónica total del ion. Usualmente sólo el más bajo (energéticamente hablando) de estos niveles está poblado a temperaturas ordinarias de $300K$ ($\approx 200 \text{ cm}^{-1}$) y es éste el grupo de niveles de estado base, el cual es la mayoría de las veces el único involucrado en el experimento de resonancia, es decir, transiciones inducidas entre ellos bajo la influencia de un campo de microondas.

La energía de cada nivel dependerá de las propiedades del ion (carga eléctrica, espín, masa, número atómico, etc.) el efecto del campo cristalino y el campo magnético aplicado, junto con las interacciones nucleares apropiadas.

Con todos estos términos, se busca un método formal para describir la energía en términos de un número pequeño de parámetros, los cuales también se busca que sean obtenidos experimentalmente.

La interpretación de los resultados, se efectúa a través del hamiltoniano de espín, expresión que en general, esta dada como:

$$\mathcal{H} = \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H}_0 + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S} \quad (\text{A3})$$

donde el primer término se refiere a la interacción Zeeman electrónica, el segundo término representa la interacción hiperfina y el tercero se refiere al campo cristalino, donde $\mathbf{g}$, $\mathbf{A}$ y $\mathbf{D}$ son los tensores espectroscópico, de interacción hiperfina y de campo cristalino, respectivamente.

Las interacciones magnéticas son anisotrópicas por naturaleza y por tanto, son descritas en general por cantidades tensoriales y este es el caso del momento magnético anisotrópico de cada electrón. La propiedad de anisotropía de μ está medida por el factor espectroscópico $\mathbf{g}$.

A3 Término Zeeman electrónico.

La expresión más general que representa la interacción Zeeman entre un campo magnético $\mathbf{H}_0$ y el espín electrónico $\mathbf{S}$ es [13]:

$$\mathcal{H}_{ze} = \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H}_0 \quad (\text{A4})$$

donde $\mathbf{H}_0$ y $\mathbf{S}$ son los vectores de campo magnético externo y de espín electrónico y $\mathbf{g}$ es un tensor. La expresión $\mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H}_0$ puede ser escrita en forma matricial como:

$$\begin{bmatrix} S_x & S_y & S_z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} H_x \\ H_y \\ H_z \end{bmatrix}$$

donde $H_x, H_y, H_z, S_x, S_y, S_z$, son las tres componentes escalares de los vectores $\mathbf{S}$ y $\mathbf{H}_0$, definidos en términos de un sistema de ejes X, Y, Z fijo en la molécula.

Se encuentra también que el tensor $\mathbf{g}$ es muchas veces simétrico, es decir, $g_{xy} = g_{yx}$ y así sucesivamente. Con esto, se infiere que el tensor $\mathbf{g}$ tiene una matriz simétrica, la cual puede ser diagonalizada por medio de una matriz de transformación:

$$\mathbf{M}\mathbf{g}\mathbf{M}^{-1} = \mathbf{g}(\text{diagonal}) \quad (\text{A5})$$

La transformación corresponde a una reorientación de los ejes y la matriz de transformación $\mathbf{M}$ define la orientación de los *nuevos ejes principales* con respecto a los anteriores. En el nuevo sistema de referencia que diagonaliza al tensor $\mathbf{g}$, el hamiltoniano Zeeman se escribe como:

$$\mathbf{H}_{ze} = \beta (g_{xx}H_xS_x + g_{yy}H_yS_y + g_{zz}H_zS_z) \quad (\text{A6})$$

Las componentes de $\mathbf{g}$ (g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}), miden la componente de momento magnético en la dirección XX, YY, ZZ del campo magnético. Simetría esférica de $\mu(g)$ del electrón, se tiene cuando ($g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$). Como caso particular, mencionamos al átomo de hidrogeno, el cual posee simetría esférica; el hamiltoniano de espín tiene su factor $\mathbf{g}$ isotrópico para el electrón y el núcleo una interacción hiperfina isotrópica $\mathbf{a}$. En la mayoría de las moléculas, estas cantidades varían con la dirección del campo magnético aplicado y el hamiltoniano de espín es anisotrópico.

A4 Término de campo cristalino.

La teoría del campo cristalino tiene su inicio con el artículo de Bethe en 1929, pero no fue sino hasta los años cincuenta en que empezó a aplicarse a problemas químicos. Dado que se quiere aplicar la teoría al Fe, esta sección se enfoca a electrones d en la capa semillena $3d$. Las densidades electrónicas o funciones de onda son fundamentales para la discusión de las propiedades del ion Fe. La dependencia angular de las cinco funciones de onda $3d$ ortogonales (orbitales) se muestran en la figura A2.

Los orbitales d_{xy}, d_{xz}, d_{yz} son llamados orbitales t_{2g} ; d_{z^2} y $d_{x^2-y^2}$ son llamados e_g . En un ion libre, la energía de los cinco orbitales es la misma, es decir, el estado base es degenerado de orden 5.

El punto crucial del método de campo cristalino es que el efecto del ambiente (es decir, los ligandos) no es el mismo en todos los orbitales d y asimismo, la degeneración se rompe.

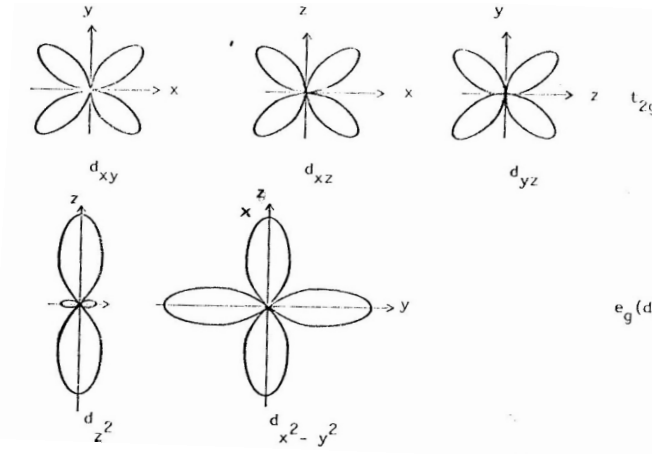


Figura A2: Parte angular de las funciones de onda de un electrón 3d.

La teoría del campo cristalino supone que el ion paramagnético reside en un campo eléctrico cuyas fuentes son cargas puntuales (de los átomos ligantes) en el sitio de estos. Esta suposición electrostática es muy aproximada al considerar los orbitales moleculares de los ligantes (ver fig. A3.b).

El desdoblamiento de los niveles de energía electrónicos degenerados será claramente a la simetría del ambiente, por ejemplo, si se toma como ambiente a un octaedro regular cuyas esquinas representan los ligandos cargados negativamente. Esta es una primera aproximación al problema del grupo *hemo* en el cual los cuatro nitrógenos de los anillos de pirrólicos y los enlaces coordinados 5 y 6 del hierro hacen las seis esquinas del octaedro. Si se coloca el ion metálico con sus electrones *d* en el centro del octaedro (ver fig. A3), el origen de los desdoblamientos es inmediatamente evidente. Los tres orbitales t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}) evaden las esquinas negativas del octaedro, mientras que los orbitales e_g (d_{z^2} y $d_{x^2-y^2}$) apuntan directamente hacia las cargas negativas. Esto les costará una gran energía repulsiva de Coulomb y consecuentemente tendrán mayor energía. La diferencia energética entre los orbitales t_{2g} y e_g es el llamado parámetro de desdoblamiento de campo cristalino Δ . El valor depende del compuesto; en los *hemo* es del orden de 10^4 cm^{-1} .

Si se perturba ahora el octaedro regular a través de una distorsión tetragonal (ver fig. A3.c) las degenerancias de los orbitales t_{2g} y e_g se desdoblan aún más. Esto es debido al hecho de que la distorsión ha separado a las cargas del ion central en la dirección del eje *z*, reduciendo así la energía repulsiva entre las cargas y los orbitales que apuntan en la dirección *z*. Se esperaría

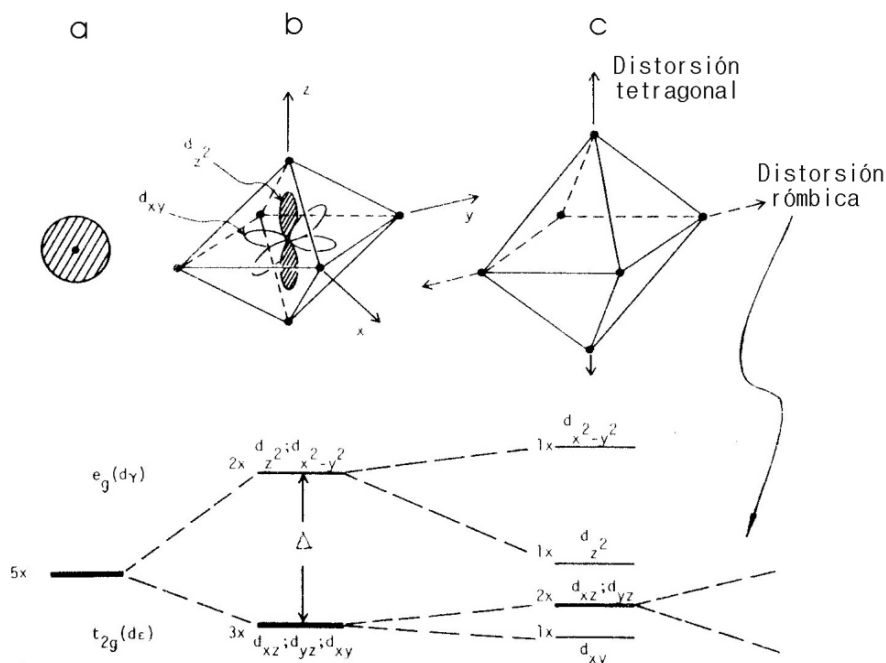


Figura A3: Efecto del campo cristalino en niveles energéticos de orbitales d.

asimismo una disminución de energía del orbital d_{z^2} , y un desdoblamiento del orbital d_{xy} . Al introducir una distorsión rómbica (líneas punteadas fig. A3.c) los ejes x y y ya no serían equivalentes y los orbitales d_{xz} y d_{yz} se desdoblan.

Una vez establecido el orden de los niveles de energía, se decide como distribuir los electrones entre ellos. En este caso, el Fe^{2+} tiene seis electrones d y el Fe^{3+} cinco electrones d para acomodar. En un complejo regular octaédrico, los primeros tres electrones pueden ser colocados sin duda alguna con espines paralelos dentro de los orbitales t_{2g} . Si el cuarto electrón, con su espín paralelo a los otros tres, es colocado en un orbital e_g , se gana la energía de intercambio de espín pero se paga por ello la energía Δ .

Entonces, si Δ es muy grande, uno habla del caso de *campo alto* en el cual los orbitales t_{2g} están llenos al máximo resultando en un compuesto de *bajo espín*. Para un valor pequeño de Δ , uno está entonces en el régimen de *campo bajo* resultando en un compuesto de *alto espín*.

Cuando el octaedro regular se distorsiona (ver fig. A3.c), el orbital d_{z^2} se acercará al orbital t_{2g} teniéndose así cuatro orbitales bajos en vez de tres. En este caso, se obtienen complejos con un valor intermedio de espín. Los

Tabla A1: Valores posibles de espín en complejos de Fe^{2+} y Fe^{3+} .

	Espín alto (campo bajo)	Espín intermedio	Espín bajo (campo alto)
Cinco electrones d Fe^{3+}	$S = 5/2$ $\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \\ \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \end{array}$	$S = 3/2$ $\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \\ \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \end{array}$	$S = 1/2$ $\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \end{array}$
Seis electrones d Fe^{2+}	$S = 2$ $\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \\ \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \end{array}$	$S = 1$ $\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \\ \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \end{array}$	$S = 0$ $\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \end{array}$

posibles valores de espín del Fe^{2+} y Fe^{3+} están tabulados en la tabla A1. Sin embargo, la mayoría de los compuestos *hemo* están dentro de la categoría de alto o bajo espín.

A5 Término de interacción hiperfina.

Por interacción hiperfina se entiende la interacción de los electrones desapareados con el momento magnético de un núcleo o varios núcleos vecinos.

Existen dos tipos de interacción hiperfina. El primer tipo es la interacción clásica de dos dipolos $\boldsymbol{\mu}_S$ y $\boldsymbol{\mu}_I$ separados una distancia $\mathbf{r}$. Esta interacción (anisotrópica) dipolar magnética, depende fuertemente del ángulo entre la línea que une a los dos dipolos y el campo magnético externo (figura A4).

La energía de interacción clásica entre dos dipolos magnéticos $\boldsymbol{\mu}_S$ y $\boldsymbol{\mu}_I$ separados una distancia $\mathbf{r}$ está dada por:

$$E_{dip} = \frac{\boldsymbol{\mu}_S \cdot \boldsymbol{\mu}_I}{r^3} - \frac{3(\boldsymbol{\mu}_S \cdot \mathbf{r})(\boldsymbol{\mu}_I \cdot \mathbf{r})}{r^5} \quad (\text{A7})$$

Sin embargo, por el principio de correspondencia, el hamiltoniano cuántico para esta interacción es:

$$\mathcal{H}_{dip} = g_e \beta_e g_n \beta_n \left[\frac{\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}}{r^3} + \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^5} \right] \quad (\text{A8})$$

La segunda interacción no es clásica y proviene de la probabilidad distinta de cero de encontrar al electrón en la región nuclear ($0 \leq r \leq a_0$) donde a_0

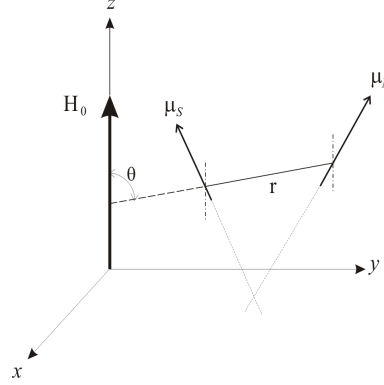


Figura A4: Interacción dipolar magnética entre μ_S y μ_N .

es el radio de Bohr, es decir, es proporcional al cuadrado de la función de onda electrónica valuada en el núcleo. Fermi demostró que esta interacción es isotrópica y es llamada interacción de contacto o interacción de Fermi, la cual está dada por:

$$\mathcal{H}_{Fermi} = \left(\frac{8\pi}{3} \right) \boldsymbol{\mu}_s \cdot \boldsymbol{\mu}_n |\Psi(0)|^2 \quad (A9)$$

donde $\Psi(0)$ es la función de onda electrónica valuada en el núcleo.

Si la molécula contiene uno o más núcleos vecinos al electrón desapareado con un momento dipolar magnético, resulta un desdoblamiento hiperfino de los niveles de energía magnéticos del electrón desapareado (aún cuando no se haya aplicado un campo magnético externo) debido a la interacción de cada núcleo con el momento magnético electrónico. Cuando las condiciones experimentales son favorables, esta interacción se manifiesta en que cada línea se desdobra en un multiplete de $(2I + 1)$ líneas, donde I es el espín del núcleo vecino responsable de la interacción.

La contribución de la interacción hiperfina al hamiltoniano de espín, es la suma de los términos de interacción dipolar y de contacto de Fermi dada como:

$$\mathcal{H}_{hf} = g_e \beta_e g_I \beta_I \left[\frac{\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}}{r^3} + \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^5} + \frac{8\pi}{3} \delta(r) \mathbf{S} \cdot \mathbf{I} \right] \quad (A10)$$

donde el tercer término es la interacción de contacto (o de Fermi).