

## Tesis de Posgrado

# Quimioluminiscencia en sistemas biológicos

Varsavsky, Alicia Inés

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Varsavsky, Alicia Inés. (1983). Quimioluminiscencia en sistemas biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1795\\_Varsavsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1795_Varsavsky.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Varsavsky, Alicia Inés. "Quimioluminiscencia en sistemas biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1795\\_Varsavsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1795_Varsavsky.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

QUIMIOLUMINISCENCIA

EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

(Tesis)

Autora: Alicia Inés Varsavsky

Director de Tesis: Dr. Alberto Boveris

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas

- 1983 -

J795  
Ej. 2

... De acuerdo con mi propuesta lo que caracteriza al método empírico es su manera de exponer a falsación el sistema que ha de contrastarse: justamente de todos los modos imaginables. Su meta no es salvarle la vida a los sistemas insostenibles, sino, por el contrario, elegir el que comparativamente sea más apto, sometiendo a todos a la más áspera lucha por la supervivencia.

Karl R. Popper

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alberto Boveris por haberme brindado su brillante capacidad y sus amplios conocimientos en la dirección de este trabajo. Quiero agradecerle además el haberme brindado la posibilidad de acceder a los Laboratorios de renombre internacional donde se realizó parte de este trabajo. Le agradezco también su apoyo incondicional ... y su paciencia.

Al Ing. Agr. Rodolfo A. Sánchez le agradezco la colaboración con sus conocimientos en el campo de la Fisiología vegetal y la guía que me brindó con sus criterios rigurosos. Le agradezco además sus consejos oportunos y su apoyo permanente.

Los experimentos presentados en esta tesis han sido publicados según se detalla:

- Spontaneous Chemiluminescence of Soybean Seeds. A. Boveris, R.A. Sánchez, A.I. Varsavsky y E. Cadenas. FEBS Lett. 113, 29 (1980).
- Low Level Chemiluminescence of the Cytochrome c Catalyzed Decomposition of Hydrogen Peroxide. E. Cadenas, A.I. Varsavsky, A. Boveris y B. Chance. FEBS Lett. 113, 141 (1980)
- Oxygen or Organic Hydroperoxide-Induced Chemiluminescence of Brain and Liver Homogenates, E. Cadenas, A.I. Varsavsky, A. Boveris y B. Chance. Biochem. J. 198, 645 (1981).
- Chemiluminescence of Soybean Seeds: Spectral Analysis, Temperature Dependence and Effect of Inhibitors. A. Boveris, A.I. Varsavsky y R.A. Sánchez. Photochem. Photobiol. 38, 99 (1983).
- Increased Chemiluminescence and Superoxide Production in the Liver of Chronically Ethanol-Treated Rats. A. Boveris, C.G. Fraga, A.I. Varsavsky y O.R. Koch. Arch. Biochem. Biophys. En prensa.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en los siguientes laboratorios:

- Instituto de Química Biológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.
- Johnson Research Foundation, School of Medicine, University of Pennsylvania, Filadelfia, Estados Unidos.
- Departamento de Bioquímica de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil.
- Instituto de Química, Universidad de San Pablo, San Pablo, Brasil.
- Departamento de Química Biológica (Cátedra de Físico Química), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Departamento de Fisiología y Ecología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Agradezco a los Directores de los laboratorios mencionados haberme permitido realizar dichos trabajos.

Durante el período en el cual se realizó este trabajo de tesis se obtuvieron las siguientes becas:

- Beca Bunge y Born de Iniciación en la Investigación Clínica otorgada por la Academia Nacional de Medicina.
- Beca BEGES del Programa Regional de Adiestramiento de la Organización de los Estados Americanos.
- Beca de Iniciación otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
- Beca de Perfeccionamiento otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
t-BOOH	Hidroperóxido de ter-butilo
Cit-c <sup>3+</sup>	Citocromo-c oxidado
CuOOH	Hidroperóxido de cumeno
DABCO	Diazo-biciclo -2,2,2- octano
DTBQ	Di-ter-butyl-quinol
FMN	Flavina mononucleótido
GSH	Glutati6n reducido
GSSG	Glutati6n oxidado
GTP	Guanosina trifosfato
LH	Acido graso insaturado
LOOH	Hidroper6xido de un 6cido graso
LOX	Lipoxigenasa
Me	Metilo
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucle6tido
NADPH	Nicotinamida-adenin-dinucle6tido fosfato
Ph	Fenilo
R	Cadena hidrocarbonada
R <sup>•</sup>	Radical org6nico
ROH	Alcohol
ROOH	Hidroper6xido org6nico
SHAM	Acido salicil hidrox6mico
SOD	Super6xido-dismutasa

## I N D I C E

### CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. Generalidades:	1
1.2. Estados electrónicos excitados	2
1.2.1. Estados singulete y triplete	2
1.2.2. Procesos fotodependientes	2
1.2.3. Diagramas de energía	4
1.3. Rendimientos cuánticos	6
1.4. Vida media	7
1.5. Espectros de absorción y de emisión	7
1.6. Reacciones orgánicas quimioluminiscentes	8
1.7. Quimioluminiscencia directa y sensibilizada	9
1.8. Procesos oxidativos	10
1.8.1. Especies oxidantes de interés biológico	10
1.8.1.I. Oxígeno molecular	10
1.8.1.II. Anión superóxido	13
1.8.1.III. Radicales libres	13
1.8.1.IV. Radical hidroxilo	14
1.8.1.V. Peróxidos	15
1.8.2. Autoxidación de lípidos	16
1.8.3. Peroxidación lipídica en sistemas biológicos	17
1.8.4. Técnicas para medir peroxidación lipídica	18
1.9. Quimioluminiscencia en sistemas biológicos	19
1.10. Objetivos del presente trabajo	20
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	22
2.1. Contadores de fotones	23
2.1.1. Fuente de poder	23
2.1.2. Tubo fotomultiplicador	23
2.1.2.I. Superficie fotoemisiva	23
2.1.2.II. Multiplicador de la señal	24
2.1.2.III. Dependencia entre la señal de salida del tubo fotomultiplicador y el voltaje aplicado	24
2.1.2.IV. Ruido electrónico en los fototubos	25

2.1 3. Amplificador discriminador	26
2.1.4. Registro de la señal de salida	27
2.2. Diseños de contadores de fotones	28
2.2.1. El contador de centelleo usado como contador de fotones	28
2.2.1.I. Contadores de centelleo que operan a temperaturas bajas (Nuclear Chicago)	29
2.2.1.II. Contadores de centelleo que operan a temperatura ambiente (Bockman IS 100, IS 150, Packard Tri-Carb 3320)	29
2.2.2. Contador de fotones diseñado en la Johnson Research Foundation de la Universidad de Pensilvania	29
2.2.2.I. Selección de los umbrales de trabajo	31
2.2.2.II. Factores que influyen en la eficiencia de conteo	32
2.2.3. Contador de fotones diseñado en la Universidad de Tohoku (Sendai, Japón)	33
2.3. Obtención y cálculo de espectros	33
2.4. Cálculo de los errores en las bandas	35
2.5. Cálculo de los rendimientos cuánticos	36
2.6. Preparaciones biológicas	37
2.6.1. Homogeneizados de hígado y cerebro de rata	37
2.6.2. Mitocondrias de hígado, corazón y cerebro de rata	37
2.6.3. Preparación de los animales para estudio de órgano "in situ"	38
2.6.3.I. Hígado	38
2.6.3.II. Músculo e intestino	38
2.6.3.III. Inyección de reactivos	38
2.6.2. Semillas de soja	38
2.6.2.I. Preparación de harina de semillas	38
2.6.2.II. Preparación de homogeneizados de semillas	39
2.6.2.III. Mursectación de semillas enteras	39
2.6.2.IV. Envejecimiento acelerado de semillas	39
2.7. Destrucción del grupo hemo del citocromo <u>c</u>	39
2.8. Determinación de malonaldehído. Ensayo del ácido tio-barbitúrico	39
2.9. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa	39

2.10	Determinación de la concentración de proteínas	40
2.11.	Determinación volumétrica de la concentración de per- óxido de hidrógeno	40
2.12.	Soluciones	40
2.12.I.	Citocromo- <u>c</u>	40
2.12.II.	Hidroperóxidos	40
2.12.III.	Otras soluciones	40
	CAPITULO III	41
3.1.	Comparación de distintos contadores de fotones	42
3.2.	Efecto de variables geométricas sobre las emisiones medidas	44
3.2.1.	Dependencia de la emisión medida con la distancia al tubo fotomultiplicador	44
3.2.2.	Dependencia de la emisión con el área expuesta	46
3.3.	Reproductibilidad de resultados en diferentes instru- mentos	46
3.3.1.	Cinéticas	46
3.3.2.	Comparación de las eficiencias de conteo	49
3.3.3.	Análisis espectral	51
3.4.	Factores físicos y químicos que influyen en la emisión	52
3.4.1.	Temperatura	52
3.4.2.	Concentraciones de reactivos	53
3.4.3.	Concentración de oxígeno	58
	CAPITULO IV. QUIMIOLUMINISCENCIA DE BAJA INTENSIDAD EN ORGA- NOS DE MAMIFEROS	60
4.1.	Sistema modelo citocromo- <u>c</u> e hidroperóxidos	63
4.1.1.	Rendimiento cuántico de la reacción de citocromo- <u>c</u> con peróxido de hidrógeno	63
4.1.2.	Efecto de la temperatura y de la desnaturalización térmica del citocromo- <u>c</u> sobre la emisión	64
4.1.3.	Efecto de inhibidores, atrapadores de radicales libres y complejos de metales pesados sobre la quimioluminis- cencia y la velocidad de desaparición de la banda Soret de mezclas de citocromo- <u>c</u> y peróxido de hidrógeno	65

4.1.3.I. Cianuro de potasio	66
4.1.3.II. Atrapadores de radicales libres	66
4.1.3.III. Metales pesados libres o complejados con aminoácidos	67
4.2. Quimioluminiscencia de mitocondrias de hígado de rata en presencia de hidroperóxido de ter-butilo	69
4.2.1. Efecto del medio de ensayo y del tratamiento previo de la preparación mitocondrial sobre la emisión	69
4.2.2. Dependencia de la emisión de mitocondrias suplementadas con hidroperóxido de ter-butilo con el estado metabólico	70
4.2.3. Dependencia de la emisión de mitocondrias y membranas mitocondriales en presencia de hidroperóxido de ter-butilo con la concentración de oxígeno	71
4.2.4. Efecto del cianuro de potasio sobre la emisión de mitocondrias de hígado de rata en estado I	73
4.2.5. Análisis espectral de la emisión de mitocondrias de hígado de rata.	
4.3. Quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado y cerebro de rata	74
4.3.1. Emisión inducida por oxígeno	74
4.3.2. Formación de malonaldehído, niveles de glutathion peroxidasa y quimioluminiscencia en homogeneizados de hígado y cerebro de rata.	75
4.3.3. Quimioluminiscencia inducida por hidroperóxido de ter-butilo en homogeneizados de cerebro de rata	77
4.3.4. Quimioluminiscencia inducida por hidroperóxido de ter-butilo en homogeneizados de hígado de rata	78
4.3.4.I. Dependencia entre la emisión de homogeneizados de hígado de rata suplementados con hidroperóxido de ter-butilo y oxígeno	79
4.3.4. Efecto de inhibidores sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de rata inducida por hidroperóxido de ter-butilo	79
4.3.4.III. Espectros de emisión de homogeneizados de hígado y cerebro de rata.	80

4.4. Quimioluminiscencia de hígado de rata "in situ"	82
4.4.1. Inducción de la emisión por halometanos	82
4.4.1.I. Emisión inducida por $\text{CCl}_4$ en condiciones en que el citocromo P450 está aumentado	85
4.4.1.II. Análisis espectral y efecto del DABCO sobre la emisión de hígado de rata "in situ" inducida por $\text{CCl}_4$	86
4.4.2. Emisión espontánea de hígado de rata "in situ"	87
4.4.2.I. Dependencia de la emisión espontánea con el aporte de oxígeno al hígado	87
4.4.2.II. Emisión espontánea de hígado de ratas hipóxicas y alcohólicas	88
4.4.2.III. Emisión en otros órganos	89
4.4.2.IV. Análisis espectral y efecto de DABCO sobre la emisión espontánea de hígado de rata "in situ"	89
CAPITULO V. QUIMIOLUMINISCENCIA DE BAJA INTENSIDAD EN PLANTAS	91
5.1. Sistemas modelo: lipoxigenasa suplementada con ácido linoleico	93
5.1.1. Efecto de inhibidores sobre la reacción de la lipoxigenasa con ácido linoleico	93
5.1.2. Dependencia de la emisión de la reacción de la lipoxigenasa con la temperatura	93
5.1.3. Análisis espectral parcial de la emisión de la lipoxigenasa con ácido linoleico	94
5.2. Homogeneizados y suspensiones de partículas de soja	95
5.2.1. Característica de la emisión de homogeneizados de semillas de soja	96
5.2.1.I. Efecto de inhibidores y activadores sobre la emisión de homogeneizados de semillas de soja	97
5.2.1.II. Análisis espectral parcial de la emisión de homogeneizados de semillas de soja	99
5.2.1.III. Dependencia de la emisión de homogeneizados de semillas de soja con el pH	100
5.3. Emisión espontánea de semillas de soja	100
5.3.1. Dependencia de la emisión de semillas de soja con la temperatura	102

5.3.2. Análisis espectral de la emisión de semillas de soja	104
CAPITULO VI. DISCUSION	107
6.1. Comparación de las medidas de quimioluminiscencia con las de otras técnicas que permiten medir peroxidación lipídica "in vitro" o "in vivo"	108
6.2. Mecanismos de reacción	110
6.2.1. Iniciación	111
6.2.2. Propagación	112
6.2.3. Terminación	113
6.2.4. Fotoemisión	113
6.2.5. Relación entre el efecto de activadores e inhibidores sobre la emisión luminosa y los mecanismos de reacción propuestos	114
6.2.6. Identificación de las especies fotoemisivas	116
6.3. Dependencia de la quimioluminiscencia con la temperatura	119
6.4. Quimioluminiscencia y defensas contra agentes oxidantes e integridad del sistema	121
6.5. La quimioluminiscencia como ensayo no invasivo	124
CAPITULO VII. CONCLUSIONES	127
CAPITULO VIII. REFERENCIAS	130
CAPITULO IX. RESUMEN	135

C A P I T U L O I

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

## 1.1 GENERALIDADES

Los primeros estudios sobre quimioluminiscencia y bioluminiscencia tuvieron interés académico y estuvieron fundamentalmente dirigidos a entender los mecanismos involucrados en la formación de estados moleculares excitados. El desarrollo de instrumental electrónico que permitió medir la emisión luminosa con gran precisión, convirtió a la bioluminiscencia y a la quimioluminiscencia en técnicas útiles para el estudio de una serie de fenómenos de importancia biológica. La posibilidad de acoplar reacciones químicas o enzimáticas a sistemas que emiten fotones permite determinar una variedad de compuestos biológicos con una sensibilidad que difícilmente se obtendría por otros métodos. Por medio de reacciones bioluminiscentes pueden determinarse fácilmente NADH, NADPH y FMN en concentraciones menores que aquellas accesibles por espectrofotometría y espectrofluorometría (Stanley, 1978), ATP y GTP en concentraciones del orden de picomolar (Karl, 1978 ; Lemasters y Hackenbrock, 1978), la actividad de proteasas (Baldwin, 1978) y la concentración de aldehídos de cadena larga también pueden ser determinadas por medio de reacciones bioluminiscentes o quimioluminiscentes (Ulitzur y Hastings, 1978).

La emisión espontánea de fotones en sistemas biológicos no está restringida a aquellos organismos que contienen sistemas enzimáticos especiales como el de la luciferina-luciferasa (Boveris y col., 1980 a). Se han detectado en sistemas biológicos un gran número de procesos quimioluminiscentes cuyas emisiones son de muy baja intensidad y que, a diferencia de aquellos con sistemas enzimáticos especiales, han sido clasificados como no funcionales (Cilento, 1980). Entre ellos se puede mencionar a la quimioluminiscencia microsomal en presencia de metabolitos carcinogénicos de hidrocarburos policíclicos (Seligler, 1975) o acompañando procesos peroxidativos (Nakano y col., 1975; Sugioaka y Nakano, 1976; Hamman y col., 1977), la quimioluminiscencia de órganos "in situ" como consecuencia del metabolismo peroxidativo (Tarusov y col., 1961; Shimizu y col., 1973; Boveris y col., 1980 a), la quimioluminiscencia acompañando a la autooxidación de ácidos grasos (Orlov, 1975) y la oxidación enzimática de ácidos grasos (Mamedov y col., 1973); la quimioluminiscencia de mitocondrias (Stauff y Ostrowski, 1967), la quimioluminiscencia acompañando procesos fagocíticos (Trush, 1978), etc.

La posibilidad de estudiar el metabolismo oxidativo a través de la medi-

da de la emisión de fotones, medida que puede ser realizada en forma no invasiva, abre el campo para el estudio de procesos peroxidativos y de patologías asociadas al metabolismo oxidativo en órganos "in situ" y sistemas vegetales enteros.

## 1.2 ESTADOS ELECTRONICOS EXCITADOS.

Cuando una molécula absorbe un fotón de frecuencia  $\nu$  y energía  $h\nu$ , emplea esta energía para hacer que un electrón pase de un orbital ocupado de menor energía a otro desocupado de mayor energía. A este último estado se lo llama estado excitado. La frecuencia asociada al fotón incidente ( $\nu$ ) está relacionada con la diferencia de energía de los orbitales entre los que se produce el salto del electrón (E) por la ley de radiación de Planck (1)

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

donde h es una constante universal igual a  $6,624 \cdot 10^{-27}$  ergio.seg

### 1.2.1 Estados singulete y triplete.

Se define la multiplicidad total de un sistema M como

$$M = 2S + 1 \quad (2)$$

donde S es el spin total obtenido sumando los valores de los números cuánticos de spin para cada electrón de la molécula (el spin de un electrón puede valer  $\pm 1/2$ ). En la excitación electrónica uno de los electrones del par que forma una unión en la molécula es excitado a un estado de mayor energía. Si el electrón excitado tiene spin apareado con el de su compañero la molécula no posee momento de spin neto y M es igual a 1 (Fig. 1). Este estado en presencia de un campo magnético externo no se desdobra permaneciendo como un solo estado y por ello se lo llama singulete (S).

Cuando los spines de los electrones están desapareados (paralelos,  $M = 3$ ) en presencia de un campo magnético externo se desdoblará en tres estados diferentes y por ello se lo llama triplete (T)(Fig. 1). Las transiciones de electrones entre estados singuletes y tripletes están limitadas por la regla de conservación de spin: aquellas transiciones en las cuales se conserva el número total de spin están cuánticamente permitidas y ocurren fácilmente. Cuando el número total de spin no se conserva la emisión está cuánticamente "prohibida", lo cual significa que la probabilidad de que dicha transición ocurra es muy baja pero no nula.

### 1.2.2 Procesos fotodependientes.

La quimioluminiscencia, la bioluminiscencia, la fotoquímica, la fluores-

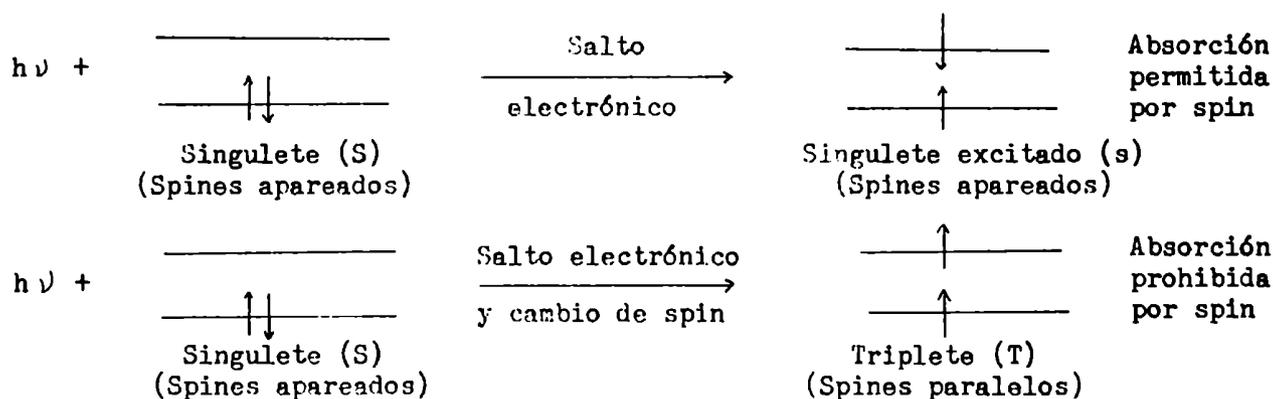


Fig. 1. Estados singulete y triplete. Descripción del proceso de absorción de fotones en los niveles orbitales de energía. Las flechas que interceptan los niveles de energía representan electrones. La dirección de la flecha representa la orientación del spin del electrón. (Turro, 1978, pág. 3).

cencia y la fosforescencia son procesos fotodependientes relacionados entre sí.

La absorción de luz por una molécula y algunas reacciones químicas pueden producir estados electrónicamente excitados. Existen mecanismos radiativos y no radiativos a través de los cuales un electrón excitado puede retornar a un estado no excitado (o estado fundamental; Fig. 2).

Situaciones tales como las temperaturas elevadas y las descargas eléctricas, además de la absorción de luz, pueden llevar a estados electrónicamente excitados (Seliger, 1978). Para que una reacción química pueda dar origen a un estado excitado debe ser exergónica. Entre estas reacciones las más importantes son las recombinaciones de iones y de radicales libres y las reacciones que involucran oxígeno y peróxidos.

Cuando un electrón que ha sido excitado a un orbital de alta energía por absorción de luz retorna a un orbital de baja energía, la diferencia de energía entre ambos orbitales puede ser transferida al medio en forma de calor, (el fenómeno es entonces una desactivación térmica) o emitida como radiación a una frecuencia menor que la de la radiación incidente (en este caso se está ante un fenómeno fluorescente o fosforescente, dependiendo de las características del estado excitado) (Ver sección 1.2.3 y Fig. 2).

Cuando la energía de excitación es usada para producir cambios físicos y/o químicos en la molécula se está ante un proceso fotoquímico. En un proceso quimioluminiscente, el estado excitado se origina a través de una reacción quí-

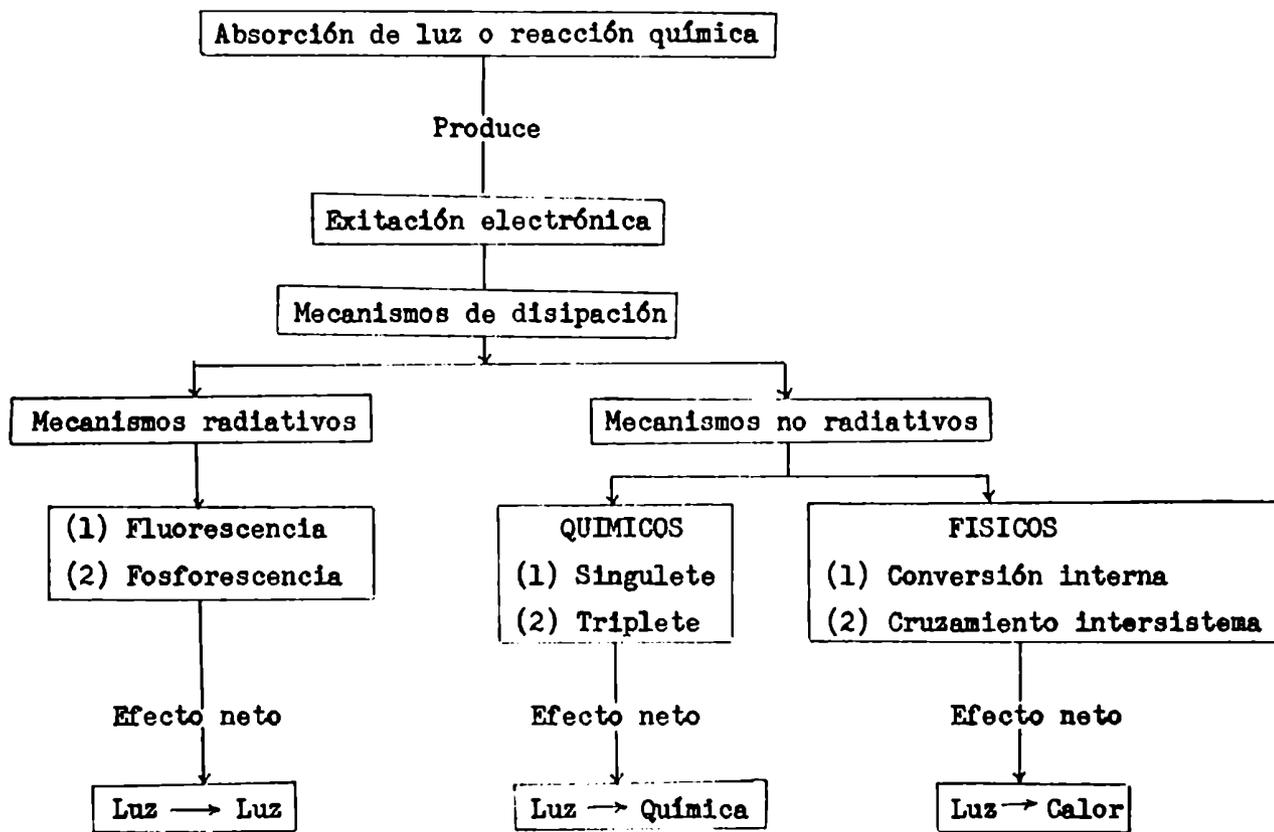


Fig. 2 Esquema de los procesos en que hay absorción o emisión de luz.

mica exergónica y la desexcitación ocurre a través de la emisión de fotones (Fig. 2). En consecuencia, puede decirse que desde un punto de vista termodinámico, la quimioexcitación corresponde a una transferencia de energía libre a energía electrónica. Existe una íntima relación entre los fenómenos quimioluminiscentes y los fotofísicos y fotoquímicos.

En un fenómeno quimioluminiscente el proceso de emisión de luz (que siempre indica la presencia de un estado excitado) ocurre a través del mismo mecanismo que otros fenómenos de fotoemisión (fluorescencia y fosforescencia). La quimioluminiscencia además puede ser considerada como un fenómeno fotoquímico ocurriendo en sentido inverso (Turro, 1978; pág. 579).

La bioluminiscencia es una quimioluminiscencia que es producto de una reacción enzimática y su principal característica es que la enzima (luciferasa) participa en el proceso de emisión de luz ya que el emisor es un complejo enzima-cromóforo (Seliger, 1978).

### 1.2.3 Diagramas de energía

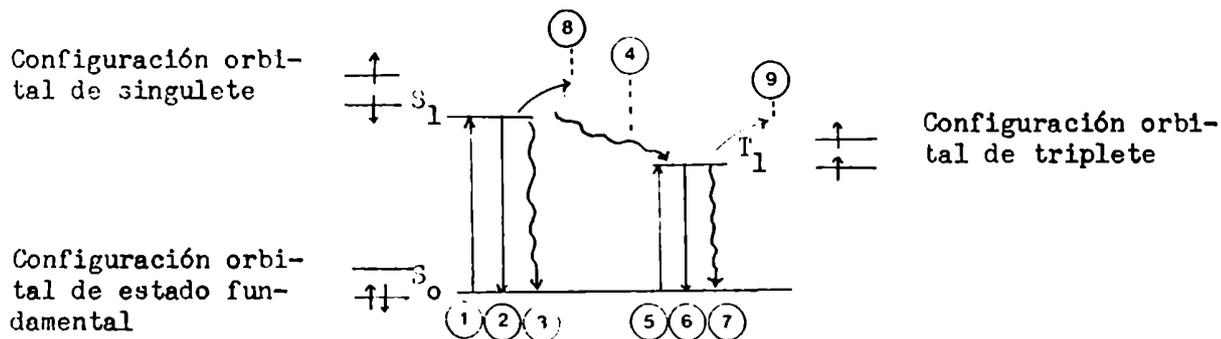


Fig. 3. Diagrama de estado de energía para procesos fotodependientes.  
Referencias en el texto.

Los procesos fotofísicos, que pueden ser definidos como transiciones que interconvierten estados excitados entre sí o con el estado fundamental, pueden ser representados en diagramas de energía, que se representan para geometrías nucleares dadas y fijas.

Se pueden clasificar las transiciones en radiativas (aquellas en que la diferencia de energía entre los estados inicial y final se libera como fotones) y no radiativas (aquellos procesos en que la diferencia de energía entre los estados inicial y final se libera al medio como calor) y pueden corresponder a transiciones cuánticamente "permitidas" o "prohibidas", según la probabilidad de que ocurran sea alta (entre estados de la misma multiplicidad) o baja (estados de diferente multiplicidad), respectivamente. (Figura 3).

La absorción de un fotón por una molécula excita un electrón pudiendo llevarlo del estado fundamental  $S_0$  al primer singlete excitado  $S_1$  (Fig. 3) (transición "permitida"; ①) o al primer triplete excitado ( $T_1$ ; transición "prohibida"; ⑤). Del estado  $S_1$  la molécula puede evolucionar:

a) volviendo a  $S_0$  liberando la diferencia de energía entre  $S_1$  y  $S_0$  bajo la forma de calor ③. A este tipo de transición se la conoce como conversión interna; es un proceso no radiativo y está cuánticamente "permitido".

b) volviendo a  $S_0$  liberando el exceso de energía como fotones ②. Este tipo de transiciones corresponde a los procesos fluorescentes. Es radiativo y está cuánticamente "permitido".

c) pasando al estado  $T_1$  liberando la diferencia de energía como calor ④. Este tipo de transición recibe el nombre de cruzamiento intersistema; es no ra-

diativa y está cuánticamente "prohibida".

Del estado  $T_1$  la molécula puede:

a) regresar a  $S_0$  liberando la diferencia de energía entre  $T_1$  y  $S_0$  como calor al medio. También es cruzamiento intersistemas. Es no radiativa y está cuánticamente "prohibida" (7).

b) regresar a  $S_0$  emitiendo la diferencia de energía como fotones. Este proceso corresponde a los fenómenos fosforescentes. Está cuánticamente "prohibida" y es radiativa (6).

c) regresar a  $S_1$  absorbiendo energía del medio.

Tanto el estado singulete excitado ( $S_1$ ) como el triplete excitado ( $T_1$ ) pueden participar en reacciones químicas (8 y 9) en un proceso fotoquímico.

En los procesos quimioluminiscentes se llega al estado  $S_1$  o  $T_1$  a través de una reacción química y los fotones que se miden son emitidos en los procesos (2) y/o (6) según el estado que emita sea singulete o un triplete.

### 1.3 RENDIMIENTOS CUANTICOS

El rendimiento cuántico  $q$  da idea de la eficiencia de un proceso de emisión. La forma de definir y de medir  $q$  para procesos fluorescentes y fosforescentes por un lado y quimioluminiscente y bioluminiscente por otro es diferente.

En los procesos fluorescentes y fosforescentes se define al rendimiento cuántico como

$$q = \frac{\text{fotones emitidos}}{\text{fotones absorbidos}} \quad (3)$$

Teóricamente  $q$  puede variar entre 0 y 1; el valor mínimo medible experimentalmente con confianza usando técnicas convencionales es de  $10^{-4}$  (Turro, 1978; pág. 109).

Análogamente para un proceso quimioluminiscente o bioluminiscente  $q$  se define como

$$q = \frac{\text{fotones emitidos}}{\text{moléculas que reaccionan}} \quad (4)$$

Su valor oscila entre 0 y 1. Es alto para procesos bioluminiscentes: 0,29 para la bioluminiscencia de Cypridina, definido como fotones medidos por molécula de luciferina reaccionante (Johnson y Shimomura, 1978) y del orden de 0,1 para la formación de estados excitados en la luminiscencia de intercambio electrónico producido químicamente (CIEEL; Faulkner, 1978). Los valores de  $q$  son más bajos para otros procesos quimioluminiscentes: 0,01 para la oxidación de luminol sobre la base de moléculas de luminol reaccionantes (Roswell y White, 1978); 0,001 para la emisión del sistema peroxidasa de rábano-isobutiraldehído-

oxígeno sobre la base de fotoproductos (isopropanol) formado (Cilento y col., 1978) y menores que  $10^{-9}$  para la reacción quimioluminiscente de citocromo-c suplementado con hidroperóxidos y oxígeno sobre la base de oxígeno consumido (Cadenas y col., 1980 a) y  $10^{-12}$  para la reacción lipoxigenasa con ácido linoleico (Boveris y col., 1980) sobre la base de oxígeno consumido.

#### 1.4 VIDA MEDIA RADIANTE

Se define la vida media de una transición radiativa, como la inversa de la constante de velocidad asociada con el proceso de emisión de luz a partir de un estado dado. Para procesos fluorescentes es generalmente menor que  $10^{-6}$  segundos y es menor que 30 segundos para procesos fosforescentes (Skoog y West, 1975). Las vidas medias que pueden calcularse como la inversa de la constante de velocidad asociada con el proceso de emisión de luz son siempre mayores que las observadas experimentalmente dado que en los sistemas reales hay interacciones no consideradas en dicha constante, que acortan las vidas medias. Así, la vida media radiativa pura (es decir cuando no hay colisiones ni reacciones) para el estado  $\Delta$  del oxígeno singulete es de  $2,7 \cdot 10^{-3}$  segundos. La desactivación química y colisional en las condiciones de laboratorio disminuyen mucho este valor: la vida media del estado  $\Delta$  es de  $2 \cdot 10^{-6}$  segundos en agua y  $2 \cdot 10^{-5}$  segundos en agua deuterada (Turro, 1978; pág. 586).

#### 1.5 ESPECTROS DE ABSORCION Y DE EMISION

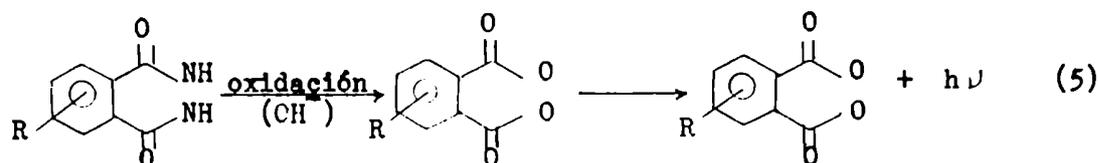
El estudio de los espectros de absorción y emisión de luz da abundante información acerca de la estructura energética y dinámica del estado electrónicamente excitado. La absorción y la emisión de luz por una molécula están reguladas por la ley de Planck (ecuación 1) y por el hecho de que sólo un electrón es excitado o desexcitado por cada fotón absorbido o emitido (Turro, 1978; pág. 91). Con este criterio deberían esperarse espectros de líneas con respecto a la frecuencia para todos los compuestos. De hecho, sólo los espectros de los átomos son casi espectros de líneas. Esto se debe a que los estados electrónicos de los átomos pueden describirse especificando las órbitas de sus electrones de valencia, estando perfectamente definidas las transiciones posibles. En una molécula, una transición electrónica no es tan "pura" como en un átomo porque en los estados electrónicos de la molécula influyen los movimientos relativos de unos núcleos con respecto a otros (vibraciones, rotaciones y colisiones), lo cual implica que a cada estado electrónico le corresponde un conjunto de estados vibracionales y rotacionales. Como resultado la absorción o emisión invo-

lucra transiciones entre "rangos" de energía más que entre valores definidos, con lo cual la línea del espectro atómico se ensancha a una banda, que no siempre puede ser bien resuelta (Turro, 1978; pág. 93).

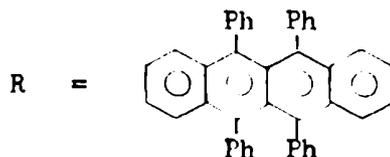
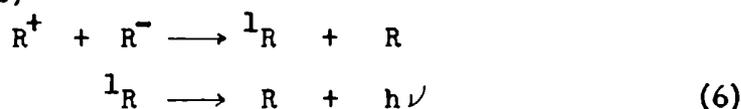
En los estudios de procesos fotoemisivos, un buen espectro permitiría identificar a la especie fotoemisiva. Sin embargo no hay que olvidar que la caracterización de un emisor sobre la única base de espectros muchas veces confusos (especialmente en el campo de las especies quimioluminiscentes y bioluminiscentes) encierra serios riesgos (Hastings, y Wilson, 1976).

### 1.6 REACCIONES ORGANICAS QUIMIOLUMINISCENTES

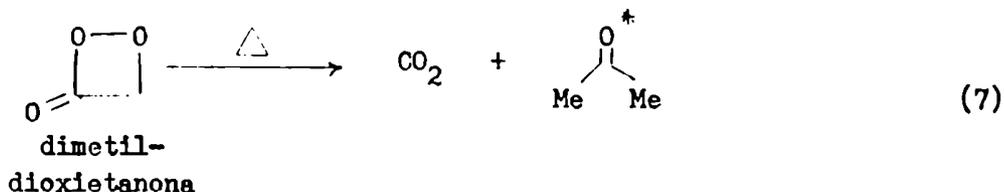
La mayoría de las reacciones orgánicas quimioluminiscentes requieren un paso crítico que involucra la oxidación de un sustrato con oxígeno molecular. Otros tipos de reacciones quimioluminiscentes importantes involucran transferencia electrónica, fragmentación y ordenamientos pericíclicos (Turro, 1978; pág. 581). Han sido muy estudiadas desde el punto de vista quimioluminiscente reacciones como la oxidación de luminol e hidrazidas relacionadas (reacción 5; Roswell y White, 1978),

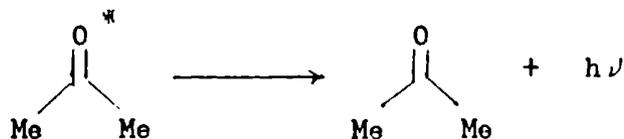


las reacciones de radicales aniónicos y catiónicos orgánicos como el rubreno (reacción 6) (Faulkner, 1978)

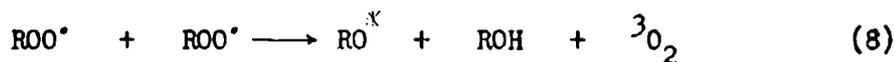


y la fragmentación de dioxetanonas y dioxetanos (reacción 7; Cilento, 1980)





La recombinación de radicales orgánicos (reacciones 8 y 9; Russell, 1957)



es suficientemente exotérmica como para que sea posible la formación de moléculas electrónicamente excitadas (Abuin y Lissi, 1979).

Muchas de estas reacciones orgánicas son las que explican las bioluminiscencias y quimioluminiscencias en sistemas biológicos: la emisión luminosa originada por la reacción de la peroxidasa de rábano ocurre a través de un mecanismo de dioxietanos (Cilento, 1980); la emisión en varias de las reacciones bioluminiscentes involucran dioxietanonas como intermediarios (Hastings y Wilson, 1976); la quimioluminiscencia de baja intensidad en sistemas biológicos (microsomos, mitocondrias, homogenados, etc.) involucraría la recombinación de radicales peroxi.

### 1.7 QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA Y SENSIBILIZADA

Existen dos subclases de reacciones quimioluminiscentes: reacciones directas y reacciones sensibilizadas.

En la llamada reacción directa el emisor es la especie excitada formada en la reacción quimioluminiscente. Esta molécula tiene propiedades fluorescentes. En consecuencia en la reacción directa puede identificarse un producto químico de la reacción quimioluminiscente de características fluorescentes semejantes a las de la emisión observada. A este tipo de quimioluminiscencia pertenecen las oxidaciones de luminol e hidrazidas relacionadas (Roswell y White, 1978), la reacción quimioluminiscente de isobutiraldehído con peroxidasa de rábano en presencia de oxígeno (Faria-Oliveira y col., 1978) y las emisiones de baja intensidad medidas en sistemas biológicos en presencia de oxígeno e hidroperóxidos orgánicos (Boveris y col., 1980 a; Cadenas y col., 1980 a y b).

En la quimioluminiscencia sensibilizada la molécula que emite no participa en la reacción química que lleva a la formación del producto excitado. En estos casos la emisión proviene de una molécula fotoemisora agregada al medio de reacción llamada aceptor (A) o sensibilizador que recibe la energía de

excitación del producto excitado (P) de la reacción en estudio de acuerdo con el siguiente mecanismo:



El espectro de emisión de la reacción coincide con el espectro de emisión del aceptor. Los rendimientos cuánticos aumentan considerablemente con respecto a la reacción directa porque el agregado del aceptor aumenta la eficiencia del proceso de emisión (Seliger, 1978). En este tipo de reacciones puede considerarse la emisión del sistema peroxidasa de rábano-isobutiraldehído-oxígeno sensibilizada por dibromo-antraceno sulfonato, eosina o rosa de bengala (Cilento, 1980; Faría-Oliveira y col., 1978).

Como en las reacciones de emisión directa el espectro de la emisión del sistema coincide con el de la especie excitada formada durante la reacción, el análisis espectral de la emisión, teniendo en cuenta las restricciones indicadas en la pág. 8, permitiría identificar la especie fotoemisora.

## 1.8 PROCESOS OXIDATIVOS

### 1.8.1 Especies oxidantes de interés biológico

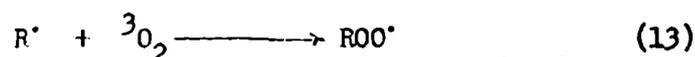
Hasta hace poco tiempo tuvo poco apoyo cuantitativo la idea de que había niveles significativos de oxidantes potencialmente peligrosos en condiciones fisiológicas, en células y tejidos. La información experimental sobre la producción de peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, anión superóxido y oxígeno singlete y sobre las funciones de las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa en diversos organismos ha aumentado considerablemente en los últimos 15 años. Aunque en bajas concentraciones, el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y los hidroperóxidos orgánicos con metabolitos presentes en una célula normal y sus niveles están controlados por las enzimas mencionadas (Chance y col., 1979)

Las reacciones químicas de especies como  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $^1\text{O}_2$  han sido estudiadas principalmente en solventes no acuosos y a altas concentraciones, condiciones poco comparables con las de los sistemas biológicos, lo cual hace que el conocimiento que de ellas tiene debe ser aplicado a sistemas biológicos con cautela.

I. Oxígeno molecular: El oxígeno molecular existe en su forma estable como birradical (es decir que en la molécula en estado fundamental hay dos electrones no apareados) lo cual le da las propiedades que lo caracterizan (paramagne-

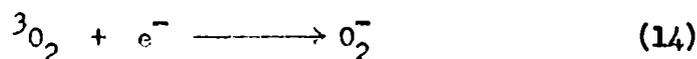
tismo, color azulado del oxígeno líquido, etc.). Debido a esta estructura y a la inversa de lo que ocurre con la mayoría de las moléculas orgánicas, el oxígeno en su estado fundamental es un triplete y en su estado excitado es un singulete (Turro, 1978; pág. 583).

El oxígeno triplete es poco reactivo hacia sustratos orgánicos (que son especies singulete) pese a que las reacciones son exotérmicas. Esto se debe a que en la reacción de una especie triplete con una especie singulete para dar especies singulete no se cumple la regla de conservación de spin. Esta restricción no existe si la reacción ocurra a través de radicales libres por lo que las reacciones de compuestos orgánicos con oxígeno triplete ocurren generalmente por mecanismos de radicales libres del tipo de la reacción (13).



Esta reacción tiene una constante de velocidad de  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  lo cual indica que está controlada por difusión (Ingold, 1969).

El oxígeno triplete es un oxidante bastante pobre: el potencial de la reacción de reducción univalente



es de  $-0,59$  Volt (Fee y Valentine, 1977). La mayoría de los iones y complejos de los metales de transición no son agentes reductores suficientemente fuertes como para reducir al oxígeno a superóxido, por lo cual son más comunes las reacciones en las que se forman complejos del metal con oxígeno semejantes a los de la hemoglobina.

En la molécula de oxígeno singulete ( ${}^1O_2$ ) existen cuatro estados electrónicos posibles, considerando la ocupación de los orbitales ligante y antiligantes llamados  ${}^3\Sigma$ ,  ${}^1\Sigma$ ,  ${}^1\Delta_x$  y  ${}^1\Delta_y$  (Turro, 1978; pág. 584). Fig. 4.

Los dos estados  $\Delta$  son degenerados y se los llama a ambos  ${}^1\Delta$  (Fig. 4). Este estado es el que se conoce normalmente como oxígeno singulete. Desde el punto de vista energético, los estados se ordenan, en orden creciente, según  ${}^3\Sigma < {}^1\Delta$  ( $94,18 \text{ kJ/mol}$ )  $< {}^1\Sigma$  ( $156,97 \text{ kJ/mol}$ ). La posibilidad de atrapar al estado  $\Delta$  con distintos compuestos con los que reacciona, llamados atrapadores, permite seguir su evolución espectroscópicamente a través de la evolución del atrapador.

El espectro de emisión del oxígeno singulete presenta bandas características a 1406 nm, 1268 nm, 703 nm, 634 nm con bandas menores a 580 nm y 478 nm (Khan y Kasha, 1963; Seliger, 1964). La emisión a 1268 nm y 1406 nm, se debe

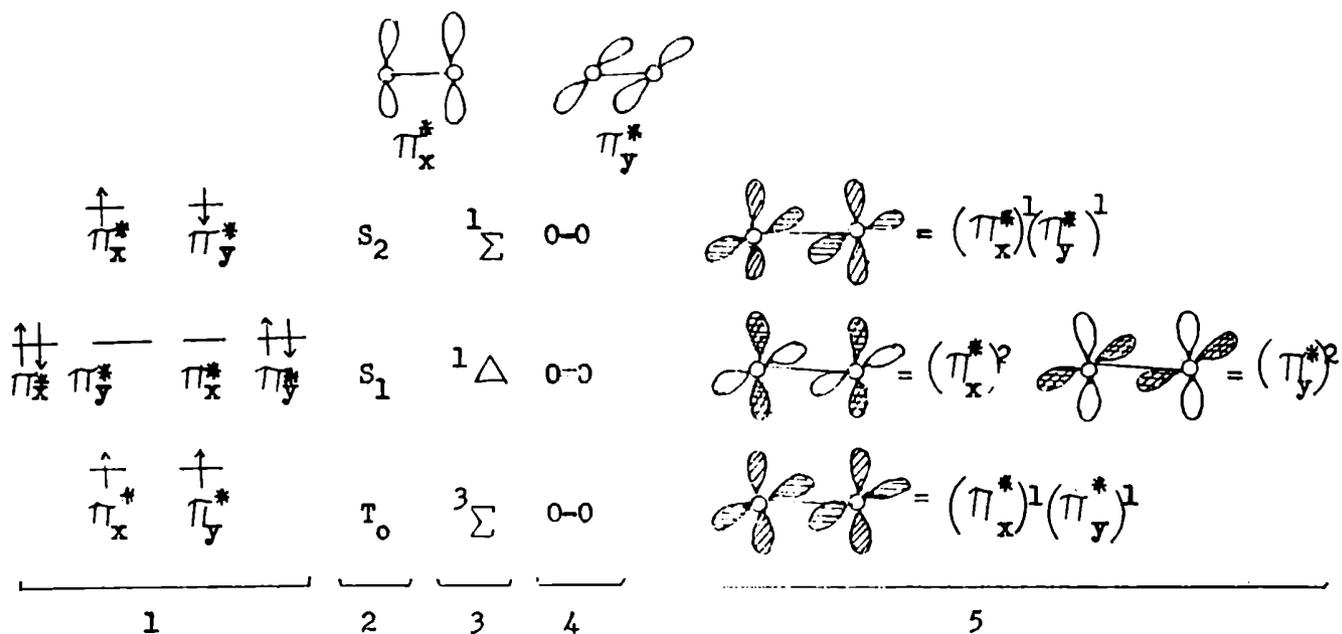
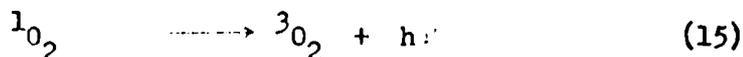


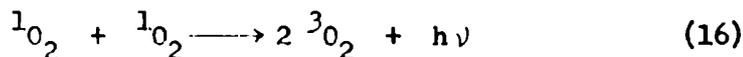
Fig. 4 Descripción cualitativa de las tres configuraciones electrónicas de los estados electrónicos orbitales de menor energía del oxígeno molecular (Turro, 1978; pág. 585).

- 1 - Llenado de orbitales
- 2 - Estado
- 3 - Designación espectroscópica
- 4 - Estructura de Lewis
- 5 - Descripción de los orbitales

a la reacción



y las otras bandas han sido asignadas a la reacción



en la cual de la colisión de dos moléculas de oxígeno excitado se origina un solo fotón (emisión bimolecular del oxígeno singulete).

El oxígeno singulete es altamente reactivo ya que no hay restricciones de spin para que reaccione con especies singulete. Las reacciones son exotérmicas: por ejemplo la reacción de  ${}^1\Delta$  y  ${}^3\Sigma$  con etilenos para dar cetonas li-

beran 418,6 kJ/mol y 334,88 kJ/mol respectivamente.

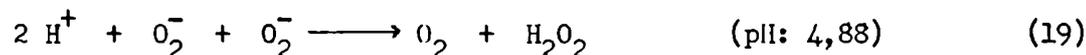
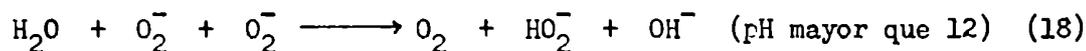
La química del oxígeno singulete producido química o fotoquímicamente ha sido estudiada principalmente en solventes no acuosos.

Se ha postulado que el  $^1\text{O}_2$  participa en una importante cantidad de procesos físicos, químicos y biológicos (Mayeda y Bard, 1974; Khan y Kasha, 1979; Nakano y col., 1975; Khan, 1976), pero su presencia en sistemas biológicos está aún muy discutida (Foote, 1976).

II. Anión superóxido. La captación de un electrón por un orbital antiligante de una molécula de oxígeno da origen al anión radical superóxido de acuerdo con la reacción



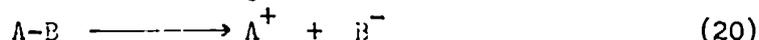
La reacción más importante del anión superóxido es la dismutación (reacciones 18 y 19)



La constante de velocidad de la reacción de dismutación es altamente dependiente del pH, siendo del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  a pH 4,88 y es de  $6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  a pH mayor que 12 (Fee y Valentine, 1977). Cualquier otra reacción del anión superóxido debe competir con la reacción de dismutación. En sistemas biológicos la dismutación está catalizada por la enzima superóxido dismutasa. En presencia de esta enzima la constante de velocidad de la reacción de dismutación es de  $1,8 - 2,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Chance y col., 1979). Los grupos de Fridovich y de Chance son los que más información han aportado sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la producción del anión superóxido en sistemas biológicos respectivamente.

III. Radicales libres. Un radical es una especie química que tiene un número impar de electrones (Pryor, 1970).

Todas las uniones químicas covalentes están constituidas por dos electrones pudiendo romperse de dos formas diferentes. En una de ellas los dos electrones de la unión quedan en uno de los fragmentos (reacción 20)



A esta ruptura, que origina dos fragmentos de carga diferentes se la llama ruptura heterolítica. La unión también puede romperse en forma tal que los dos electrones se dividan simétricamente (reacción 21)

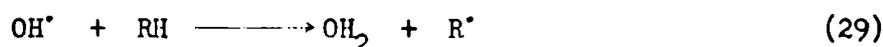
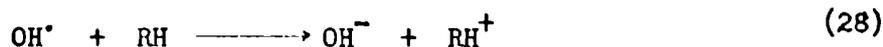


A este proceso se lo llama ruptura homolítica y da origen a dos radicales. La mayoría de los radicales son extremadamente reactivos y existen en muy bajas concentraciones (del orden de  $10^{-5}$  -  $10^{-9}$  M; Pryor, 1970). En consecuencia, sólo aquellas reacciones en las cuales los radicales son reciclados (como las reacciones en cadena) tienen velocidades apreciables.

Una reacción de radicales en cadena consta de tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación se originan los radicales libres por ruptura homolítica de un enlace covalente (reacción 22); las reacciones de propagación son aquellas en las que un radical reacciona con una molécula no radical en forma tal que el número total de radicales del sistema no cambia pero sí cambian las moléculas radicales (reacciones 23 y 24). En las reacciones de terminación reaccionan dos radicales libres para originar moléculas covalentes (disminuye el número total de radicales en el medio de reacción (reacciones 25 a 27)

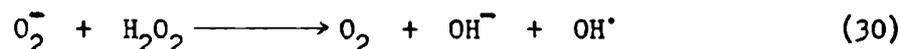


IV. Radical hidroxilo. El radical  $OH^{\cdot}$  es un potente agente oxidante. Dada su alta reactividad es muy poco específico (Fee y Valentine, 1977). Puede aceptar electrones de un sustrato (reacción 28) o captar hidrógeno para dar origen a un radical más estable pero aún reactivo (reacción 29)



La mayoría de estas reacciones tienen constantes bimoleculares del orden de  $10^7$  -  $10^{10}$   $M^{-1}$   $seg^{-1}$  (Pryor, 1973).

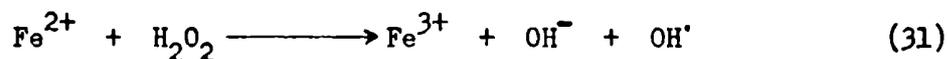
En los sistemas en los cuales hay superóxido y peróxido de hidrógeno puede ocurrir la reacción de Haber Weiss (1934) (reacción 30)



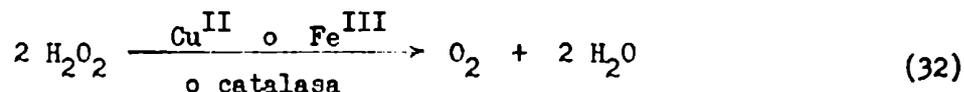
La presencia de  $\text{OH}^\cdot$  y la posibilidad de que ocurra esta reacción en sistemas biológicos ha sido muy discutida siendo refutada por algunos autores (Barb y col., 1951) y apoyada por otros (Cohen, 1977). La catálisis de la reacción 30 por hierro quelado con EDTA y la complejidad de los sistemas biológicos son los factores más importantes que permiten sostener que pueda ocurrir en sistemas biológicos (Cohen, 1977; Chance y col., 1979).

V. Peróxidos. a) Peróxido de hidrógeno: si bien el peróxido de hidrógeno es fuertemente oxidante para compuestos orgánicos en general, sus reacciones son lentas. Muchas de ellas ocurren a través de radical  $\text{OH}^\cdot$  iniciándose por la ruptura homolítica del enlace  $-\text{O}-\text{O}-$  por acción del calor, luz o catálisis por metales de transición. La velocidad de la reacción del peróxido de hidrógeno con metales de transición es mayor que con compuestos orgánicos.

Entre las reacciones más características del peróxido de hidrógeno figuran las reacciones tipo Fenton (reacción 31)



(Walling y Ohlson, 1975) y las reacciones tipo catalasa (reacción 32)

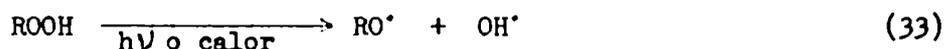


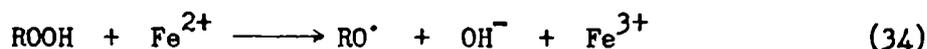
La constante de velocidad para la reacción (32) cuando está catalizada por la catalasa es del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Chance y col., 1979).

La presencia de peróxido de hidrógeno en bajas concentraciones en sistemas biológicos y las características de la catalasa han sido descritas por el grupo de Chance.

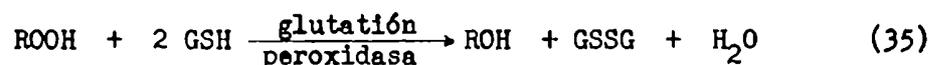
b) Peróxidos orgánicos: los peróxidos orgánicos pueden ser peróxidos de mono o de bialquilo ( $\text{ROOH}$  o  $\text{ROOR}$  respectivamente). Los bialquilperóxidos se descomponen a velocidades que son independientes del grupo alquilo sustituyente, a través de mecanismos de radicales en cadena que dependen del medio de reacción. Las energías de activación para estas reacciones son de 142,32 kJ/mol - 150,69 kJ/mol (Pryor, 1970).

El enlace peroxi de los hidroperóxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno, en presencia de luz, calor o  $\text{Fe}^{2+}$  sufre ruptura homolítica según las reacciones 33 y 34





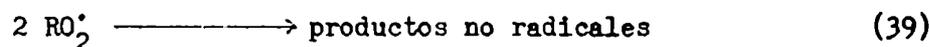
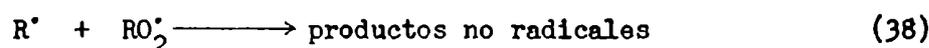
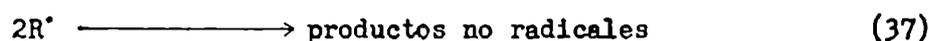
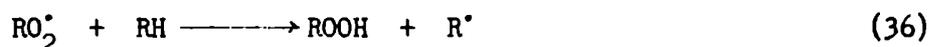
En sistemas biológicos a través de los procesos de peroxidación lipídica se forman peróxidos del tipo ROOH que son capaces de participar en reacciones de radicales en cadena. Su presencia en estos sistemas está regulada por la actividad de la enzima glutatión peroxidasa que cataliza la reacción 35



donde GSH es glutatión reducido y GSSG glutatión oxidado (Chance y col., 1979)

### 1.8.2 Autoxidación de lípidos

Se sabe que los lípidos pueden autooxidarse "in vivo" e "in vitro". Cuando se autooxidan hidrocarburos a bajas temperaturas usualmente se forman hidroperóxidos de acuerdo con las siguientes reacciones:



A presión atmosférica la concentración de oxígeno en solventes orgánicos es del orden de  $10^{-3}$  M. En estas condiciones la velocidad de la reacción (13) es alta y la única reacción de terminación importante es la reacción (39). Cuando la presión de oxígeno es menor, aumenta la concentración de  $\text{R}^\cdot$  en el estado estacionario (disminuye la velocidad de la reacción 13) y las reacciones (37) y (38) se hacen más importantes. La presión de oxígeno en los tejidos de mamíferos es del orden de 20-40 mm de mercurio, por lo cual la reacción (38) contribuiría a las reacciones de terminación de los procesos de oxidación en la célula viviente. También se esperaría que la reacción (37) fuera importante, lo que haría que la autooxidación de lípidos pueda llevar a la formación de nuevos enlaces -C-C- produciendo entrecruzamientos que en las membranas podrían alterar las velocidades de difusión y la química celular. Otro factor importante en las cinéticas de autooxidación es que cuanto más compleja es la mezcla de reacción y especialmente cuando hay metales de transición presentes, mayor es la velocidad de autooxidación (Walling, 1969). La presencia de lípidos (compuestos fácilmente oxidables), iones metálicos (que

actúan como catalizadores en procesos oxidativos) y de oxígeno puede llevar a la oxidación de materiales celulares relativamente inertes a velocidades mayores de las que podrían predecirse por estudios en sistemas más simples (Pryor, 1973).

### 1.8.3 Peroxidación lipídica en sistemas biológicos

El fenómeno de peroxidación lipídica ocurre extensamente cuando se incuban homogeneizados o fracciones subcelulares de tejidos con oxígeno. En los últimos 5 años, gracias al desarrollo de ensayos no invasivos como la quimioluminiscencia de órganos "in situ" (Boveris y col., 1980 a), la medición de la liberación de alcanos en el aire espirado (Sagai y Tappel, 1978) y la liberación de glutatión oxidado en bilis (Akerboom y col., 1982) se han tenido evidencias directas de que los procesos de peroxidación lipídica ocurren "in vivo".

Se ha asociado la peroxidación de estructuras membranosas con procesos patológicos. Gershman y col. propusieron en 1954 la primera teoría que postulaba la presencia de radicales libres y productos de la reducción parcial del oxígeno en sistemas biológicos. En 1964 Gershman propuso que los radicales libres del oxígeno producen daños en los sistemas biológicos cualquiera sea su concentración, siendo el tiempo de manifestación del daño inversamente proporcional a la presión parcial de oxígeno a la que está sometido el sistema.

Los componentes celulares más susceptibles de ser peroxidados con los lípidos insaturados, dada su extrema labilidad en presencia de oxígeno o de los productos de la reducción parcial de oxígeno y su distribución en membranas celulares. La peroxidación lipídica en tejidos es irreversible y puede ser considerada en sí misma un proceso patológico. Los productos de la peroxidación son tóxicos para muchos sistemas biológicos y pueden causar daños posteriores. Es fundamental tener en cuenta que la introducción de funciones hidrofílicas en la membrana por la formación de hidroperóxidos puede producir perturbaciones en la microarquitectura de la misma, inhibir actividades enzimáticas, alterar la permeabilidad de la membrana, su fluidez, etc.

Pese a la regulación de los niveles endógenos en la célula, su presencia puede alterar al azar moléculas de DNA, RNA y otros componentes del sistema sintetizador de proteínas.

El énfasis principal en los trabajos relacionados con peroxidación lipídica en sistemas biológicos estuvo centrado principalmente en el estudio de estados patológicos (Chance y col., 1979).

Szilard en 1959 y Orgel en 1963 postularon una teoría de envejecimiento ba-

sada en daños acumulativos producidos en el material genético por el ataque continuo de agentes oxidantes. Además del proceso de envejecimiento se ha relacionado a la peroxidación lipídica "in vivo" con el daño celular que los agentes oxidantes presentes en la polución ambiental producen en los pulmones y las células, con algunas fases de la arterioesclerosis, con la hepatotoxicidad de hidrocarburos clorados y con el daño hepático producido por etanol (Tappel, 1973; Videla y col., 1983)

La célula se defiende contra la acción de radicales libres y agentes oxidantes a través de mecanismos que actúan en diferentes niveles siendo los factores más importantes la existencia de estructuras especiales, de enzimas antioxidantes y de vitaminas antioxidantes (Tappel, 1979).

Las estructuras propias de las proteínas asociadas a membranas, especialmente en aquellas proteínas en las que hay transporte de electrones, tienden a minimizar el riesgo de pérdida de electrones en reacciones laterales.

La citocromo oxidasa, por ejemplo, con su alta afinidad por el oxígeno y su capacidad para retener los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno opera en condiciones óptimas dando  $H_2O$  como producto final y permitiendo el acoplamiento energético sin que haya prácticamente pérdida de electrones (Chance y col., 1979). En los animales, además, la presión de oxígeno en los tejidos es mantenida en niveles bajos por el sistema circulatorio.

Entre las enzimas más importantes se pueden mencionar la superóxido dismutasa y la catalasa, que actúan como antioxidantes, que al eliminar el superóxido y el peróxido de hidrógeno respectivamente del medio también impiden la formación del radical  $OH\cdot$  a través de la reacción 30. La enzima glutation peroxidasa cumple un rol fundamental al metabolizar peróxidos orgánicos. La vitamina E es un eficiente antioxidante biológico, actuando como un atrapador de radicales libres e inhibiendo así las cadenas de reacciones de radicales; la vitamina A tendría también propiedades antioxidantes y actuaría además disminuyendo los niveles de oxígeno singulete en la célula al actuar como atrapador de dicha especie (Foote, 1976).

#### 1.8.4 Técnicas para medir peroxidación lipídica

Varias técnicas permiten medir el nivel de hidroperóxidos formados en un sistema. La mayoría de ellas (titulación de los hidroperóxidos con IK, medición del malonaldehído formado, de dienos conjugados, de bases de Schiff fluorescentes después de incubación prolongada con proteínas) dan buenos resulta-

dos "in vitro" pero ninguna de ellas permite realizar estudios "in vivo" (Chance y col., 1979) ya que en todas ellas es necesario destruir el material biológico para poder realizar las mediciones. Cuando se forman hidroperóxidos en un sistema biológico, éstos pueden ser metabolizados por la glutatión peroxidasa con formación de glutatión oxidado (GSSG) (reacción 35). La medida de los niveles de glutatión oxidado permitiría determinar los niveles de peroxidación lipídica. Ha demostrado ser particularmente interesante la medida de la liberación de glutatión oxidado en bilis de hígados perfundidos e "in situ" (Sies y col., 1972; Akerboom y col., 1982).

La ruptura de una molécula de hidroperóxidos por mecanismos aún no aclarados completamente lleva a la formación de alcanos (etano, propano o pentano) que son liberados en el aire espirado. El nivel de hidrocarburos en el aire espirado ha sido considerado un reflejo de los niveles endógenos de peroxidación (Billard y col., 1977; Riely y col., 1974).

La recombinación en reacciones laterales y secundarias de dos radicales peroxilo en una reacción de terminación (reacción 39) lleva a la formación de especies excitadas, capaces de emitir fotones. Esta emisión luminosa es de intensidades sumamente bajas y puede medirse en cualquier sistema que pueda exponerse ante un tubo fotomultiplicador. Es interesante la posibilidad de medir emisión de fotones en la superficie de aquellos órganos susceptibles de ser expuestos (Boveris y col., 1980 a).

Las tres técnicas: medida de los niveles de glutatión en bilis, medida de los niveles de alcanos en el aire espirado y emisión superficial de fotones en órganos expuestos, son aprovechadas para medir procesos de peroxidación lipídica "in vivo" ya que las tres pueden considerarse ensayos no-destructivos. Si bien sólo la medida de la liberación de alcanos puede ser considerada también ensayo no-invasivo para el animal, las otras técnicas siguen siendo ensayos no-invasivos y específicos para el órgano en estudio.

## 1.9 QUIMIOLUMINISCENCIA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.

En 1961 Tarusov y col. identificaron una luminiscencia azul verdosa muy débil en hígado de ratón "in situ". Estas observaciones fueron confirmadas y ampliadas por Shimizu y col. en 1973 y por Boveris y col. en 1980. Se han descrito luminiscencias de intensidades comparables acompañando procesos de peroxidación en órganos perfundidos (Cadenas y col., 1980 c y d), células aisladas (Lloyd y col., 1979), homogeneizados de tejidos (Di Luzio y Stege, 1977)

membranas mitocondriales (Cadenas y col., 1980 e) y microsomas (Sugioka y Nakano, 1976) y sistemas enzimáticos como lipoxigenasa suplementada con ácido linoleico (Boveris y col., 1980 b) y no enzimáticos como citocromo suplementado con hidróperóxido (Cadenas y col., 1980 a,b).

Si bien es sabido que la emisión de fotones refleja directa o indirectamente los procesos de peroxidación lipídica, al haber relativamente poca información sobre estos procesos por ser muy reciente el empleo de técnicas de conteo de fotones en sistemas biológicos, son muchos los factores que influyen en este fenómeno y que aún se desconocen. Todavía no se tiene información suficiente que permita identificar en forma unívoca las especies fotoemisivas en la mayoría de los sistemas estudiados.

Se ha postulado al oxígeno singulete como una de las principales especies responsables de la fotoemisión (Boveris y col., 1980 a; Nakano y col., 1975).

Debido a la alta reactividad del oxígeno singulete y a la de los radicales libres responsables del proceso de peroxidación lipídica, es importante determinar hasta que punto estas especies se forman en sistemas intactos en condiciones fisiológicas y patológicas contribuyendo al daño celular.

#### 1.10 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

En el presente trabajo se describe:

- a) Una comparación de distintos instrumentos que se emplean en la medida de la emisión luminosa de sistemas biológicos (Capítulo 3).
- b) La emisión en algunos sistemas animales: sistemas modelo, organelas subcelulares, homogeneizados de órganos y órganos "in situ" (Capítulo 4).
- c) La emisión en semillas de soja y de sistemas relacionados (Capítulo 5).

Si bien las técnicas de conteo de fotones están desarrolladas, especialmente en lo que a contadores de centelleo se refiere, recién en los últimos 10 años se ha comenzado a aplicarlas a la medición de emisiones de baja intensidad en sistemas biológicos. La variedad de instrumentos empleados en dichas mediciones hace interesante la comparación de sus rendimientos y propiedades. Es también esta la razón por la que se describen en la sección materiales y métodos los instrumentos empleados.

Es aparente que todos los sistemas biológicos en presencia de oxígeno emiten fotones como consecuencia de procesos peroxidativos. Dada la universal distribución de este fenómeno, es una aproximación útil al conocimiento de los

procesos de fotoemisión en sistemas biológicos un estudio comparado en sistemas animales y vegetales. La existencia de una emisión espontánea, es decir en ausencia de estímulos exógenos, tanto en órganos de animales "in situ" como en semillas enteras hace atractiva la eventual posibilidad del empleo de la quimioluminiscencia como ensayo no invasivo no sólo a nivel de investigación básica sino también aplicada a la clínica y a la agronomía. Para esto es necesario una descripción completa de dichos fenómenos. Dada la poca información que sobre ellos se tiene y la complejidad de los sistemas enteros nos pareció adecuada una aproximación a través de sistemas más sencillos (reacciones modelo).

C A P I T U L O I I

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

## 2.1 CONTADORES DE FOTONES

Los elementos básicos de un contador de fotones son: (Fig. 5)

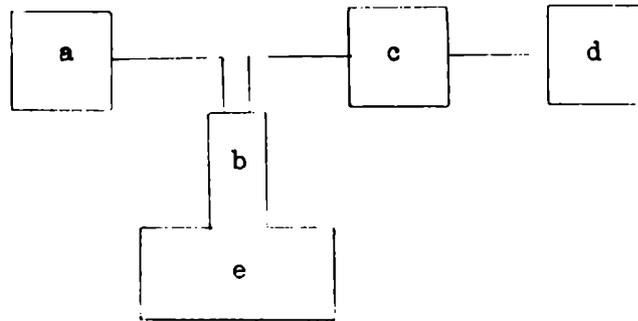


Fig. 5. Diagrama en bloques de un contador de fotones

- a) fuente de alto voltaje para el tubo fotomultiplicador
- b) tubo fotomultiplicador con un sistema adecuado de enfriamiento
- c) amplificador discriminador
- d) registrador, contador de pulsos y/o impresora
- e) compartimento de muestra

### 2.1.1 Fuente de poder

La fuente de poder de un contador de fotones debe ser una fuente estabilizada. El rango de voltaje en que se puede trabajar depende de las características del tubo fotomultiplicador empleado, por lo cual para seleccionar el voltaje de trabajo es imprescindible conocer la curva de respuesta del tubo fotomultiplicador al voltaje.

### 2.1.2 Tubo fotomultiplicador

Un tubo fotomultiplicador es un dispositivo consistente en un cátodo fotoemisor seguido de una sección que multiplica la señal (Fig. 6).

I. Superficie fotoemisiva. La superficie fotoemisiva está compuesta por metales que se caracterizan porque sus electrones de valencia están débilmente ligados pudiendo ser arrancados de la estructura metálica por la energía aportada por un fotón de frecuencia adecuada. La energía mínima necesaria para arrancar un fotoelectrón de una superficie fotoemisiva es igual a la energía que mantiene unido el electrón al metal ( $A$ ). Todo exceso de energía de un fotón incidente de frecuencia  $\nu$  con respecto al valor de  $A$  se convierte en energía cinética del electrón ( $E$ ) de acuerdo con la ley del efecto fotoeléctrico de Einstein (40).

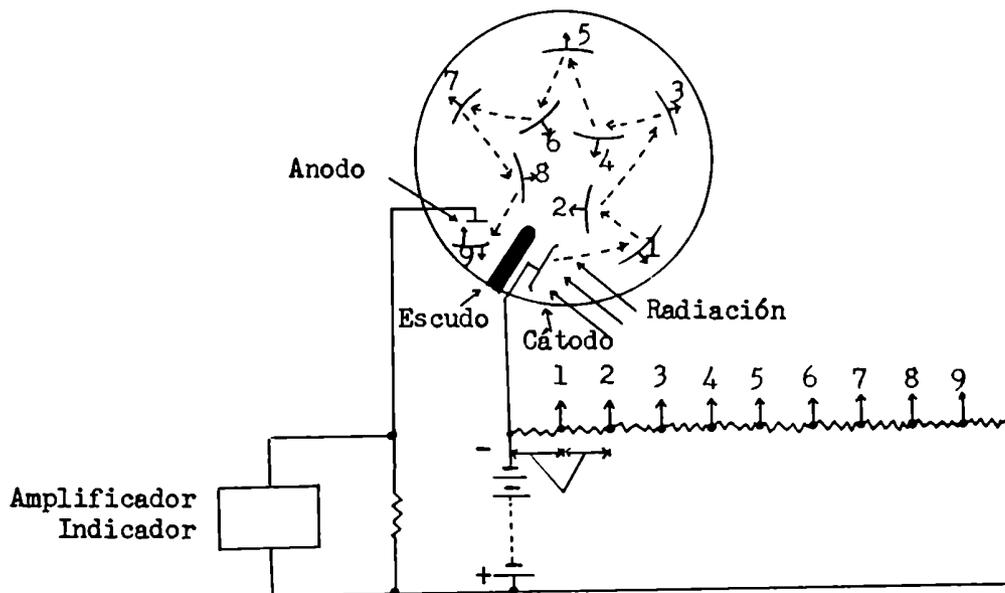


Fig. 6 Esquema de un tubo fotomultiplicador.  
1 a 8: dinodos (de Skoog y West, 1975)

$$E + A = h\nu \quad (40)$$

(Moore, 1976)

La sensibilidad del fotocátodo (Figura 7) depende de su composición y de la longitud de onda de la radiación incidente.

II. Multiplicador de la señal. Cuando se aplica voltaje entre una superficie fotoemisiva y un ánodo los electrones emitidos fluyen hacia el ánodo originando una corriente eléctrica. Los tubos fotomultiplicadores tienen entre el cátodo y el ánodo una sección que multiplica la señal consistente en electrodos adicionales llamados dinodos cuyas superficies tienen la propiedad de liberar varios electrones cuando son golpeadas por un electrón con energía suficiente. Los dinodos (Fig. 6) están conectados a voltajes positivos (con respecto al cátodo) y sucesivamente crecientes, de manera tal que los electrones emitidos en uno de ellos sea acelerado hacia el siguiente. Al incidir en un dinodo cada fotoelectrón provoca la emisión de varios electrones más. Se consiguen con este sistema ganancias de  $10^6$  o mayores. (Skoog y West, 1975).

III. Dependencia entre la señal de salida del tubo fotomultiplicador y el voltaje aplicado. La señal de salida de un fototubo depende de la intensi-

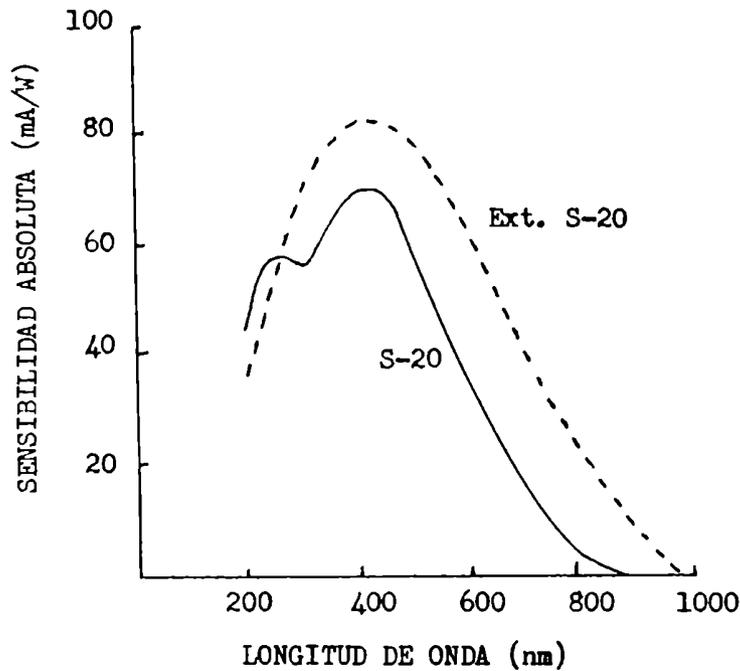


Fig. 7 Curvas típicas de respuesta espectral para dos tipos de tubo fotomultiplicador marca EMI. S-20 (—) y extended S-20 (---) (del catálogo para tubos fotomultiplicadores EMI).

dad y de la longitud de onda del haz incidente y del voltaje aplicado al fototubo (Fig. 8). Con voltajes menores que  $V_1$  ambos factores influyen en la señal de salida. Si el voltaje es mayor que  $V_2$  se está en una zona de descarga continua que puede dañar irreversiblemente al fototubo. La zona comprendida entre  $V_1$  y  $V_2$ , donde la señal emitida es relativamente independiente del voltaje aplicado y es sólo función de la intensidad del haz incidente, es la zona adecuada para trabajar.

IV. Ruido electrónico en los fototubos. En un tubo fotomultiplicador el término señal se refiere al flujo de corriente producida por la excitación luminosa intencional y controlada del fotocátodo. Un ruido es por definición una señal medida que no corresponde al estímulo que se intenta medir.

Aún cuando el fotocátodo esté protegido de radiaciones ópticas externas la señal que se obtiene en un fototubo no es nula. Los pulsos medidos en estas condiciones reciben el nombre de corriente oscura (cuando se la mide con un contador de pulsos lo que se está midiendo es una suma del ruido electrónico del sistema de amplificación (que en ciertas condiciones puede llegar a

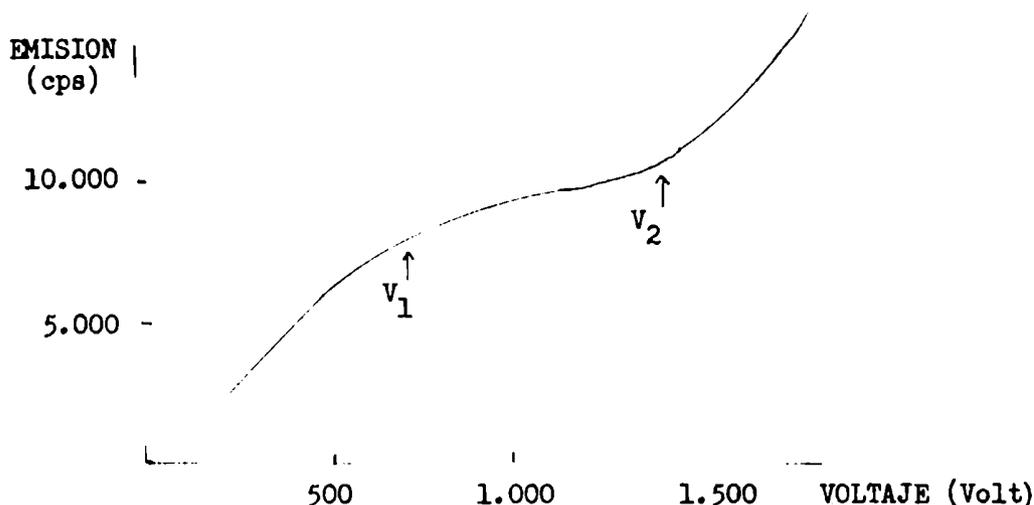


Fig. 8 Dependencia de la emisión detectada con un tubo fotomultiplicador EMI 9658 ( $T = -13,5^{\circ}\text{C}$ ) en función del voltaje aplicado.

ser importante) y del ruido electrónico del fototubo (que es el principal componente). En cualquier fototubo la corriente oscura está determinada por el tipo y área del fotocátodo, aumentando tanto con la sensibilidad del mismo a longitudes de onda largas como con su área. La corriente oscura nunca puede ser eliminada pero puede ser reducida disminuyendo la temperatura de trabajo del fototubo o reduciendo el área efectiva del cátodo por medio de una lente magnética. Si un fototubo aún sin voltaje aplicado es iluminado, su corriente oscura aumentará, siendo necesarias entre 1 y 24 horas de oscuridad para que regrese a su valor normal. Este tiempo depende de las características del fototubo: cuanto mayor es la sensibilidad y/o más viejo es el tubo, mayores son los tiempos necesarios para que se normalice. Además del ruido electrónico debido al fototubo, suele haber en el compartimento de muestra luz espúrea que es difícil de eliminar. A la lectura obtenida con el obturador cerrado (es decir en ausencia de luz espúrea) se la identifica con la corriente oscura. Con el obturador abierto se mide la suma de la corriente oscura y la luz espúrea; a esta emisión se la llama fondo. Cuando se miden emisiones tan bajas como las de órganos "in situ" y, especialmente cuando se busca conocer la distribución espectral de cualquier emisión es indispensable disminuir al mínimo valor posible la luz espúrea.

### 2.1.3 Amplificador discriminador.

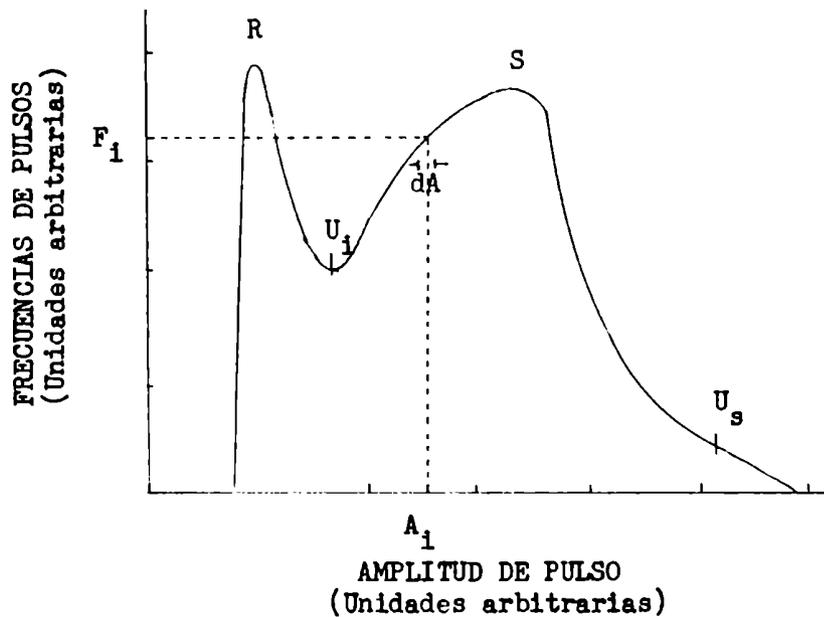


Fig. 9 Respuesta típica de un tubo fotomultiplicador conectado a un amplificador-discriminador (Princeton Applied Research modelo 1121 en el modo PHA) .  
 R: ruido del fototubo y del amplificador; S: pico de respuesta para fotoelectrones;  $U_1$ : umbral inferior;  $U_2$ : umbral superior;  $dA$ : ventana de amplitud de diferencial.

La señal que sale del tubo fotomultiplicador puede ser procesada por el amplificador-discriminador en dos formas diferentes: analógica o digital. La forma analógica mide la cantidad de fotoelectrones como voltajes acumulativos y la digital los resuelve en el tiempo siendo contados como pulsos eléctricos. El amplificador-discriminador tiene la función de amplificar la señal que sale del tubo fotomultiplicador bajo la forma de pulsos y discriminar qué pulsos son contados. (Fig. 9). Esto se hace seleccionando a través de los umbrales de discriminación las intensidades mínima y máxima que debe tener una señal para que sea considerada como tal. La selección de ambos umbrales se hace en forma independiente (el criterio para seleccionarlos se indica en la sección 2.2.2-1). Los dos umbrales determinan la ventana en la cual habrá de llevarse a cabo el conteo.

#### 2.1.4 Registro de la señal de salida

La señal que sale del amplificador-discriminador puede ser conectada a contadores de pulsos, registradores o impresoras.

## 2.2 DISEÑOS DE CONTADORES DE FOTONES

Dado que los contadores de fotones empleados en diferentes laboratorios suelen diferir entre sí por ser, muchas veces, diseñados especialmente por cada grupo de investigación, se describen acá los contadores de fotones empleados en el presente trabajo. Se describe con más detalle el contador desarrollado en la Johnson Research Foundation, Universidad de Pensilvania (sección 2.2.2) por ser el instrumento con el que se ha realizado la mayor parte del presente trabajo y por ser aún un instrumento en etapa de desarrollo.

### 2.2.1 El contador de centelleo usado como contador de fotones

Un contador de centelleo es un contador de fotones modificado para minimizar los ruidos cuando se trabaja con un tipo determinado de señal. El contador de centelleo tiene dos tubos fotomultiplicadores enfrentados entre sí. Los tubos están conectados a un circuito llamado circuito de coincidencia, cuya función se indica más abajo. La señal que sale del circuito de coincidencia entra a un amplificador-discriminador donde sigue un camino semejante al ya descrito para un contador de fotones (Fig. 5). La muestra se coloca entre ambos tubos de manera que un pulso de fotones de intensidad adecuada pueda ser detectado por ambos tubos a la vez. La función del circuito de coincidencia es permitir que lleguen al amplificador-discriminador solamente aquellos pulsos que sean detectados simultáneamente por los dos tubos en el tiempo de resolución del circuito (usualmente 4 - 10  $\mu$ seg). Como los ruidos electrónicos son originados en cada tubo aleatoriamente, la probabilidad de que se produzca un pulso simultáneamente en ambos tubos debido a ruido de los fototubos es muy baja.

Con este sistema disminuye notablemente el ruido de fondo. En una muestra radioactiva la señal originada por cada desintegración en el líquido centelleador es de intensidad tal que puede llegar a ambos tubos simultáneamente, ya que una desintegración  $\beta$  en un medio centelleador adecuado origina aproximadamente 800 fotones (Hastings y Weber, 1963). Cuando se trabaja con este tipo de señales el circuito de coincidencia permite reducir el ruido electrónico sin alterar significativamente la lectura con lo cual se mejora su calidad.

Quando se mide la emisión de una reacción quimioluminiscente en un contador de centelleo con el circuito de coincidencia conectado, la lectura es casi nula. Esto se debe a que por ser la intensidad de cada pulso muy baja (un fotón por pulso) será detectada por uno u otro de los tubos pero no

simultáneamente por ambos y en consecuencia no será contada. Si se desconecta el circuito de coincidencia los ruidos electrónicos aumentan significativamente pero es posible medir la señal con uno u otro de los tubos (en la mayoría de los contadores de centelleo se puede seleccionar el tubo con que se cuenta).

I. Contadores de centelleo que operan a temperaturas bajas (Nuclear Chicago. Este aparato opera normalmente a temperaturas menores que  $10^{\circ}\text{C}$ . Como las reacciones quimioluminiscentes se miden a temperatura ambiente o a  $37^{\circ}\text{C}$  es indispensable aislar térmicamente las muestras, lo cual puede conseguirse empleando dos frascos de vidrio, uno de 13 mm de diámetro y 42 mm de altura y otro de 25 mm de diámetro y 60 mm de altura. El frasco más pequeño se ubica dentro del más grande sobre un pequeño trozo de material aislante no emisor. Bajo estas condiciones la temperatura del sistema se puede mantener constante ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) durante los períodos de lectura (que en nuestras experiencias fueron de 24 ó 60 segundos).

II. Contadores de centelleo que operan a temperatura ambiente (Beckman LS 100, LS 150, Packard Tri-Carb 3320). El tubo fotomultiplicador de estos instrumentos trabaja a temperatura ambiente, por lo cual no es necesario aislar la muestra siendo poco conveniente emplear los dos frascos descritos ya que por el diseño geométrico del sistema disminuyen considerablemente las lecturas. Sin embargo cuando se desea obtener la distribución espectral de la emisión es útil el uso de ambos frascos: en el frasco interior se coloca la muestra y en el exterior el filtro. No es necesario usar material aislante en la base del tubo si las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

Los contadores de centelleo tienen un sistema automático de cambio de muestra que permite medir varias muestras simultáneamente, si el contador trabaja a temperatura ambiente y la reacción se puede medir a dicha temperatura.

En todos los sistemas estudiados en contadores de centelleo la agitación aportada por el movimiento de cambio de muestras fue suficiente para mantener oxigenado el medio de reacción.

2.2.2 Contador de fotones diseñado en la Johnson Research Foundation, Universidad de Pensilvania. A este instrumento se lo identificará en este trabajo como contador modelo Johnson Foundation. El contador tiene un tubo fotomulti-

plicador EMI 9658 que se caracteriza por su sensibilidad extendida en el rojo. La respuesta espectral del fototubo corresponde al Ext. S-20 (Fig. 6). El fototubo se mantiene enfriado a 35 °C por debajo de la temperatura ambiente con un enfriador Fact Mark II (EMI Gencom Inc.). El enfriamiento del fototubo permite mantener las corrientes oscuras en valores del orden de 100-200 cps (cps = cuentas por segundo). La salida del tubo fotomultiplicador está conectada a un amplificador-discriminador (Princeton Applied Research modelo 1121). La señal de salida del amplificador-discriminador se grafica en un registrador y se la lee en un contador de pulsos (Heathkit modelo IM - 4100). La muestra se ubica en un compartimento oscuro y termostatzado. Una barra de polimetilacrilato de 15 cm de longitud y 5 cm de diámetro, con sus caras ópticas pulidas y forrada lateralmente con papel de aluminio y cinta negra (para que no deje pasar luz), separa la muestra del fototubo. Esta barra provee un buen aislamiento térmico con acoplamiento óptico entre la muestra y el tubo fotomultiplicador. El aparato está formado por módulos independientes pudiendo ser usado en dos posiciones: vertical y horizontal. En la posición vertical se trabaja con muestras sólidas y órganos "in situ" (y muestras líquidas usando cubetas especiales). En la posición horizontal se puede trabajar con sistemas líquidos o sólidos pero no puede trabajarse con órganos "in situ". En la posición vertical, el compartimento de muestra es una caja de madera de 22cm x 15 cm x 50 cm pintada por dentro de negro y con trampa para luz en la tapa. La caja está equipada con un obturador y un portafiltros que es desmontable y tiene capacidad para cuatro filtros, pudiendo controlarse la ubicación de cada filtro desde fuera de la caja. Una de las paredes tiene adosada una espira de cobre por la cual circula agua, pudiéndose termostatzar la caja completa a la temperatura deseada. Este tipo de termostatzación es útil sólo cuando se trabaja con animales, donde interesa una temperatura ambiente adecuada para ayudar a mantener al animal anestesiado vivo pero no en el caso de cubetas (con muestras sólidas o líquidas) donde se requiere una rápida equilibración térmica. En estos casos se emplean portacubetas termostatzables. En experimentos "in vivo" el animal con el órgano expuesto se ubica sobre una plataforma de madera de altura graduable con el órgano próximo al obturador y centrado con el sistema óptico. La inyección de reactivos durante los experimentos se hace desde el exterior de la caja a través de una cánula adecuadamente fijada al animal.

Para la posición horizontal del aparato se cuenta con una caja de aluminio con su superficie anodizada de 18 cm x 23cm x 44cm que contiene un portacubetas termostatizable, un obturador y un portafiltros circular con capacidad para ocho filtros cuya posición puede controlarse desde el exterior de la caja. El portacubetas está preparado para tener un agitador magnético, pero también puede aprovecharse el burbujeo de gases en la cubeta para agitar la muestra. La cubeta permite incluir un electrodo de oxígeno pequeño. Los reactivos se agregan desde el exterior de la caja a través de cánulas con lo cual es posible seguir las reacciones desde los tiempos iniciales.

Dada la gran superficie del fotocátodo ( $20 \text{ cm}^2$ ) y su sensibilidad extendida en el rojo, cualquier exposición a luz intensa, aún con el voltaje desconectado, produce un aumento en la corriente oscura e inestabiliza al fototubo. Una exposición a luz intensa con el voltaje conectado podría dañar irreversiblemente al fototubo. En consecuencia es imprescindible tener siempre la precaución de no abrir la caja cuando se tiene el obturador abierto y/o voltaje aplicado al tubo. La fuente de poder tiene una llave que abre el circuito para poder desconectar rápida y fácilmente el voltaje del tubo.

I. Selección de los umbrales de trabajo. La amplitud (o intensidad) de un pulso detectado por el amplificador-discriminador es función de la energía del mismo y ésta en el sistema de fotoelectrones depende de la energía del fotón que lo originó. La frecuencia (número de pulsos/unidad de tiempo) con que los pulsos son detectados por el amplificador-discriminador en presencia de luz es función de la amplitud de los mismos (Fig. 9). El pico R corresponde a señales de baja amplitud constituidas principalmente por ruido del fotomultiplicador; el pico S es la respuesta del tubo a fotoelectrones. Se pueden seleccionar los pulsos a contar en forma tal que la contribución de los que fueron originados por ruido sea mínima y regular la de los pulsos de altas energías. Esto se consigue usando dos discriminadores que fijan las energías mínima (umbral inferior) y máxima (umbral superior) que debe tener un pulso para ser contado. El amplificador-discriminador de este instrumento permite analizar visualmente la altura de pulsos con un dispositivo que se base en el siguiente principio: si se tiene una ventana pequeña, de amplitud fija  $dA$  (Fig. 9) que se puede ubicar en cualquier punto  $A_1$  de la zona de amplitudes detectada por el fototubo, el número de pulsos detectados en dicha ventana en la unidad de tiempo ( $F_1$ ) corresponderá a la frecuencia de pulsos

que se producen en el intervalo de amplitudes  $\left[ A_1 \pm dA/2 \right]$  (para todo  $i$ ). Graficando esta frecuencia en función de la amplitud se obtendrá una curva análoga a la de la Fig. 9. Si se mueve la ventana sobre el rango de discriminación (de amplitud de pulso) a una velocidad constante, la ventana permanecerá tiempos iguales y constantes en cada intervalo ( $dA$ ). Si este movimiento se repite en todo el rango de discriminación con una frecuencia de barrido constante  $\nu$ , los valores medidos en cada punto  $A_1$  para un intervalo de tiempo  $t$  mayor que  $\nu^{-1}$  podrán ser (según como se construye el instrumento) una suma o un promedio del número de pulsos por unidad de tiempo contados en cada intervalo  $\left[ A_1 \pm dA/2 \right]$  (para todo  $i$ ). El amplificador-discriminador tiene un dispositivo que barre el rango de frecuencias de discriminación del aparato con una ventana de amplitud fija que se mueve con una frecuencia de 6 Hz. El número de pulsos contados en cada intervalo los traduce en voltaje y la amplitud  $A_1$  a la que corresponden las frecuencias se puede traducir en una escala de tiempo ya que cada  $1/6$  segundos volverá a estar en el mismo valor de  $A$ . En consecuencia un osciloscopio conectado al amplificador discriminador cuando funciona este dispositivo reflejará en la pantalla la distribución de frecuencias de los pulsos generados por el sistema conectado al amplificador-discriminador en función de su amplitud. En el caso de tratarse de un tubo fotomultiplicador conectado al amplificador-discriminador en la pantalla del osciloscopio se verá una figura semejante a la Fig. 9. Dos marcadores visuales en el osciloscopio indican la posición de los dos niveles de discriminación que determinan qué zona dentro del rango total de amplitudes será considerada como señal. La posición de los umbrales debe seleccionarse en forma tal que el umbral inferior sea superior a la señal debida al ruido ( $U_1$  en la Fig. 9); la posición del umbral superior ( $U_2$ ) se selecciona de acuerdo con el sistema a medir, pudiendo dejarse flotante. Conociendo el comportamiento del instrumento (corriente oscura en función de la temperatura del fototubo) y contando con un patrón cuya emisión sea conocida (los patrones radioactivos Hastings y Weber son los más empleados) se puede regular la posición de los umbrales sin emplear el osciloscopio.

II. Factores que influyen en la eficiencia de conteo. El número de fotones medidos para una muestra determinada y, en consecuencia la eficiencia de conteo, depende de la sensibilidad del fototubo, los niveles de discrimi-

minación fijados, la distancia de la muestra al fototubo, la longitud de la barra de polimetilacrilato, el área de exposición y de las características de la muestra (turbidez, espectro de la emisión, etc.). Todos estos factores deben ser tenidos en cuenta cuando se intenta calcular un rendimiento cuántico.

### 2.2.3 Contador de fotones diseñado en la Universidad de Tohoku. (Sendai, Japón).

(A este instrumento se lo identificará en este trabajo como contador IEEE Tohoku). Este contador de fotones tiene un tubo fotomultiplicador modelo HTV R 562 conectado a una fuente de poder estabilizada FLUKE 415 B, enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La salida del tubo fotomultiplicador está conectada a un contador de fotones HTV C 968. La señal de salida puede conectarse a un registrador o a una impresora e integrarse por tiempos variables entre 1 y 100 segundos. El compartimento de la muestra está termostatzado y está ubicado lo más cerca posible del tubo fotomultiplicador. El aparato tiene un juego de 25 filtros de vidrio de corte que están ubicados en un aro en el cual se alternan en 50 posiciones filtros y lugares vacíos. El aro pasa entre la cubeta y el tubo fotomultiplicador. El movimiento del aro se controla a través de un sistema electrónico que permite cambiar automática o manualmente la serie completa de filtros o una secuencia preseleccionada. La alternancia de posiciones con filtro y vacías permite obtener fácilmente lecturas de la muestra en presencia y ausencia de filtro sucesivamente. (Inaba y col., 1979).

Este aparato está preparado para trabajar con frascos de 25 mm de diámetro y 60 mm de altura y es posible termostatzarlos. Al igual que en el otro contador de fotones el burbujeo de oxígeno en el medio de reacción se emplea para oxigenar y agitar la muestra.

En los dos contadores de fotones descritos se puede medir sólo una muestra por vez. Tanto en el contador de fotones IEEE-Tohoku como en los contadores de centelleo es necesario abrir el compartimento de cubetas para agregar reactivos. En el contador de fotones Johnson Foundation al poder agregarse los reactivos desde afuera a través de cánulas de polietileno se puede seguir la cinética completa de la reacción.

## 2.3 OBTENCION Y CALCULO DE ESPECTROS

Debido a la baja intensidad de las señales con que se trabaja, los espectros se obtienen empleando filtros de corte y no espectrómetros de red,

ya que en el primer caso la relación señal:ruido es mayor en dos órdenes de magnitud. Se sacrifica así la mejor resolución espectral que daría un espectrómetro de red por la mejor relación señal:ruido. (Inaba y col., 1979).

Un filtro de corte ideal transmite el 100 % de la radiación incidente que tiene longitudes de onda mayores que un cierto valor y 0 % de la radiación que tiene longitudes de onda menores que este valor. A esta longitud de onda se la conoce como longitud de onda de corte. Dados dos filtros de corte ideales  $i$  y  $j$ , que corten a longitudes de onda  $\lambda_i$  y  $\lambda_j$  y un sistema de emisión constante (sistema ideal), la diferencia entre la emisión medida en presencia del filtro  $i$  y en presencia del filtro  $j$  es la cantidad de luz que el sistema emite en el intervalo  $(\lambda_i, \lambda_j)$ . En consecuencia usando un conjunto adecuado de filtros de corte en un sistema emisor ideal, se puede obtener (por restas) la distribución espectral de su emisión. Los sistemas emisores reales y los filtros de corte reales difieren de los ideales por lo cual al realizar los cálculos es necesario aplicar una serie de correcciones. Las principales causas de alejamiento de la idealidad son:

a) los filtros de corte reales no tienen una longitud de onda de corte neta sino un intervalo de corte (que es más chico cuanto mejor es la calidad del filtro) en el cual la transmitancia pasa de casi 0 % a 85 - 95 %. En este caso se define la longitud de onda de corte a aquella en la cual el 50 % de la radiación incidente es transmitida. Cuando se usa este tipo de filtros para obtener un espectro puede ser necesario aplicar correcciones por la forma de las bandas determinadas por los filtros empleados.

b) la sensibilidad de los fototubos depende de la longitud de onda de la radiación incidente, en consecuencia para obtener un espectro que no esté deformado por las características del tubo fotomultiplicador hay que corregir las lecturas. El factor de corrección depende de la eficiencia cuántica del tubo para cada longitud de onda. Se define la eficiencia cuántica de un fototubo como la probabilidad de que un fotón incidente haga que un electrón sea emitido hacia la parte vacía del fotocátodo. La eficiencia cuántica ( $E_c$ ) depende de la sensibilidad del fotocátodo para cada longitud de onda y de la longitud de onda según:

$$E_c = 123,95 \times E(\lambda) \times (1/\lambda) \quad (41)$$

donde:

$E(\lambda)$  está expresada en mA.W y  $(\lambda)$  en nm. Como la eficiencia cuántica representa la relación entre los fotones medidos y los incidentes no puede ser, desde un punto de vista teórico mayor que 50 %.

Para corregir el espectro por la sensibilidad del fototubo hay que normalizar la lectura de cada banda a  $E_c = 1$  (lo cual se obtiene dividiendo la emisión de cada banda por la  $E_c$  correspondiente).

c) En los sistemas biológicos, la emisión de la muestra rara vez es constante. También la corriente oscura puede variar con el tiempo. En consecuencia es necesario obtener lecturas tanto de los valores de las corrientes oscuras como de la emisión del sistema en ausencia de filtro que corresponden al momento en que se realizó la lectura con cada filtro.

Para calcular un espectro es necesario tener la lectura de la emisión en presencia del filtro, emisión control (lectura en ausencia de filtro) correspondiente a ese momento y de las corrientes oscuras correspondientes. Estas pueden obtenerse interpolando las lecturas inmediatamente anteriores y posteriores al empleo de filtro al tiempo en que se usó el filtro. La emisión que se emplea en el cálculo del espectro se obtiene restando a las lecturas de emisión (control o en presencia de filtros) las corrientes oscuras correspondientes y normalizando con respecto a la emisión control. En consecuencia, dados dos filtros de corte sucesivos i y j que cortan a las longitudes de onda  $\lambda_i$  y  $\lambda_j$  respectivamente, la emisión en la banda  $[\lambda_i, \lambda_j]$  estará dada por:

$$E_{ij} = (1/F_{ij}) \times (E_{fi} - D_i)/(C_i - D_i) - (E_{fj} - D_j)/(C_j - D_j) \times 100 \quad (42)$$

válida si la corriente oscura es igual al fondo.

En esta ecuación:

$E_{ij}$  es la emisión de la banda  $[\lambda_i, \lambda_j]$

$E_{fi}$  es la emisión de la banda media en presencia del filtro i al tiempo i (para todo tiempo  $t_i$ )

$D_i$  es la corriente oscura interpolada al tiempo  $t_i$

$C_i$  es la emisión en ausencia de filtro (control) interpolada al tiempo  $t_i$

$F_{ij}$  es un factor de corrección que tiene en cuenta las correcciones que es necesario aplicar por variaciones de sensibilidad del fototubo ( $E_c$ ) y por la forma de las bandas determinadas por los filtros empleados.

Estas definiciones valen para todo i y j.

## 2.4 CALCULO DE LOS ERRORES EN LAS BANDAS

Cada uno de los valores experimentales tiene un error de lectura asociado. Teniendo en cuenta que las emisiones para calcular  $E_{ij}$  son generalmente pequeñas, es necesario conocer el error de cada lectura y calcular el error asociado a cada banda para saber cuán significativa es.

Sabiendo que para una función  $F(x,y,z,\dots)$  la desviación típica de la función está dada por

$$\sigma = \left[ \left( \frac{\partial f}{\partial x} x \right)^2 + \left( \frac{\partial f}{\partial y} y \right)^2 + \left( \frac{\partial f}{\partial z} z \right)^2 + \dots \right]^{1/2} \quad (43)$$

(Roederer, 1973), se puede calcular el error típico de cada valor de  $E_{ij}$ . Si el número de mediciones de  $x,y,z, \dots$  es el mismo la ecuación (43) vale tanto para las desviaciones como para los errores típicos.

## 2.5 CALCULO DE LOS RENDIMIENTOS CUANTICOS

Se define rendimiento cuántico de una reacción quimioluminiscente

$$q = \frac{\text{Número de fotones emitidos}}{\text{Número de moléculas reaccionantes}} \quad (4)$$

El número de moléculas reaccionantes en una reacción quimioluminiscente se mide con técnicas clásicas adecuadas para el tipo de molécula seleccionada (polarografía, espectrofotometría, etc.). El número de fotones emitidos puede calcularse si se conoce la eficiencia de conteo del instrumento ya que por definición

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Cuentas medidas}}{\text{Fotones emitidos}} \times 100 \quad (44)$$

de donde

$$\text{Fotones emitidos} = \frac{\text{Cuentas medidas}}{\text{Eficiencia}} \times 100 \quad (45)$$

y

$$q = \frac{\text{Cuentas medidas}}{\text{Eficiencia}} \times 100 \times \frac{1}{\text{Nº de moléculas reaccionantes}} \quad (46)$$

Para medir la eficiencia de conteo son muy utilizados los patrones radioactivos, en los cuales por conocerse la velocidad de desintegración (expresadas generalmente como desintegraciones por minuto o dpm) se conoce el número de cuentas que deberían medirse si la eficiencia fuera 100 % (equiva-

lente al número de fotones emitidos). Cada desintegración equivale a 800 fotones emitidos dentro del tiempo de resolución de los instrumentos por lo que son contados como un solo pulso (Hastings y Weber, 1963).

Midiendo las cuentas en un patrón de este tipo, la eficiencia será

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Número de cuentas por minuto}}{\text{Número de desintegraciones por minuto}} \times 100 \quad (47)$$

Como la eficiencia de conteo depende de la forma de la cubeta y de la autoabsorción del sistema emisor, es imprescindible que la cubeta, volúmenes de muestra empleados, turbidez, etc. empleados para determinar la eficiencia de conteo del instrumento (con el patrón radioactivo) y el rendimiento cuántico de la muestra sean iguales.

## 2.6 PREPARACIONES BIOLÓGICAS

### 2.6.1 Homogeneizados de hígado y cerebro de rata

Los homogeneizados de hígado y cerebro de rata se obtuvieron anaeróbicamente a partir de los órganos libres de sangre. Para obtener hígados y cerebros de rata libres de sangre se perfundieron (empleando una bomba peristáltica) ratas (Wistar o Long Evans, macho, 200 - 300 g) anestesiadas con éter o pentobarbital (5 mg/kg de peso). La perfusión se realizó a través de vena porta con solución de NaCl 0,9 % saturada con nitrógeno. Una vez separado el órgano del animal todas las operaciones se realizaron a 0 - 4°C en medios saturados con nitrógeno. Los tejidos (hígado o cerebro) fueron cortados en pequeños trozos y lavados con una solución de KCl 140 mM, fosfato de potasio 5 mM, pH 7,2 - 7,4. Los trozos de tejidos suspendidos en este medio fueron homogeneizados con un homogeneizador Potter-Elvehjem y centrifugados durante 10 minutos a 750 g (con centrifuga Sorvall RC 2B refrigerada, rotor SS 25, 2000 rpm) para eliminar núcleos y restos de tejidos. El sobrenadante (homogeneizado) se mantuvo en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de ser empleado.

Las concentraciones finales de proteínas fueron de 40 - 50 mg/ml para homogeneizados de hígado y de 4 - 10 mg/ml para homogeneizados de cerebro.

### 2.6.2 Mitocondrias de hígado, corazón y cerebro de rata.

Se siguió el método de Schneider y Hogeboom (1950) modificado por Chance y Hagihara (1963). Los hígados o cerebros de rata libres de sangre fueron cortados y lavados en sacarosa 0,25 M o en manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2 - 7,4, suspendidos en 9 ml de medio por

gramo de tejido, homogeneizando con un homogeneizador Potter-Elvehjem y centrifugando a 750 g durante 10 minutos (centrífuga Sorvall refrigerada RC 2B, rotor SS 25; 2000 rpm). El sobrenadante de esta centrifugación fue vuelto a centrifugar a 7000 g (7500 rpm) durante 10 minutos y el precipitado (mitocondrias) fue lavado dos veces y resuspendido en el medio de preparación (concentración final de proteínas: 30 - 50 mg/ml). Para que el lavado sea extensivo en cada resuspensión se debe homogeneizar suavemente con la mano en homogeneizador Potter-Elvehjem.

### 2.6.3 Preparación de los animales para estudio de órgano "in situ".

I. Hígado. Se usaron ratas Long Evans macho de  $170 \pm 20$  g de peso anestesiadas con pentobarbital (5 mg/kg de peso). Los hígados se expusieron abriendo la pared abdominal y el área cuya emisión no se deseaba medir (músculo, costillas intestino, etc) fue cubierta con una superficie no emisora adecuada. De todos los materiales empleados, el papel de aluminio demostró ser el más adecuado. La superficie no cubierta por el papel de aluminio expuesta al fototubo (en un 90 - 95 % hígado) representa el área expuesta y fue medida por planimetría.

II. Músculo e intestino. La exposición de músculo se realizó separándolo de la piel y teniendo especial cuidado en que no cayeran pelos sobre la superficie a medir ya que los pelos o la suciedad que de ellos puede salir tiene una emisión especialmente alta y que depende de la iluminación que haya recibido. Los intestinos fueron expuestos abriendo la pared abdominal, cuidando que el área expuesta fuera en un 90 % o más intestino delgado. En estos casos la superficie también fue delimitada con papel de aluminio.

III. Inyección de reactivos. Los halometanos se inyectaron intraperitonealmente y desde el exterior de la caja en que se medía la emisión a través de cánulas de polietileno insertas en la cavidad abdominal del animal conectadas a una jeringa.

El diazobiciclo - 2,2,2, - octano (DABCO) se inyectó intraperitonealmente antes de la anestesia (una hora antes de la medición de quimioluminiscencia); se emplearon diferentes volúmenes de una solución de la droga (400 mM en solución fisiológica). Los animales controles fueron inyectados con igual volumen de solución fisiológica.

### 2.6.2 Semillas de soja.

I. Preparación de harina de semillas. La harina de semillas de soja se

obtuvo tratando una cantidad adecuada de semillas (cosechadas el año de los experimentos) con un desintegrador de alta velocidad (Waring Blendor CB 4) durante tres períodos de 20 segundos separados por períodos de 1 - 2 minutos de descanso para evitar recalentamientos. La harina resultante fue tamizada a través de tres capas de gasa fina para eliminar los trozos demasiado grandes y empleada inmediatamente.

II. Preparación de homogeneizados de semillas. Los homogeneizados de semillas de soja se obtuvieron suspendiendo 2,5 mg de harina recién preparada en 10 ml de solución de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0 homogeneizando con un homogeneizador Potter-Elvehjem a 0 - 4°C hasta total desintegración de los gránulos. Los homogeneizados se mantuvieron a 0 - 4°C hasta ser usados.

III. Humectación de semillas enteras. Se emplearon semillas de soja secas (10 - 12 % de humedad). Para humedecerlas se colocaron aproximadamente 60 semillas en una caja de Petri con 1 ml de agua y se las hizo rodar suavemente durante 1 minuto, escurriendo el agua sobrante.

IV. Envejecimiento acelerado de semillas. Las semillas se trataron humedeciéndolas en la forma indicada una vez cada 24 horas, dejándolas secar en los períodos intermedios a temperatura y humedad ambientes.

#### 2.7 DESTRUCCION DEL GRUPO HEMO DEL CITOCROMO-c

La destrucción del grupo hemo del citocromo-c se determinó siguiendo la desaparición de la banda Soret ( $\epsilon_{408 \text{ nm}} = 109,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 2.8 DETERMINACION DE MALONALDEHIDO. ENSAYO DEL ACIDO TIOBARBITURICO

El nivel de malonaldehido se determinó por el ensayo del ácido tiobarbitúrico (Bernheim y col., 1948). A una cantidad de muestra equivalente a 1 - 1,5 mg de proteína (llevada a volumen final de 1,5 ml con agua destilada) se le agregó igual volumen de ácido tricloroacético 20 % para precipitar las proteínas. Se centrifugó durante 5 minutos en centrífuga de mesa y se incubaron 2 ml de sobrenadante con 2 ml de solución saturada de ácido tiobarbitúrico durante 10 minutos a 100°C. Se leyó la densidad óptica de 535 nm. El nivel de malonaldehido formado se expresa en mM/mg de proteína usando el coeficiente de extinción  $\xi = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sinhuber y Lu, 1958).

#### 2.9 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA

Se determinó la actividad de glutatión peroxidasa en homogeneizados de tejidos siguiendo espectrofotométricamente la velocidad de oxidación de NADPH

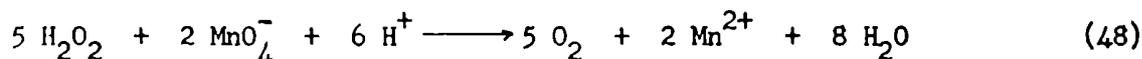
acoplada a la actividad de glutatión peroxidasa de una mezcla de reacción conteniendo 0,15 mM de NADPH, exceso de glutatión reducido, 5 mM de hidroperóxido de ter-butilo y 0,04 - 0,08 mg de proteína de homogeneizado de tejido/ml. La actividad se expresó en nmol de NADPH oxidado/minuto.mg de proteína ( $\epsilon = 6,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Pinto y Bartley, 1969; Günzler y col., 1974).

## 2.10 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas en las muestras se determinó usando la técnica del biuret en presencia de desoxicolato de sodio 0,1 % (Gornall y col., 1948) y el reactivo de Folin-Ciocalteau (Lowry y col., 1951).

## 2.11 DETERMINACION VOLUMETRICA DE LA CONCENTRACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO

A una muestra que contiene peróxido de hidrógeno (aproximadamente 10 mM) se le agrega ácido sulfúrico 1:5 y se la titula con solución de permanganato de potasio 0,1 N. La reacción que ocurre es



(Kolthoff y col., 1972).

## 2.12 SOLUCIONES

I. Citocromo-c. Se empleó citocromo-c Sigma. Se prepararon soluciones madre de citocromo-c 1 mM en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0 - 7,2. Se controló la concentración final de citocromo-c midiendo la absorbancia a 550 nm antes y después de reducir totalmente con ditionito sódico. La concentración de citocromo-c está dada por

$$\text{citocromo-c} = \Delta A / (l \cdot \epsilon) \quad \epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

donde  $\Delta A = A_{+ \text{ ditionito}} - A_{- \text{ ditionito}}$

II. Hidroperóxidos. Se prepararon soluciones madre de hidroperóxido de ter-butilo, hidroperóxido de cumeno o peróxido de hidrógeno 400 mM en agua. La concentración de peróxido de hidrógeno se controló midiendo la absorbancia a 240 nm ( $\epsilon = 0,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

III. Otras soluciones. Las soluciones de DABCO se prepararon en solución fisiológica cuando fue inyectada en ratas o en agua destilada en los demás casos. Las soluciones de lipoxigenasa, glutatión reductasa, y superóxido dismutasa se prepararon en un medio regulador de fosfato 10 mM pH 7,2 - 7,4.

Las soluciones de ácido linoleico y de 2,5-diterbutil quinol se prepararon en etanol.

El resto de las soluciones se prepararon en agua destilada.

C A P I T U L O I I I

Debido al amplio desarrollo que en los últimos años han tenido los ensayos químico y bioluminiscentes, es clara la necesidad de contar con aparatos para medir fotones que sean adecuados y confiables. Si bien existen instrumentos comerciales, muchos investigadores diseñan los propios, lo cual hace muchas veces difícil la comparación de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación. El acceso a diferentes contadores de fotones y de centelleo nos ha permitido comparar sus rendimientos empleando sistemas fotoemisores de emisión constante o variable en el tiempo.

### 3.1. COMPARACION DE DISTINTOS CONTADORES DE FOTONES

Los contadores de fotones permiten termostatar la muestra y burbujear gases en ella; esto no puede hacerse en un contador de centelleo. Todos los aparatos, salvo el contador Johnson Foundation emplean frascos de 25 mm de diámetro por 60 mm de altura. El contador de fotones Johnson Foundation permite medir en cubetas de cara plana (usualmente de 4 cm x 4 cm) y órganos expuestos de animales.

En la Tabla I se comparan las condiciones de operación de dos contadores de fotones y tres contadores de centelleo. Las variables que se consideran son: temperatura de trabajo de los tubos fotomultiplicadores, fondos, medidos en cps (cuentas por segundo); se define el fondo como la suma de la corriente oscura y la luz espúrea, (sección 2.1.2 - IV); emisiones leídas para un sistema de emisión constante (semillas de soja), eficiencia relativa de conteo (definida como el cociente entre señal y fondo) e índice de mérito (definido como el cociente entre el cuadrado de la señal y el fondo).

El fondo depende de las características de cada fototubo aumentando cuanto mayores son la sensibilidad a longitudes de onda altas, la temperatura de trabajo, el área del fotocátodo y las horas de uso del fototubo. Los fototubos de los contadores de fotones IEEE-Tohoku y Johnson Foundation tienen áreas grandes (del orden de 20 cm<sup>2</sup>) y ambos fototubos tienen sensibilidad extendida en el rojo; estos factores determinan corrientes oscuras altas. El fototubo del contador IEEE-Tohoku tiene más horas de uso que el del contador Johnson Foundation lo cual justificaría los valores mayores de su corriente oscura. La gran variedad en los valores de corrientes oscuras en los contadores de centelleo son consecuencia de las diferentes temperaturas de operación y de los tiempos de uso de los fototubos (agotamiento).

Cuando se trabaja en sistemas de baja intensidad, para optimizar la con-

Tabla I

Aparato	Temperatura de trabajo del fototubo	Fondo (cps)	Señal (a) (cps)	$\frac{\text{Señal}}{\text{Fondo}}$	$\frac{\text{Señal}^2}{\text{Fondo}}$
Contador de fotones Johnson Foundation	- 20°C	150 ± 12	125 ± 25 (7)	0,83	104
Contador de fotones IEEE-Tohoku	- 20°C	280 ± 17	32 ± 6 (5)	0,11	3,6
Contador de centelleo Beckman LS 100	T.ambiente	250 ± 16	64 ± 10 (5)	0,26	16
Contador de centelleo Nuclear Chicago	10°C	20 ± 4	29 ± 5 (5)	1,5	42
Contador de centelleo Packard 3320	T.ambiente	35 ± 6	35 ± 5 (5)	1	35

TABLA I. Comparación de las condiciones de trabajo y eficiencias de conteo de cinco aparatos diferentes usando como sistema emisor semillas de soja.

(a) - señal = emisión total - corriente oscura

Los datos son  $\bar{x} \pm \text{ESM}$ ; los números entre paréntesis indican el número de muestras diferentes.

fiabilidad de la lectura se deberá seleccionar un instrumento en el cual la relación señal<sup>2</sup>/fondo sea máxima;

Desde este punto de vista y de acuerdo con la Tabla I, el orden decreciente de confiabilidad de la lectura es: contador de fotones Johnson Foundation, contadores de centelleo (Nuclear Chicago, Packard 3320, Beckman LS 100) y contador de fotones IEEE-Tohoku. La calidad de la lectura en los tres contadores de centelleo puede considerarse equivalente. Pese a la baja relación señal<sup>2</sup>/fondo del

contador de fotones IEEE-Tohoku para emisiones de muy baja intensidad, su diseño especial para obtener análisis espectrales y su muy buen sistema de cambio de filtros además de la posibilidad de termostatar y oxigenar la muestra lo convierte en un aparato adecuado para sistemas de mayores emisiones (fracciones subcelulares, etc.). El contador de fotones Johnson Foundation además de ser el que da lecturas más confiables, es versátil: puede usarse para cualquier tipo de muestra y permite obtener espectros de emisión con relativa facilidad. Es importante además tener en cuenta que su costo es relativamente bajo. Su principal inconveniente es que por la gran área del fototubo (de alta sensibilidad en el rojo), es muy fácil inestabilizarlo por iluminación accidental, aún con el voltaje apagado. Tanto este contador como el IEEE-Tohoku son sumamente sensibles a temperatura y humedad ambientes altas.

El uso de contadores de centelleo para medir reacciones quimioluminiscentes trae aparejada ventajas y desventajas con respecto al uso de contadores de fotones de diseño más específico. Un contador de centelleo es accesible en la mayoría de los laboratorios, lo cual elimina la exclusividad de este tipo de mediciones para aquellos laboratorios con equipos especializados. En un contador de centelleo se pueden medir simultáneamente varias reacciones, gracias a su sistema de cambio automático de muestras. Estos aparatos tienen además una relación señal<sup>2</sup>/fondo favorable (Tabla I). La principal desventaja reside en la dificultad de controlar el aporte de oxígeno y la temperatura de la muestra (agravado en los casos en los que el compartimento de cubetas también es refrigerado). Estos factores influyen decisivamente en la emisión medida, limitando seriamente en algunos casos las posibilidades de trabajo.

### 3.2 EFECTO DE VARIABLES GEOMETRICAS SOBRE LAS EMISIONES MEDIDAS

Las medidas de quimioluminiscencia de baja intensidad dependen de las características geométricas de los compartimentos de muestra. En el contador de fotones Johnson Foundation, además de las variaciones debidas a volumen de la muestra, la distancia de la muestra al fototubo y las áreas expuestas pueden variarse con mayor facilidad que en los demás instrumentos.

#### 3.2.1 Dependencia de la emisión medida con la distancia al tubo fotomultiplicador.

En el contador de fotones Johnson Foundation la muestra está separada del tubo fotomultiplicador por una barra de polimetilacrilato. Tanto su longitud como su distancia a la muestra o al fototubo afectan las lecturas. En ausen-

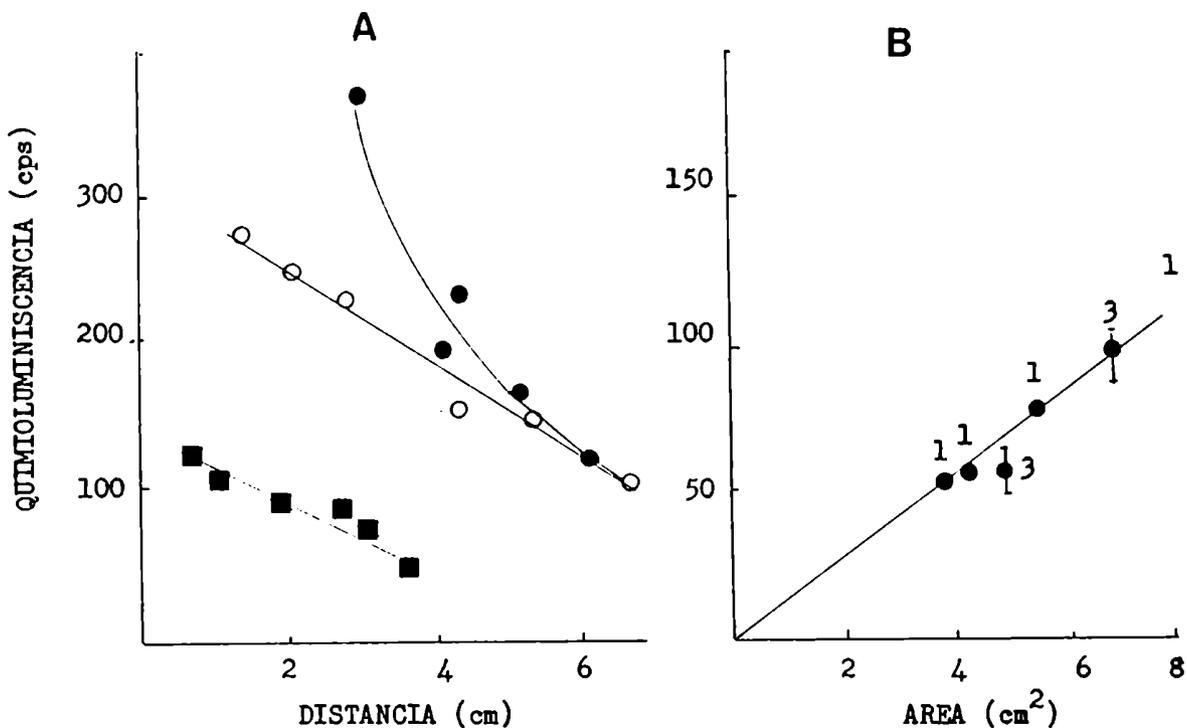


Fig. 10. A - Dependencia de la emisión leída para un emisor radioactivo con la distancia al tubo fotomultiplicador (●) y a una barra de polimetilacrilato de 5 cm de longitud (○). Dependencia de la emisión de semillas de soja con la distancia a una barra de polimetilacrilato de 10 cm de longitud (■).

B - Dependencia de la emisión espontánea de hígado de rata "in situ" con el área expuesta (distancia a la barra de polimetilacrilato = 1 cm). Los números indican el número de animales con que se obtuvo cada punto. Los valores graficados con  $\bar{x} \pm \text{ESM}$ . Se usaron ratas de 200 - 300 gramos.

cia de la barra de polimetacrilato la emisión de una muestra radioactiva de pequeño volumen, que puede considerarse puntual con respecto al área del tubo fotomultiplicador, que es de 20 cm<sup>2</sup>, da una lectura que siminuye con la distancia al fototubo, siendo muy marcada la disminución en el primer centímetro (fig. 10-A).

La misma dependencia se observa en presencia de una barra de polimetilacrilato de 5 cm de longitud (en este caso la distancia se mide con respecto a la barra). En ambos casos la emisión obtenida extrapolando a distancia cero (al tubo fotomultiplicador en el primer caso y a la superficie de la barra en el segundo) da un valor de 650 cps, lo cual indica que el porcentaje de luz que se pierde por la absorción en la barra está dentro del error de lectura. En el caso de una fuente extensa de área semejante al área del fototubo (una cubeta de 4 x 8 cm con semillas de soja) la emisión medida decae menos marcadamente al aumentar la distancia a la barra. (Fig. 10 - A). Esto es esperado porque a iguales distancias de la fuente al tubo fotomultiplicador, el ángulo sólido de emisión detectado por el fototubo, y en consecuencia la lectura, es mayor cuanto más extensa sea la fuente. Esta dependencia entre la emisión detectada y la distancia a la barra de polimetilacrilato deben ser tenidas en cuenta cuando se mide la emisión de órganos "in situ", sistema en el cual las variaciones de la distancia entre la fuente y el fototubo en las distintas muestras son marcadas.

### 3.2.. Dependencia de la emisión con el área expuesta.

La emisión detectada para una distancia fija de la muestra a la barra de polimetilacrilato es función lineal del área expuesta (Fig. 10 - B, obtenida para la emisión de hígado de rata "in situ"). En consecuencia es necesario expresar los resultados en cuentas/segundo.cm<sup>2</sup>, siendo óptimo normalizarlas a una distancia determinada al fototubo. Esta corrección se hace indispensable cuando se trabaja con órganos ya que la ubicación del animal frente al fototubo y el área expuesta depende de las características anatómicas propias de cada animal (tamaño del hígado, altura de las costillas, etc.). En el caso de trabajar con cubetas, empleando un volumen constante, dado que la ubicación del portacubetas es fija, los parámetros geométricos no difieren de una muestra a otra. Para el cálculo de rendimientos cuánticos es necesario que las condiciones geométricas en que se miden el patrón y la muestra sean iguales.

## 3.3 REPRODUCTIBILIDAD DE RESULTADOS EN DIFERENTES INSTRUMENTOS.

### 3.3.1 Cinéticas.

Las cinéticas de sistemas líquidos son variadas y generalmente complejas (como se observa en las figuras 11 y 12 obtenidas para homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidropéroxido de ter-butilo 5 mM en medio oxigenado y homogeneizado de cerebro de rata en presencia de oxígeno respectivamente). En el primer caso la cinética de la fotoemisión es compleja; la curva

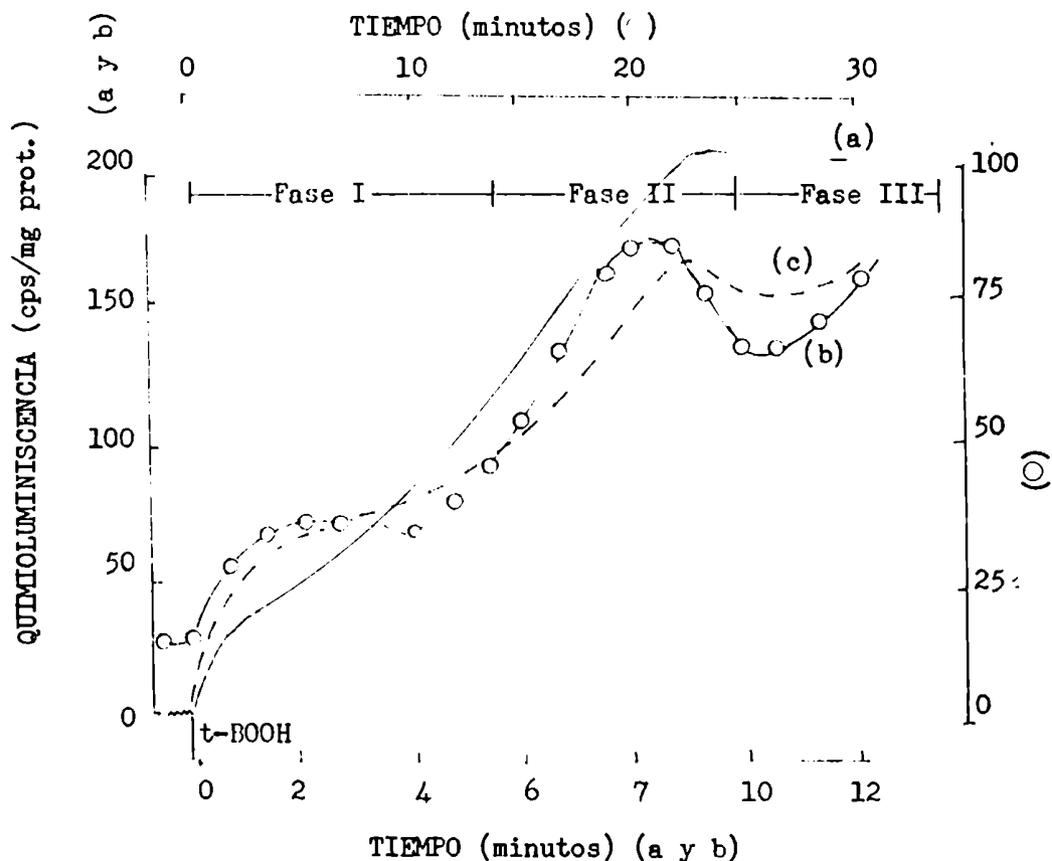


Fig. 11. Cinética de la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de oxígeno y de hidroperóxido de ter-butilo 5 mM, medida en (a) un contador de fotones Johnson Foundation (los homogenados fueron preparados anaeróbicamente); (b) un contador de centelleo Beckman LS 100 (los homogenados fueron preparados aeróbicamente); y (c) un contador de fotones IEEE-Tohoku (los homogenados fueron preparados aeróbicamente).

presenta tres fases características (fig. 11). Si bien en todos los instrumentos de medida y cualquiera sea la condición en que se ha preparado el homogeneizado se observan estas tres fases, hay diferencias en las duraciones y tiempos de aparición de cada una de ellas. La duración de cada fase es función de la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción (Fig. 14 B) y es necesario recordar que cada aparato tiene una temperatura de trabajo diferente (Tabla I). Las diferencias observadas en el desarrollo cinético de la reacción en la Fig.

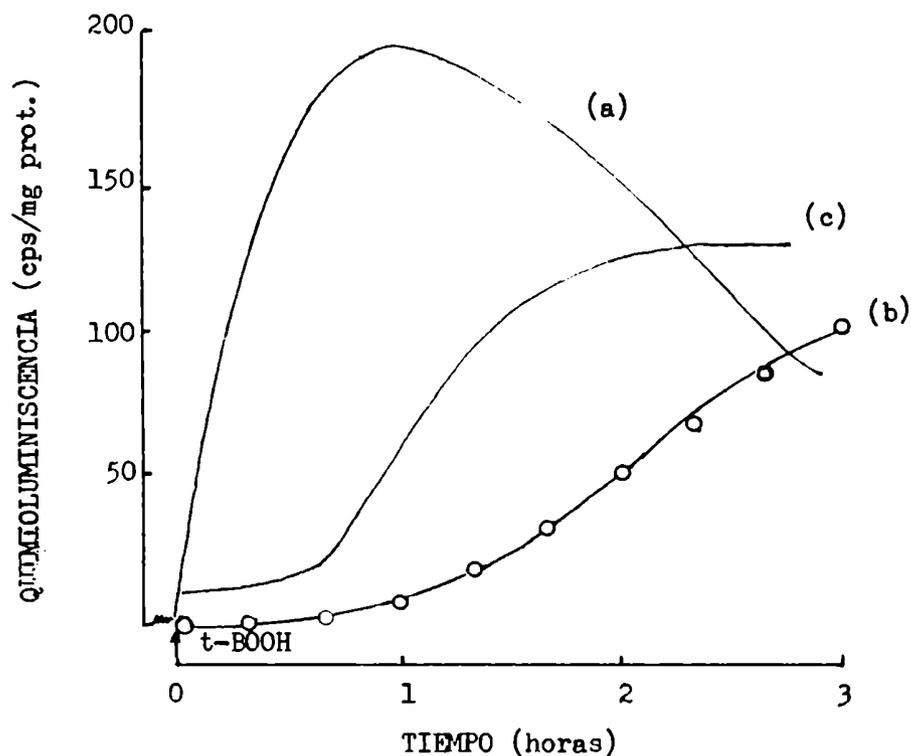


Fig. 12. Cinética de la emisión de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno medida en (a) un contador de fotones Johnson Foundation (a 37°C; los homogeneizados fueron preparados anaeróbicamente); (b) en un contador de centelleo Beckman LS 100 (a 28°C; los homogeneizados fueron preparados aeróbicamente) y (c) un contador de fotones IEEE-Tohoku (a 37°C; los homogeneizados fueron preparados aeróbicamente).

ll (a y b) han sido reproducidas en un contador de fotones IEEE-Tohoku modificando solamente la temperatura a la que se desarrolló la reacción. El tiempo necesario para alcanzar el máximo de emisión es mayor de 60 minutos en el contador de centelleo Beckman LS 100 (a 28°C) y de 45 - 50 minutos en el contador de fotones IEEE-Tohoku (a 28°C) (Fig. 14 C).

En el caso de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno la cinética es más simple. (Fig. 12). Se sabe que si el homogeneizado ha sido preparado en atmósfera de nitrógeno, oxigenando y aumentando la temperatura aumenta la emisión alcanzando un máximo a los 50 - 60 minutos de iniciada la

reacción (Fig. 12, a). Si el homogeneizado ha sido preparado en atmósfera de aire al suplementar con oxígeno o aire y calentar hay una fase de retraso de 10 - 15 minutos, alcanzándose el máximo de emisión entre 120 y 180 minutos de iniciada la reacción. Esto se ha obtenido en un contador de centelleo Beckman LS 100 y en un contador de fotones IEEE-Tohoku (Fig. 12 b y c) a 28°C y 37°C respectivamente.

Se ha hallado en todos los aparatos empleados una buena reproductibilidad de las cinéticas de emisión.

### 3.3.2 Comparación de las eficiencias de conteo.

Los rendimientos y la distribución espectral de la emisión de citocromo-c en presencia de hidroperóxido han sido estudiados por Cadenas y col., (1980 a y b), siendo un sistema adecuado para comparar las eficiencias de conteo de diversos instrumentos. En la Tabla II se comparan las emisiones máximas medidas para la reacción de citocromo-c con hidroperóxido de cumeno (CuOOH), hidroperóxido de ter-butilo (t-BOOH) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en un contador de centelleo (Nuclear Chicago) y en un contador de fotones (Johnson Foundation).

Según la Tabla II la relación entre la emisión medida en el contador de fotones Johnson Foundation y en el contador de centelleo no es la misma para cada peróxido. Esta relación es de 29 usando hidroperóxido de ter-butilo, 16 usando hidroperóxido de cumeno y 5 usando peróxido de hidrógeno. Se sabe que la disminución espectral de la emisión de citocromo-c en presencia de peróxido de hidrógeno y de hidroperóxido de ter-butilo no es la misma: en el primer caso hay un máximo de emisión a 660 - 680 nm y en el segundo a 600 nm decayendo para longitudes de onda mayores (Cadenas y col., 1980 b). En consecuencia, el porcentaje de la emisión total que se encuentra en la zona donde es mayor la diferencia de sensibilidad de los tubos fotomultiplicadores de ambos instrumentos (longitud de onda mayor que 600 nm; Fig. 6) es diferente en ambos casos. El tubo fotomultiplicador del contador de fotones Johnson Foundation tiene mayor sensibilidad en el rojo, por lo que contará con mayor eficiencia que otros tubos, emisiones de longitudes de onda altas. Se esperarían para este instrumento mayores rendimientos relativos en presencia de hidroperóxido de ter-butilo, que en presencia de peróxido de hidrógeno, que es lo que se observa en la Tabla II.

En la Tabla III se comparan las emisiones máximas medidas para la reacción de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidroperóxido de

TABLA II

APARATO	P E R O X I D O		
	t-ROOH 5 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 mM	CuOOH 5 mM
Contador de centelleo Nuclear Chicago	56-80	3.300	210
Contador de fotones Johnson Foundation (●)	2.000	10500-17000*	3.300

Tabla II. Emisión luminosa de citocromo-c 15 mM en fosfato de potasio 100 mM pH 7,2 en presencia de los hidroperóxidos indicados. Comparación de las lecturas máximas obtenidas en un contador de centelleo Nuclear Chicago y un contador de fotones Johnson Foundation. Los números indican emisiones en cuentas por segundo. (●) de Cadenas y col., 1980, b. (\*) la selección de los umbrales de trabajo puede modificar las lecturas.

ter-butilo en medio oxigenado y homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno para tres aparatos: contador de fotones Johnson Foundation, contador de centelleo Beckman LS 100 y contador de fotones IEEE-Tohoku. Este es el orden en que disminuye la eficiencia con que detectan la emisión y coincide con el de eficiencias de conteo mencionado en la Tabla I.

La emisión máxima detectada por el contador de fotones Johnson Foundation para homogeneizados de cerebro es de 1,7 veces mayor que la detectada por el contador IEEE-Tohoku; esta relación es de 2,5 veces para homogeneizados de hígado en presencia de hidroperóxido de ter-butilo en medio oxigenado y de 3,7 veces para semillas de soja (Tabla I). En estos sistemas complejos, las diferencias en la forma de la cubeta y la turbidez de la muestra pueden ser factores decisivos en la eficiencia del conteo. La cubeta del contador de fotones Johnson Foundation tiene una superficie de exposición mayor y una geometría más simple (la cubeta es de sección rectangular con una cara paralela a la superficie del

TABLA III

Aparato	Homogeneizados de cerebro de rata suplementados con O <sub>2</sub>	Homogeneizados de hígado de rata suplementados con O <sub>2</sub> y t-BOOH 3 mM
Contador de fotones Johnson Foundation	4300 ± 400 (5)	2190 ± 30 (6)
Contador de fotones IEEE-Tohoku	2500 ± 200 (3)	870 ± 50 (2)
Contador de centelleo Beckman LS 100	3200 ± 200 (3)	870 ± 50 (3)

Tabla III. Emisiones máximas de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno y de hígado de rata en presencia de oxígeno y de hidroperóxido de ter-butilo 3 mM. Comparación de las lecturas máximas obtenidas con tres aparatos diferentes. Los datos son  $\bar{x} \pm$  ESM. Los números entre paréntesis indican el número de muestras diferentes.

fototubo; el contador IEEE-Tohoku tiene una cubeta cilíndrica. En consecuencia el contador de fotones Johnson Foundation debería ser menos sensible a las variaciones en turbidez de la muestra que es lo que efectivamente ocurre (la relación de emisión de soja a homogeneizados de hígado a homogeneizados de cerebro es de 1 : 17 : 34 para el contador Johnson Foundation y de 1 : 27 : 78 para el contador IEEE-Tohoku disminuyendo la turbidez de la muestra en ese sentido). También las diferentes distribuciones espectrales de estas emisiones influyen sobre las eficiencias de conteo.

### 3.3.3 Análisis espectral.

El análisis espectral de la emisión de los sistemas quimioluminiscentes puede dar información muy importante sobre las especies fotoemisivas si se tie-

nen espectros confiables (Seliger, 1978). Por la forma en que se calculan los espectros (Sección 2.3 pág. 33) pequeños errores de medición pueden ser significativos en el espectro definitivo, habiendo una solución de compromiso entre la resolución espectral deseada y la confiabilidad de la medida de cada banda. En un sistema de semillas de soja, en el cual la emisión medida en el contador de fotones Johnson Foundation es del orden de  $150 \pm 6$  cps ( $\bar{x} \pm \text{EMS}$ ), el empleo de 15 filtros (es decir 13 bandas), suponiendo una emisión blanca daría una emisión aproximada de 10 cps/banda. El error de medida (como ESM) es de aproximadamente 6 cps. Como el error de la banda es la combinación de los errores de cuatro medidas (emisión control, emisión en presencia de filtro y corriente oscura en ambos casos; ecuaciones 42 y 43) un espectro obtenido en estas condiciones no sería estadísticamente significativo. Para hacerlo significativo habría que disminuir los ruidos electrónicos perfeccionando el aparato. Ocho filtros darían la posibilidad de obtener un espectro relativamente confiable, ya que éste tendría 6 bandas con un promedio de 25 cps/banda, suponiendo luz blanca. En este caso un error de 6 cps en la medida de cada banda es porcentualmente menor. Para sistemas de mayor emisión como homogeneizados de cerebro o de hígado se pueden emplear más filtros siempre que se tenga en cuenta que es preferible sacrificar definición ante confiabilidad de la lectura.

La Fig. 13 permite comparar la distribución espectral de la emisión luminosa de homogeneizados de cerebro de rata suplementados con oxígeno obtenidos en dos contadores de fotones: IEEE-Tohoku y Johnson Foundation. En ambos casos la emisión es una banda muy ancha (125 nm de semiancho de banda) centrada en 600 nm con poca resolución. En ambos casos se observan picos anchos centrados en 520 - 530, 575 y 640 y un hombro de 470 nm. Dado el tipo de espectro la resolución que da la técnica empleada es buena y los espectros obtenidos con ambos instrumentos concuerdan (dentro del error experimental).

### 3.4 FACTORES FISICOS Y QUIMICOS QUE INFLUYEN EN LA EMISION

#### 3.4.1 Temperatura.

La emisión luminosa en sistemas biológicos es consecuencia de reacciones de radicales en cadena (Boveris y col., 1980). La velocidad de estas reacciones depende marcadamente de la temperatura del sistema.

La dependencia con la temperatura de la emisión de homogeneizados de hígado de rata o de citocromo c en presencia de hidroperóxido de ter-butilo

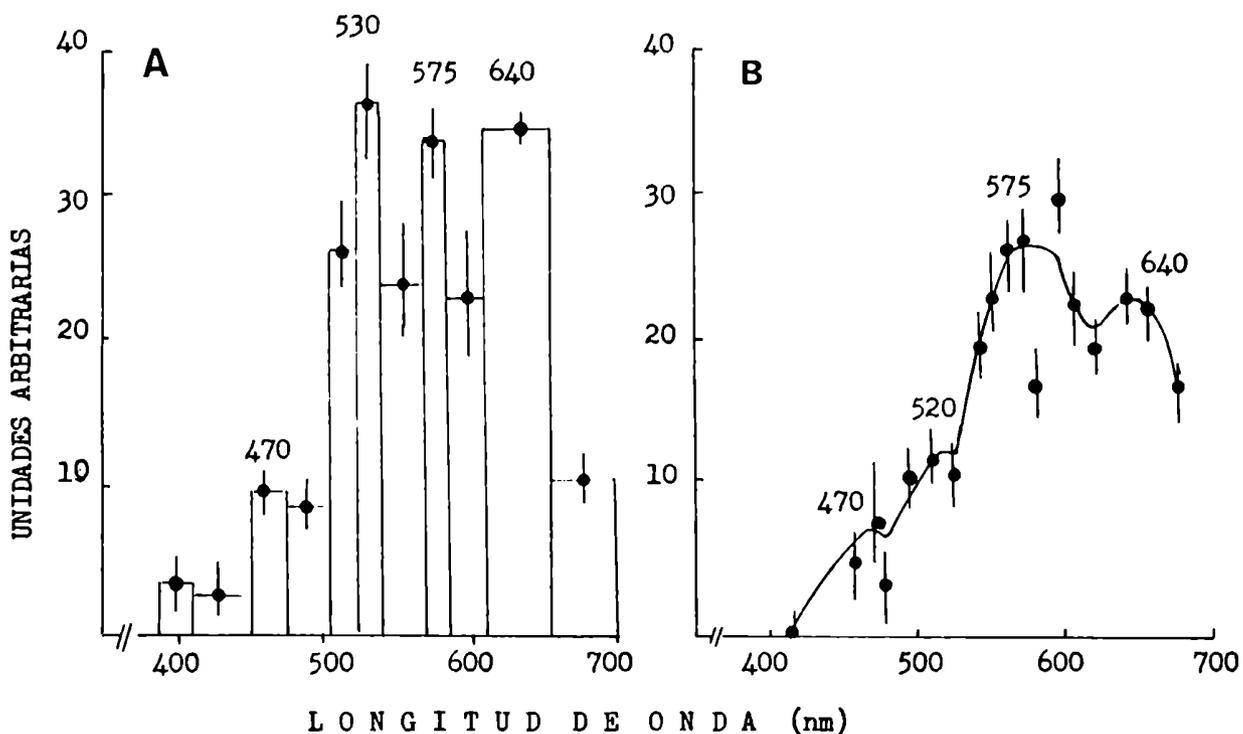


Fig. 13. Distribución espectral de la emisión de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno obtenida en un contador de fotones Johnson Foundation (A) y en un contador de fotones IEEE-Tohoku (B).

en medios oxigenados responde en ambos casos al mismo esquema: cuanto mayor es la temperatura mayor es la emisión máxima obtenida y menor es el tiempo en que este máximo es alcanzado (Fig. 14). Si bien en el caso de cinéticas más complejas como las de homogeneizados de hígado de rata con hidroperóxido de *ter*-butilo no aparecen fases nuevas, la aparición de las diferentes fases es menos nítida a temperaturas bajas. Sistemas como semillas de soja y lipoxigenasa con ácido linoleico también responden a este esquema (Fig. 45). En consecuencia una mala termostatación de la muestra (que es un error factible y difícil de controlar cuando se trabaja con contadores de centelleo) puede introducir alteraciones en los resultados.

#### 3.4.2 Concentraciones de reactivos.

Las emisiones luminosas de sistemas como homogeneizados de órganos,

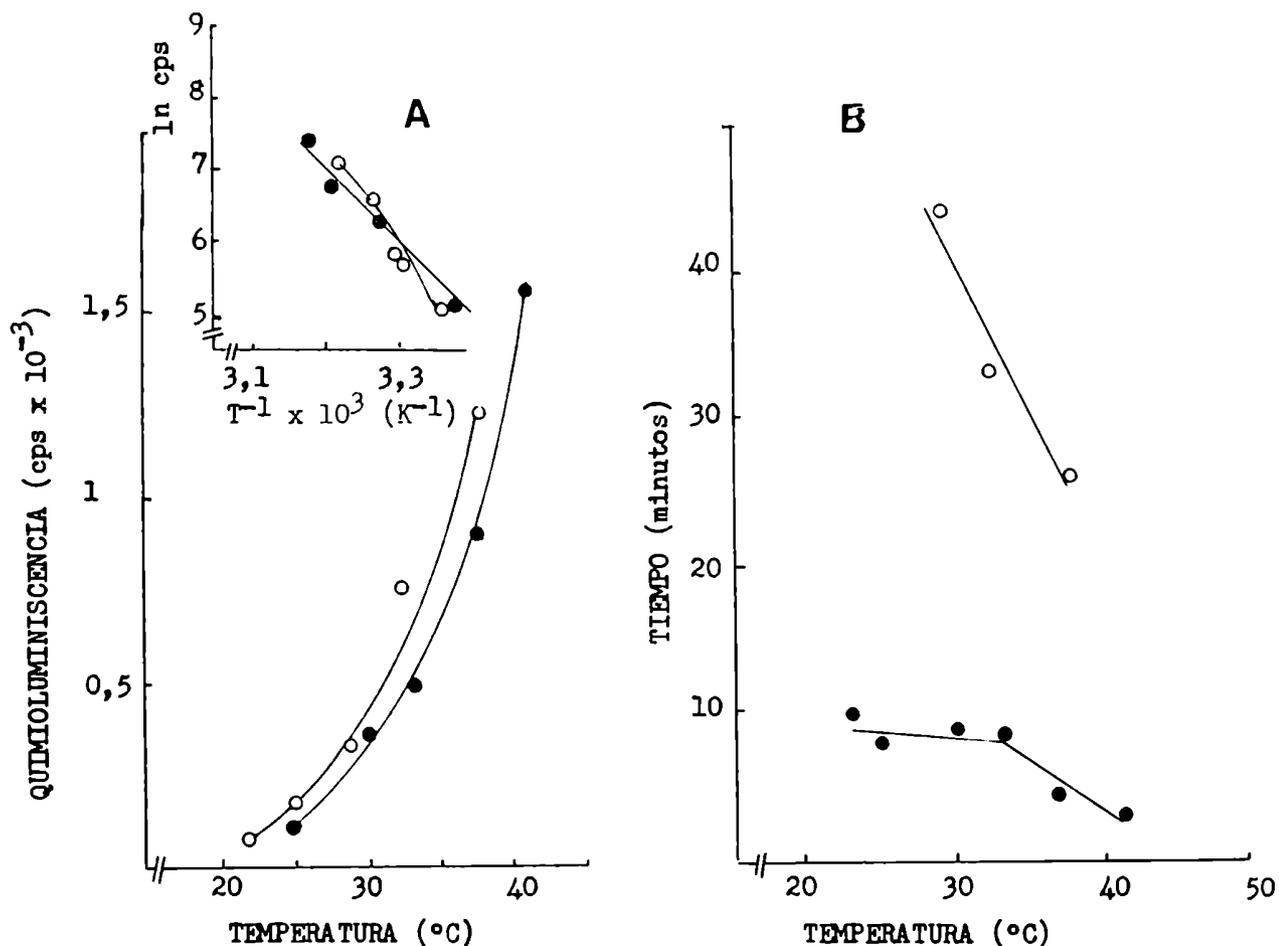


Fig. 14. A - Dependencia de la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de oxígeno e hidropéroxido de ter-butilo 5 mM (○) y de citocromo-c en presencia de hidropéroxido de ter-butilo 5 mM (●) con la temperatura y diagramas de Arrhenius correspondientes.

B - Dependencia del tiempo en que la emisión máxima es alcanzada, con la temperatura.

fracciones subcelulares o hemoproteínas suplementados con hidropéroxidos muestran siempre una dependencia lineal con respecto a la concentración de proteínas y saturante con respecto a la concentración de hidropéroxido. En algunos sistemas que forman suspensiones turbias pueden observarse alejamiento de la linealidad por absorción o dispersión de la luz emitida por las capas superficiales.

Para un sistema transparente pero coloreado (citocromo-c en presencia de hidropéroxidos) la emisión depende linealmente de la concentración de

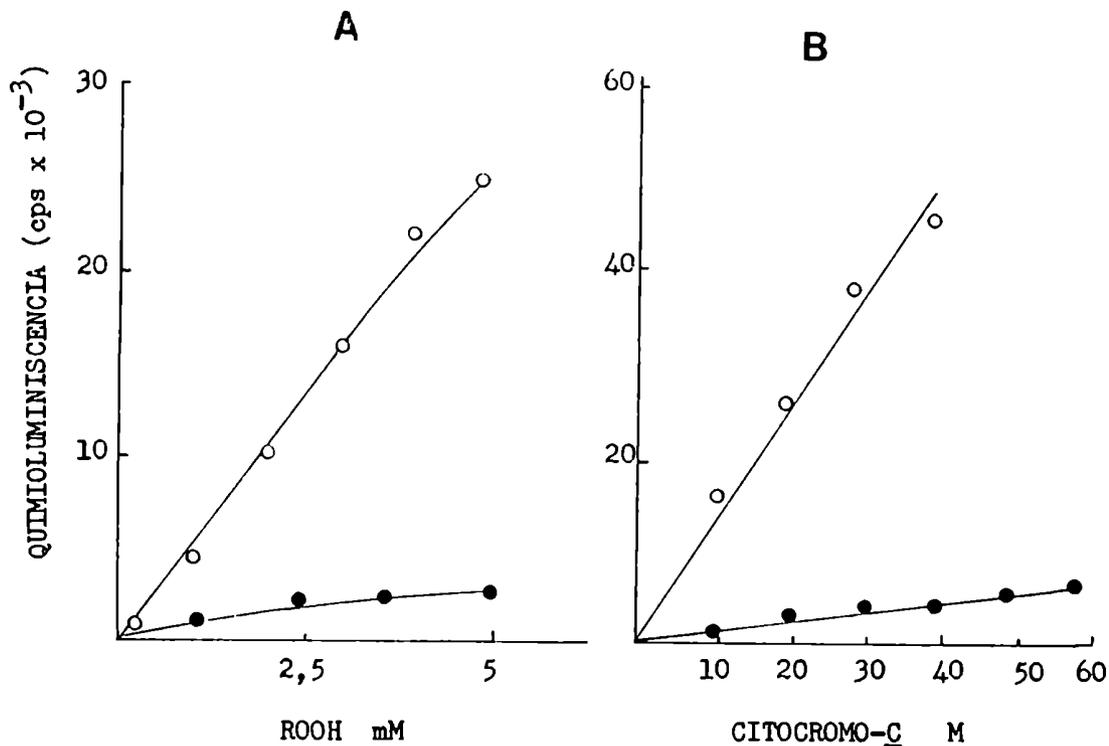


Fig. 15. Emisión de citocromo-c suplementado con peróxido de hidrógeno (○) o con hidroperóxido de ter-butilo (●).

A - Dependencia con la concentración del hidroperóxido ( [citocromo-c] = 15 μM)

B - Dependencia con la concentración de citocromo-c ( [hidroperóxido] = 5 mM)

la hemoproteína y satura con la concentración del hidroperóxido (Fig. 15). En un sistema transparente y donde la luminiscencia es producto lateral de una reacción enzimática como lipoxigenasa suplementada con su sustrato (ácido linoleico) (Boveris y col., 1980 b) se observa alejamiento del comportamiento enzimático clásico (linealidad con la concentración de enzima y saturante respecto del sustrato (Fig. 16).

En sistemas más turbios y capaces de dispersar la luz como mitocondrias de hígado de rata suplementadas con hidroperóxido de ter-butilo, se observa inhibición de la emisión a concentraciones de proteínas mayores que 3,5 mg/ml (Fig. 17 A). Esto no se observa tan nítidamente en homogeneizados de hígado de rata (que no son suspensiones homogéneas de partículas de tamaño semejante

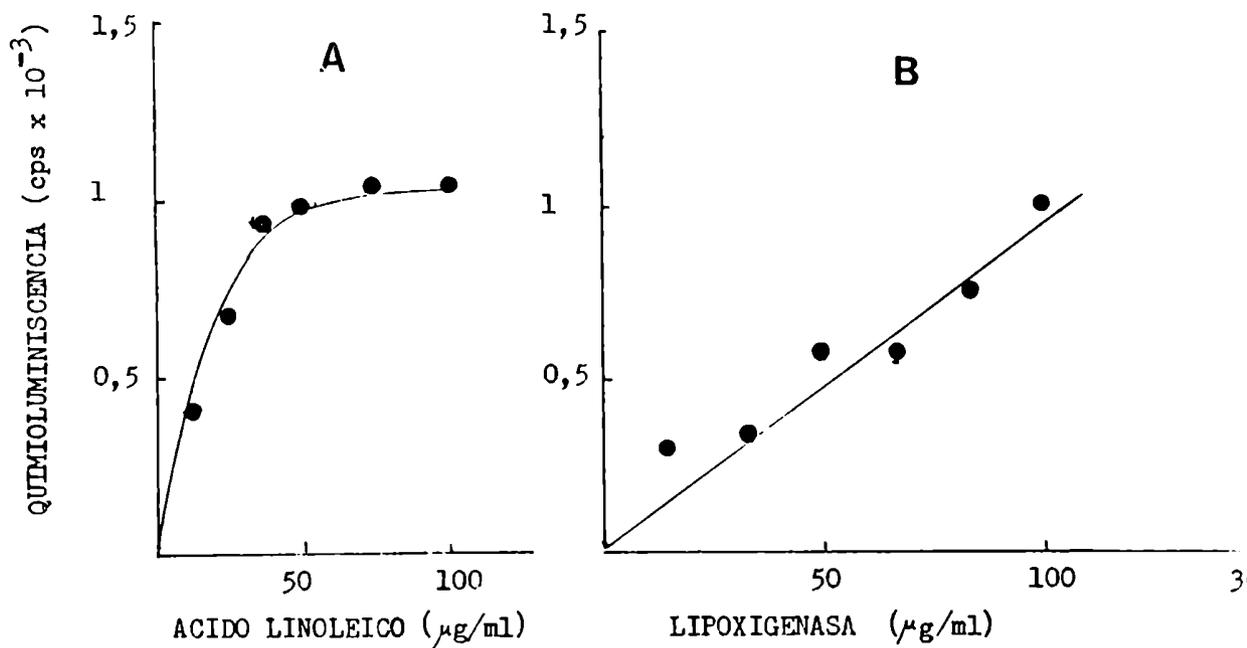


Fig. 16. Emisión que acompaña a la reacción de la lipoxigenasa suplementada con ácido linoleico.

A - Dependencia con la concentración de ácido linoleico (100 µg/ml de lipoxigenasa).

B - Dependencia de la concentración de lipoxigenasa (50 µg/ml de ácido linoleico).

como las suspensiones mitocondriales) ni en los homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno (que son medios relativamente transparentes; (Fig. 17 A). La emisión de mitocondrias (mg proteínas/ml) y homogeneizados de hígado de rata (mg proteína/ml) suplementadas con hidroperóxido de ter-butilo saturan con la concentración de hidroperóxido (Fig. 17 B). La emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidroperóxido de ter-butilo presenta tres fases características (Fig. 11). La emisión máxima de cada fase satura en todas ellas con la misma concentración de peróxido (4 mM) siendo este comportamiento reproducible en un contador de centelleo Beckman LS 100 y en un contador de fotones Johnson Foundation (Fig. 18). Los homogeneizados de cerebro de rata en presencia de hidroperóxido de ter-butilo tienen un comportamiento anómalo (Fig. 17 B).

El hidroperóxido produce algunas alteraciones respecto de la cinética de emisión en presencia de oxígeno (disminuye el tiempo en que el máximo es alcanzado) e inhibe la fotoemisión a concentraciones mayores que 2,5 mM, activando

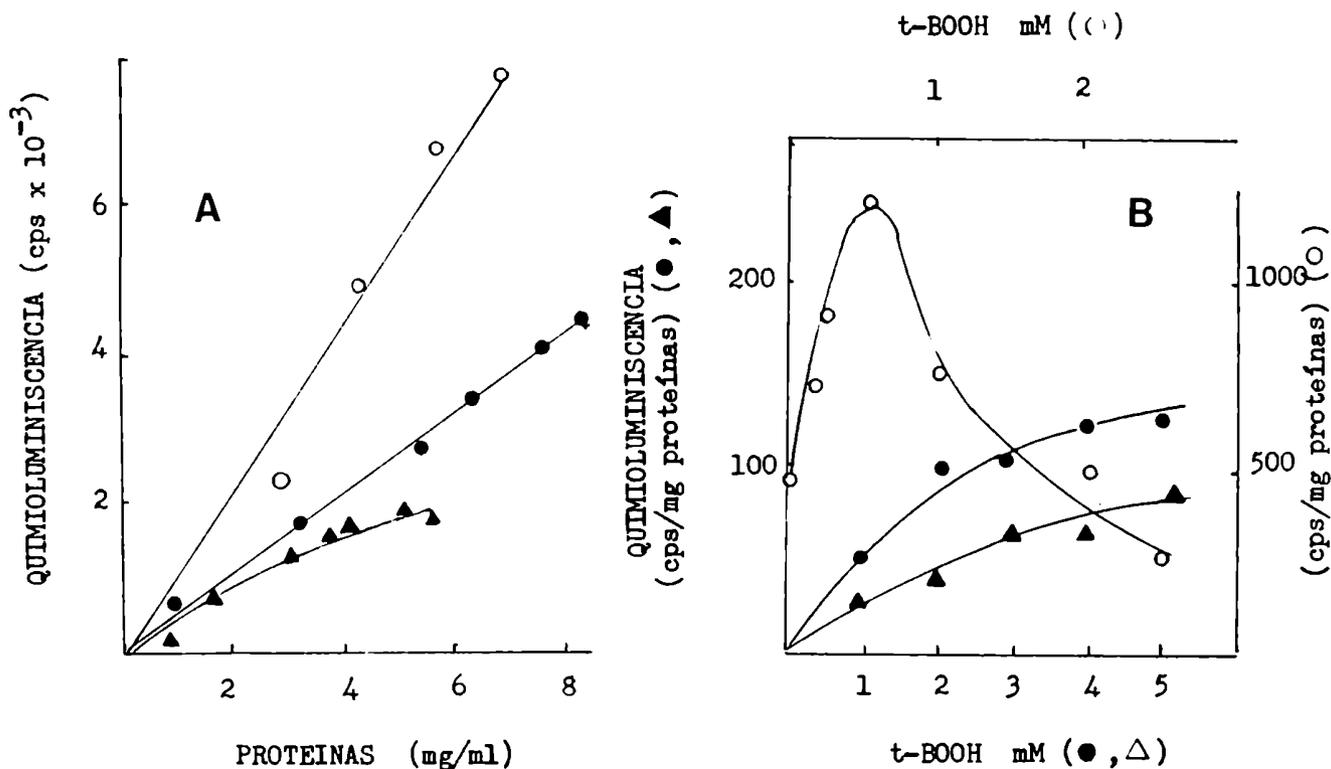


Fig. 17. Emisión de homogeneizados de cerebro de rata (○), mitocondrias de hígado de rata (▲) y homogeneizados de hígado de rata (●) en presencia de hidróperóxido de ter-butilo.

A - Dependencia con la concentración de proteína (5 mM de hidróperóxido para los homogeneizados y mitocondrias de hígado de rata y 1 mM para homogeneizados de cerebro de rata).

B - Dependencia con la concentración de hidróperóxido (5 mg proteína/ml para todos los casos).

En todas las mediciones el volumen final fue de 4 ml.

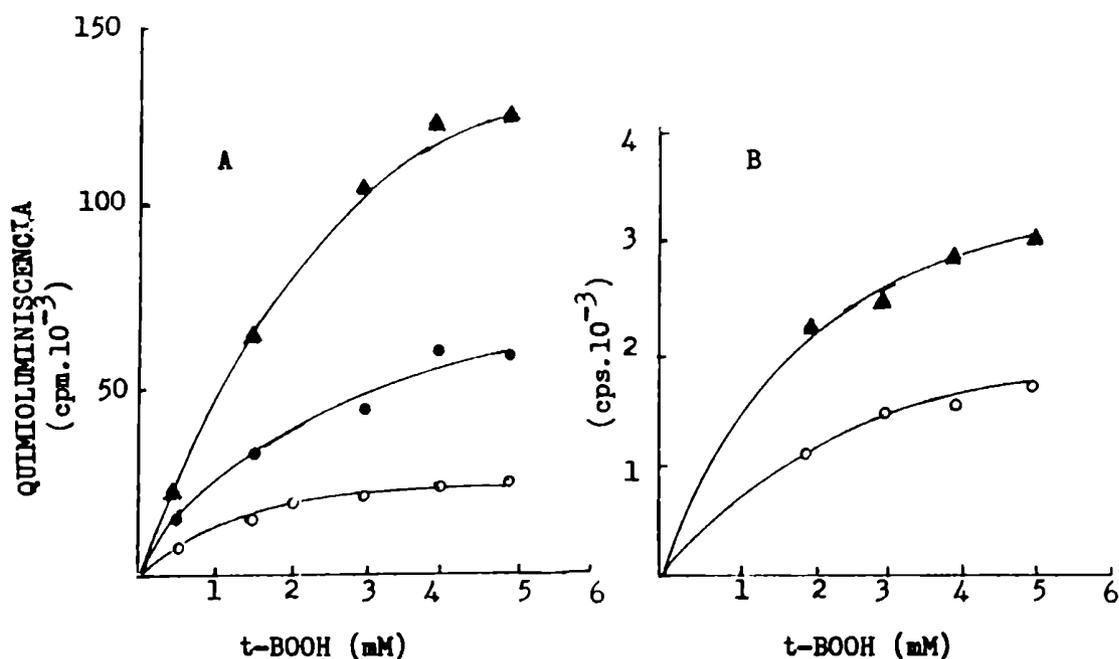


Fig. 18. Dependencia con la concentración del hidropéroxido de los valores máximos de quimioluminiscencia para cada una de las tres fases que caracterizan la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de ter-butilo. Los datos fueron obtenidos en un contador de centelleo Beckman LS 100 a 28°C (A), y a 37°C (B) en un contador de fotones Johnson Foundation. (▲) primera fase; (●) segunda fase; (○) tercera fase.

a concentraciones menores con un efecto máximo a 0,4 mM de hidropéroxido.

### 3.4.3 Concentraciones de oxígeno.

La emisión luminosa de todos los sistemas estudiados depende marcadamente de la concentración de oxígeno del medio. Los homogeneizados de cerebro de rata en ausencia de oxígeno no emiten fotones; tampoco los homogeneizados de hígado de rata mantenidos en anaerobiosis responden a un estímulo de hidropéroxido de ter-butilo 5 mM (Fig. 19). De la misma manera, cuando una reacción de homogeneizados de hígado de rata con hidropéroxido de ter-butilo se ha iniciado en un medio oxigenado, el cambio del oxígeno del medio por nitrógeno produce una inhibición en la emisión que es menos importante cuanto mayor es el tiempo que se ha dejado evolucionar la reacción. La reincorporación de oxígeno al medio de reacción produce un brusco aumento en la emisión. Este aumento depende del tiempo en que el sistema haya estado en anaerobiosis y del de aéro-

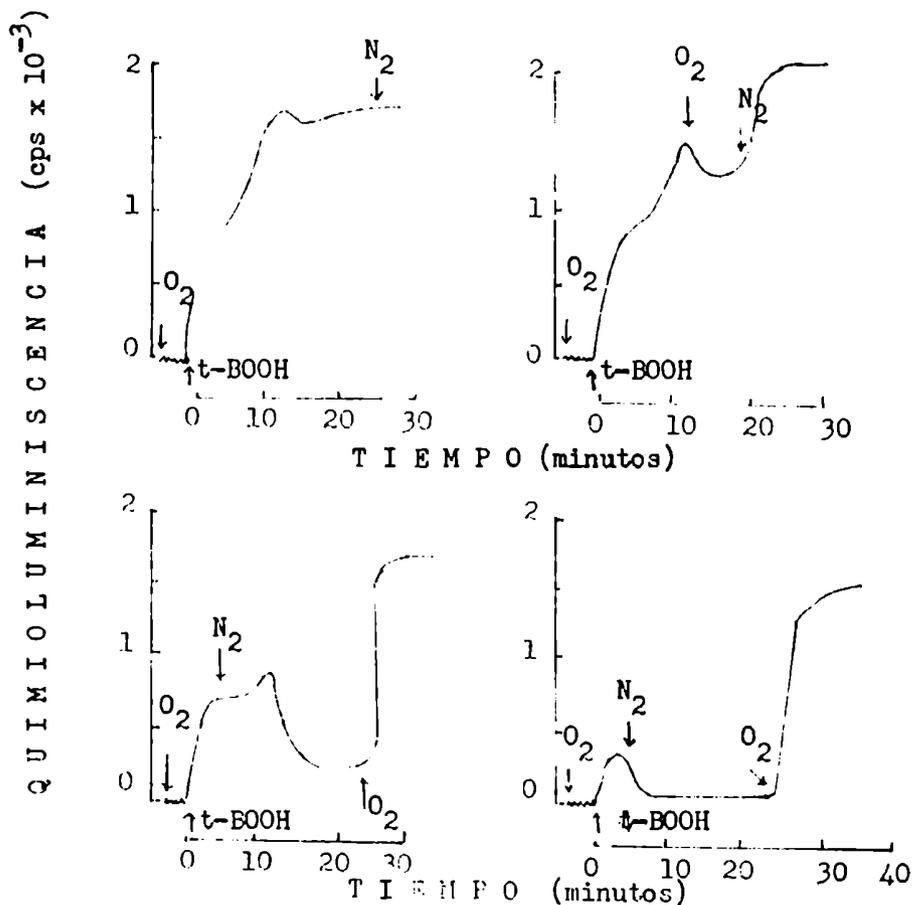


Fig. 19. Efecto del burbujeo de nitrógeno o de oxígeno sobre la reacción de homogeneizados de hígado de rata suplementados con hidroperóxido de ter-butilo. Las flechas indican el momento en que se agregan los reactivos.

biosis previa (Fig. 19). La emisión de mitocondrias de hígado de rata suplementadas con hidroperóxido de ter-butilo y la de hígado de rata "in situ" también depende de la concentración de oxígeno (Fig.28, 30 y Tabla V ). Lo mismo ocurre para sistemas más simples como citocromo-*c*, hidroperóxido o lipoxigenasa con ácido linoleico (Cadenas y col., 1980 a; Boveris y col., 1980 b).

CAPITULO IV

QUIMIOLUMINISCENCIA DE BAJA  
INTENSIDAD EN ORGANOS DE MAMIFEROS

## INTRODUCCION

El estudio de la emisión espontánea de órganos "in situ" presenta una serie de dificultades experimentales y teóricas. Una aproximación adecuada al conocimiento de estos fenómenos es el estudio de sistemas relacionados más sencillos partiéndose de un sistema modelo simple (hemoproteínas en solución) aumentando gradualmente la complejidad en estructura y composición hasta llegar al órgano "in situ".

La emisión de órganos "in situ" ocurre a través de reacciones de radicales libres en cadena. Una de las posibles reacciones de iniciación de este proceso es la ruptura homolítica de un enlace peróxido (reacción 34). Como los complejos de  $Fe^{3+}$  catalizan esta reacción, se seleccionó una hemoproteína (citocromo-c) en presencia de hidroperóxidos como sistema modelo simple para el estudio de procesos fotoemisivos en sistemas biológicos. La emisión de citocromo-c suplementado con hidroperóxido es modificada por la presencia de fosfolípidos en el medio de reacción (Cadenas y col., 1980 f), Las suspensiones de mitocondrias suplementadas con hidroperóxido de ter-butilo representan un sistema más complejo en cuanto a composición y estructura se refiere que el citocromo-c ya que en este caso hay interacción entre las hemoproteínas de membrana y los fosfolípidos. En grado creciente de complejidad en cuanto a composición pero no en cuanto a estructura están los homogeneizados de órganos que contienen mitocondrias, microsomas y citosol y en consecuencia pueden ser considerados suspensiones de organelas celulares. En este caso la emisión fue estimulada con oxígeno y con hidroperóxido de ter-butilo. La información existente sobre la emisión microsomal es suficiente como para obviar su estudio (Akerboom y col., 1982).

En todos los casos mencionados se estudió:

- i) emisión espontánea (es decir, en presencia de oxígeno) e inducida por hidroperóxidos.
- ii) efecto de la temperatura sobre la emisión.
- iii) dependencia de la emisión con la presencia de oxígeno.
- iv) efecto sobre la emisión de activadores e inhibidores adecuados.
- v) estudio de la distribución espectral de la emisión si no había suficiente información al respecto.

El estudio de la emisión de órgano "in situ" donde la complejidad viene dada fundamentalmente por la estructura, es experimentalmente más compleja y presenta más limitaciones que el estudio de sistemas en solución. En este caso se

estudió la emisión espontánea (es decir en presencia de oxígeno) y la inducida por el tetracloruro de carbono, cuya metabolización origina radicales libres. La luminiscencia de hígado de rata "in situ" inducida por hidroperóxido de ter-butilo fue estudiada por Boveris y col., (1980 a).

#### 4.1 SISTEMA MODELO-CITOCROMO-C E HIDROPEROXIDOS

Las reacciones con citocromo-c se llevaron a cabo en un medio de fosfato 100 mM, pH 7,2 - 7,3, a 37°C con burbujeo de oxígeno cuando se trabajó con contadores de fotones, y a temperatura ambiente en atmósfera de aire cuando se trabajó con contadores de centelleo. En estas reacciones el consumo de oxígeno es suficientemente bajo como para no encontrar diferencias entre las emisiones medidas con y sin burbujeo de oxígeno. Las reacciones se iniciaron agregando hidropéroxido a una solución de citocromo-c en el medio de reacción.

La fotoemisión de la reacción de citocromo-c con hidropéroxidos sigue una cinética simple (Fig. 20).

La pendiente inicial (aceleración inicial de la reacción; cps/seg<sup>2</sup>), la emisión máxima y el tiempo en que éste es alcanzado son funciones de la temperatura de trabajo y del tipo de hidropéroxido empleado (Figuras 14 y 20).

A 37°C y 5 mM de hidropéroxido el máximo de emisión se alcanza a los 5 - 7 minutos de iniciada la reacción cuando se trabaja con hidropéroxido de ter-butilo y a los 2 - 3 minutos cuando se emplea hidropéroxido de cumeno o peróxido de hidrógeno. A 28°C y 5 mM de hidropéroxido de ter-butilo son necesarios más de 20 minutos para alcanzar dichos valores.

El máximo de emisión depende linealmente de la concentración de citocromo-c y satura con 1,5 mM de hidropéroxido de ter-butilo, 1 mM de hidropéroxido de cumeno y 3 mM de peróxido de hidrógeno (Fig. 15).

##### 4.1.1 Rendimiento cuántico de la reacción de citocromo-c con peróxido de hidrógeno.

El análisis cromatográfico de los productos de la reacción de citocromo-c con hidropéroxidos indica que el grupo hemo se destruye completamente durante la reacción. Esta destrucción puede seguirse espectrofotométricamente midiendo la variación en la absorbancia a 408 nm (banda de Soret). En una mezcla de reacción con peróxido de hidrógeno 5 mM y 10  $\mu$ M de citocromo-c la velocidad inicial de desaparición de citocromo-c es de 40 nM/seg., consumiéndose todo el citocromo-c a los 5 - 8 minutos de iniciada la reacción (Fig. 21). El consumo de peróxido de hidrógeno, que no puede seguirse espectrofotométricamente midiendo la absorción a 240 nm porque durante la reacción aparecen compuestos que absorben a esta longitud de onda, puede determinarse titulando el peróxido con permanganato de potasio. En las mismas condiciones que se emplearon para medir la desaparición de citocromo-c, el peróxido se consume con una velocidad inicial de 5  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/segundo (Fig. 21). Durante el pri-

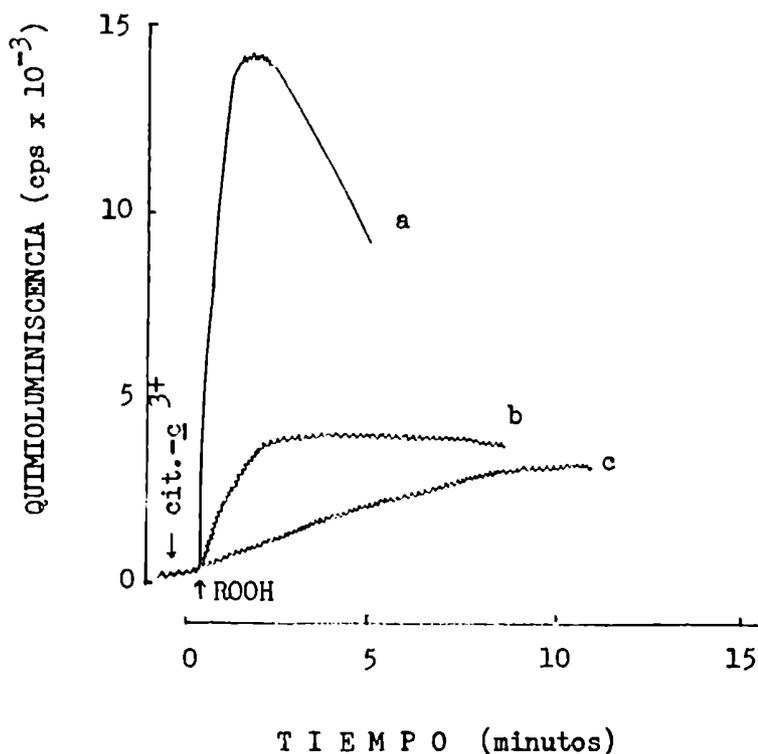


Fig. 20. Cinética de la emisión de citocromo-c suplementado con: a) peróxido de hidrógeno; b) hidroperóxido de cumeno y c) hidroperóxido de terbutilo. Temperatura: 37°C; [hidroperóxido] = 5 mM; [citocromo-c] = 20  $\mu$ M.

mer minuto de reacción la fotoemisión total es de 2000 - 3000 cuentas. Se puede calcular que por cada molécula de citocromo-c destruido se consumen 125 moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se miden  $2 \times 10^{-13}$  cuentas (teniendo en cuenta que la eficiencia de conteo del contador de fotones es de 10 %,  $2 \times 10^{-13}$  cuentas corresponden a  $2 \times 10^{-12}$  fotones). Esto indica que los rendimientos cuánticos son de  $2 \times 10^{-12}$  fotones/grupo hemo destruido y de  $1,6 \times 10^{-14}$  fotones/molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumida. Si bien la reacción depende de la presencia de oxígeno en el medio y consume oxígeno, éste no puede medirse polarográficamente en presencia de peróxido de hidrógeno porque el peróxido interfiere en las medidas.

#### 4.1.2 Efecto de la temperatura y de la desnaturalización térmica del citocromo-c sobre la emisión.

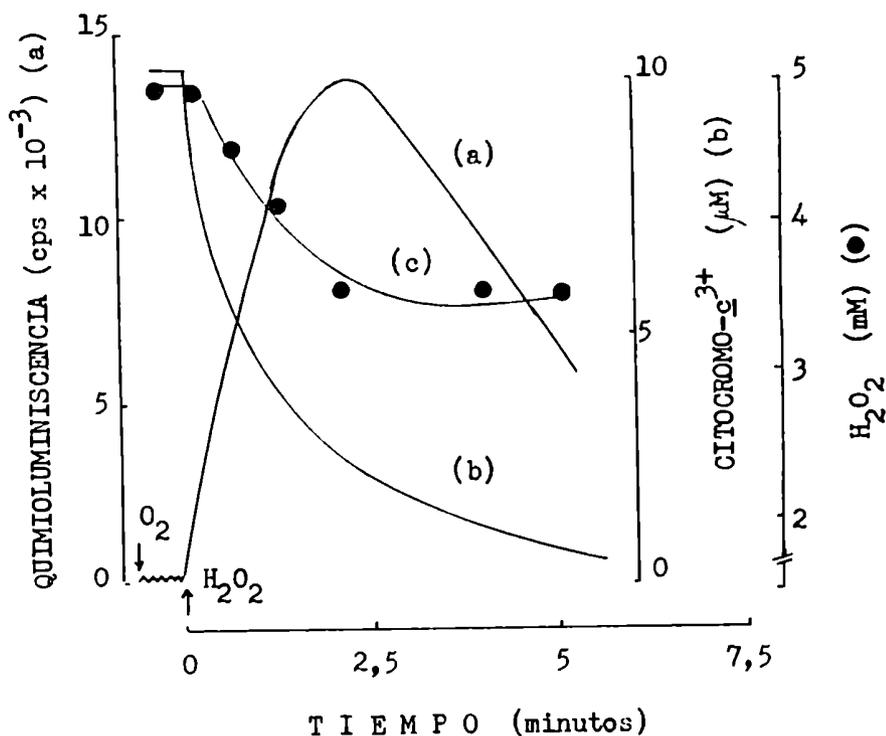


Fig. 21. Emisión luminosa (a), consumo de citocromo-c (b) y consumo de peróxido de hidrógeno (c) para citocromo-c suplementado con peróxido de hidrógeno (10 μM y 5 mM respectivamente a 37°C).

La emisión de citocromo-c con hidropéroxido de ter-butilo aumenta considerablemente al aumentar la temperatura (Fig. 14). El diagrama de Arrhenius quiebra a 32°C con energías de activación de 101 y 112 kJ/mol por encima y por debajo de este punto respectivamente.

Calentando citocromo-c a diferentes temperaturas y tiempos se observa que cuanto mayores son ambos parámetros, mayor es la fotoemisión inducida por hidropéroxido de ter-butilo 5 mM medida a temperatura ambiente (Fig. 22). Esto estaría de acuerdo con la idea de que el verdadero catalizador de la reacción es el citocromo-c desnaturalizado. Los diagramas de Arrhenius indican un punto de quiebre a 74°C con energías de activación de 161 y 56 kJ/mol por encima y por debajo de este punto respectivamente.

#### 4.1.3 Efecto de inhibidores, atrapadores de radicales libres y complejos de metales pesados sobre la quimioluminiscencia y la velocidad de desaparición de la banda Soret en mezclas de citocromo-c y peróxido de hidrógeno.

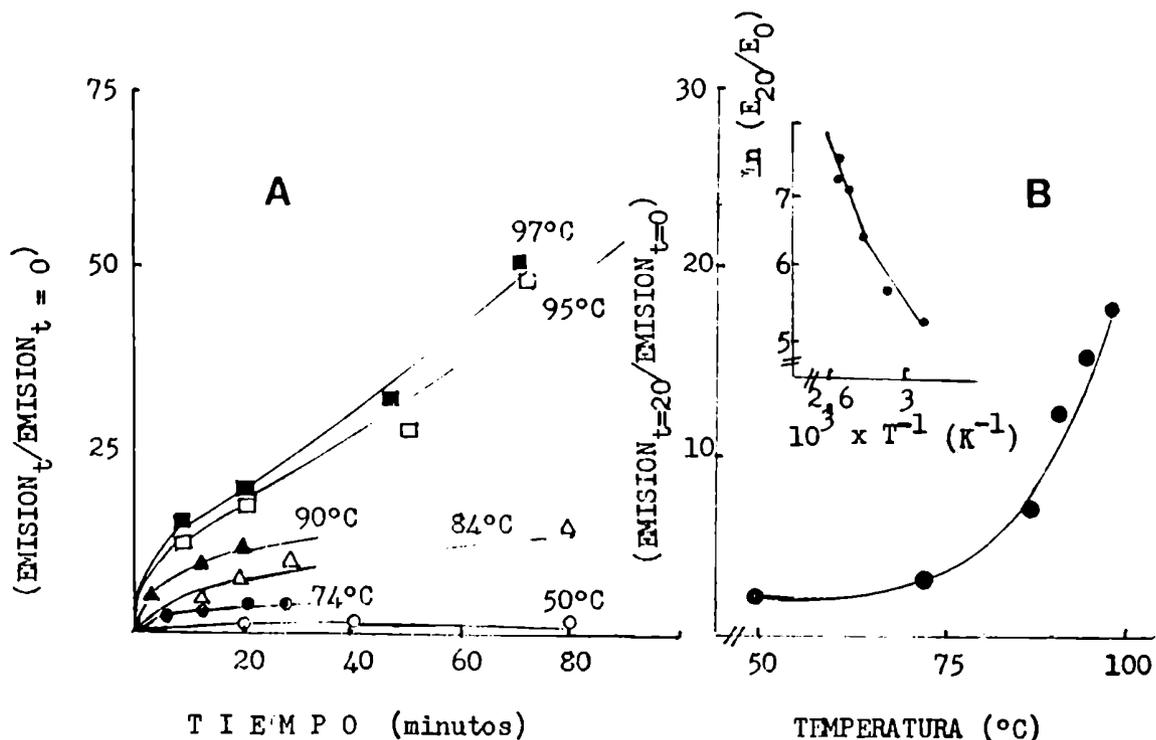


Fig. 22. A - Efecto del calentamiento de citocromo- $c$   $10 \mu M$  sobre la emisión en presencia de hidropéroxido de ter-butilo 5 mM. El citocromo- $c$  en fosfato de potasio 0,1 M pH 7,2 - 7,4 fue calentado a las temperaturas y tiempos indicados previamente a la reacción con hidropéroxido. La reacción con hidropéroxido se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Emisión $_t$  = emisión al tiempo  $t$

Emisión $_{t=0}$  = emisión a tiempo 0

B - Dependencia entre las emisiones máximas para cada temperatura de desnaturalización del citocromo- $c$  y la temperatura; diagrama de Arrhenius correspondiente.

I. Cianuro de potasio. El cianuro de potasio inhibe en un 87 % la velocidad de desaparición de la banda Soret y la quimioluminiscencia en mezclas de citocromo- $c$  con peróxido de hidrógeno (Fig. 23) con un 50 % del efecto inhibitorio con 0,9 mM de cianuro de potasio.

Para obtener efectos semejantes con hidropéroxido de ter-butilo son necesarias concentraciones de cianuro de potasio siete veces mayores (Cadenas y col., 1980 a).

II. Atrapadores de radicales libres. El 2,5-di-terbutil quinol, que es

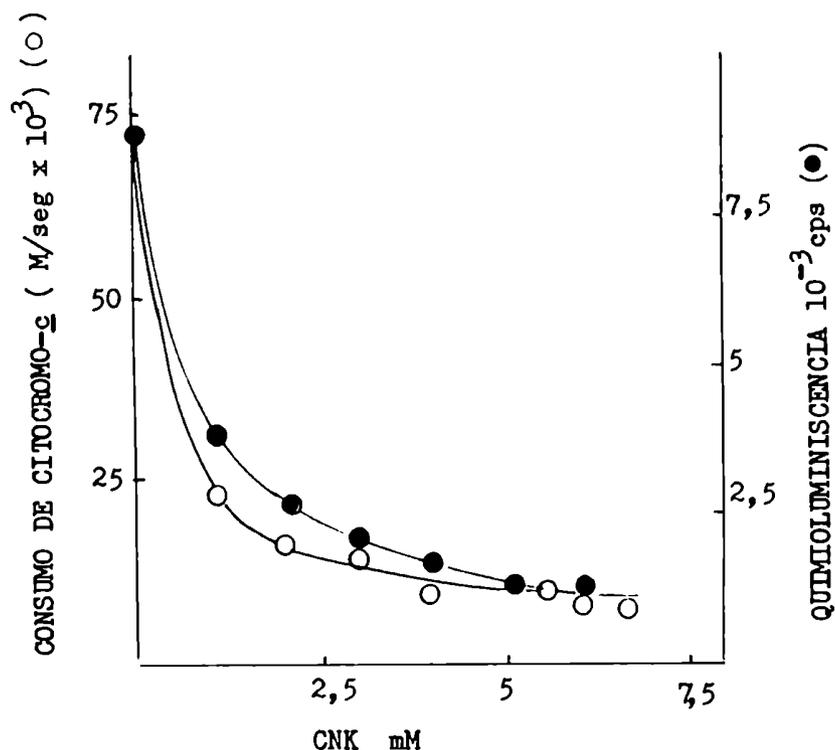


Fig. 23. Efecto del cianuro de potasio sobre la emisión luminosa y la destrucción de citocromo- $c$   $20 \mu\text{M}$  en presencia de peróxido de hidrógeno  $5 \text{ mM}$ .

un atrapador de radicales libres eficiente (Sugloka y col., 1976), inhiben tanto la emisión luminosa como la velocidad de desaparición de la banda Soret en mezclas de citocromo- $c$  con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 24). El efecto inhibitorio máximo se obtuvo con  $1 \text{ mM}$  de atrapador y fue de  $60 - 70 \%$ .

Los alcoholes son atrapadores eficientes del radical  $\text{OH}^\bullet$  (Dorfman y Adams, 1973). Se ensayó el efecto de metanol, etanol, etanodiol, glicerol, propilenglicol, butanol y manitol a concentraciones de  $25$  y  $250 \text{ mM}$  sobre el sistema citocromo- $c$ /peróxido de hidrógeno sin observarse efecto sobre la emisión luminosa.

III. Metales pesados libres o complejados con aminoácidos. Tanto los metales pesados como algunos aminoácidos pueden actuar como inhibidores de la emisión luminosa debida a oxígeno singulete por reaccionar con el mismo (Turro, pág. 14, 1978). Por otra parte, el cobre y el manganeso pueden reaccionar con peróxido de hidrógeno produciendo emisión luminosa.

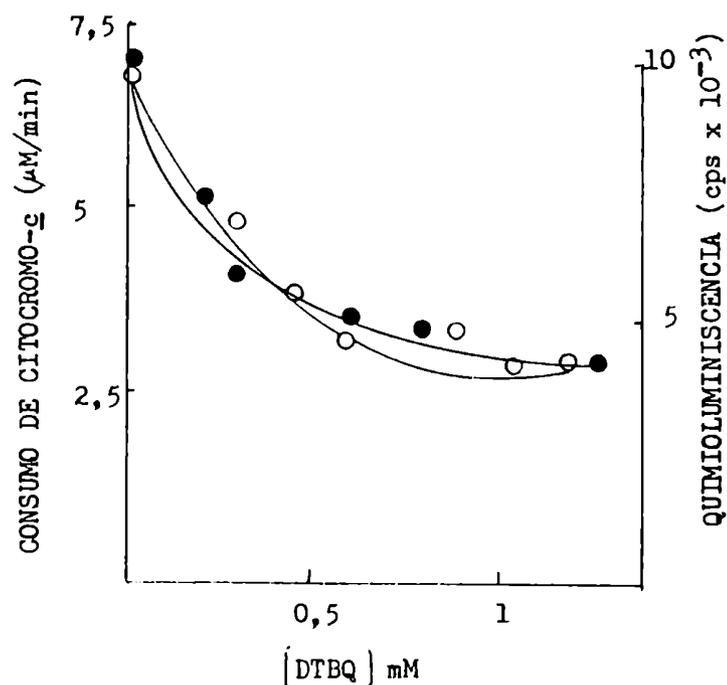


Fig. 24. Efecto del atrapador de radicales libres 2,5-di-terbutil quinol (DTBQ) sobre la emisión luminosa (○) y la destrucción de la banda Soret (●) para una mezcla de citocromo  $c$   $10 \mu\text{M}$  con peróxido de hidrógeno  $5 \text{ mM}$ .

Se ensayó el efecto de cobre libre o quelado con aminoácidos y de manganeso libre sobre la quimioluminiscencia y la velocidad de desaparición de la banda Soret de citocromo  $c^{3+}$  en presencia de peróxido de hidrógeno. El  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cu-His}$  inhibieron la fotoemisión en un 60 % (Fig. 25) con un efecto máximo a concentraciones de  $0,3 \text{ mM}$ . Los complejos de cobre con lisina produjeron una inhibición de 41 % a concentraciones de  $0,6 \text{ mM}$ . Cadenas y col., (1980 a) encontraron inhibición de la emisión luminosa de citocromo  $c$  en presencia de hidroperóxido de ter-butilo por  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Las concentraciones de metales necesarias para inhibir la emisión luminosa (Fig. 25) indican que las cantidades en las que pudieran estar presentes como impurezas no son suficientes como para producir efectos detectables.

Ni el  $\text{Cu}^{2+}$  (libre o quelado) ni el  $\text{Mn}^{2+}$  afectaron la velocidad de desaparición de la banda Soret. Esto está indicando que los metales pesados actúan inhibiendo el proceso fotoemisivo en sí pero no las reacciones que lle-

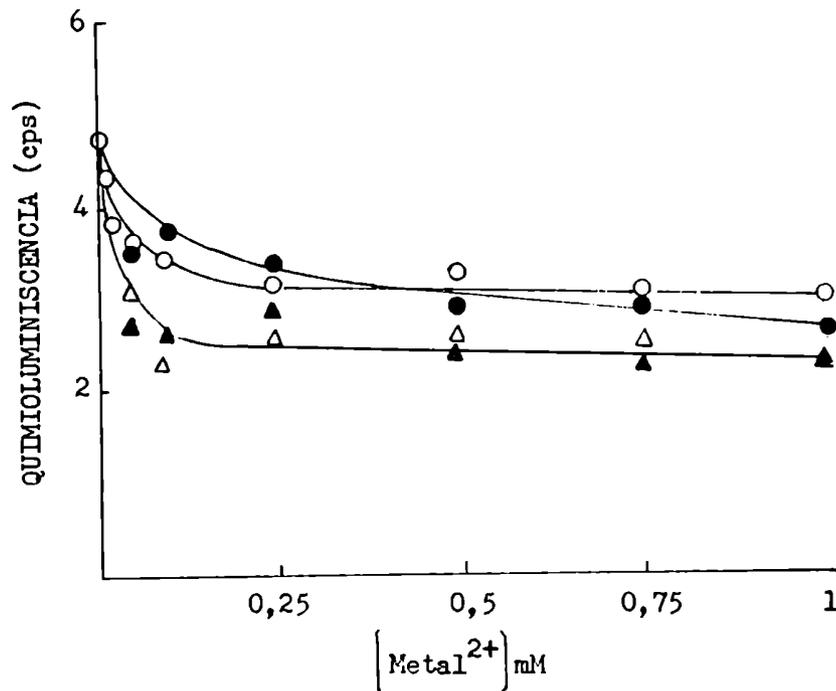


Fig. 25. Efecto de metales  $Mn^{2+}$  ( $\blacktriangle$ ),  $Cu^{2+}$  ( $\triangle$ ), Cu-His ( $\circ$ ) y Cu-Lys ( $\bullet$ ) sobre la emisión máxima de citocromo-c suplementado con peróxido de hidrógeno.

van a él.

#### 4.2 QUIMIOLUMINISCENCIA DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA EN PRESENCIA DE HIDROPEROXIDO DE TER-BUTILO.

Las mitocondrias de hígado de rata mantenidas en un medio aeróbico a 37°C tienen una emisión basal muy débil (10 cps/mg de proteína) que aumenta al suplementarlas con hidroperóxido de ter-butilo. La cinética en este caso es simple, presentando un máximo a los 2 - 3 minutos de iniciada la reacción (Fig. 26); la emisión se mantiene en valores constantes por tiempos mayores que una hora. La emisión máxima depende de las concentraciones de proteínas, hidroperóxidos y oxígeno (Figuras 17 y 30). Ni las mitocondrias de corazón de rata o de paloma ni las mitocondrias de cerebro de rata o de conejo emiten al ser estimuladas con hidroperóxido de ter-butilo 5 mM.

##### 4.2.1 Efecto del medio de ensayo y del tratamiento previo de la preparación mitocondrial sobre la emisión.

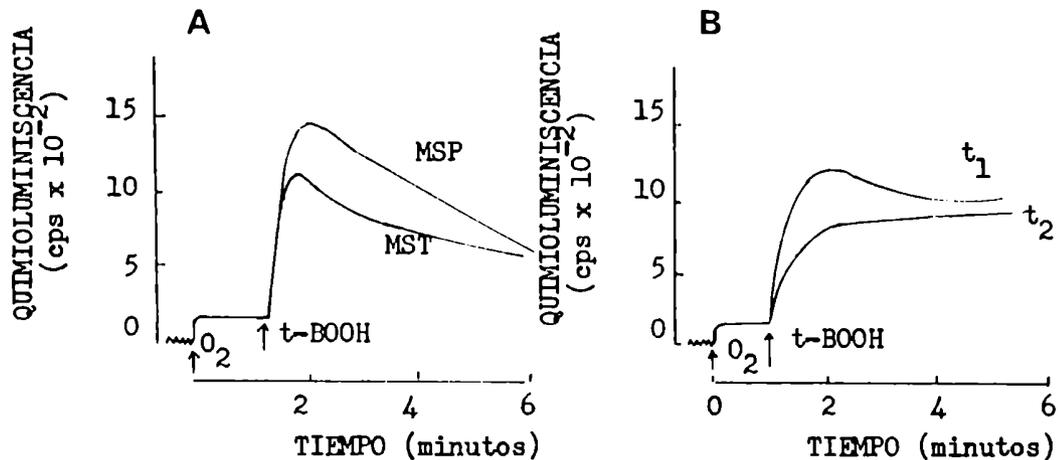


Fig. 26. Emisión de mitocondrias de hígado de rata suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM.

A - En distintos medios de reacción (MSP: manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M; fosfato de potasio 10 mM; pH 7,2; MST: manitol 0,23 M; sacarosa 0,07 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,2)

B - En MSP. Las mitocondrias tienen 0-0,5 horas de preparadas ( $t_1$ ) ó 4 horas de preparadas ( $t_2$ ).

Tanto el medio de ensayo como la integridad de las mitocondrias influyen en la cinética de su emisión en presencia de hidropéroxido de ter-butilo. En medios con Tris-HCl (que es inhibidor de la emisión debida a oxígeno singlete; Deneke y Krinsky, 1977) la emisión es menor que cuando el medio contiene solo fosfato (Fig. 26 A).

La cinética de la emisión de una preparación mitocondrial (en presencia de hidropéroxido de ter-butilo) depende de cuanto tiempo se han conservado aisladas las organelas. Se ha observado que al aumentar el tiempo de preparadas desaparece el máximo inicial descrito (Fig. 26 B). Son más marcadas aún las diferencias entre las emisiones de mitocondrias de hígado de rata frescas o congeladas (a las mitocondrias congeladas al menos una vez se las llama también membranas mitocondriales ya que con este tratamiento la organela pierde su integridad). La emisión de membranas mitocondriales se asemeja a la de mitocondrias que tienen más de seis horas de preparación. Por otra parte, la cinética de dicha emisión no depende significativamente del origen de la membrana mitocondrial y/o de la mitocondria (Fig. 27).

#### 4.2.2 Dependencia de la emisión de mitocondrias suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo con el estado metabólico.

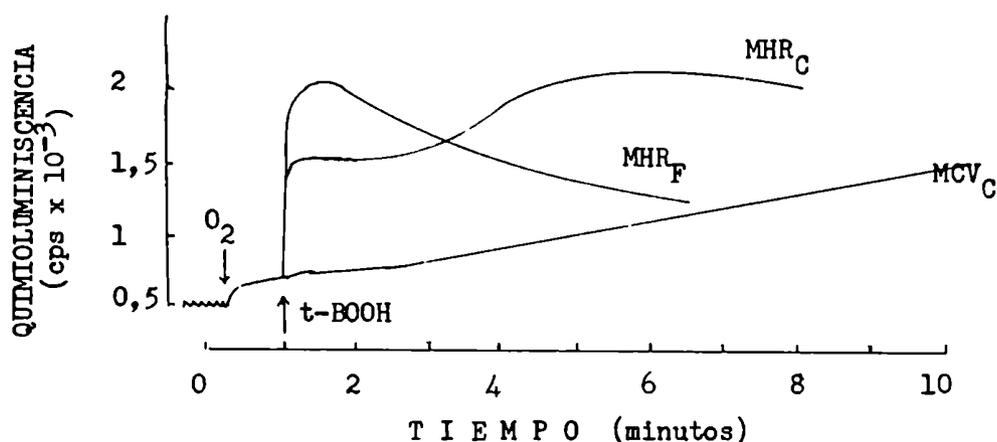


Fig. 27. Emisión de mitocondrias de hígado de rata frescos (MHR<sub>F</sub>) o congelados (MHR<sub>C</sub>) y de mitocondrias de corazón de vaca congeladas (MCV<sub>C</sub>) suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM. En los tres casos la concentración de proteínas fue de 4 mg/ml. Las reacciones se han llevado a cabo en MSP a 37°C.

Pese a la fuerte agresión que significa la adición de altas concentraciones de hidropéroxido de ter-butilo a mitocondrias metabólicamente activas, durante los 3 - 4 minutos posteriores al agregado del hidropéroxido, la integridad de la organela se mantiene, como lo indica la no alteración del consumo de oxígeno para mitocondrias en estado 3 (Fig. 28 A).

La emisión luminosa de mitocondrias suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo en un medio con burbujeo constante de oxígeno depende de su estado metabólico (Fig. 29).

La relación entre las emisiones para los estados 3, 4 y 1 para todas las concentraciones de hidropéroxido ensayadas es de 1 : 1,2 : 1,6. No se halló una correlación directa entre el valor del control respiratorio y la emisión luminosa.

#### 4.2.3 Dependencia de la emisión de mitocondrias y membranas mitocondriales en presencia de hidropéroxido de ter-butilo con la concentración de oxígeno.

Las mitocondrias de hígado de rata en estado 3 consumen oxígeno activamente. Su emisión al ser estimulada con hidropéroxido de ter-butilo disminuye junto con la concentración de oxígeno del medio (Fig. 28 A), alcanzando un nivel cercano a cero cuando éste ha sido totalmente consumido.

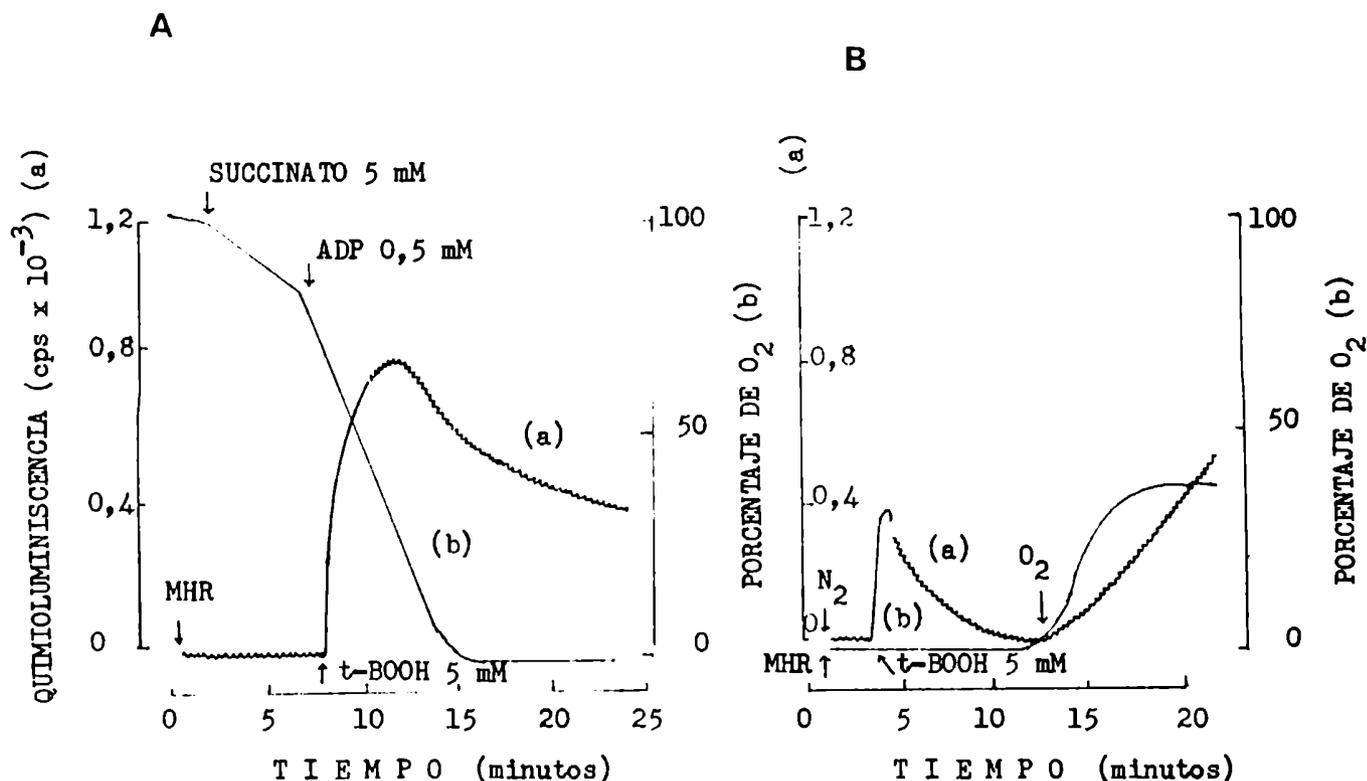


Fig. 28. A - Emisión luminosa (a) y consumo de oxígeno (b) de mitocondrias de hígado de rata en estado 3 al ser suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM en un medio saturado con aire.

B - Relación entre la emisión luminosa (a) de mitocondrias de hígado de rata en estado 1 suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM y la concentración de oxígeno en el medio de reacción (b).

La emisión y el consumo de oxígeno fueron medidos simultáneamente.

La emisión de mitocondrias en estados 1 y 4 y la emisión de membranas mitocondriales también depende de la presencia de oxígeno. La adición de hidropéroxido de ter-butilo a mitocondrias frescas en estado 1 en un medio en el que se burbujea nitrógeno induce rápidamente una emisión en forma de espiga que no pudo ser eliminada con burbujeados de nitrógeno de 20 minutos en cubeta cerrada. Esta emisión ha sido atribuida a un proceso de muy alta afinidad por el oxígeno tal que reaccionaría con el oxígeno residual en la cubeta. La incorporación de oxígeno al medio una vez desaparecida la espiga produce un brusco aumento en la emisión (Fig. 28 B).

Dadas las características cinéticas de la emisión de mitocondrias frescas en estado 1 suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM para estudiar su dependencia con la concentración de oxígeno se pueden considerar cuatro pa-

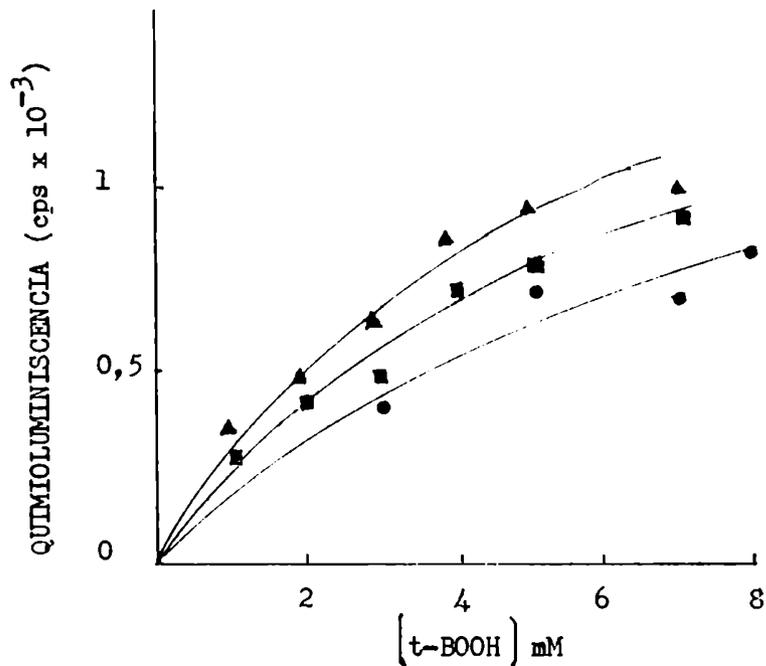


Fig. 29. Dependencia de la emisión máxima de mitocondrias de hígado de rata metabólicamente activas con la concentración de hidróperóxido. (▲) mitocondrias en estado 1; (■) mitocondrias en estado 4; (●) mitocondrias en estado 3. Se grafica la emisión a los dos minutos de haber agregado el hidróperóxido.

rámetros (Fig. 30) a) emisión espontánea (en ausencia de inductor); b) emisión máxima que alcanza el sistema al ser suplementado con hidróperóxido; c) emisión estacionaria (tomada a los 8 minutos de agregado el hidróperóxido) y d) emisión total (área debajo de la curva al cabo de un tiempo prefijado). Los tres primeros valores son velocidades instantáneas de emisión y el cuarto es una emisión total; las unidades son fotones/segundo para los tres primeros parámetros y fotones para el cuarto. Los cuatro parámetros dependen de la concentración de oxígeno para la emisión máxima. Se calcularon valores de  $K_m$  de  $19 \mu M$  para la emisión máxima,  $189 \mu M$  para la emisión estacionaria y  $65 \mu M$  para la emisión integral (Fig. 30 B). Las membranas mitocondriales por su parte tienen un  $K_m$  de  $390 \mu M$ .

#### 4.2.4 Efecto del cianuro de potasio sobre la emisión de mitocondrias de hígado de rata en estado 1.

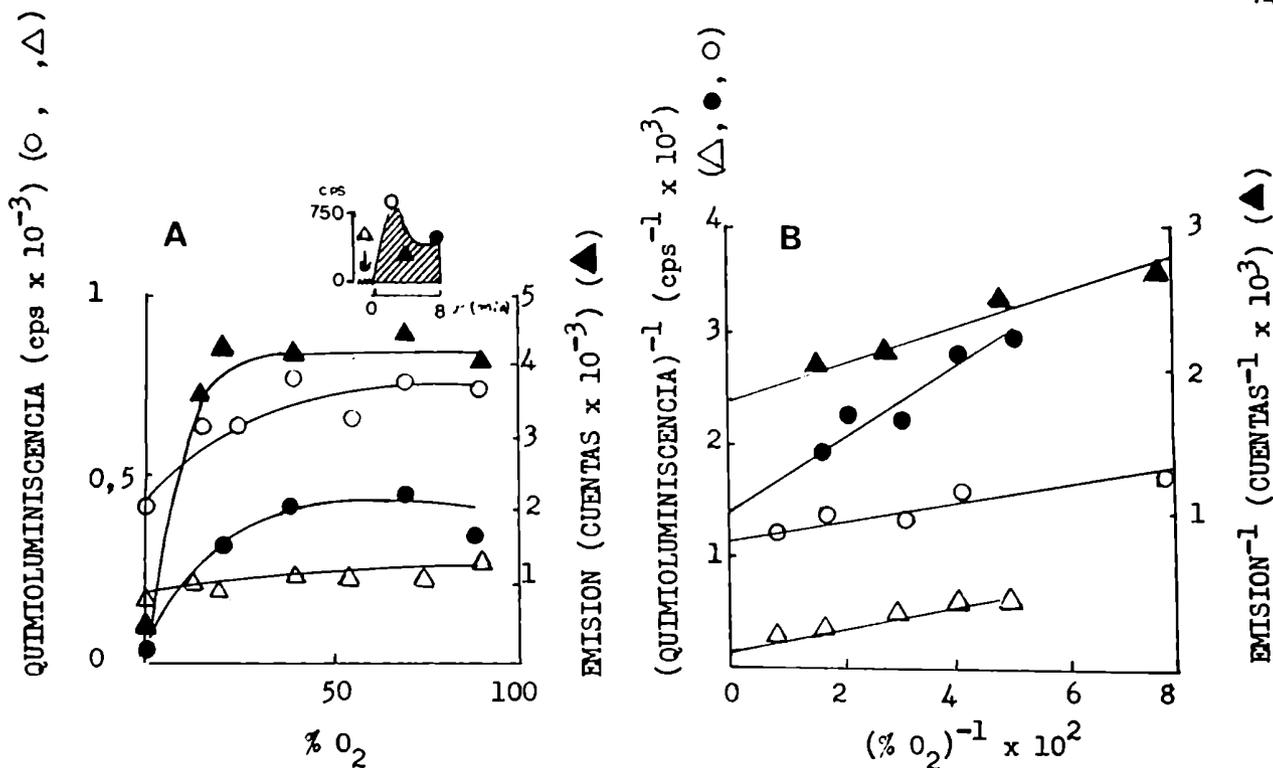


Fig. 30. A - Dependencia de la emisión de mitocondrias de hígado de rata suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM con la concentración de oxígeno. Se grafican emisión espontánea ( $\Delta$ ), máxima ( $\circ$ ), estacionaria ( $\bullet$ ) e integral ( $\blacktriangle$ ).

B - Gráfico de inversas correspondientes.

El cianuro de potasio inhibe tanto la emisión de mitocondrias frescas como la de membranas mitocondriales (Fig. 31) siendo diferentes las concentraciones que producen máximo efecto inhibitorio. La emisión de mitocondrias de hígado de rata en estado 1 es inhibida en un 64 % con concentraciones de cianuro de potasio de 300  $\mu$ M; las membranas mitocondriales de corazón de vaca son inhibidas en un 45 % con concentraciones de 15  $\mu$ M de cianuro de potasio y las membranas mitocondriales de hígado de rata son inhibidas en un 67 % con 150  $\mu$ M de cianuro de potasio.

#### 4.2.5 Análisis espectral de la emisión de mitocondrias de hígado de rata.

El análisis espectral de la emisión de mitocondrias de hígado de rata en estado 1 suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM muestra bandas muy anchas con un máximo de 480 nm y un máximo más marcado en 580 nm. Un 10 % de la emisión total detectada está a longitudes de onda mayores que 670 nm (por no tener acceso a filtros adecuados esta emisión no ha podido ser resuelta; Fig. 32).

### 4.3 QUIMIOLUMINISCENCIA DE HOMOGENEIZADOS DE HIGADO Y CEREBRO DE RATA.

#### 4.3.1 Emisión inducida por oxígeno.

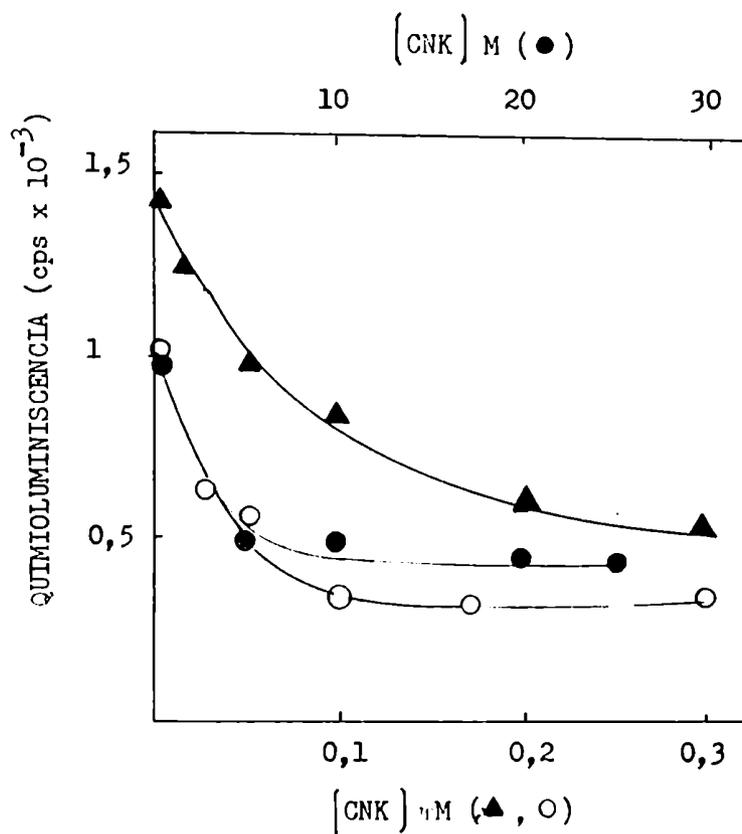


Fig. 31. Inhibición por CNK de la emisión máxima de mitocondrias de hígado de rata frescas (▲), mitocondrias de corazón de vaca congeladas (●) y mitocondrias de hígado de rata congeladas (○). En todos los casos se emplearon 2,8 mg de proteína/ml y 5 mM de ter-butilo.

Como se indicó en la sección 3.3.1, la cinética de la emisión de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno es afectada principalmente por las condiciones en que han sido preparados. La cinética de la emisión luminosa de homogeneizados de hígado de rata en presencia de oxígeno muestra una fase de retraso que dura de 20 a 40 minutos, (independientemente de las condiciones en que se haya obtenido la preparación) seguida de un aumento en la emisión que llega a tener un valor máximo a las 1,5 - 2 horas de iniciada la reacción, decayendo luego lentamente (Fig. 33). Esta cinética es semejante a la de homogeneizados de cerebro de rata pero la emisión expresada por mg de proteína es casi 20 veces mayor en el segundo caso.

#### 4.3.2 Formación de malonaldehído, niveles de glutatión peroxidasa y quimioluminiscencia en homogeneizados de hígado y cerebro de rata.

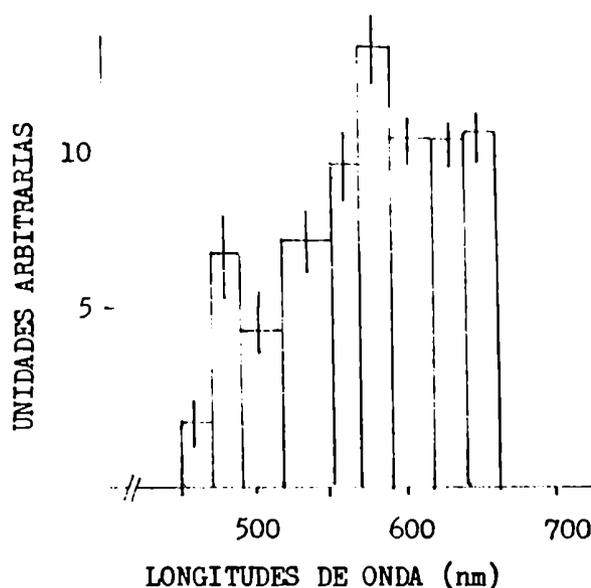


Fig. 32. Distribución espectral de la emisión de mitocondrias de hígado de rata (en estado 1) suplementadas con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM.

La cantidad de hidropéroxidos lipídicos formados en un sistema puede medirse a través de la cantidad de malonaldehído presente (Chance y col., 1979). Las curvas de quimioluminiscencia en función del tiempo de reacción (que registran velocidad de emisión de fotones en función del tiempo, es decir cuentas por segundo) y la velocidad de acumulación de malonaldehído (nmoles/segundo) son semejantes entre sí tanto para homogeneizados de hígado de rata como de cerebro de rata. En la Fig. 33 se observa claramente para homogeneizados de cerebro de rata que cuando no se acumula más malonaldehído los niveles de luminiscencia disminuyen indicando una clara relación entre la emisión de fotones y la formación de hidropéroxidos lipídicos.

La enzima glutatión peroxidasa es una de las defensas de los tejidos contra los procesos peroxidativos (Chance y col., 1979). Esta actividad es muy baja en homogeneizados de cerebro ( $0,4 \pm 0,05$  nmol/min. mg de proteína) pero es alta en homogeneizados de hígado ( $182 \pm 12$  nmol/min. mg de proteína). Estos valores medidos están de acuerdo con los niveles de actividad de glutatión peroxidasa conocidos (Prohaska y Ganther, 1976; Sies y col., 1979) y en relación inversa con los niveles de quimioluminiscencia y formación de malonaldehído.

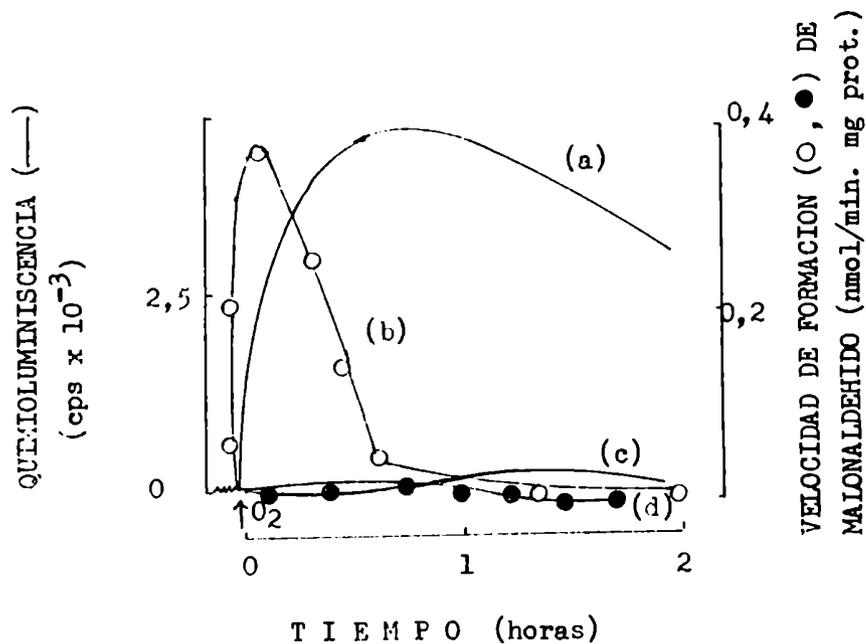


Fig. 33. Emisión luminosa (en cps) y acumulación de malonaldehído (en nmoles/seg) para homogeneizados de cerebro (a y b) y homogeneizados de hígado (c y d) de rata en presencia de oxígeno.

do en ambos homogeneizados, de acuerdo con lo esperado (cuanto mayor es el nivel de defensas contra la formación de hidropéroxidos, reflejados por la actividad de glutatión peroxidasa, menor es la cantidad de hidropéroxido formados, reflejado en el nivel de malonaldehído).

#### 4.3.3 Quimioluminiscencia inducida por hidropéroxido de ter-butilo en homogeneizados de cerebro de rata.

La emisión de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno es activada por concentraciones de hidropéroxido de ter-butilo menores que 2,5 mM, con un efecto activador máximo (1,6 - 1,7 veces) a 0,4 mM de hidropéroxido (Fig. 17). Es interesante hacer notar que los tiempos en que la emisión máxima es alcanzada disminuyen al aumentar la concentración de hidropéroxido. Si se considera la emisión en función de la concentración de hidropéroxido a tiempos menores que los necesarios para alcanzar la emisión máxima se observa activación para cualquier concentración de hidropéroxido. La composición del medio de ensayo, fundamentalmente la posibilidad de que existan metales bivalentes libres, influyen en el efecto del hidropéroxido sobre la emisión.

El agregado de hemoproteínas exógenas como hemoglobina o citocromo-g pue-

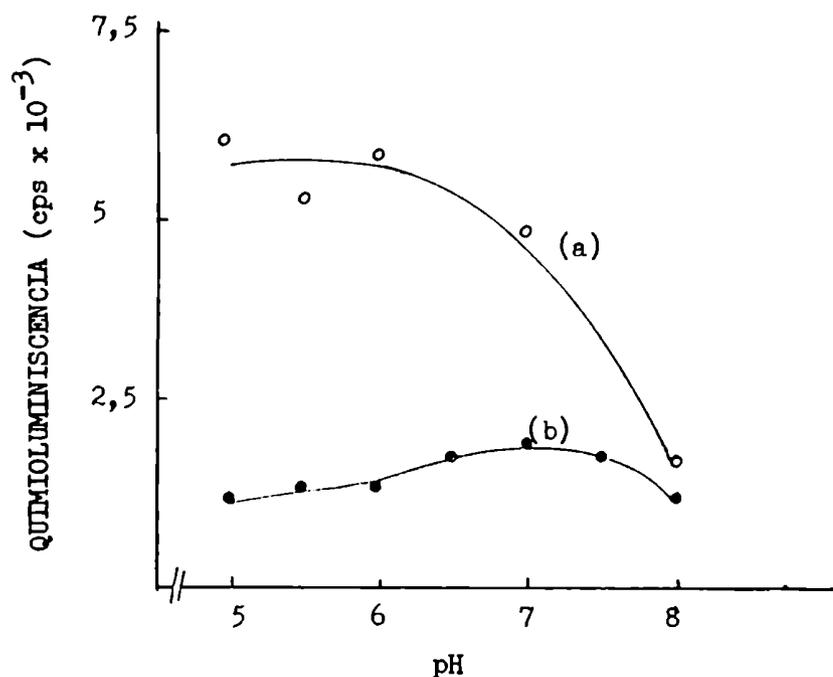


Fig. 34. Dependencia de la emisión máxima de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno (a) y de oxígeno más hidropéroxido de ter-butilo 5 mM (b) con el pH del medio.

de tanto hacer variar la emisión máxima como alterar sus características cinéticas.

El peróxido de hidrógeno, pese a la baja actividad de catalasa del cerebro (Sinnott y col., 1980) tiene poco efecto sobre la emisión de homogeneizados de cerebro de rata libres de sangre, en presencia de oxígeno.

El pH óptimo para la emisión inducida por oxígeno está entre 5 y 6; en la reacción inducida por hidropéroxido de ter-butilo este pH es de 6,5 - 7,5 (Fig. 34).

#### 4.3.4 Quimioluminiscencia inducida por hidropéroxido de ter-butilo en homogeneizados de hígado de rata.

En un medio oxigenado los homogeneizados de hígado de rata reaccionan eficientemente y rápidamente con hidropéroxido de ter-butilo. Esta emisión presenta tres fases características (Fig. 11) cuyos tiempos de aparición, duración y máximos dependen de la temperatura, del medio, (Fig. 14), la concentración de proteínas e hidropéroxido (Figuras 17 y 18), la presencia de activadores

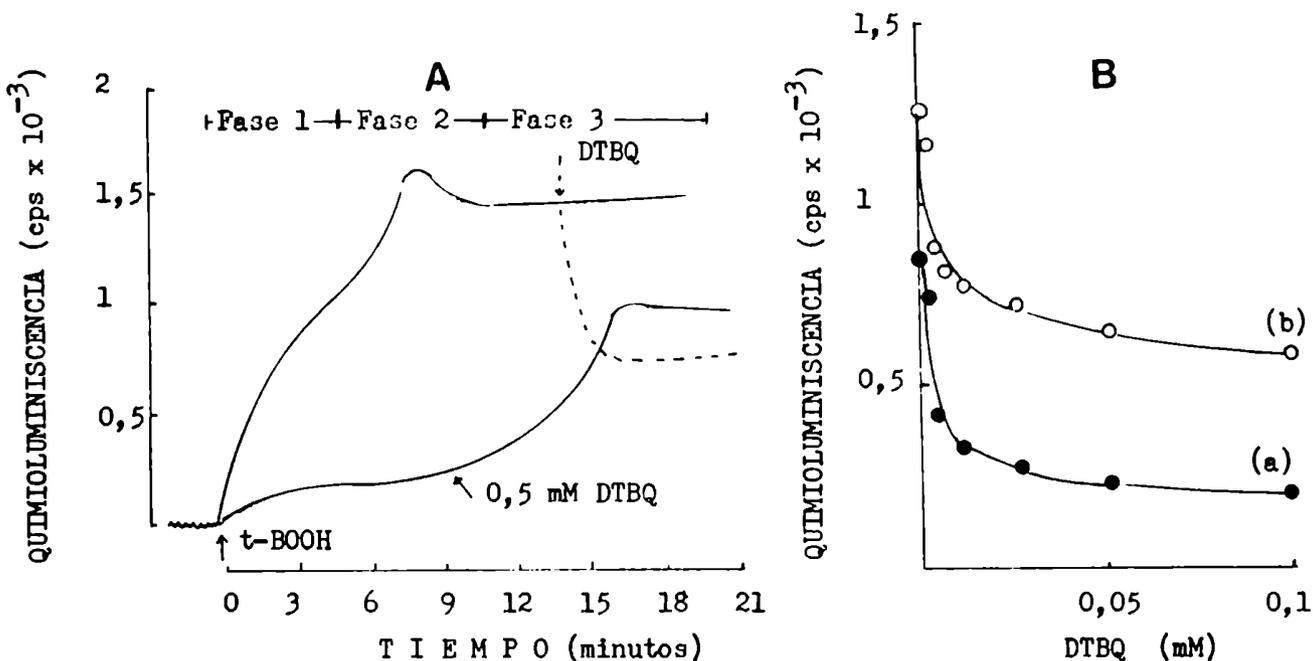


Fig. 35. A - Efecto del agregado de diterbutilquinol (DTBQ) sobre la cinética de la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidroperóxido de ter-butilo 5 mM.  
B - Dependencia entre las emisiones máximas de las fases 1 (a) y 3 (b) y la concentración de diterbutilquinol.

o inhibidores y de la concentración de oxígeno en el medio de reacción.

I. Dependencia entre la emisión de homogeneizados de hígado de rata suplementados con hidroperóxido de ter-butilo y oxígeno. En un medio con homogeneizados de hígado de rata que están reaccionando con hidroperóxido de ter-butilo en presencia de oxígeno la eliminación del oxígeno del medio en cualquier momento posterior a la iniciación de la reacción hace caer la emisión a niveles cercanos a cero. (Fig. 19). En ausencia de oxígeno el hidroperóxido no induce emisión luminosa; una posterior oxigenación del sistema reaccionante produce un aumento en la emisión con una aceleración inicial que es mayor cuanto mayor es el tiempo en que el sistema suplementado con hidroperóxido estuvo en anaerobiosis (Fig. 19).

II. Efecto de inhibidores sobre la quimioluminiscencia de homogeneizados de hígado de rata inducida por hidroperóxido de ter-butilo. El atrapador de radicales di-terbutil quinol (DTBQ) que inhibe la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidroperóxido de ter-butilo 5 mM (Fig. 35) lo

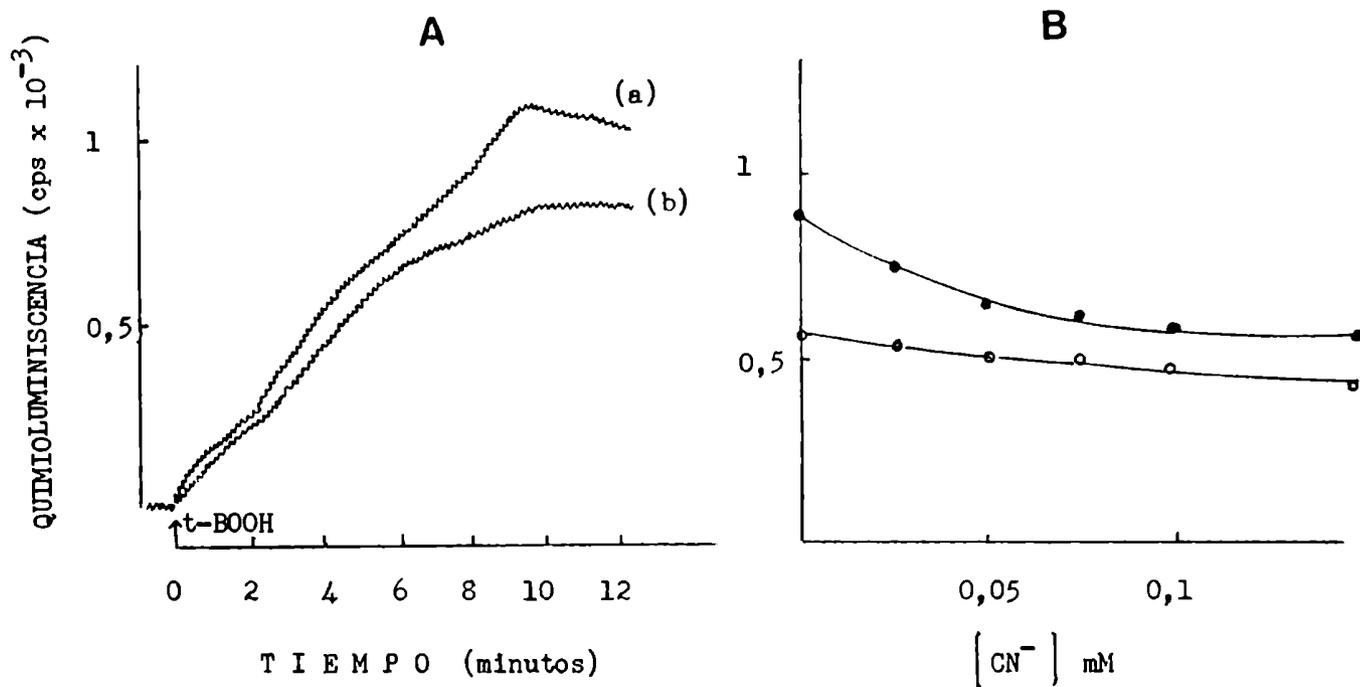


Fig. 36. A - Cinética de la emisión de homogeneizados de hígado de rata suplementados con hidroperóxido de ter-butilo 5 mM en ausencia (a) y en presencia (b) de CNK 0,1 mM.  
 B - Dependencia de la emisión máxima de las fases 1 (○) y 3 (●) con la concentración de CNK.

hace disminuyendo el valor de la emisión máxima de la primera fase y alargando su duración, pero manteniendo constante la diferencia de emisión entre las metasetas de la primera y tercera fases. La duración de la primera fase inhibida depende de la concentración de DTBQ. El agregado de este inhibidor en cualquier momento durante la reacción produce una inhibición inmediata en la emisión (Fig. 35 A). Esto es consistente con el hecho de que el inhibidor lo hace reaccionando (pasa a diter-butilquinol) y se agota; una vez agotado el inhibidor la reacción continúa normalmente.

El cianuro de potasio que inhibe la emisión de hemoproteínas inducida por hidroperóxido de ter-butilo (Fig. 23), inhibe la segunda fase pero no la primera en la emisión de homogeneizados de hígado suplementados con hidroperóxido de ter-butilo (Fig. 36).

### III. Espectros de emisión de homogeneizados de hígado y cerebro de rata.

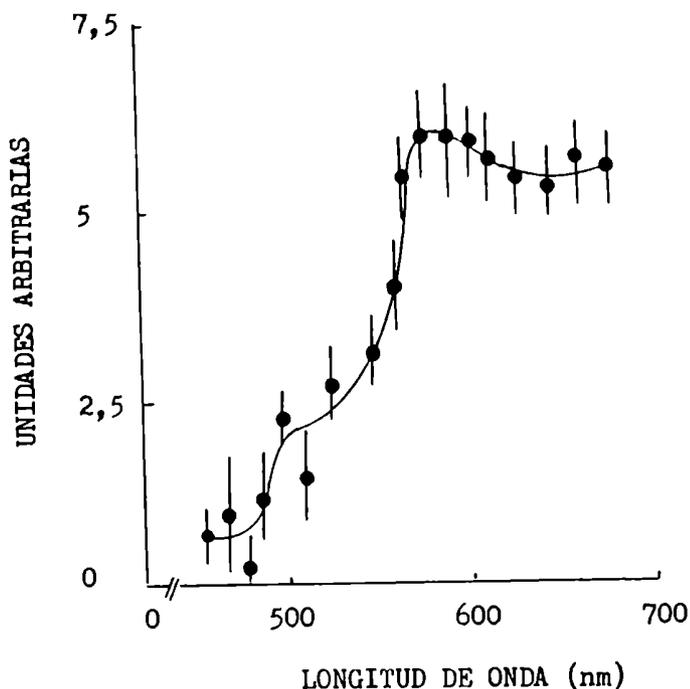


Fig. 37. Distribución espectral de la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidróperóxido de ter-butilo 5 mM.

la longitud de onda del 95 % de la emisión de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de oxígeno está comprendida entre 500 y 700 nm. La distribución espectral de esta emisión presenta un hombro suave en 470 - 500 nm y dos máximos centrados en 575 y 640 nm (Fig. 13). El espectro de la emisión de homogeneizados de cerebro de rata en presencia de hidróperóxido de ter-butilo es semejante al ya descrito.

Entre el 80 y el 90 % de la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidróperóxido de ter-butilo y oxígeno está comprendida entre los 450 y 700 nm, con un 10 - 12 % de la emisión detectada a longitudes de onda mayores que 710 nm. La distribución espectral de esta emisión presenta dos máximos centrados en 500 y 600 nm (Fig. 37). El espectro de la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de oxígeno presenta características semejantes al de los mismos homogeneizados suplementados con hidróperóxido de ter-butilo.

En homogeneizados de hígado de rata suplementados con hidróperóxido de ter-butilo el Diazo-biciclo-octano (DABCO) aumenta la emisión con un efecto máximo

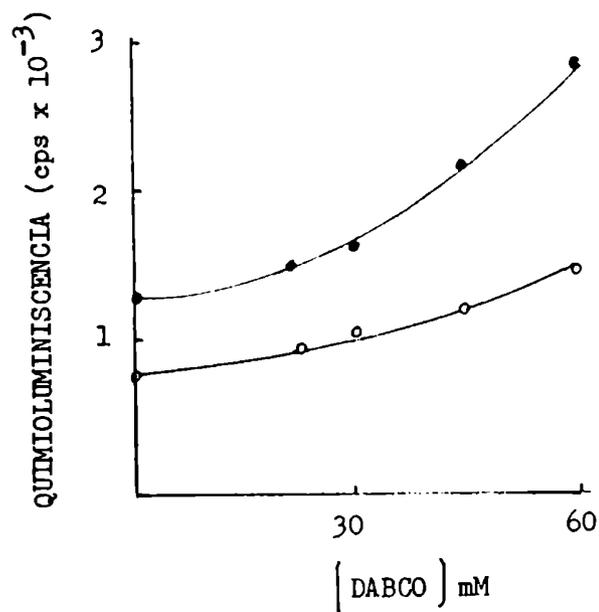


Fig. 38. Efecto del DABCO sobre la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de hidropéroxido de ter-butilo 5 mM; (○) fase 1; (●) fase 3.

de 20 % a una concentración de 60 mM alterando significativamente la cinética de la emisión.

La presencia de las bandas de emisión a 640 y 710 nm, con un aumento de la emisión en presencia de Diazo-biciclo-octano sin que éste produzca alteraciones espectrales indicaría que la especie fotoemisiva es oxígeno singulete (Deneke y Krinsky, 1977). Debido al bajo aumento porcentual en la emisión total y el ancho de las bandas espectrales descritas (Fig. 37), cualquier alteración en el espectro producida por dicha droga quedaría enmascarada por el error experimental. Sin embargo la alteración considerable en la cinética de la reacción, hace suponer que el Diazo-biciclo-octano en este caso actuaría a través de un mecanismo diferente que la acción sobre oxígeno singulete. En homogeneizados de hígado de rata suplementados con hidropéroxido de ter-butilo 5 mM y en presencia de O<sub>2</sub>, el DBAS (di-bromo-antraceno sulfonato) que aumenta la emisión debido a carbonilos tripletes, no tuvo efecto sobre la misma.

#### 4.4 QUIMIOLUMINISCENCIA DE HIGADO DE RATA IN SITU.

##### 4.4.1 Inducción de la emisión por halometanos.

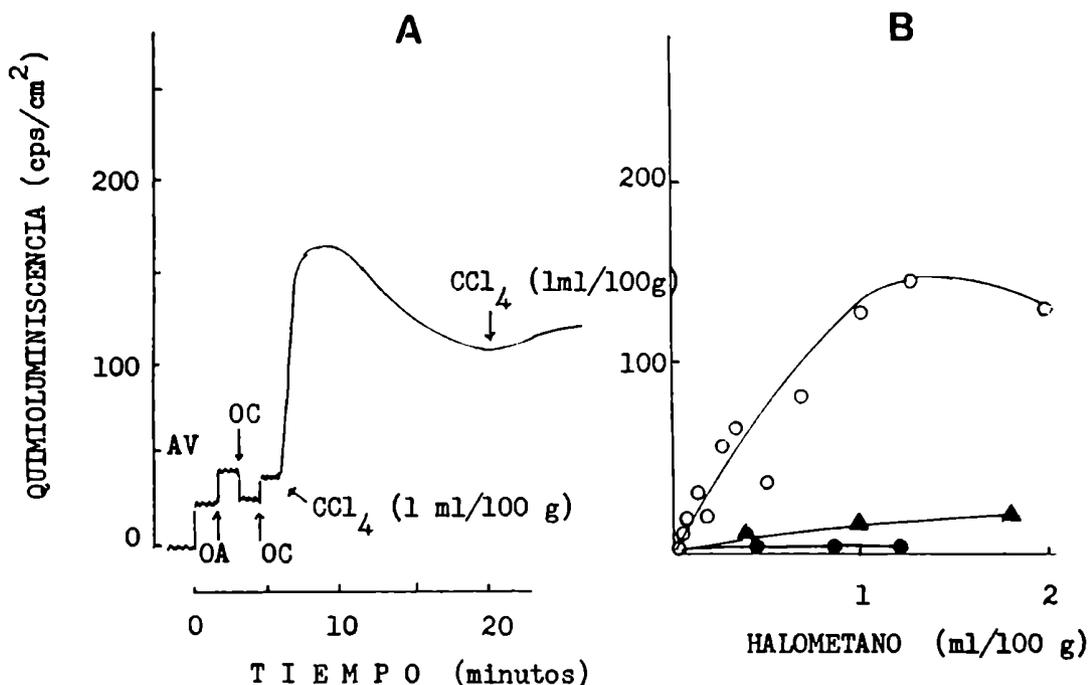


Fig. 39. A - Emisión espontánea e inducida por  $\text{CCl}_4$  de hígados de rata "in situ"  
 OA = obturador abierto  
 OC = obturador cerrado — AV = alto voltaje  
 B - Dependencia entre la emisión máxima de hígado de rata "in situ" y  
 la dosis de haloalcano inyectada intraperitonealmente (○)  $\text{CCl}_4$ ;  
 (▲)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (●)  $\text{CHCl}_3$

Se sabe que el  $\text{CCl}_4$  se metaboliza en el hígado a través de un mecanismo de radicales libres. Sin embargo dada la inestabilidad de los radicales que se formarían, este mecanismo no es el favorecido en la metabolización de  $\text{CHCl}_3$  y de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Recknagel y col., 1977). Esto convierte al hígado "in situ" de ratas inyectadas con halometanos en un sistema adecuado para estudiar la dependencia entre el metabolismo de radicales libres en órganos de animales vivos y su emisión luminosa.

El hígado de ratas normales anestesiadas presenta una emisión basal baja (10 cps/cm<sup>2</sup>).

La inyección intraperitoneal de  $\text{CCl}_4$  produce un rápido aumento en esta emisión (Fig. 39 A). El tiempo que transcurre entre que se inyecta el  $\text{CCl}_4$  y aumenta la señal oscila entre 45 y 70 segundos, alcanzándose un máximo de emisión a los 2 - 4 minutos de inyectado el  $\text{CCl}_4$ . Esta emisión decae en pocos minutos hasta un valor constante que se mantiene por un tiempo variable y que depende del

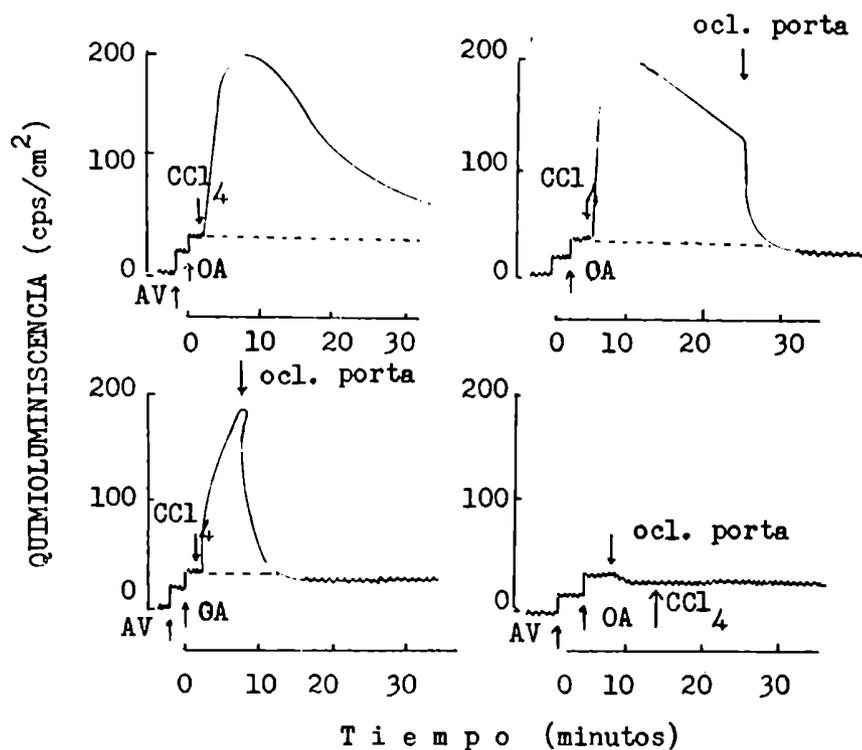


Fig. 40. Efecto sobre la emisión de hígado de rata "in situ" del bloqueo de la circulación a través de la vena porta antes o después de administrar intraperitonealmente  $\text{CCl}_4$  (1 ml/100 g de peso). OA = Obturador abierto. OC = Obturador cerrado. Ocl. porta = oclusión de la vena porta. AV = Alto voltaje

estado del animal. La inyección de una segunda dosis de  $\text{CCl}_4$  produce una respuesta menor que la primera inyección a igualdad de dosis (Fig. 39 A). El valor máximo de la emisión depende de la dosis de  $\text{CCl}_4$  aumentando en forma casi lineal hasta 1 ml  $\text{CCl}_4$ /100 g de peso, saturando con dosis mayores. La inyección de  $\text{CHCl}_3$  no produce efecto sobre la emisión luminosa y el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tiene un efecto muy débil, aún a concentraciones altas (Fig. 39 B).

La emisión inducida por  $\text{CCl}_4$  depende de que haya circulación de sangre por el hígado. Tanto la muerte del animal como el bloqueo de la circulación a través de la vena porta en cualquier momento después de haber inyectado el halometano hacen caer la emisión a valores cercanos a cero. Si dicho bloqueo se realiza antes de inyectar el  $\text{CCl}_4$  o se inyecta el  $\text{CCl}_4$  a un animal muerto no se detecta emisión luminosa (Fig. 40).

TABLA IV

Tratamiento	Emisión espontánea (cps/cm <sup>2</sup> )		Emisión inducida por CCl <sub>4</sub> (1 ml/100 g) (cps/cm <sup>2</sup> )	
	Control	Tratada	Control	Tratada
Hipoxia Hipóxica	17,5 ± 1,3 (5)	13,2 ± 1,2 (7)	55 ± 6 (4)	26 ± 2 (5)
Alcohol crónico (10 semanas)	19,6 ± 2,5 (5)	22,6 ± 1,5 (5)	33 ± 7 (8)	48 ± 5 (7)
Alcohol crónico (20 semanas)	20,1 ± 1 (6)	15,2 ± 1,2 (7)	—	—

TABLA IV. Emisión espontánea e inducida por CCl<sub>4</sub> en hígados "in situ" de ratas controles, hipóxicas y tratadas crónicamente con alcohol.

La emisión del intestino (que absorbe pero no metaboliza al CCl<sub>4</sub>) a los 12 minutos de haber administrado 1 ml de CCl<sub>4</sub>/100 g de peso y con una emisión en hígado de 86 cps/cm<sup>2</sup> era de 8 cps/cm<sup>2</sup>. La emisión de intestino en ausencia de CCl<sub>4</sub> es del orden de 10 cps/cm<sup>2</sup> (Tabla VI).

La emisión medida en hígado corresponde a  $10^{-12}$  -  $10^{-14}$  fotones/molécula de CCl<sub>4</sub> administrado.

I. Emisión inducida por CCl<sub>4</sub> en condiciones en que el citocromo P450 está aumentado. Se postula que el daño hepático producido en el alcoholismo crónico experimental se debe a un aumento en los niveles de peroxidación lipídica (Di Luzio, 1973). Se sabe además que está aumentada la actividad específica del sistema microsomal NADPH-dependiente (Thurman, 1973) y la masa del retículo endoplásmico y el contenido de citocromo P450 (Lieber y de Carli, 1970). Esto último produciría en los niveles de emisión luminosa un incremento en la velocidad de metabolización del CCl<sub>4</sub> que se reflejaría en los mismos. La emisión luminosa de hígados de ratas tratadas crónicamente con alcohol e inyectadas con 1 ml/kg de peso de CCl<sub>4</sub> es de 48 ± 5 cps/cm<sup>2</sup> (7 animales) y el de los animales control es de 33 ± 7 cps/cm<sup>2</sup> (8 animales) o sea, un aumento de 1,45 veces (p < 0,01) en la emisión luminosa (Tabla IV).

En la hipoxia hipóxica también hay un leve incremento en los niveles de

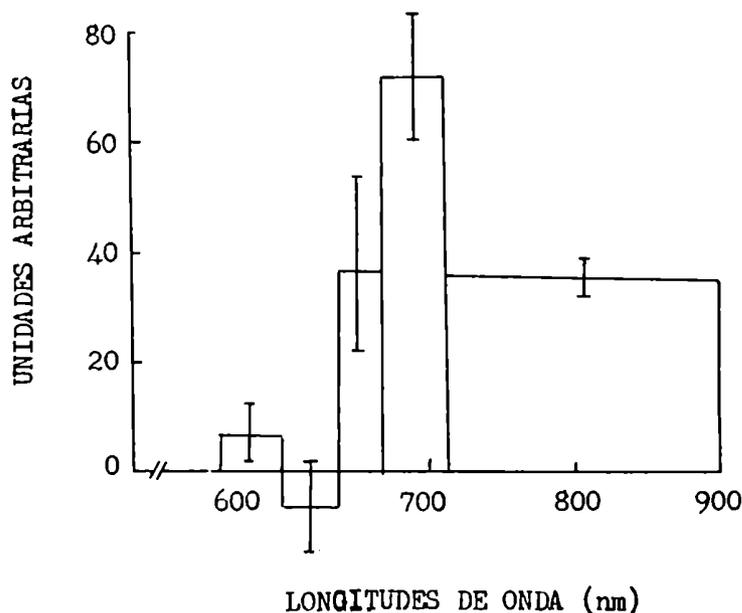


Fig. 41. Distribución espectral de la emisión inducida por el  $\text{CCl}_4$  de hígado de rata "in situ".

citocromo P450. Sin embargo en este caso la emisión inducida por 1 ml de  $\text{CCl}_4/100$  g de peso fue de  $26 \pm 2$  cps/cm<sup>2</sup> para animales hipóxicos y de  $55 \pm 6$  cps/cm<sup>2</sup> para animales control (5 y 4 animales respectivamente), lo cual indica una disminución de aproximadamente dos veces en la emisión. Este hecho es consecuencia de que otros factores (como aporte de oxígeno al órgano) también influyen en los niveles de fotoemisión.

II. Análisis espectral y efecto del DABCO sobre la emisión de hígado de rata "in situ" inducida por  $\text{CCl}_4$ . La distribución espectral de la emisión de hígado de rata "in situ" inducida por  $\text{CCl}_4$  (Fig. 41) indica que el  $90 \pm 10$  % de la misma es la longitud de onda mayor que 600 nm con un  $39 \pm 4$  % de la emisión detectada por encima de 715 nm.

La alta contribución de fotones de longitudes de onda mayores que 700 nm permiten considerar la posibilidad de que parte de la luz detectada pueda deberse a la emisión bimolecular de oxígeno singuleto. Si es así el DABCO debe aumentar la emisión pero no alterar su distribución espectral (Deneke y Krinsky, 1977). La administración de DABCO sobre la superficie del hígado no produce efecto sobre la emisión. Si bien la administración intraperitoneal de DABCO produce un

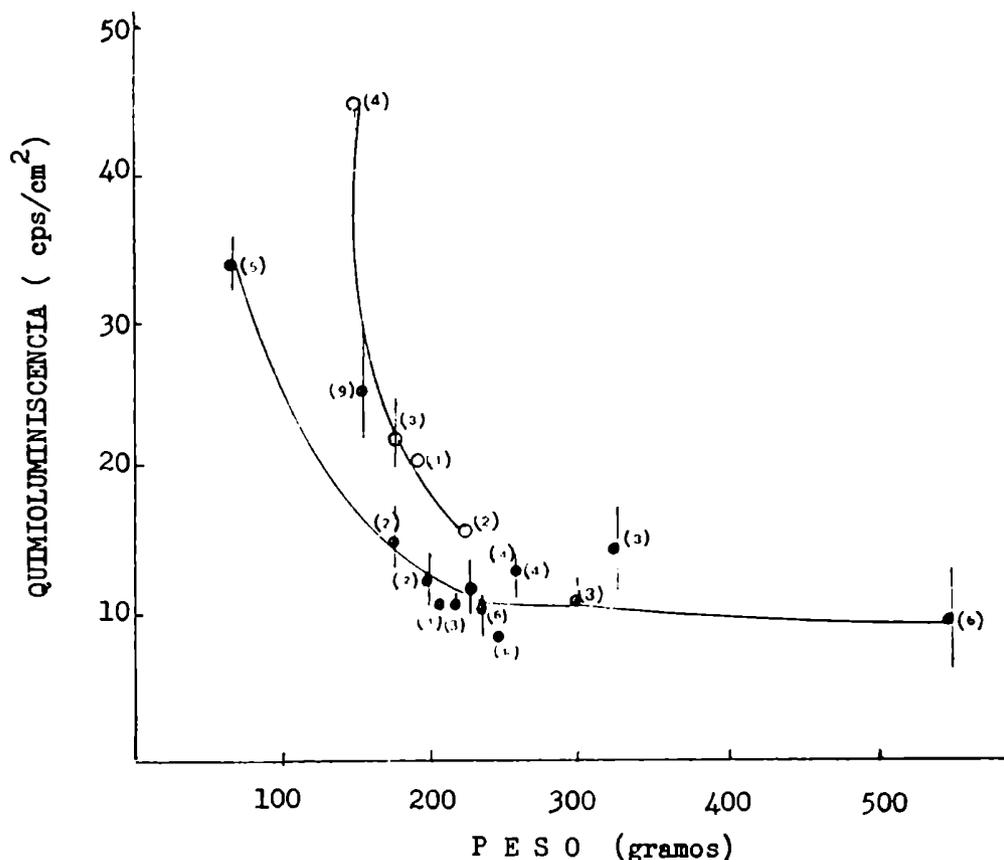


Fig. 42. Dependencia de la emisión espontánea de hígado de rata "in situ" con el peso del animal en presencia (○) y ausencia (●) de DABCO (0,18 m moles/100 g) inyectado intraperitonealmente.

aumento de  $30 \pm 5 \%$  en la emisión luminosa de hígado ( $p < 0,02$ ). Este incremento no permitiría detectar eventuales alteraciones en la distribución espectral debido a los altos errores experimentales en la obtención de los espectros.

#### 4.4.2 Emisión espontánea de hígado de rata "in situ".

La emisión espontánea de hígado de rata "in situ" es del orden de  $10 \text{ cps/cm}^2$  para ratas de peso mayor que 200 gramos. La emisión expresada por unidad de área, depende del peso del animal, habiendo una gran disminución en los valores medidos cuando el peso aumenta de 60 a 150 gramos, estabilizándose a partir de los 200 gramos hasta los 550 gramos. (Fig. 42).

##### I. Dependencia de la emisión espontánea con el aporte de oxígeno al hígado.

La emisión luminosa depende de que haya circulación de sangre por el hígado. Al cortar la circulación por la arteria hepática la emisión disminuye a un 70 %

TABLA V

	Porcentaje de la emisión espontánea
Emisión espontánea	100
Ligando la arteria hepática	64 ± 8 (3)
Ligando la arteria hepática y la vena porta	24 ± 10 (3)
Liberando la circulación por la vena porta	91 ± 17 (3)
Ligando nuevamente la vena porta	20 ± 10 (3)
Animal muerto	5 ± 10 (3)

TABLA V. Efecto del bloqueo de la circulación sanguínea por arteria hepática y/o la vena porta sobre la emisión espontánea del hígado de rata "in situ". Los valores indicados son  $\bar{x} \pm$  error standard de la media. Los números entre paréntesis indican el número de animales experimentados.

del valor inicial (Tabla V); si se corta la circulación por la arteria hepática y la vena porta simultáneamente la emisión cae a valores cercanos a cero. Si se libera la circulación por la vena porta la emisión vuelve a un valor cercano al inicial. Ligando nuevamente la vena porta la emisión vuelve a caer a cero. En el momento en que el animal muere la emisión también cae a cero (Tabla V).

II. Emisión espontánea de hígado de ratas hipóxicas y alcohólicas. La emisión espontánea de hígados de ratas hipóxicas es levemente menor que la de hígados de ratas normales (Tabla IV). Como estos animales tienen poliglobulia (por lo cual el aporte de oxígeno al hígado no estaría fundamentalmente alterado) y las alteraciones metabólicas debidas a la hipoxia no son marcadas, estos resultados eran esperables.

Se postula que el alcoholismo crónico experimental produce un aumento en la lipoperoxidación en hígado (Sies y col., 1979). La emisión de fotones en hígados de ratas sometidas a tratamiento crónico con alcohol comparada con la de animales controles depende del tiempo de tratamiento con alcohol y de las condiciones de alimentación del animal en el momento de realizar las mediciones

TABLA VI

ORGANO	EMISION (cps/cm <sup>2</sup> )
Músculos del cuello	14 ± 3 (2)
Músculos abdominales	15 ± 1 (6)
Intestino delgado	17 ± 1 (5)
Hígado	13 ± 2 (5)
Cerebro	100*

\* de Boveris y col., 1981

TABLA VI. Emisión espontánea en diferentes órganos de rata. Los valores indicados corresponden a  $\bar{x} \pm \text{ESM}$ ; los números entre paréntesis indican la cantidad de animales experimentales.

(ayuno de 24 horas o no) en el momento de hacer la medición. Cuando el animal tiene 10 semanas de alcoholización y las medidas se realizan sin ayuno previo no hay diferencias entre animales control o tratados con alcohol. En animales de 20 semanas de alcoholización, sin ayuno, hay un 25 % de disminución en la emisión espontánea (Tabla IV). Estos resultados son alterados si el animal ha sido sometido a 24 horas de ayuno.

III. Emisión en otros órganos. La emisión espontánea de fotones no es característica privativa del hígado. El cerebro, el intestino y el músculo también tienen una emisión detectable (Tabla VI), la cual expresada por unidad de área decrece en el orden indicado.

Las emisiones de músculo y de hígado son semejantes entre sí (Tabla VI). El cerebro, con un nivel de antioxidantes bajo y un nivel de prooxidantes relativamente alto (Sinet y col., 1980), es el órgano de mayor emisión por unidad de área. Dado su pequeño tamaño, las lecturas siempre son bajas, lo cual limita las posibilidades experimentales.

IV. Análisis espectral y efecto de DABCO sobre la emisión espontánea de hígado de rata "in situ". El análisis espectral de la emisión espontánea de hígado de rata "in situ" es semejante al de la emisión inducida por  $\text{CCl}_4$ . To-

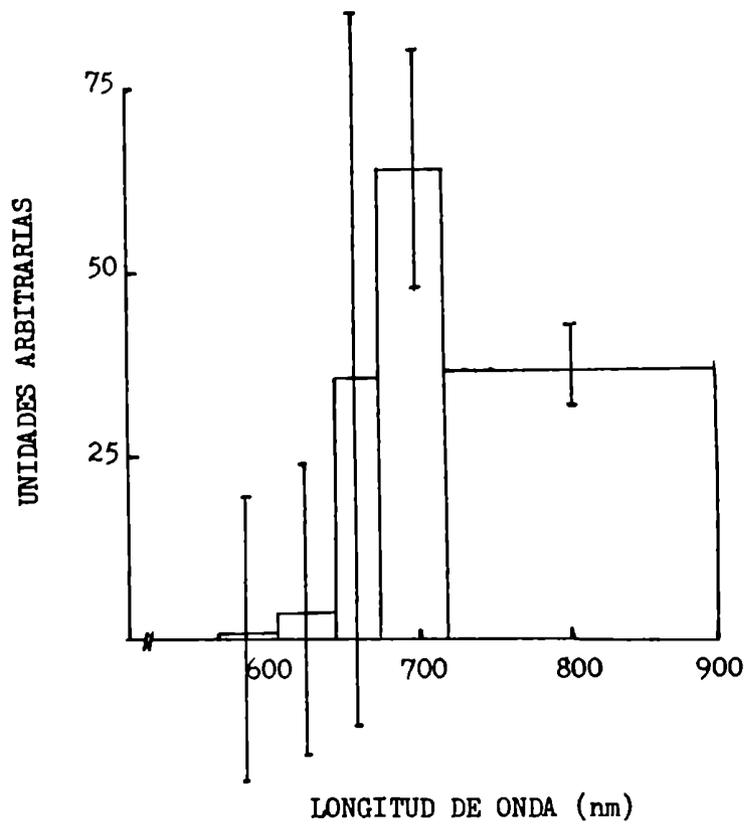


Fig. 43. Distribución espectral de la emisión espontánea de hígado de rata "in situ".

da la emisión es de longitudes de onda mayores que 715 nm (Fig. 43).

La administración intraperitoneal de DABCO aumenta la emisión espontánea de hígado de rata en un 20 - 50 % con un grado bajo de significación estadística ( $p < 0,3$ ).

CAPITULO V

QUIMIOLUMINISCENCIA DE  
BAJA INTENSIDAD EN PLANTAS

## INTRODUCCION

La lipoxigenasa, enzima presente en las semillas de soja, cataliza la reacción



donde LH representa un ácido graso insaturado, LOOH es un hidroperóxido de dicho ácido y LOX es lipoxigenasa. Si bien el sustrato específico de la lipoxigenasa es el ácido linoleico, otros ácidos grasos insaturados reaccionan eficientemente con esta enzima. La reacción (49) es fotoemisiva (Boveris y col., 1980 b).

Dada la importancia de esta enzima en el metabolismo oxidativo de semillas de soja, se la seleccionó como sistema modelo para el estudio de la emisión de las mismas; con grado de complejidad creciente se estudió la emisión de suspensiones de partículas de soja ("harina"), homogeneizados de semillas y de las semillas enteras.

Los estudios que se realizaron en los casos donde el sistema lo permitió fueron:

- i) descripción de la emisión espontánea (en ausencia de activadores o inhibidores.
- ii) efecto de la temperatura sobre la emisión.
- iii) dependencia de la emisión con el oxígeno y efecto de activadores e inhibidores.
- iv) estudio de la distribución espectral de la emisión.

## 5.1 SISTEMAS MODELO: LIPOXIGENASA SUPLEMENTADA CON ACIDO LINOLEICO

En la reacción (49) se consume oxígeno y se producen especies electrónicamente excitadas (Boveris y col., 1980 b) por lo cual se la puede estudiar a través de la medida de los fotones emitidos o del oxígeno consumido.

Se midió la emisión de esta reacción en un contador de centelleo (Nuclear Chicago) o en un contador de fotones (Johnson Foundation). La reacción se llevó a cabo en un medio regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6,6 a 37°C. Las reacciones se iniciaron por agregado de sustrato (ácido linoleico) a la enzima disuelta en 4 ml de medio. En el contador de centelleo las lecturas se realizaron durante 24 segundos.

La emisión de fotones depende de las concentraciones de sustrato y de enzima (Fig. 16) saturando a 50  $\mu$ g/ml de ácido linoleico y dependiendo linealmente de la concentración de enzima.

### 5.1.1 Efecto de inhibidores sobre la reacción de lipoxigenasa con ácido linoleico.

La actividad de lipoxigenasa medida como consumo de oxígeno es inhibida por el ácido salicilhidroxámico (SHAM) (Parrish y Leopold, 1978). En una preparación de lipoxigenasa 25  $\mu$ g/ml y ácido linoleico 50  $\mu$ g/ml el SHAM inhibe la fotoemisión en un 60 % y el consumo de oxígeno en un 93 %. El cianuro de potasio, que no inhibe la actividad enzimática medida como consumo de oxígeno (Parrish y Leopold, 1978), inhibe la quimioluminiscencia en un 72 % (Fig. 44).

### 5.1.2 Dependencia de la emisión de la reacción de la lipoxigenasa con la temperatura.

En un medio conteniendo lipoxigenasa y ácido linoleico el ácido graso puede oxidarse tanto por catálisis enzimática como por procesos de autoxidación no enzimáticos. Como la dependencia de ambos procesos con la temperatura es diferente, las condiciones en que se lleva a cabo la reacción pueden favorecer un proceso u otro.

La curva de dependencia de la emisión de lipoxigenasa con ácido linoleico con la temperatura se realizó en el contador de fotones Johnson Foundation que permite la termostatación de la muestra. Las reacciones se llevaron a cabo termostatación 5 minutos con burbujeo de aire a la temperatura deseada:

- a) una suspensión de ácido linoleico 30  $\mu$ M en fosfato de potasio 50 mM, pH 7,2.
- b) una suspensión de 100  $\mu$ g/ml de lipoxigenasa en el mismo medio
- c) ambos reactivos a la vez por separado (ácido linoleico 60  $\mu$ M y lipoxigenasa 200  $\mu$ g/ml).

Las reacciones se iniciaron en (a) y en (b) agregando el reactivo que fal-

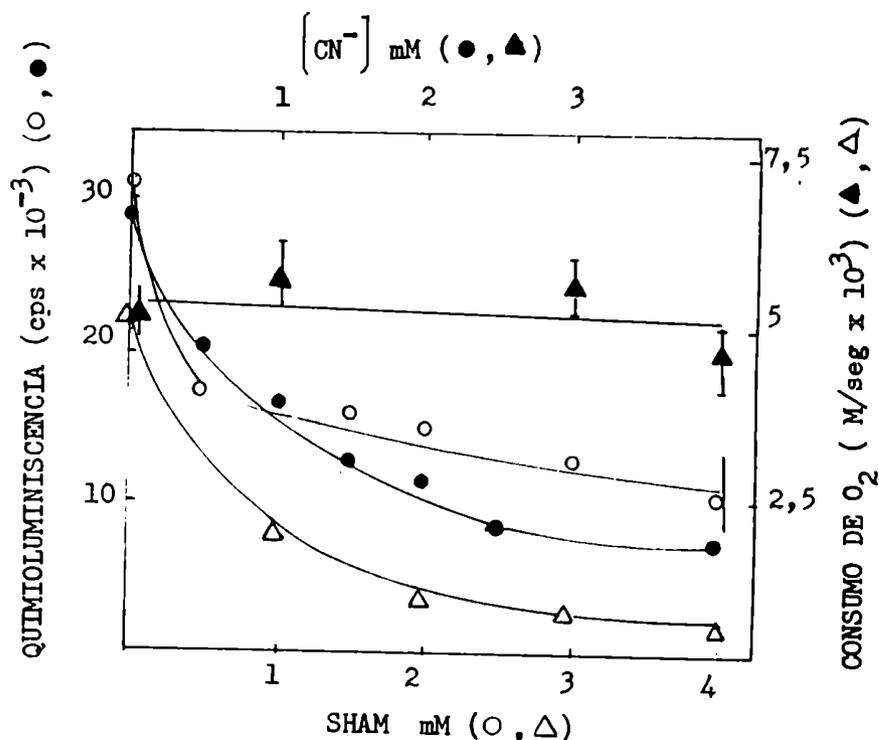


Fig. 44. Efecto del cianuro de potasio y del SHAM sobre el consumo de oxígeno y la emisión de lipoxigenasa (25  $\mu$ g/ml) en presencia de ácido linoleico (50  $\mu$ g/ml).

ta a la mezcla preincubada y en (c) mezclando volúmenes iguales de las mezclas preincubadas. El objetivo de estas preincubaciones es determinar la dependencia con la temperatura de la autooxidación no enzimática (a), de la oxidación enzimática (b) y de ambos procesos a la vez (c).

En una curva de dependencia con la temperatura obtenida en la primera condición, la emisión aumenta constantemente hasta 52°C. Un diagrama de Arrhenius muestra un cambio de pendiente a 35°C, con energías de activación de 20 y 68 kJ/mol por debajo y por encima de dicha temperatura respectivamente (Fig. 45 B). Cuando se preincuba sólo la enzima a la temperatura de ensayo se observa una temperatura óptima de 39°C y cuando se realiza tanto la preincubación del sustrato como la de la enzima se obtiene una dependencia con la temperatura que es una combinación de las dos curvas anteriores (Fig. 45 B) con una temperatura óptima de 32°C pero con un aumento en la emisión para temperaturas mayores que 40°C. Un comportamiento análogo se observa cuando se mide el consumo de oxígeno a distintas temperaturas.

### 5.1.3 Análisis espectral parcial de la emisión de lipoxigenasa con ácido linoleico.

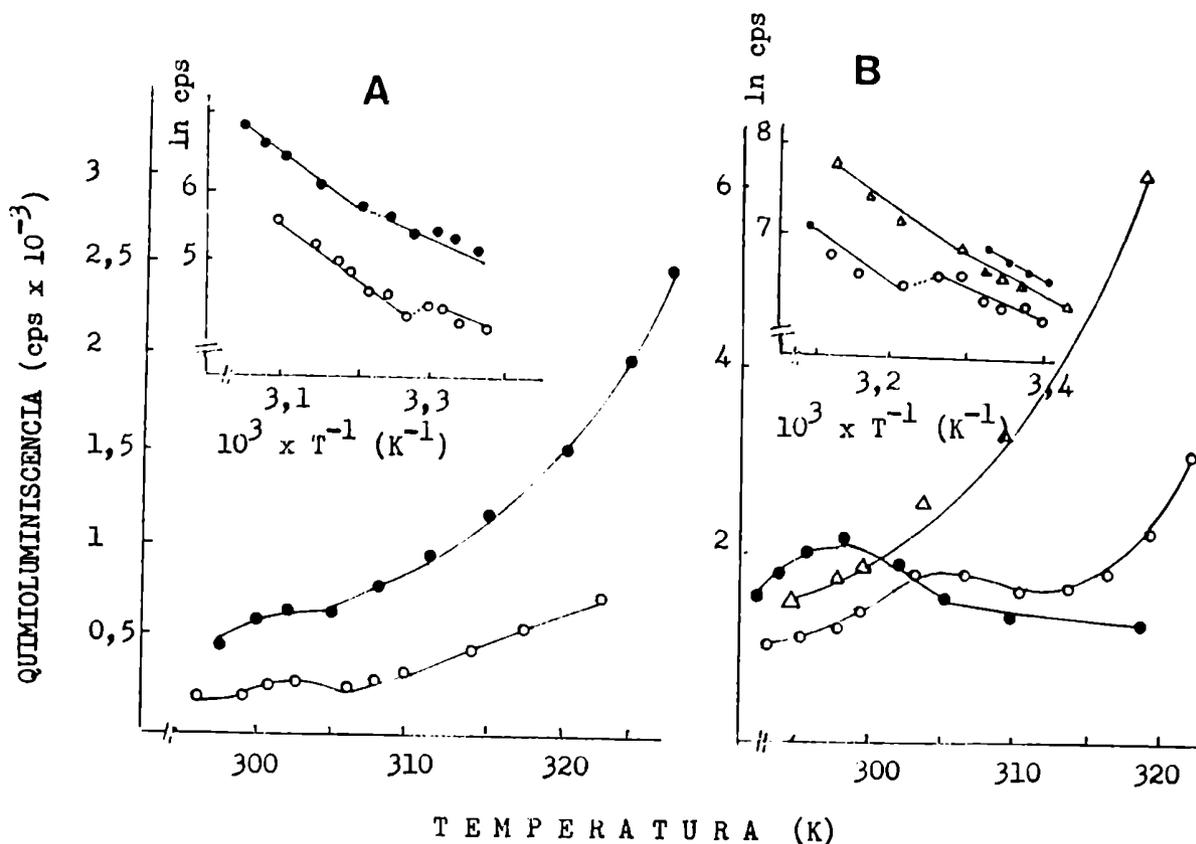


Fig. 45. A - Efecto de la temperatura sobre la emisión de semillas de soja secas (O) y mojadas (●) y diagrama de Arrhenius correspondiente. B - Dependencia con la temperatura de la emisión de lipoxigenasa suplementada con ácido linoleico preincubado a la temperatura de ensayo sólo el sustrato ( $\Delta$ ), sólo la enzima (●) y tanto la enzima como el sustrato (O).

La Tabla VII muestra el análisis espectral parcial (usando filtros de bandas anchas) de la emisión de lipoxigenasa. Es importante notar que el 43 % de la emisión detectada está a longitudes de onda mayores que 600 nm.

## 5.2 HOMOGENEIZADOS Y SUSPENSIONES DE PARTICULAS DE SOJA.

La emisión de suspensiones de partículas y de homogeneizados de semillas de soja se midió a temperatura ambiente en un contador de centelleo (Nuclear Chicago) en dos condiciones: con y sin suplementación del sistema con ácido linoleico (sustrato de la enzima lipoxigenasa).

Las reacciones con harina de semillas se iniciaron suspendiendo 70 - 80 mg de material/ml de solución en un medio fosfato 50 mM, pH 7,0. La quimioluminiscencia de los homogeneizados se inició por dilución en el mismo medio en que

TABLA VII

	F I L T R O			
	Azul (460 ± 35 nm)	Azul - verde (500 ± 20 nm)	Verde (520 ± 30 nm)	Rojo (620 ± 20 nm)
Semillas enteras	26	8	25	51
Partículas	37	7	12	44
Homogeneizados	31	12	21	35
Lipoxigenasa	30	9	18	43

TABLA VII. Distribución espectral parcial de la emisión de lipoxigenasa en presencia de ácido linoleico, homogeneizados, suspensiones, harina y semillas de soja. La distribución se obtuvo usando filtros de bandas anchas.

fueron preparados. Cuando se usó ácido linoleico la concentración final fue de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se tomaron lecturas los primeros 24 segundos de reacción.

La emisión de semillas de soja, suspensiones de partículas y homogeneizados (en ausencia de sustrato exógeno) aumenta en ese orden. La emisión de las suspensiones de partículas y de los homogeneizados depende linealmente con la concentración de tejido hasta 8 mg/ml (con una pendiente de 10 cps/mg de tejido) y 4 mg/ml (con una pendiente de 200 cps/mg de tejido) respectivamente. Comparando sus emisiones las suspensiones de semillas de soja son 2800 veces más efectivas que las semillas enteras; en cambio los homogeneizados son sólo 20 veces más efectivos que las suspensiones de partículas (Fig. 46). Aparentemente la destrucción del tejido hace más accesibles los componentes que originan la reacción quimioluminiscente.

#### 5.2.1 Características de la emisión de homogeneizados de semillas de soja.

Desde un punto de vista cinético, mientras la emisión de semillas es constante, la señal quimioluminiscente de los homogeneizados alcanza un valor máximo a los 30 - 40 segundos de iniciada la reacción (por dilución y calentamiento) decayendo luego hasta un valor nulo en 5 - 10 minutos. El valor de la emisión máxima disminuye con el tiempo de preparación de los homogeneizados como conse-

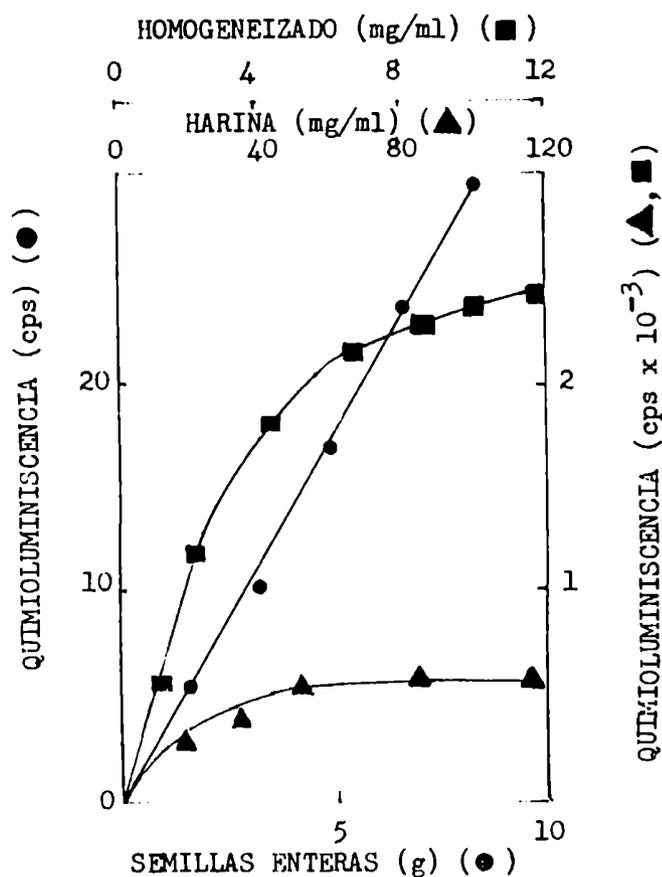


Fig. 46. Emisión de homogeneizados (■), suspensiones (▲) y semillas de soja (●) en función de la cantidad de tejido.

cuencia del consumo lento de los sustratos endógenos. La adición de ácido linoleico (30 - 40  $\mu\text{g/ml}$ ) a un homogeneizado de semillas de soja aumenta la emisión de 2 a 3 veces, inhibiéndola a concentraciones mayores. El consumo de oxígeno, casi nulo en ausencia de ácido linoleico, también se estimula en presencia del mismo (Fig. 47).

I. Efecto de inhibidores y activadores sobre la emisión de homogeneizados de semillas de soja. El ácido salicilhidroxámico (SHAM), que inhibe la actividad de lipoxigenasa (Parrisch y Leopold, 1978), inhibe en un 70 - 80 % la quimioluminiscencia de homogeneizados de semillas en presencia de ácido linoleico y sólo un 30 - 50 % en su ausencia. El consumo de oxígeno en presencia de ácido linoleico es inhibido en un 60 - 75 % (Fig. 48). La emisión de suspensiones de harina de soja también es inhibida por el SHAM.

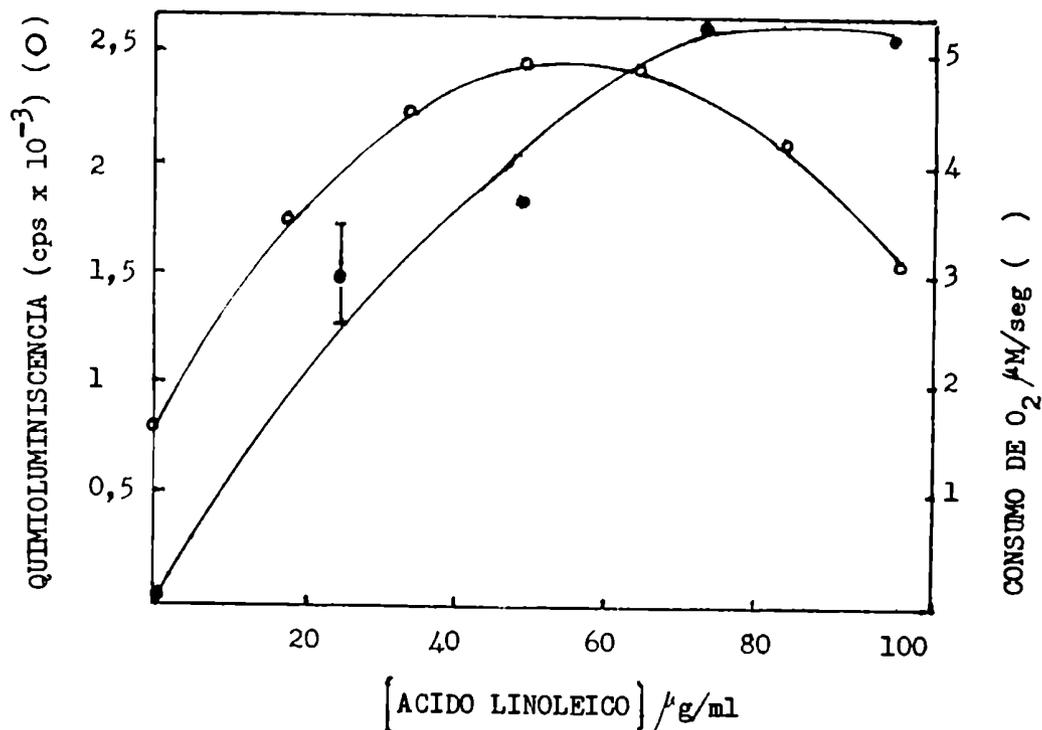


Fig. 47. Dependencia de la emisión luminosa (O) y del consumo de oxígeno (●) de homogeneizados de semillas de soja con la concentración de ácido linoleico.

El cianuro de potasio (que no tiene efecto sobre la actividad de lipoxigenasa, Parrisch y Leopold, 1978) inhibe en un 20 - 40 % la emisión de los homogeneizados estando suplementados o no con ácido linoleico. El consumo de oxígeno en presencia de ácido linoleico es inhibido sólo en un 10 - 13 % (Fig. 48).

La superóxido dismutasa inhibe en un 30 - 35 % la emisión de homogeneizados en presencia de ácido linoleico y un 20 % en su ausencia (Fig. 49 B).

El etanol, que es un atrapador eficiente del radical OH<sup>•</sup> (Dorfman y Adams, 1973) no tiene efecto sobre la emisión de homogeneizados en presencia de ácido linoleico hasta una concentración de 400 mM, pero en ausencia de sustrato activa la emisión 1,3 veces. El DABCO, que cuando aumenta la emisión debida a la emisión bimolecular de oxígeno singulete no altera sus características espectrales (Deneke y Krinsky, 1977), activa 1,4 y 4,2 veces la quimioluminiscencia de los homogeneizados en ausencia y en presencia de ácido linoleico respectivamente (Fig. 49 A).

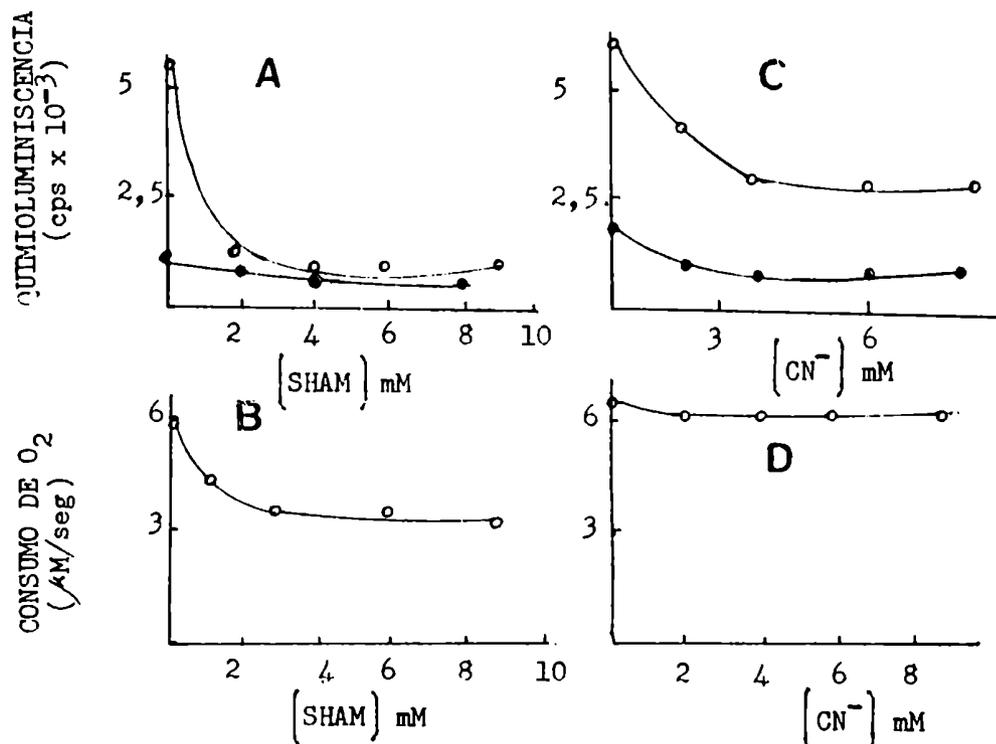


Fig. 48. A - Efecto del SHAM sobre la emisión luminosa de homogeneizados de semilla de soja en presencia (○) y ausencia (●) de ácido linoleico (50 μg/ml).  
 B - Efecto del SHAM sobre el consumo de oxígeno de homogeneizados de semillas de soja en presencia de ácido linoleico (50 μg/ml).  
 C - Efecto del CNK sobre la emisión de homogeneizados de semillas de soja en presencia (○) y ausencia (●) de ácido linoleico (50 g/ml).  
 D - Efecto del CNK sobre el consumo de oxígeno de homogeneizados de semillas de soja en presencia de ácido linoleico (50 μg/ml).

II. Análisis espectral parcial de la emisión de homogeneizados de semillas de soja. El análisis espectral parcial de la emisión de semillas de soja y sus fracciones se obtuvo empleando filtros de acetato de bandas anchas. La luz roja es predominante tanto en las semillas como en sus fraccionamientos (Tabla VII) a pH 6,6. La emisión en otras bandas es parecida siendo más importante la banda verde (520 ± 30 nm) que la azul-verde (500 ± 20 nm lo cual indicaría un mínimo en esta zona.

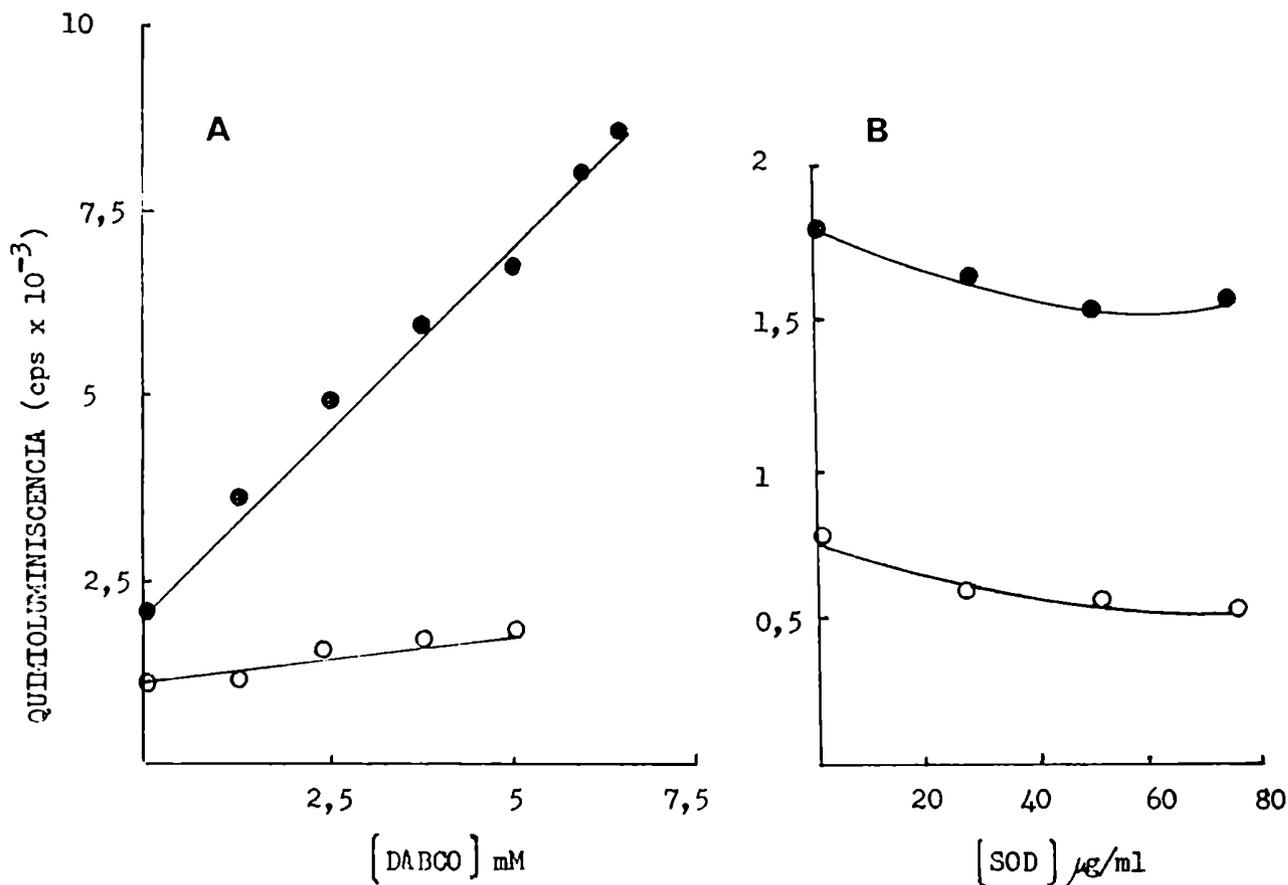


Fig. 49. Efecto del DABCO (A) y de la superóxido dismutasa (B) sobre la emisión de homogeneizados de semillas de soja en presencia (●) y en ausencia (○) de ácido linoleico (50 g/ml).

III. Dependencia de la emisión de homogeneizados de semillas de soja con el pH. La emisión de homogeneizados de semillas de soja sin el agregado exógeno de ácido linoleico tiene dos pH óptimos: 6,6 y 8,9 (Fig. 50). El pH interno de las semillas es próximo al menor de estos valores: una suspensión de partículas de 20 - 100 mg/ml en agua destilada tiene un pH de 6,5. Se sabe que la actividad de la enzima lipoxigenasa presenta dos pH óptimos 6,7 y 9 (Tappel, 1970). La longitud de onda predominante en la emisión depende del pH (Fig. 50). Empleando filtros de acetato de banda ancha se observa que la emisión roja es más importante a pH 6,5 en tanto que a pH 7,5 - 8,5 la luz predominante es azul ( $460 \pm 35$  nm). Es importante tener en cuenta que cuanto mayor es el pH del medio, mayor es la concentración de carbonato en el medio y que la emisión del carbonilo excitado está en la zona de 400 - 500 nm.

### 5.3 EMISION ESPONTANEA DE SEMILLAS DE SOJA.

La quimioluminiscencia de semillas de soja enteras se midió en todos los instrumentos mencionados. En el contador de fotones Johnson Foundation se usó

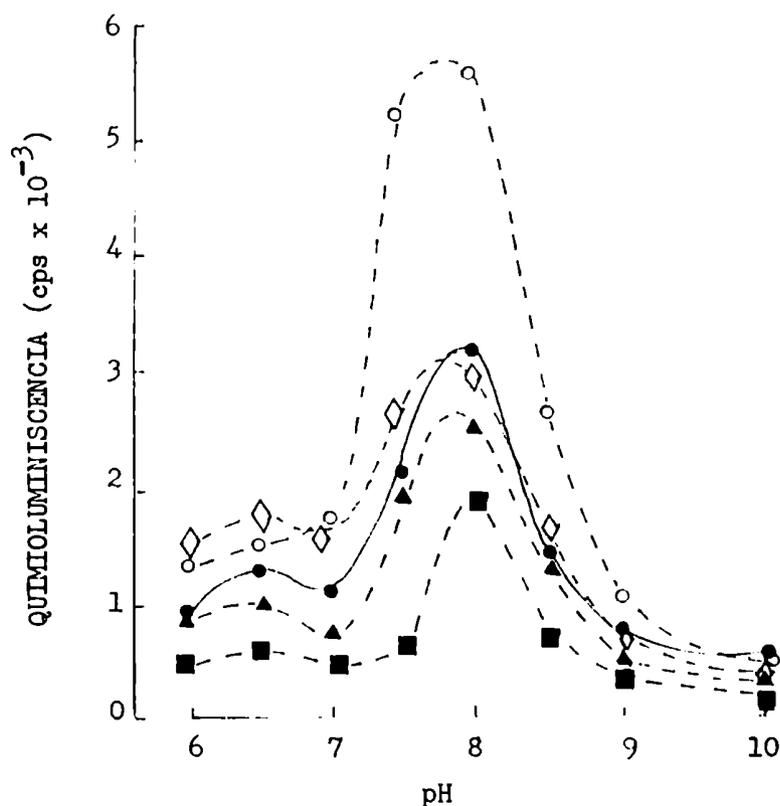


Fig. 50. Efecto del pH sobre la emisión y su distribución espectral en homogeneizados de semillas de soja. Emisión sin filtro (●), en presencia de filtro rojo ( $620 \pm 20$  nm; ◇), azul ( $460 \pm 35$  nm; ○), verde ( $520 \pm 30$  nm; ▲) y azul-verde ( $500 \pm 20$  nm ■).

una cubeta especial de 6 x 4 x 1 cm.

La emisión de semillas de soja es de muy baja intensidad (Tablas I y VIII) y no dependen mayormente de la variedad de semilla estudiada. Los tegumentos, cotiledones y embriones obtenidos de las semillas, también emiten fotones espontáneamente (Tabla VIII).

Al humedecer las semillas con agua, agua pesada o solventes orgánicos, la emisión aumenta y mantiene valores constantes por tiempos mayores que 2 horas. El aumento porcentual de la emisión depende de la forma en que se pongan en contacto las semillas con el solvente: la emisión de semillas mojadas en el solvente o mantenidas en una atmósfera saturada con el mismo a 20°C durante 48 horas se indica en la tabla IX.

TABLA VIII

	EMISION (cps)		
	Secos	Húmedos	Aumento
Cotiledones	270	870	3,2
Tegumentos	520	3700	7,1
Semillas	200	700	3,5
Embriones	190	330	1,7

TABLA VIII. Emisión de cotiledones, tegumentos, semillas y embriones de semillas de soja secas al aire y luego de ser mojadas con 1 ml de agua (60 semillas o fracciones provenientes de 60 semillas).

No hay una relación simple entre variables físico-químicas (como la constante dieléctrica del solvente, su viscosidad o su capacidad de aumentar la vida media del oxígeno singulete) y el aumento en la emisión de las semillas. Esto puede deberse a que la emisión de las semillas depende no sólo de factores físico-químicos que pueden afectar la fluidez de las membranas, la movilidad de los electrolitos o la vida media de los estados excitados, sino también de factores más complejos que pueden afectar directamente actividades biológicas relacionadas con la fotoemisión (como, por ejemplo, actividades enzimáticas).

#### 5.3.1 Dependencia de la emisión de semillas de soja con la temperatura.

Para estudiar la dependencia de la emisión de las semillas con la temperatura se las termostatóizó durante los 30 - 60 minutos inmediatos anteriores a las mediciones a las temperaturas indicadas dejando equilibrar 10 - 20 minutos adicionales en el compartimento de muestra antes de medir. Estas curvas se realizaron en el contador de fotones IEEE-Tohoku.

La emisión espontánea de semillas de soja depende de la temperatura y/o de procesos de calentamiento. La emisión de semillas a 110°C es más de 50 veces mayor que la de semillas a temperatura ambiente. La emisión de semillas calentadas durante 12 horas a 110°C y medida a 52°C es 2 - 3 veces mayor que

TABLA IX

S O L V E N T E	T R A T A M I E N T O	
	Sumergidas en el solvente	Expuestas a atmósfera saturada de solvente
Agua	840	100
Acetona	100	267
Tetracloruro de carbono	100	88
Benceno	100	106
Cloroformo	140	206
Metanol	800	375
Etanol	140	306
n-propanol	-	127
n-butanol	-	326
Piridina	470	326
Agua pesada	800	105
Agua pesada más DABCO	1200	100

TABLA IX. Aumento porcentual respecto de la emisión de semillas no tratadas en semillas de soja sumergidas durante 1 hora en diversos solventes y expuestas durante 48 horas en una atmósfera saturada del solvente a 20°C

la de semillas secas medida a 53°C. Si bien el calentamiento a 110°C disminuye o anula actividades enzimáticas, al mismo tiempo acelera los procesos no enzimáticos de autooxidación de ácidos grasos por lo que la emisión medida será una combinación de ambos efectos.

Tanto la emisión de semillas secas como húmedas aumenta con la temperatura hasta 52°C (Fig. 45 A). En ambos casos hay un pequeño máximo a 30°C y un gran aumento a partir de 33°C. Los diagramas de Arrhenius en ambos casos muestran cambios de pendiente a 43°C para semillas mojadas y a 33 - 35°C para semillas secas. Las energías de activación aparente son de 20 y 68 kJ / mol para

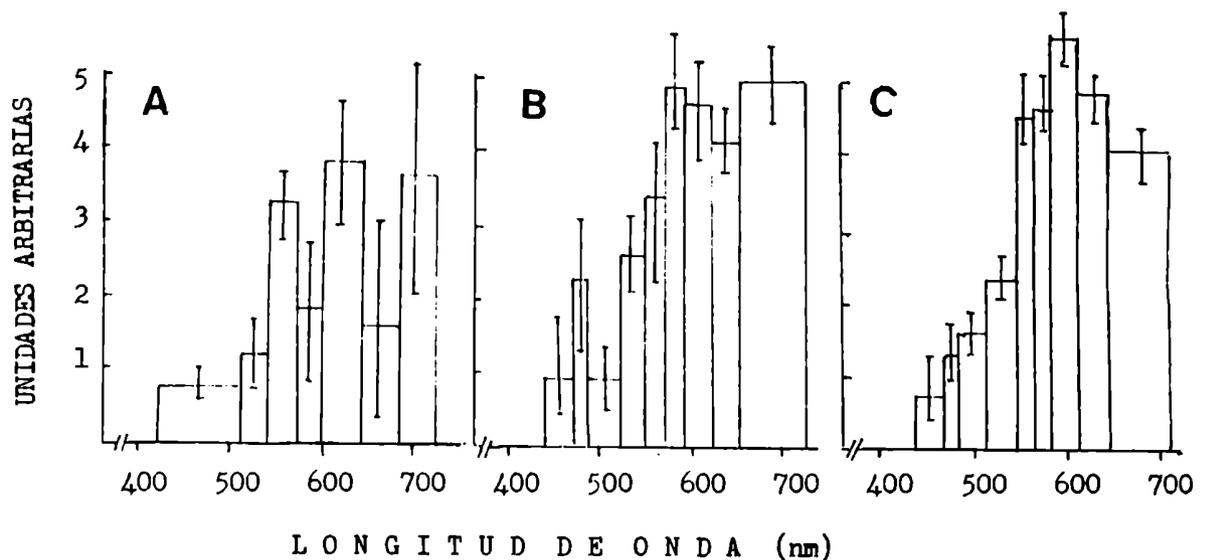


Fig. 51. Distribución espectral de la emisión de semillas de soja:

A - Secas termostatzadas a 28°C

B - Secas termostatzadas a 52°C

C - Secas calentadas 12 horas a 110°C y termostatzadas a 52°C.

semillas secas y mojadas por debajo y por encima de dichas temperaturas respectivamente.

### 5.3.2 Análisis espectral de la emisión de semillas de soja.

El análisis espectral de la emisión de semillas de soja se llevó a cabo en una serie de condiciones experimentales que aumentan la emisión. La emisión espontánea medida en semillas de soja es del orden de  $150 \pm 5$  cps con corrientes oscuras del mismo orden y error. Para obtener espectros confiables en estas condiciones no pueden usarse más de 8 filtros, es decir, 7 bandas, que en el rango de trabajo tendrían un ancho promedio de 40 nm por banda. Esto representa un 10 - 14% de la emisión medida (suponiendo luz blanca). El límite de resolución con los aparatos empleados en estas condiciones está en el rango de 6 - 8 % de la emisión medida. Esto hace que el espectro de la emisión de semillas de soja a 25°C presente errores altos y sólo sea factible obtener una distribución espectral gruesa (Fig. 51 A). Se pueden ubicar máximos poco marcados centrados en 560, 620 y 700 nm. El calentamiento de semillas secas hasta 52°C aumenta la emisión (Fig. 45 A), sin alterar significativamente su distribución espectral (Fig. 50 B).

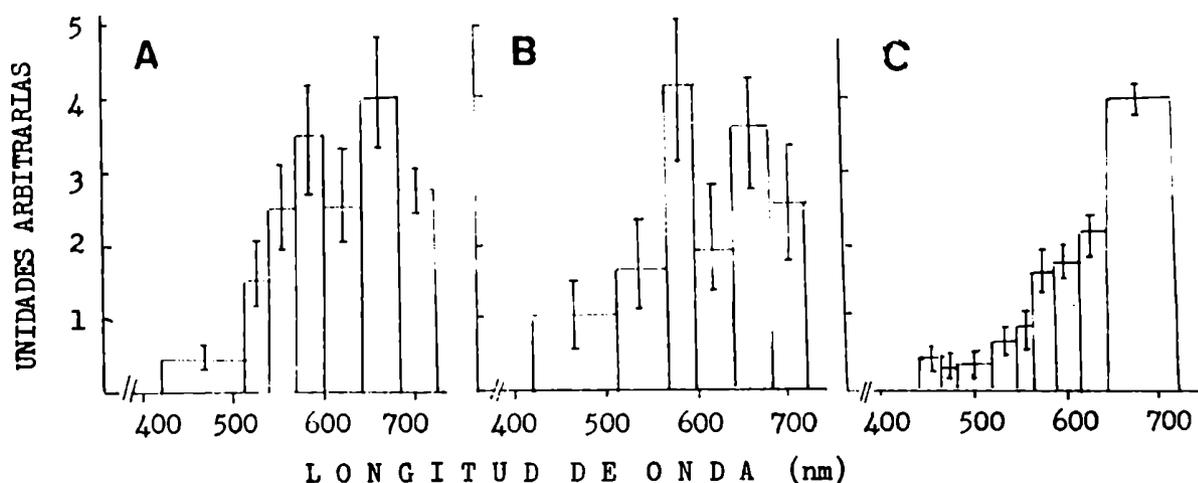


Fig. 52. Distribución espectral de la emisión de semillas de soja mojadas con agua.

A - termostatizadas a 28°C;

B - termostatizadas a 28°C en presencia de DABCO (2,7 mg/ml);

c - termostatizadas a 52°C.

El calentamiento durante 12 horas a 110°C hace más homogénea la distribución espectral de la emisión (que por razones prácticas se midió a 52°C). Este espectro se convierte en una banda ancha con un máximo de 600 nm. La contribución relativa de la banda de 650 - 720 nm disminuye con respecto a los casos anteriores (Fig. 51 C). La emisión espectral de la emisión de semillas mojadas a 28°C, aunque tiene mejor resolución, no presenta diferencias notables con respecto a la de semillas secas a la misma temperatura (comparar las figuras 51 A y 52 A). Sin embargo, el espectro de las semillas mojadas y calentadas a 52°C es notablemente diferente (Fig. 52 C). En estas condiciones aumenta considerablemente la contribución de la banda de 650 - 720 nm convirtiéndose la emisión centrada en 600 nm de los espectros anteriores en una meseta de contribución poco considerable a la totalidad de la emisión. Es interesante hacer notar que este efecto se consigue sólo cuando se calientan semillas húmedas, ya que el calentamiento de semillas secas (Fig. 52 B) no produce estas modificaciones.

La contribución importante de la emisión de longitudes de onda mayores que 700 nm en todos los casos hace pensar que la emisión bimolecular del oxígeno singulete (que ocurre a 640 y 710 nm; Deneke y Krinsky, 1977) podría ser responsable

de parte de los fotones medidos. El DABCO aumenta la emisión sin alterar (dentro de los límites del error experimental) la distribución espectral (comparar las figuras 52 A y B). Sin embargo la azida sódica, que inhibe la emisión debida a la emisión bimolecular de oxígeno singulete no tiene efecto sobre esta emisión. Tampoco se observa efecto mojando las semillas con  $D_2O$  (que aumenta la vida media del oxígeno singulete de  $2 \mu\text{seg}$  en agua a  $20 \mu\text{seg}$  en agua pesada; Turro, 1980, pág.588) pero hay un efecto marcado, mayor que el del DABCO solo cuando se mojan semillas en agua pesada con DABCO (2,7 mg/ml) disuelto (Tabla IX). No se pudo relacionar la acción de diversos solventes orgánicos con su capacidad para aumentar la vida media del oxígeno singulete. Sin embargo, la complejidad del sistema en estudio es mucho mayor que la del sistema en solución y no es posible descartar la posibilidad de que la emisión pueda deberse a emisión bimolecular de oxígeno singulete pero los efectos se encuentran enmascarados por interferencias difíciles de discriminar.

C A P I T U L O V I

D I S C U S I O N

Las medidas de luminiscencia de baja intensidad en sistemas biológicos permiten estudiar procesos peroxidativos que ocurren a través de reacciones de radicales en cadena, ya que en algunas reacciones de terminación se forman estados electrónicamente excitados que se desexcitan emitiendo el exceso de energía como fotones detectables con instrumentos adecuados; (Russell, 1957; Boveris y col., 1980 a).

En una célula entera, las mezclas de metales pesados (complejados o libres) y de lípidos (insaturados o saturados) que la forman, sumado a la producción de especies oxidantes en procesos metabólicos normales, facilitan la peroxidación (a través de reacciones de radicales libres) de compuestos que en otras condiciones se peroxidarían con dificultad (Chance y col., 1979; Pryor, 1973). El daño derivado de la agresión continua de estos procesos sobre los mecanismos fundamentales del funcionamiento celular ha sido propuesto como una de las principales causas del envejecimiento y muerte celular (Gerschman y col., 1954). El organismo tiene defensas que mantienen los niveles de agentes oxidantes en valores bajos pero no nulos; el desequilibrio en una o varias de estas defensas puede producir consecuencias catastróficas en la célula.

Si bien se han estudiado mucho los procesos peroxidativos "in vitro", hasta hace relativamente poco tiempo no se disponía de técnicas adecuadas para su estudio "in vivo". El desarrollo en los últimos años de las medidas de quimioluminiscencia de baja intensidad (Boveris y col., 1980 a), liberación de glutatión en bilis (Akerboon y col., 1982) y de exhalación de alcanos (Sagai y Tappel, 1980) ha permitido comenzar a estudiar la ocurrencia de procesos que involucran radicales libres oxidativos "in vivo".

#### 6.1 COMPARACION DE LAS MEDIDAS DE QUIMIOLUMINISCENCIA CON LAS DE OTRAS TECNICAS QUE PERMITEN MEDIR PEROXIDACION LIPIDICA "IN VITRO" O "IN VIVO".

Es importante el paralelismo observado entre la emisión luminosa y la formación de malonaldehído descripto para homogeneizados de hígado y cerebro de rata en presencia de oxígeno (Fig. 33) ya que esta última técnica ha sido empleada durante mucho tiempo para medir procesos peroxidativos "in vitro" (Chance y col., 1979). Los homogeneizados de cerebro en presencia de oxígeno emiten en dos horas  $1,5 \cdot 10^7$  fotones/mg de proteína y en las mismas condiciones se forman 24 nmoles de malonaldehído/mg de proteína (Fig. 33), lo cual indica que se miden  $10^{10}$  moléculas de malonaldehído por fotón. Para los homogeneizados de hígado estos valores son de  $2,1 \cdot 10^6$  fotones/mg de proteína y 2,3 nmoles de malonaldehído/mg de proteína con una relación de  $10^9$  moléculas de malonaldehído/fotón (la formación de malonaldehído responde al 10 % del oxígeno consumido, es decir al 10%

del proceso de peroxidación; Hochstein y col., 1964).

Boveris y col., (1980 a) han encontrado un paralelismo entre la liberación de glutatión en bilis y la emisión de superficie de hígados ("in situ") de ratas perfundidas con hidroperóxido de ter-butilo.

Los procesos peroxidativos que acompañan a la intoxicación de ratas con  $\text{CCl}_4$  han sido muy estudiados desde todo punto de vista (Recknagel y col., 1977; Sagai y Tappel, 1978) y han sido usados por estos últimos como sistemas modelo para el estudio de la liberación de alcanos en el aire expirado como reflejo de procesos peroxidativos. Comparando nuestros resultados experimentales con los obtenidos por Sagai y Tappel para sistemas equivalentes, se observa que hay diferencias entre las sensibilidades de las técnicas: dosis de 10 - 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{CCl}_4$ /100 g de peso producen aumentos detectables en la liberación de alcanos pero la respuesta quimioluminiscente es muy débil. También hay diferencias cinéticas: la respuesta quimioluminiscente alcanza un valor máximo a los 2 - 3 minutos de la inyección de  $\text{CCl}_4$  mientras que la máxima liberación de alcanos se mide recién a los 15 minutos. A los 15 minutos de inyectado el haloalcano la emisión luminosa ya está en un valor estacionario; en la liberación de alcanos este valor se alcanza a tiempos mayores (una hora). Estas diferencias cinéticas podrían ser reflejo entre otras causas de problemas técnicos ya que para medir liberación de alcanos se necesita purgar 10 minutos el sistema antes de tomar las muestras. La emisión luminosa es del orden de  $10^{-12}$  -  $10^{-14}$  fotones/molécula de  $\text{CCl}_4$  inyectada. En la liberación de alcanos se miden  $10^{-2}$  moléculas de pentano/molécula de  $\text{CCl}_4$  inyectado (Sagai y Tappel, 1978), lo que indica una relación aproximada de  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$  fotones/molécula de alcano detectada.

Las diferencias de sensibilidad y cinética entre ambas técnicas podrían responder a varios factores. La química luminiscencia se mide en la superficie del órgano y mide los eventos iniciales del proceso; la medida de la liberación de alcanos incluye el proceso de transporte de los gases al pulmón por circulación. La quimioluminiscencia se mide en el hígado expuesto de un animal anestesiado; esta condición está alejada de la condición fisiológica en la que se mide la liberación de alcanos. Este factor es la causa principal por la que no se pueden realizar mediciones de quimioluminiscencia "in vivo" por tiempos largos: la superficie del órgano expuesto se seca y se enfría, la anestesia tiene un tiempo de acción limitado, etc.

Los rendimientos cuánticos medidos como fotones/molécula reaccionante, se-

leccionando dicha molécula de acuerdo con el sistema para las medidas de quimioluminiscencia en sistemas biológicos están en el orden de  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$  (Cadenas y col., 1980 a). Estos números coinciden con los hallados cuando la molécula reaccionante es el malonaldehído formado o el pentano exhalado en sistemas tan diferentes como un homogeneizado y un órgano "in situ" respectivamente. Si bien estos rendimientos cuánticos indican que la quimioluminiscencia mide productos secundarios al proceso de la peroxidación lipídica, las características de la emisión comparadas con las de otros productos medidos indican que refleja dicho proceso. Sin embargo es muy probable, especialmente cuando se trabaja con órganos "in situ", que se estén midiendo otras reacciones cuya importancia relativa con respecto a la de la peroxidación lipídica varía con el sistema.

Cada una de las técnicas empleadas para medir peroxidación lipídica "in vivo" tiene ventajas y desventajas. La medida de la liberación de alcanos refleja lo que ocurre en el animal entero. El hecho de ser no invasiva y no destructiva la hace potencialmente útil para ensayos clínicos aplicables a patologías en las que los procesos peroxidativos están incrementados. La medida de la liberación de glutatión en bilis es una técnica muy sensible pero está limitada a estudios en hígado. La medida de quimioluminiscencia de órganos no tiene esta desventaja ya que cualquier órgano al que se pueda acceder con una guía óptica (ya sea por exposición del órgano o por acceso a través de vías naturales) es susceptible de ser estudiado. Tiene la ventaja, sobre la medida de la liberación de alcanos, de poder focalizar la medida en cada órgano. Es un ensayo no invasivo y no destructivo para el órgano en estudio, ya que es una medida de superficie pero es invasiva para el animal.

La importancia fundamental de estas tres técnicas y su ventaja sobre las técnicas clásicas para medir peroxidación lipídica es que permite realizar mediciones "in vivo".

Es interesante hacer notar que cada fotón que se mide es una molécula que se desexcita por lo que la sensibilidad de las medidas de quimioluminiscencia es muy alta (100 cuentas =  $1,7 \times 10^{-22}$  moles).

## 6.2 MECANISMOS DE REACCION.

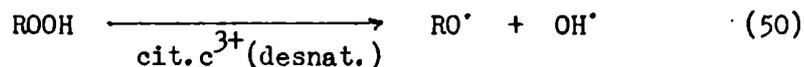
Dada la inestabilidad de los radicales libres, la poca selectividad de sus reacciones y la complejidad de composición y estructura de los sistemas biológicos es casi imposible analizar los productos específicos del proceso de peroxidación lipídica (Pryor, 1973). Sin embargo, se ha postulado un mecanismo gene-

ral al que responden estas reacciones. Como se indica en la sección 1.8.1 (III) todo mecanismo de reacciones de radicales en cadena consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Los productos de algunas reacciones de terminación son especies excitadas, capaces de emitir fotones al desexcitarse.

### 6.2.1 Iniciación.

Las reacciones de iniciación en un sistema biológico dependen de sus características y de las del agente iniciador. En este trabajo se han usado como agentes iniciadores hidroperóxidos,  $\text{CCl}_4$  y oxígeno.

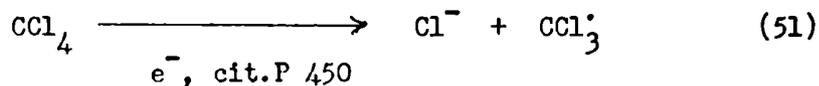
Se sabe que en sistemas muy simples los peróxidos pueden ser descompuestos por complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  (Walling y col., 1975) a través de la ruptura homolítica del enlace -O-O- cuya energía es del orden de 213 kJ/mol (Moore, 1976). Las hemoproteínas de la cadena respiratoria, el citocromo P450 y la hemoglobina son complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  presentes en sistemas biológicos y que pueden participar en estas reacciones. En un sistema simple como citocromo-c suplementado con hidroperóxido la reacción de iniciación más factible es la reacción (50)



donde la hemoproteína desnaturalizada sería la que cataliza la ruptura homolítica del enlace -O-O- (Fig. 22). Otras hemoproteínas como la hemoglobina o la mioglobina podrían catalizar esta reacción (Cadenas y col., 1980 a).

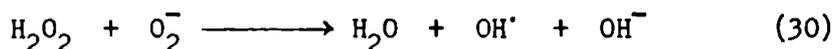
En sistemas más complejos como homogeneizados o mitocondrias de órganos de rata en presencia de hidroperóxidos una reacción de este tipo podría ser la iniciadora. En estos casos dada la complejidad del medio y la posible presencia de radicales originados en procesos metabólicos normales también son posibles homólisis inducidas por otras moléculas (Pryor, 1973).

En el caso de sistemas con  $\text{CCl}_4$  y citocromo P 450 (como hígados "in situ" de ratas inyectadas intraperitonealmente con  $\text{CCl}_4$ ) la reacción de iniciación aceptada (Recknagel, 1977) es



En los homogeneizados de hígado o cerebro de rata cuando no se agrega hidroperóxido exógeno, la reacción de iniciación es más difícil de determinar ya que no hay agentes peroxidantes (como  $\text{ROOH}$  o  $\text{CCl}_4$ ) que puedan denominarse iniciadores. Se acepta que hay un nivel endógeno bajo de radicales libres origina-

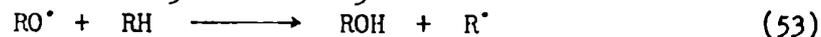
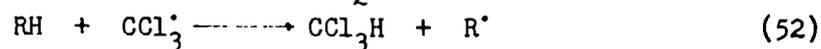
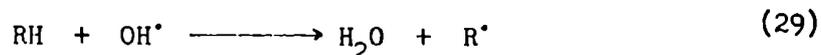
dos en reacciones de compuestos como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , los que son productos de varias vías metabólicas normales (Chance y col., 1979). En presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  complejo o libre, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con el radical superóxido dando radicales hidroxilo como producto (reacción 30).



El  $\text{OH}^\cdot$  es una especie de alta reactividad y de poca especificidad (Pryor, 1970). En consecuencia es factible su reacción con cualquier componente celular, lo que lo convierte en una especie peligrosa para la célula. Aunque su concentración sería mantenida en niveles muy bajos por acción de atrapadores locales de  $\text{OH}^\cdot$ , en una célula entera puede ser responsable de la iniciación de procesos de peroxidación de componentes celulares con la consecuente emisión luminosa. En un homogeneizado sometido a la agresión de altas concentraciones de oxígeno, las defensas endógenas se agotan, con lo cual esta reacción adquiriría mayor importancia. (Recknagel, 1977). En sistemas como semillas de soja, hay enzimas especiales como la lipoxigenasa, que peroxidan lípidos donde los radicales  $\text{ROO}^\cdot$  se formarían en reacciones laterales (Boveris y col., 1980 b). Como la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de  $\text{O}_2^-$  también es factible, son posibles también en este sistema las reacciones (50) y (30), siendo el  $\text{ROOH}$  producto de la reacción enzimática.

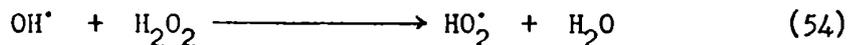
#### 6.2.2 Propagación.

Los  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$  y  $\text{CCl}_3^\cdot$  formados en las reacciones (50), (51) y (30) pueden reaccionar con cualquier molécula orgánica presente (representada por  $\text{RH}$  en las reacciones siguientes en una reacción de abstracción de hidrógeno (Pryor, 1973; 1978) (reacciones 29, 52 y 53).



En sistemas relativamente simples (hemoproteínas-hidroperóxido) los  $\text{RH}$  sólo pueden provenir de la hemoproteína (y eventualmente de impurezas presentes) que se destruyen en estas reacciones. En sistemas complejos como homogeneizados, mitocondrias, órganos intactos o semillas, la cantidad y variedad de moléculas representadas por  $\text{RH}$  es mucho más grande (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.) siendo muy grande la variedad de  $\text{R}^\cdot$  formados.

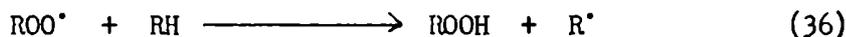
En medios en los cuales hay peróxido de hidrógeno es posible que éste reaccione con los OH<sup>•</sup> formados en las reacciones (30) y (50) según la reacción (54)



En presencia de oxígeno molecular los radicales R<sup>•</sup> formados en las reacciones (29), (52) y (53) reaccionan según la reacción (63)



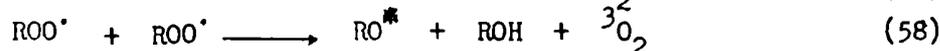
con una constante  $k = 10^9$  l/mol. seg (este valor de k indica que la reacción está controlada por difusión; Ingold, 1969). Los radicales ROO<sup>•</sup> son menos reactivos y más selectivos que los radicales R<sup>•</sup> (Pryor, 1973). En presencia de moléculas orgánicas (RH) puede haber una reacción de transferencia de hidrógeno con la formación de hidroperóxido (reacción 36)



Los radicales clorados pueden dar reacciones análogas a la reacción 13, donde R<sup>•</sup> sería CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>. Estas reacciones pertenecen al sistema clásico de reacciones de radicales en cadena propuestas por Pryor para el proceso de autooxidación de lípidos. (Pryor, 1978).

### 6.2.3 Terminación.

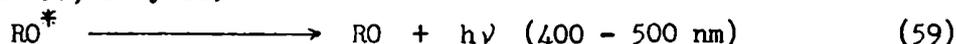
Las posibles reacciones de terminación de la cadena son: a) reacción de dos R<sup>•</sup> entre sí; b) reacción de dos ROO<sup>•</sup> entre sí y c) reacción de un R<sup>•</sup> con un ROO<sup>•</sup>, en todos los casos para dar productos no radicales (reacciones 55 a 58)

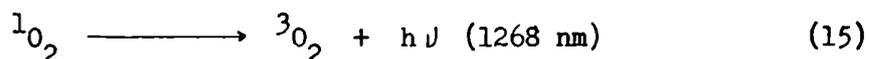


donde RO<sup>\*</sup> representa una molécula con un grupo carbonilo excitado (triplete). Las reacciones (57) y (58) han sido propuestas por Russell en 1957 para carbonos primarios y secundarios.

### 6.2.4 Fotoemisión.

El oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y el carbonilo excitado (RO<sup>+</sup>) formados en las reacciones (57) y (58) pueden emitir fotones de longitudes de onda características (reacciones 59, 10 y 11)

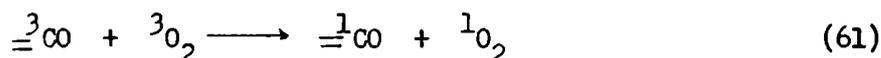




La emisión bimolecular de oxígeno singulete (reacción 16) ocurre a varias longitudes de onda. Las más características son las de 634 y 703 nm (Khan y Kasha, 1963; Khan, 1976) siendo posibles corrimientos de 15 nm en medios complejos (Andersen y col., 1978). El oxígeno singulete puede reaccionar con compuestos con dobles enlaces para dar dioxiitanos intermediarios que se descomponen originando dos carbonilos, uno de los cuales está excitado (estado triplete) y se desexcita emitiendo fotones (Foote, 1976; reacciones 59 y 60)



En medios oxigenados, el oxígeno inhibe la emisión de carbonilos triplete que se debería a la reacción (59) debido a la reacción (61) (Turro, 1978, pág. 353)



siendo en consecuencia el oxígeno singulete la especie fotoemisiva.

#### 6.2.5 Relación entre el efecto de activadores e inhibidores sobre la emisión luminosa y los mecanismos de reacción propuestos.

El estudio del efecto de activadores e inhibidores sobre la emisión luminosa de un sistema permite determinar si responde a estos mecanismos.

El 2,5-di-terbutil quinol actúa como atrapador de radicales (Nakano y col., 1975). Este reactivo inhibe la destrucción de citocromo-c suplementado con peróxido de hidrógeno y su emisión luminosa (Fig. 24) e inhibe la emisión luminosa de homogeneizados de hígado de rata en presencia de t-BOOH (Fig. 35) indicando una activa participación de los radicales en el proceso que lleva a la fotoemisión y destrucción del citocromo-c y a la emisión de homogeneizados de hígado.

Los alcoholes son atrapadores de radicales OH' efectivos. Actúan a través de reacciones que mantienen el número total de radicales libres (reacción 62)



(Fee y Valentine, 1977).

Como la emisión luminosa depende de reacciones de terminación en el proceso de reacciones en cadena, puede haber un efecto de atrapador sobre los radi-

cales  $\text{OH}^{\bullet}$  formados sin que sea detectado por medidas de quimioluminiscencia. En consecuencia, la falta de efecto de los alcoholes sobre la quimioluminiscencia del citocromo-c con peróxido de hidrógeno (pág. 67) y sobre homogeneizados de semillas de soja (pág. 98) no permite eliminar la posibilidad de que los radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  participen en la reacción, ni la de que radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  eventualmente formados reaccionen rápidamente con la proteína circundante.

En ausencia de oxígeno, la reacción (13) no puede ocurrir, pero no se impide que ocurra alguna de las reacciones 29, 30, 50, 51, 52, 53 y 54, acumulándose  $\text{R}^{\bullet}$ . La única reacción de terminación posible en este caso sería la reacción (54) que no lleva a la formación de especies excitadas. Si a un sistema que ha evolucionado en ausencia de oxígeno se lo oxigena, aumentará rápidamente la concentración de  $\text{ROO}^{\bullet}$  por la reacción (13), cuya velocidad está controlada por difusión. En estas condiciones prevalecerán las reacciones de terminación (57) y (58) ya que será mayor la concentración de  $\text{ROO}^{\bullet}$  que la de  $\text{R}^{\bullet}$  (Pryor, 1973), llevando a la formación de especies excitadas. Esto justificaría el hecho de que en todos los sistemas estudiados la eliminación de oxígeno del medio inhibe la emisión y la reincorporación del mismo reactiva la emisión. La mayor aceleración inicial observada cuanto mayor haya sido el tiempo que el sistema ha estado en anaerobiosis indica que la acumulación de  $\text{R}^{\bullet}$  es función de dicho tiempo. Las diferencias cinéticas en la emisión de homogeneizados de cerebro de rata según hayan sido preparados en anaerobiosis o en aerobiosis (Fig. 12) pueden explicarse por este mismo hecho. En los homogeneizados preparados en anaerobiosis la acumulación de  $\text{R}^{\bullet}$  hace que al agregar oxígeno al medio de reacción, la reacción (13) ocurra en forma explosiva. Cuando los homogeneizados han sido preparados en aerobiosis, la reacción (13) y en consecuencia las reacciones (57) y (58) ocurren en un nivel bajo (pero no nulo) y continuo, estando inhibida sólo por la baja temperatura. Al calentar el sistema, el aumento de la emisión depende de la velocidad de las reacciones (57) y (58), que dependerá de la acumulación de  $\text{ROO}^{\bullet}$  (que será menor que en el caso anterior) y de la velocidad de formación de  $\text{R}^{\bullet}$  (que será igual que en el caso anterior). La emisión espontánea de hígado de rata y la inducida por  $\text{CCl}_4$  y la de mitocondrias de hígado de rata en presencia de peróxido de ter-butilo presentan una dependencia marcada con la concentración de oxígeno (Tabla V; Fig. 40 y figuras 28 y 30), explicable por las mismas razones. Resultados semejantes para la fotoemisión que acompaña la reacción de la lipoxigenasa han sido descriptas por Boveris y col., (1980 b).

El cianuro inhibe la emisión luminosa de homogeneizados de hígado de rata con hidroperóxido de ter-butilo y oxígeno (Fig. 36), mitocondrias de hígado de rata con hidroperóxido de ter-butilo (Fig. 31), lipoxigenasa suplementada con ácido linoleico y homogeneizados de semillas de soja (Figuras 44 y 48) y citocromo-c en presencia de peróxido de hidrógeno (Fig. 23) lo cual indicaría que actuaría inhibiendo la formación de radicales libres o su acción sobre la proteína. Hay pocos sistemas quimioluminiscentes que son insensibles al cianuro; entre ellos figura la *a. castellanii* (Lloyd y col., 1980) y los leucocitos polimorfonucleares (Cadenas y col., 1980 g). La inhibición de la emisión de la mezcla de hidroperóxido de ter-butilo con citocromo-c por cianuro de potasio se debería a su capacidad de complejar al  $Fe^{3+}$ . El citocromo-c cataliza la destrucción de ROOH llevando a la emisión de fotones (reacción 50) cuando está desnaturalizado (Fig. 22). En estas condiciones al menos una de las seis valencias de coordinación del  $Fe^{3+}$  estaría libre. Esta valencia libre sería indispensable para su acción catalítica ya que su bloqueo con  $CN^-$  inhibe la reacción fotoemisiva. Esta explicación estaría apoyada por el hecho de que el cianuro de potasio inhibe competitivamente la emisión de citocromo-c con peróxido de hidrógeno (Fig. 25) no puede deberse a su actividad de superóxido dismutasa ya que agregando superóxido dismutasa al medio de la reacción no se altera la emisión y la actividad de catalasa también se descarta ya que esta actividad está presente sólo en el cobre sin complejar (Sigel, 1969). El hecho de que no actúen sobre la destrucción de la banda Soret sugiere que actúan en la etapa de emisión de fotones (reacciones 15, 16 y 59) sin alterar mayormente la cadena de reacciones de radicales. Esto podría deberse a una inhibición en la emisión bimolecular de oxígeno singlete por efecto de átomo pesado (Turro, 1978, pág. 125).

#### 6.2.6 Identificación de las especies fotoemisivas.

De acuerdo con los mecanismos de reacción propuestos y generalmente aceptados para explicar la emisión en sistemas biológicos, las especies fotoemisivas podrían ser carbonilos excitados (especies triplete) y oxígeno excitado (oxígeno singlete). En medios oxigenados la reacción (61) dificultaría la detección de una emisión proveniente de un carbonilo triplete pese a que en algunos sistemas especiales, en los cuales el carbonilo triplete se origina protegido del oxígeno del medio esta emisión es detectable (Cilento, 1980). El análisis espectral de la emisión y el estudio del efecto de activadores e inhibidores de la emisión debido a las diferentes especies mencionadas, ayudará a determinar cuál es la o

las especies fotoemisivas. Cuanto más complejo es el medio en que la reacción fotoemisiva ocurre, más anchas serán las bandas (Andersen y col., 1978) lo cual puede llevar a superposiciones espectrales imposibles de resolver.

Cuanto menor sea la emisión, mayores serán los errores experimentales y menor será la definición con que podrá obtenerse el espectro. Dados los bajos valores de emisión de algunos de los sistemas estudiados (semillas de soja, órganos "in situ") los espectros obtenidos en uno u otro de los contadores de fotones descritos tienen errores experimentales altos (en varios casos se trabajó en el límite de resolución de los instrumentos). La concordancia entre los espectros obtenidos para preparaciones equivalentes en los dos contadores de fotones descritos en la Sección 2.2 es adecuada (Fig. 13).

Los espectros de los diversos sistemas estudiados son diferentes entre sí lo cual haría pensar en más de una especie fotoemisiva. Los espectros de los homogeneizados de cerebro en presencia de oxígeno (Fig. 13) presentan una banda ancha centrada en  $630 \pm 20$  nm, sin emisión por encima de 700 nm. Si bien una banda centrada en 630 nm podría corresponder a la banda de 634 nm descrita para la emisión bimolecular de oxígeno singulete, el ancho de la banda y la falta de emisión en la zona de 700 - 720 nm hace difícil pensar en esta especie (Khan y Kasha, 1963; Khan, 1976). Tampoco parece haber una contribución directa significativa de carbonilos excitados ya que la emisión por debajo de 525 nm es escasa. Si bien es posible que se formen carbonilos excitados que transfieran su energía a otras especies que sean las fotoemisoras, no hay aún datos experimentales que permitan confirmarlo.

La distribución espectral de la emisión de mitocondrias y homogeneizados de hígado de rata suplementadas con hidróperóxido de *ter*-butilo (Figuras 32 y 37) es semejante con dos bandas anchas en 470 - 490 nm y 575 - 600 nm. Si bien han sido descritas para la emisión bimolecular de oxígeno singulete bandas centradas en 470, 580, 640 y 710 nm (Khan y Kasha, 1963; Khan, 1976) las alturas relativas de estas bandas decrece al aumentar la longitud de onda de la banda. En los homogeneizados y mitocondrias de hígado de rata la altura relativa de la banda de 575 nm es mayor que la de la de 480 nm y la emisión a 700 - 720 nm es muy baja. Si bien es factible que las alturas relativas de las bandas se modifiquen al ser más complejos los medios de reacción, no hay pruebas suficientes como para asignarlas a las transiciones descritas. La emisión por debajo de 500 nm podría deberse a carbonilos excitados. Las porfirinas, que fluorescen a 589 y 620 nm podrían lle-

gar a justificar los picos a 575 nm y la emisión a 600 nm. No se dispone de evidencia experimental que permita confirmar o rechazar esta hipótesis. El hígado de rata "in situ" en presencia o ausencia de  $\text{CCl}_4$  tiene una emisión que es predominantemente roja, con el  $90 \pm 10$  % de la emisión detectada a longitudes de onda mayores que 650 nm. (Figuras 41 y 43). El alto porcentaje de luz roja hace pensar en la emisión bimolecular de oxígeno singulete. La falta de resolución en la zona de 720 - 900 nm (por no disponer de filtros adecuados para dicha zona espectral) es un serio inconveniente para apoyar esta idea. Dada la compleja composición de todos estos sistemas y las características de los espectros obtenidos, no es improbable que haya transferencia de energía de una especie primaria formada a otros componentes celulares y que sean éstos los emisores.

El comportamiento espectral de la emisión en sistemas provenientes de órganos de animales depende de la integridad del órgano y de su composición, siendo relativamente independiente del agente iniciador. La emisión de hígado "in situ" (espontánea o inducida por  $\text{CCl}_4$ ) es predominantemente roja (Figuras 41 y 43); la emisión de homogeneizados de hígado (en presencia o ausencia de t-BOOH) y de mitocondrias de hígado (Figuras 32 y 37) son semejantes entre sí con sólo un 5 - 10 % de la emisión por encima de 700 nm. La emisión de homogeneizados de cerebro en presencia de oxígeno (Fig. 13) es completamente diferente de la de homogeneizados de hígado en presencia de oxígeno. Es interesante hacer notar que cuanto mayor sea la integridad del órgano (y menores sus emisiones) mayor es la importancia (porcentual) de la luz de longitud de onda mayor que 700 nm en la emisión total. La compartimentalización celular y el bajo aporte de oxígeno al sistema, característica del hígado "in situ" pero no del homogeneizado, pueden dificultar los procesos peroxidativos de manera que: ocurran selectivamente ciertas reacciones. Al destruir el tejido (homogeneizados) y someterlo a concentraciones de oxígeno altas, se facilita la interacción entre diferentes componentes que en la célula entera estarían aislados. Esto podría ser la causa principal de la mayor emisión de los homogeneizados y del corrimiento al azul en la emisión detectada.

El DABCO, que aumenta la emisión bimolecular del oxígeno singulete sin alterar la distribución espectral (Deneke y Krinsky, 1977) aumentó la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de t-BOOH sólo en un 20 % (Fig. 38) alterando significativamente la cinética de la emisión.

En el caso de la emisión de hígado de rata "in situ" este incremento fue muy poco marcado (Pág. 86 y Fig. 87). En ambos casos, dados los errores experimentales y por tratarse de sistemas biológicos, la diferencia se consideró en el límite de lo que es estadísticamente significativo y no se llevó a cabo un análisis espectral ya que las eventuales diferencias en la distribución espectral quedarían cubiertas por el error experimental. El dibromoantraceno sulfonato que aumenta la emisión debida a carbonilos excitados no tuvo efecto sobre la emisión de homogeneizados de hígado de rata en presencia de t-BOOH (pág. 82). Esto puede ser consecuencia de la alta concentración de oxígeno en el medio. La emisión de semillas de soja bajo una variedad de condiciones experimentales tiene una distribución semejante: la emisión predominante está en la región roja con una contribución importante de la banda de 650 - 720 nm con otras bandas relativamente menos importantes (Figuras 51 y 52). Hay una emisión temolábil a longitudes de onda menores que 600 nm mostrando la presencia de moléculas desnaturizables relacionadas con la fotoemisión (Fig. 52 A y C). Una distribución espectral que podría considerarse semejante a esta fue descrita por Inaba y col., (1979) para la quimioluminiscencia que acompaña la descomposición del hidroperóxido del ácido linoleico con bandas centradas en 480, 575 y 640 nm. También Boveris y col., (1980 b) han descrito bandas a 450, 550 y 630 nm para la emisión de lipoxigenasa. Si bien no hay acuerdo absoluto, al menos no hay discrepancias grandes entre las bandas descritas para la emisión de semillas de soja y las conocidas para la emisión bimolecular de oxígeno singulete. Es importante que un alto porcentaje de la emisión está ubicada entre 650 y 720 nm. El DABCO aumenta la emisión (Tabla IX, Sección 5.3.2), y el espectro no es alterado significativamente (Figuras 52 A y B). Esto apoya la idea de que al menos parte de la emisión se debería a la emisión bimolecular de oxígeno singulete. Si bien no se encontró efecto de  $D_2O$ , que aumenta la vida media del oxígeno singulete 10 veces con respecto a la vida media en agua (Turro, 1978, pág. 588) se encontró un aumento mayor en la emisión debida a DABCO si éste se disolvía en  $D_2O$  (Tabla IX). La falta de efecto del agua pesada podría deberse a que en la semilla el sistema emisor no está en un medio acuoso sino en un medio mucho más complejo. Esto justificaría también la falta de relación entre los aumentos en la emisión debida a solventes y su capacidad de aumentar la vida media del oxígeno excitado (Tabla IX).

6.3 DEPENDENCIA DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA CON LA TEMPERATURA.

El aumento continuo de la emisión con la temperatura hasta temperaturas mayores que 50°C es característica común a todos los sistemas estudiados (Fig. 14, 22 y 45) apoyando el concepto de que en todos los casos las reacciones de radicales en cadena son responsables de la fotoemisión. Se ha descrito emisión luminosa acompañando procesos enzimáticos (emisión de lipoxigenasa con ácido linoleico; Boveris y col., 1980 b) y no enzimáticos (autooxidación de ácidos grasos; Inaba y col., 1979) y procesos catalizados por proteínas sin función enzimática (hemoproteínas con hidroperóxidos; Cadenas y col., 1980 a). La dependencia con la temperatura de estos procesos es diferente. La principal diferencia entre la dependencia con la temperatura de un proceso de autooxidación y de una reacción enzimática es que en el segundo caso hay una temperatura óptima. Cuando ambos procesos pueden ocurrir, la emisión final detectada depende de las probabilidades con que ambos suceden. El aumento de la velocidad de emisión de citocromo-c en presencia de t-BOOH con la temperatura (Fig. 14) se debe fundamentalmente a la mayor facilidad con que las reacciones de radicales en cadena ocurren a mayores temperaturas. Si bien las altas temperaturas favorecen la desnaturalización de la proteína, las Figuras 14 y 22 muestran que hay un marcado efecto sobre la velocidad de la emisión cuando aún no hay desnaturalización significativa de la proteína. Los diagramas de Arrhenius en ambos casos indican que si bien la desnaturalización de la proteína y el aumento de emisión por temperaturas altas son procesos independientes, ambos contribuyen a aumentar la fotoemisión. En los homogeneizados de hígado de rata puede haber autooxidación de ácidos grasos de la membrana. Sin embargo, el diagrama de Arrhenius se superpone con el del citocromo-c, ambos en presencia de t-BOOH (Fig. 14).

En un sistema enzimático simple (lipoxigenasa suplementada con ácido linoleico) el sustrato se peroxida por acción de la enzima y por autooxidación, pudiendo separarse ambos fenómenos por preincubaciones adecuadas (Fig. 45. Cuando se preincuba a diferentes temperaturas sólo el sustrato (es decir que se autooxida parcialmente el sustrato antes de iniciar la reacción), la dependencia de la emisión con la temperatura está controlada por este fenómeno. Cuando se preincuba sólo la enzima se observa una dependencia con la temperatura típica de un proceso enzimático. Cuando se preincuban tanto la enzima como el sustrato se observa una dependencia con la temperatura que parece ser una combinación de las dos situaciones anteriores. Esta separación entre reacción en-

zimática y autooxidación a través de preincubaciones no se puede hacer con semillas de soja enteras. En este caso la semejanza entre las formas de la curva de dependencia de la emisión con la temperatura y las energías de activación con las de la lipoxigenasa en presencia de ácido linoleico cuando se preincubaban tanto el sustrato como la enzima hacen pensar que en la emisión de las semillas pueden participar ambos procesos. La forma del diagrama de Arrhenius y los valores de las energías de activación están de acuerdo con el hecho de que a bajas temperaturas la emisión está controlada por el proceso enzimático y a altas temperaturas por el proceso no enzimático. El aumento marcado de la emisión después de calentar semillas de soja a 110°C durante 12 horas, nuevamente está de acuerdo con una activación de un proceso de radicales libres no enzimático que una vez que se ha iniciado no se detendrá, y aún aumentará su velocidad dada la gran cantidad de sustratos presente y el agotamiento de las defensas antioxidantes.

#### 6.4 QUIMIOLUMINISCENCIA Y DEFENSAS CONTRA AGENTES OXIDANTES E INTEGRIDAD DEL SISTEMA.

La quimioluminiscencia en sistemas biológicos es consecuencia de procesos peroxidativos y es función de la relación entre agentes oxidantes y antioxidantes presentes. Agentes antioxidantes como las vitaminas A y E, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa inhiben los procesos peroxidativos (Chance y col., 1979). Una composición lipídica con alto porcentaje de lípidos insaturados y la actividad de enzimas oxidantes favorecen estos procesos (Pryor, 1978).

La emisión de homogeneizados de cerebro preparados anaeróbicamente aumenta bruscamente al oxigenarlos pero los homogeneizados de hígado ensayados en las mismas condiciones presentan una fase de retardo que dura aproximadamente 30 minutos (Figuras 12 y 33). Las velocidades de emisión máxima (expresadas como cps/mg de proteína) son considerablemente mayores para cerebro que para hígado (Tabla III). Esta diferencia también se observa en los niveles de malonaldehído formados (Fig. 33). Ya se ha discutido desde el punto de vista de la acumulación de radicales libres cual podría ser la causa de la ausencia o presencia de fase de retardo en homogeneizados de cerebro (Sección 6.2.5). La comparación de los niveles de pro y antioxidantes en hígado y cerebro permitirá explicar más a fondo estos procesos. La fase de retardo inicial presente en homogeneizados de hígado pero ausente en los de cerebro podría responder al

tiempo necesario para que los antioxidantes endógenos se agoten: el hígado acumula 10 a 20 veces más vitamina A que otros tejidos (Olson, 1968) y tiene altos niveles de glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa (Chance y col., 1979); el cerebro tiene un bajo nivel de glutatión peroxidasa y catalasa (Sinnet y col., 1980 y pág 76). El contenido de lípidos de cerebro e hígado es de 1,85 y 1,27 mg/g de tejido respectivamente (White, 1973). Teniendo en cuenta que la relación de lípido insaturado a lípido saturado es de casi 1 para ambos, habría 0,9 y 0,6 mg de lípido insaturado por gramo de peso para cerebro e hígado respectivamente, lo cual estaría de acuerdo con un mayor potencial peroxidable en cerebro. La destrucción de la estructura característica de las membranas sería, en consecuencia, más dañina en tejido nervioso que en hepático, que es lo que se observa a través de las medidas de quimioluminiscencia. La diferencia de respuestas frente al estímulo de hidroperóxido de *ter-butilo* de homogeneizados de hígado y de cerebro eran esperables. Los hidroperóxidos actúan a través de la ruptura homolítica del enlace peroxi, catalizada por hemoproteínas (Cadenas y col., 1980 a y b). La diferencia en niveles de hemoproteínas de cerebro e hígado pueden hacer que la cantidad de hidroperóxido necesaria para tener una respuesta óptima sea diferente en ambos casos siendo el rango de concentraciones en el cual el peróxido es efectivo como activador mucho menor en el cerebro (la respuesta quimioluminiscente de un sistema hemoproteína/hidroperóxido tiene una relación hemoproteína/hidroperóxido para la cual la respuesta es máxima; Cadenas y col., 1980 a).

Las mitocondrias de hígado de rata constituyen un sistema relativamente simple donde influyen la integridad de la organela en la respuesta a agresiones peroxidantes. Si bien la reacción con hidroperóxido de *ter-butilo* rompe las membranas, durante los primeros 3 - 5 minutos de agregado el peróxido, la organela mantiene su integridad, como lo demuestra el hecho de mantenerse el control respiratorio (Fig. 28 A). La cinética de la emisión depende principalmente del medio de ensayo y tratamiento previo de la preparación (Fig. 26). Las membranas mitocondriales enteras y las mitocondrias enteras tienen un comportamiento cinético diferente (Fig. 27) lo cual indica que la integridad de la mitocondria es un factor determinante en las características de la fotoemisión. Stauff y Ostrowsky (1967) describieron una quimioluminiscencia en membranas mitocondriales que aumentaba con la edad de la preparación y dependía del tratamiento que recibía; supusieron que esta emisión no respondía a fenómenos fisiológicos. La emisión

máxima no depende apreciablemente del estado metabólico de la mitocondria (Fig. 29), lo que estaría de acuerdo con esta suposición. La independencia de la emisión luminosa inducida por t-BOOH 5 mM con el estado metabólico de la mitocondria respondería fundamentalmente al hecho de que la agresión de peróxido 5 mM es mucho mayor que cualquiera de las variaciones que pudieran deberse a la producción endógena de hidroperóxidos. Una mitocondria de hígado o corazón de rata puede producir 0,3 - 0,6 nmoles de  $H_2O_2$ /min.mg de proteína (Chance y col., 1979); Boveris y Chance, 1973). Si una concentración de t-BOOH de 5 mM produce una emisión máxima de 800 cps (Fig. 17), considerando un volumen de 4 ml y 12 mg de proteína y 20  $\mu$ moles de hidroperóxido en dicho volumen, para la producción mitocondrial de  $H_2O_2$  en un sistema con la misma cantidad de proteína se esperarían 3 cuentas por segundo en la cubeta (considerando que el  $H_2O_2$  es 10 veces más efectiva que el t-BOOH en inducir emisión luminosa en un sistema modelo, Tabla II). En consecuencia, la variación de la emisión luminosa debida a la producción de moléculas oxidativas durante la respiración mitocondrial no sería detectable. Aparentemente la emisión que se mide en presencia de hidroperóxidos refleja fundamentalmente un proceso destructivo que involucra a los lípidos y las proteínas de la membrana. Las diferencias observadas en los distintos estados metabólicos podrían llegar a atribuirse al mayor consumo de oxígeno en los estados 1, 4 y 3, en ese orden.

La dependencia de la emisión con la concentración de oxígeno (Fig. 30) indicaría que ocurren dos procesos independientes: uno de muy alta afinidad por el oxígeno que ocurriría al iniciarse la reacción y para el cual la integridad de la mitocondria sería indispensable y otro a tiempos largos que sería semejante al que ocurre en membranas mitocondriales. Los bajos niveles de emisión de las mitocondrias indicaría que no son el factor principal responsable de la emisión de homogeneizados de hígado de rata.

Un comportamiento especial y coherente con el de los correspondientes homogeneizados es el de las mitocondrias de cerebro de rata frente al estímulo de t-BOOH en altas concentraciones (pág. 69). La falta de respuesta está de acuerdo con la inhibición de la emisión de homogeneizados en dichas condiciones (Fig. 17). Así como la integridad de la mitocondria disminuye los valores de la emisión máxima, ya se ha indicado que la integridad de un órgano no sólo disminuye los valores de las emisiones sino que también cambia sus características espectrales y el mismo fenómeno se observa con semillas de soja (Sección 6.2.6).

Esto indica que si bien en la célula normal hay una compleja mezcla de proteínas y lípidos que, puestos en solución se peroxidan fácilmente (Pryor, 1973, 1978) la compartimentalización de la célula, sumado a la acción y reciclaje de agentes y enzimas antioxidantes y el control de las concentraciones de oxígeno tisulares disminuyen el peligro potencialmente alto de que ocurran procesos peroxidativos a valores bajos y controlables. Cuando por patologías diferentes o disminuye el nivel de agentes antioxidantes o se destruye o daña la estructura membranosa de la célula, la posibilidad de que las reacciones oxidativas normales de la célula hagan aumentar los niveles de radicales libres aumenta considerablemente, pudiendo ser causa y consecuencia de diversos daños tisulares.

#### 6.5 LA QUIMIOLUMINISCENCIA COMO UN ENSAYO NO INVASIVO.

Los ensayos para procesos peroxidativos que son no invasivos permiten estudiarlos en condiciones fisiológicas. En el caso de la quimioluminiscencia de superficies de órganos, si bien la agresión que representa la anestesia y exposición del órgano es grande, es menor que la que produce sobre el tejido cualquier otra técnica clásica empleada para estudiar procesos peroxidativos. En el caso de semillas de soja o embriones este problema no existe y puede estudiarse el sistema en condiciones normales. El hígado de rata tiene una emisión de muy baja intensidad. Esta emisión fue descrita por Tarusov en 1964 y por Shimizu y col., en 1973. Boveris y col., en 1980 (a) han demostrado que esta emisión aumenta cuando se perfunden animales con t-BOOH. En el presente trabajo se lo ha hecho usando  $\text{CCl}_4$  como agente pro-oxidante hepático. Se sabe que la toxicidad del  $\text{CCl}_4$  se debe a su capacidad de formar radicales libres estables. La ruptura de un enlace C-Cl por el citocromo P 450 origina radicales  $\text{CCl}_3$  (reacción 51) iniciando reacciones de radicales en cadena que llevan a la peroxidación de los lípidos y otros componentes celulares (Recknagel, 1977). El  $\text{CHCl}_3$  que por ruptura homolítica del enlace C-Cl da radicales menos estables no actúa de esta forma. La administración intraperitoneal de  $\text{CCl}_4$  en ratas induce una emisión de fotones solamente en el hígado (pág. 85) siendo el aumento de emisión inmediato a la inyección del halometano. Esta emisión depende de que haya circulación del intestino al hígado (Fig. 40) y el efecto es específico para el hígado, estando de acuerdo con que la metabolización del  $\text{CCl}_4$  se produce a través del citocromo P 450 hepático.

La emisión espontánea puede depender de mecanismos moleculares diferentes que la inducida por hidropéroxido de ter-butilo o por  $\text{CCl}_4$ , diferenciándose principalmente en la forma de iniciarse los procesos, aunque respondiendo todos a mecanismos peroxidativos que involucran radicales libres. Es un hecho importante que la emisión espontánea depende de que haya circulación de sangre por el hígado (Tabla IV) ya que permite eliminar la posibilidad de que la emisión sea solamente una emisión superficial debida a la exposición del hígado a una presión de oxígeno superior a la del medio interno de la rata. En un hígado expuesto por 20 minutos, la emisión cae lentamente a un valor que es de  $80 \pm 5\%$  de su valor inicial. Este efecto es esperable si se tiene en cuenta que la superficie del hígado puede secarse y, aunque el animal está vivo y termostaticado, la situación no fisiológica de hígado expuesto y la anestesia profunda pueden inducir alteraciones en la capacidad de mantener la regulación del medio interno afectando la emisión. Es difícil estudiar en estos casos el efecto del anestésico sobre la emisión porque es imposible trabajar con animales sin anestesiar. Si bien es posible trabajar con animales desmedulados, la situación de animal desmedulado es considerada menos fisiológica que la de anestesiado. Un estudio a fondo con diferentes anestésicos o, en el caso de emisión de cerebro, estudios con animales trepanados empleando anestesia leve o sin anestesia (único caso de exposición de órgano en el que es posible trabajar sin anestesia) pueden ayudar a mejorar la información.

Una situación fisiológica de gran interés en la cual se alteran continuamente y suavemente los aportes de oxígeno a los órganos es el proceso de envejecimiento. Cuanto mayor es el peso del animal (más viejo es) menor es el aporte de oxígeno a los órganos (Dehn y Bruce, 1972) y menor es la posibilidad de formar peróxidos. Esto debería reflejarse en los niveles de quimioluminiscencia y es lo que se observa (Fig. 42) en la emisión espontánea de hígado de rata. Cuanto más joven es el animal, mayor es la emisión por unidad de área del hígado, siendo notable la variación para animales jóvenes, donde la velocidad de envejecimiento es alta. Como los procesos oxidativos ocurren en todos los órganos y todos los sistemas biológicos (Chance y col., 1979), todos los órganos de rata deberían ser capaces de emitir (Tabla VI). El comportamiento especial de cerebro "in situ" es consistente con su comportamiento especial observado en homogeneizados y puede explicarse por las mismas causas; además

"in vivo" hay que tener en cuenta que el cerebro es el órgano que más oxígeno consume; combinando los bajos niveles de antioxidantes, la presencia de enzimas peroxidantes y el alto nivel de prooxidantes (Sinnott y col., 1980), se explican sus altos niveles de emisión. El intestino emite menos que el cerebro pero más que el hígado, siendo ésta una emisión insensible al  $\text{CCl}_4$ . El intestino tiene tejido adiposo expuesto que podría responder en parte por la emisión observada. La emisión de músculo, igual que la de hígado refleja el consumo de oxígeno de ambos.

La fuerte dependencia entre la emisión y el aporte de oxígeno al órgano o la edad del animal convierten a la quimioluminiscencia en una técnica adecuada para el estudio de procesos fisiológicos o patológicos en los cuales la integridad del órgano, su metabolismo oxidativo o sus niveles de oxigenación se encuentran alterados. Es una técnica que permite el estudio integral del órgano. El desarrollo de instrumental adecuado permitirá el estudio localizado en microestructuras del tejido. Estos instrumentos deberían ser capaces de detectar emisiones mucho menores que las descritas en este trabajo por lo que deberían tener un ruido electrónico menor que los actuales. El hecho de tener que detectar fotones emitidos por áreas menores permitiría usar tubos fotomultiplicadores más chicos, lo que disminuiría considerablemente el ruido electrónico; el empleo de amplificadores más sofisticados que el que tienen los instrumentos descritos en este trabajo (pero que ya han sido desarrollados) también permitirá disminuir el ruido, lo cual permitirá detectar señales menores. La posibilidad de estudiar la emisión en el interior del tejido a través de guías ópticas delgadas (introducidas en el tejido) o de hacer barridos de superficie ofrece interesantes posibilidades de estudio.

C A P I T U L O V I I

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

1. La luminiscencia de baja intensidad puede ser medida con contadores de fotones o con contadores de centelleo con el circuito de coincidencia desconectado. Las eficiencias de conteo en los diversos instrumentos es variable y depende de las características geométricas del instrumento y de la sensibilidad y tiempo de uso de los tubos fotomultiplicadores.

La reproductibilidad de los resultados en los distintos instrumentos (cinéticas, dependencias con las concentraciones de reactivos, distribuciones espectrales) es satisfactoria.

2. Las reacciones quimioluminiscentes son altamente dependientes de la temperatura. Como en estas reacciones suelen combinarse procesos de autooxidación de lípidos con reacciones enzimáticas, el aumento de la temperatura implica generalmente un aumento en la fotoemisión.
3. Los rendimientos cuánticos de las reacciones quimioluminiscentes están en el orden de  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$  fotones/molécula reaccionante.
4. Se ha encontrado un paralelismo entre las características de las emisiones de fotones y las medidas realizadas con otras técnicas empleadas en el estudio de procesos peroxidativos (formación de malonaldehído, liberación de alcanos, liberación de glutatión en bilis).
5. Para que un sistema biológico emita, es necesario la presencia de oxígeno. Los atrapadores de radicales libres y el cianuro inhiben la emisión de la mayor parte de los sistemas estudiados.
6. La identificación de las especies fotoemisivas sobre la única base del estudio de las distribuciones espectrales no es posible. Los espectros suelen presentar bandas muy anchas y ser complejos.
7. El comportamiento espectral de la emisión en sistemas provenientes de órganos de animales depende de la integridad del órgano y de su composición, siendo relativamente independiente del agente iniciador.
8. Los resultados de la distribución espectral de semillas de soja y el efecto del DABCO son consistentes con la idea de que, al menos una de las especies fotoemisivas pueda ser el oxígeno singulete.
9. El efecto de calentamiento de semillas húmedas sobre la distribución espectral de su emisión indica la presencia de una molécula termolábil relacionada con la emisión.
10. Los estudios de efecto de temperatura sobre la emisión de semillas de soja y de la lipoxigenasa sumado a los efectos de inhibidores, indican que en dicha emi-

sión participan al menos dos procesos: la reacción de la lipoxigenasa y la auto-oxidación de ácidos grasos.

11. La quimioluminiscencia es un ensayo no invasivo y no destructivo que permite estudiar procesos peroxidativos en condiciones fisiológicas.

C A P I T U L O V I I I

R E F E R E N C I A S

- ABUIN, E. y LISSI, E. (1979). *Photochem. Photobiol.*, 30, 59
- AKERBOOM, T.P.M., BILZER, M. y SIES, H. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 4248
- ANDERSEN, B.R., LINT, T.R., BRENDYEL, A.M. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 542, 527
- BAKWIN, T.O. (1978) *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 198. Editado por M.A. De Luca, Academic Press, Nueva York
- BARB, W.G., BAXENDALE, J.H., GEORGE, P. y HARGRAVE, K.R. (1951). *Trans. Faraday Soc.* 47, 591
- BERNHEIM, F., BERNHEIM, M.L.C. y WILBUR, K.M. (1948). *J. Biol. Chem.*, 174, 257
- BOVERIS, A. y CHANCE, B. (1973) *Biochem. J.* 134, 707
- BOVERIS, A., CADENAS, E., REITER, R., FILIPKOWSKI, M., NAKASE, Y. y CHANCE, B. (1980 a) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 347
- BOVERIS, A., CADENAS, E., y CHANCE, B. (1980 b). *Photobiochem. Photobiophys.* 1, 175
- BOVERIS, A., CADENAS, E. y CHANCE, B. (1981). *Fed. Proc.* 40, 2326
- CADENAS, E., BOVERIS, A., CHANCE, B. (1980 a). *Biochem. J.* 187, 131
- CADENAS, E., BOVERIS, A., y CHANCE, B. (1980 b). *FEBS. Lett.* 112, 285
- CADENAS, E., ARAD, I.D., FISHER, A.B., BOVERIS, A. y CHANCE, B. (1980 c). *Biochem. J.* 192, 303
- CADENAS, E., ARAD, I.D., BOVERIS, A., FISHER, A.B. y CHANCE, B. (1980 d). *FEBS. Lett.* 111, 413
- CADENAS, E., BOVERIS, A. y CHANCE, B. (1980 e). *Biochem. J.* 186, 659
- CADENAS, E., BOVERIS, A., y CHANCE, B. (1980 f). *Biochem. J.* 188, 577
- CILENTO, G., DURAN, N., ZINNER, L., VIDIGAL, C.C., FARIA OLIVEIRA, O.M.M., HAUN, M. FALJONI, A., AUGUSTO, O., DE BAPTISTA, R.C. y BECHARA, E.J.H. (1978). *Photochem. Photobiol.* 28, 445
- CILENTO, G. (1980). *Photochem. Photobiol. Rev. Vol. V*, pág. 199. Editado por K.C. Smith. Plenum Pub. Corp.
- CHANCE, B. y HAGIHARA, B. (1963). *Proc. 5<sup>th</sup> Inter. Congress. Biochem. Moscú*. Pergamon Press, Londres. Vol. V, pág. 3
- CHANCE, B., SIES, H. y BOVERIS, A., (1979). *Physiol. Rev.* 59, 527
- COHEN, G. (1977) en *Superoxide and Superoxide dismutases*, pág. 317, editado por A.M. Michelson, J.M. Mc Cord e I. Fridovich. Academic Press. Londres
- DEHN, M.M. y BRUCE, R.A. (1972). *J. Appl. Physiol.* 33, 805
- DENEKE, C.F. y KRINSKY, N.I. (1977). *Photochem. Photobiol.* 25, 299
- DILLARD, C.J., DUMELIN, E.E. y TAPPEL, A. (1977). *Lipids*, 12, 109
- DI LUZIO, N.R. y STEGE, T.E. (1977). *Life Sci.* 21, 1457
- DORFMAN, L.M. y ADAMS, G.E. (1973) en *Reactivity of the Hydroxyl Radical in Aqueous Solutions*. NSRDS - NBS 46
- FARIA OLIVEIRA, O.M.M., HAUN, M., DURAN, N., O'BRIEN, P.J., O'BRIEN, C.R. BECHARA, E.J.H. y CILENTO, G. (1978). *J. Biol. Chem.* 4707

- FAULKNER, L.R. (1978) en *Methods in Enzymology* Vol. LVII, pág. 494. Editado por M.A. De Luca, Academic Press, Nueva York
- FEE, J.A. y VALENTINE, J.S. (1977) en *Superoxide and Superoxide Dismutases*, pág. 19 Editado por A.M. Michelson, J.M. McCord. e I. Fridovich. Academic Press, Nueva York
- FOOTE, C.S. (1976) en *Free Radicals in Biology*, Vol. II, pág. 85. Editado por W.A. Pryor. Academic Press, Nueva York
- GERSHMAN, R., GILBERT, D.L., NYE, S.W., SWYER, P. y FENN, W.D. (1954) *Science* 119, 623
- GERSHMAN, R. (1964) en *Oxygen in the Animal Organism*. Actas de un simposio realizado en Londres en 1963. Pergamon Press, Oxford
- GORNALL, A.G. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751
- GUNZLER, W.A., KREMERS, H. y FLOHE, L. (1974). *Z. Klin. Chem. Biochem.* 12, 444
- HABER, F. y WEISS, J. (1934) *Proc. R. Soc. London. Ser. A.* 147, 332
- HAMMAN, J.P., GORBY, D.R., y SELIGER, H.H. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 793
- HASTINGS, J.W. y WEBER, G. (1963). *J. Opt. Soc. of Am.* 53, 1410
- HASTINGS, J.W. y WILSON, T. (1976) *Photochem. Photobiol.* 23, 461
- HOCHSTEIN, P., NORDENBRAND, K. y ERNSTER, L. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 323
- INABA, H., SHIMIZU, Y., TSUJI, Y. y AMAGISHI, A. (1979). *Photochem. Photobiol.* 30, 169
- INGOLD, K.U. (1969). *Acc. Chem. Res.* 2, 1
- JOHNSON, F.H. y SHIMOMURA, O. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 331 Editado por M.A. De Luca; Academic Press, Nueva York
- KAKINUMA, K., CADENAS, E., BOVERIS, A. Y CHANCE, B. (1979). *FEBS Lett.* 102, 38
- KARL, D.M. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 85. Editado por M.A. De Luca, Academic Press, Nueva York
- KHAN, A.U. (1976) *J. Phys. Chem.* 80, 2219
- KHAN, A.U. y KASHA, M. (1963). *J. Chem. Phys.* 39, 2105
- KHAN, A.U. y KASHA, M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 6047
- KOHLTOFF, I.M., SANDELL, E.B., MEEHAN, E.Y. y BRUCKENSTEIN, S. (1972). *Análisis Químico Cuantitativo*, 4a. edición; pág. 863. Librería y Editorial Nigar, S.R.L. Buenos Aires
- LEEMASTERS, J.J. y HACKENBROCK, C.R. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 36. Editado por M.A. De Luca. Academic Press, Nueva York
- LIEBER, C.S. y DE CARLI, L.M. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2505
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265
- LLOYD, D., BOVERIS, A., REITER, R. Y CHANCE, B. (1979). *Biochem. J.* 184, 149
- MAMEDOV, T.G., KONEN, V.V. y POPOV, G.A. (1973) *Biophysika (Moscú)* 18, 685

- MAYEDA, E. y BARD, A.J. (1974). *J. Am. Chem. Soc.* 96, 4023
- Mc. CORD, J.M. y DAY, E.D. (1978). *FEBS Lett.* 86, 139
- MOORE, J.F. (1976). *Físico-Química*, Vol. II. pág. 527. Edición en portugués. Ed. Edgard Blucher Ltda. Editora da Universidade de Sao Paulo, Brasil
- NAKANO, M., NOGUCHI, T., SUGIOKA, K., FUKUYAMA, H., SATO, M., SHIMIZU, Y., TSUJI, M. e INABA, H. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 2404
- OLSON, J.A. (1968). *Vitam. Horm.* (Nueva Uork) 26, 1
- ORGEL, L. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 49, 519
- ORLOV, S.N., DANILOV, V.S., KRUSHCHEV, A.A. y SHVETSOV, Y.N. (1975). *Biophysics (Mos-cá)* 20, 637
- PARRISH, D.J. y LEOPOLD, A.C. (1978). *Plant. Physiol.* 62, 470
- PINTO, R.E. y BARTLEY, W. (1969). *Biochem. J.* 112, 108
- PROHNSKA, J.R. y GANTHER, H.E. (1976). *J. Neurochem.* 27, 1379
- PRYOR, W.A. (1970) en *Introdução ao Estudo dos Radicais Livres* (en portugués), pág. 35. Editora Edgar Blücher Ltda. Editora da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil
- PRYOR, W.A. (1973). *Fed. Proc.* 32, 1862
- PRYOR, W.A. (1978). *Photochem. Photobiol.* 28, 787
- RECKNAGEL, R.O., GLENDE, E.A. y KRUSZKEWYCZ, A.M. (1977) en *Free Radicals in Biology*, Vol. III, pág. 97. Editado por W.A. Pryor, Academic Press, Nueva York
- RIELY, C.A., COHEN, G. y LIBERMAN, M. (1974). *Science* 183, 208
- ROEDERER, J.G. (1973) en *Física Elemental*, pág. 27. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires
- ROSWELL, D.F. y WHITE, E.H. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 409. Editado por M.A. De Luca. Academic Press, Nueva York
- RUSSELL, G.A. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3871
- SAGAI, M. y TAPPEL, A.L., (1978). *Toxicology Letters*, 2, 149
- SELIGER, H.H. (1964). *J. Chem. Phys.* 40, 3133
- SELIGER, H.H. (1975). *Photochem. Photobiol.* 21, 355
- SELIGER, H.H. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 560. Editado por M. A. De Luca, Academic Press, Nueva York
- SHIMIZU, Y., INABA, H., KUMAKI, K., MIZUNO, K., HATA, S. y TOMIOKA, S. (1973). *IEEE Trans Instrum. Meas.* 22, 153
- SIES, H., GERSTENECKER, C., MENZEL, H., FLOHE, L. (1972) *FEBS Lett.* 27, 171
- SIES, H., KOCH, O.R., MARTINO, E. y BOVERIS, A., (1979) *FEBS Lett.* 103, 287
- SIGEL, H., (1969). *Angew. Chem.* 8, 161
- SINNET, P.M., HEIKKILA, R.E. y COHEN, G. (1980). *J. Neurochem.* 34, 1421
- SINNHUBER, R.D. y LU, T.C. (1958). *Food Technol.* 12, 9
- SKOOG, D.A. y WEST, D.M. (1975) en *Análisis Instrumental*, pág. 55. Ed. Interamericana, México.

- STANLEY, P.E. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 215, editado por M. A. De Luca. Academic Press, Nueva York
- STAUFF, J. y OSTROWSKI, J. (1967). *J. Naturforschg*, 22, 734
- SUGIOKA, K., y NAKANO, M. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 423, 203
- SZILARD, L. (1959). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 30
- TAPPEL, A.L. (1963) en *The Enzymes*, Editado por P.D. Boyer, M. Lardy y K. Myrback, Vol. III, pág. 275. Academic Press, Nueva York
- TAPPEL, A.L. (1979) en *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen*, editado por W. S. Caughey, pág. 679, Academic Press, Nueva York
- TAPPEL, A.L. (1980) en *Free Radicals in Biology*, Vol. V, capítulo II. Editado por W.A. Pryor. Academic Press, Nueva York
- TARUSOV, B.N., POLIDOVA, A.I. y ZHURAVLEV, A.I. (1961) *Radiobiologiya*, 1, 150
- THURMAN, R.G. (1973) *Mol. Pharmacol.* 2, 670
- TRUSH, M.A., WILSON, M.E. y VAN DYKE, K. (1978) en *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 462. Editado por M.A. De Luca, Academic Press, Nueva York
- TURRO, N.J. (1978). *Modern Molecular Photochemistry*. Editado por The Benjamin Cunnings Publishing Co. Inc. California
- ULITZUR, S. Y HASTINGS, J.W. (1978). *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, pág. 189 Editado por M.A. De Luca, Academic Press, Nueva York
- VIDELA, L.A., FRAGA, C.G., KOCH, O.R. y BOVERIS, A. (1983). *Biochem. Pharmacol.* (en prensa)
- WALLING, C. (1969). *J. Am. Chem. Soc.* 91, 7590
- WALLING, C. y JOHNSON, R.A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* 97, 363
- WALLING, C., PARTCH, R.E. y WEIL, T. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 140

C A P I T U L O I X

R E S U M E N

La luminiscencia de baja intensidad en sistemas biológicos refleja directa o indirectamente procesos de peroxidación lipídica (Boveris y col., 1980 a, Cadenas y col., 1980 a). Si bien había abundante información sobre la de algunos sistemas como leucocitos polimorfonucleares (Nakinuma y col., 1979), peroxidasa de rábano con isobutiraldehído (Cilento, 1980), lipoxigenasa con ácido linoleico (Boveris y col., 1980 b), era muy poca la información que había sobre la emisión de sistemas más complejos, especialmente órganos de mamíferos "in situ" y semillas enteras.

Las técnicas de conteo de fotones están desarrolladas, especialmente en lo que a contadores de centelleo se refiere, pero recién en los últimos 10 años se han comenzado a aplicar a la medición de emisiones de baja intensidad en sistemas biológicos. La variedad de instrumentos empleados en dichas medidas hizo interesante la comparación de sus rendimientos y propiedades. Se han comparado las medidas obtenidas para sistemas de emisión constante y variable con el tiempo con cinco instrumentos diferentes (tres contadores de centelleo con el circuito de coincidencia desconectado y dos contadores de fotones). Los valores de las emisiones medidas dependen de las características geométricas del aparato (área del fototubo, distancia de la muestra al tubo, área de la zona emisiva).

Se ha hallado entre los aparatos empleados una buena reproducibilidad de las cinéticas y de los espectros de emisión. El estudio de las emisiones de sistemas en solución simple (citocromo c en presencia de hidroperóxidos, o lipoxigenasa con ácido linoleico), o complejos (homogeneizados de órganos, o de semillas de soja, mitocondrias de hígado) indican que la emisión depende de la temperatura y de la concentración de oxígeno y de reactivos. Todas las emisiones son inhibidas por cianuro de potasio y por el atrapador de radicales libres di-ter-butyl quinol. En sistemas que contenían lipoxigenasa, el ácido salicil hidroxámico, inhibidor selectivo de dicha enzima también inhibió la emisión.

Los sistemas enteros (órganos "in situ", semillas) tienen emisiones de intensidad mucho menor que los sistemas en solución. Agentes adecuados (como  $\text{CCl}_4$  en el caso de órganos "in situ" y agua o diversos solventes orgánicos en el caso de semillas) aumentaron significativamente las emisiones.

El estudio de las distribuciones espectrales de las emisiones detectadas no permiten identificar inequívocamente las especies fotoemisivas. De acuerdo con las teorías más aceptadas (Boveris y col., 1980 a, Cadenas y col., 1980 a,b,c; Deneke y Krinsky, 1977; Inaba y col., 1979) las especies que podrían llegar a

emitir son carbonilos excitados que emiten en la región de 400 - 500 nm y el oxígeno excitado cuyas emisiones más características están a 634 y 703 nm (Khan y Kasha, 1963). Ninguna de las distribuciones espectrales estudiadas (homogeneizados de hígado y cerebro de rata, mitocondrias de hígado de rata, hígado de rata "in situ", semillas de soja, usando agentes inductores adecuados para cada caso) responde a estos patrones. En algunos casos (órganos "in situ" y semillas enteras) el alto porcentaje de luz roja y el efecto del DABCO (que aumenta la emisión luminosa debida a la emisión bimolecular del oxígeno excitado sin alterar el espectro de la emisión, Deneke y Krinsky, 1977) haría pensar que el oxígeno singulete es como una de las especies emisoras.

Cuanto mayor es la integridad del sistema emisor, mayor es el porcentaje de luz roja en la emisión. Por otra parte son más importantes en la distribución espectral de la emisión las características del emisor que las del inductor.

Una de las grandes ventajas de los estudios de quimioluminiscencia de baja intensidad, es su carácter de no invasiva, lo cual, en la mayoría de los casos permite recuperar la muestra en las condiciones originales.

Alberto Brauer

Alvaro Krinsky