

## EFFECTOS DE ANTIOXIDANTES SOBRE LA ACCION DEL PEROXIDO DE HIDROGENO EN PIEL DE SAPO\*

Effects of antioxidants on Hydrogenperoxide acting on toad skin

ALARCÓN, J.M., QUEVEDO, L., REYES, P. \*\*

### RESUMEN

Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) produce daño a nivel celular y tisular. El medio extracelular posee pocos mecanismos de defensa antioxidantes y se ha demostrado que en presencia de trazas de iones metálicos se puede formar el radical oxihidrilo ( $OH^\cdot$ ) a partir del  $H_2O_2$ . Postulamos que este mecanismo de acción podría inhibirse con compuestos antioxidantes. Con el objeto de estudiar los efectos de  $H_2O_2$  y de antioxidantes en un epitelio transportador de iones, se midieron parámetros bioeléctricos como la corriente de corto circuito (CCC) y la diferencia de potencial (DP) en una preparación de piel del abdomen de sapo *Pleurodema thaul*, montada en una cámara de lucita tipo Ussing. La adición de dosis crecientes de  $H_2O_2$  (mM: 0.82, 8.2 y 24.6) causa una respuesta inhibitoria de ambos parámetros. Posteriormente las pieles fueron preincubadas con agentes antioxidantes para determinar la presencia de radicales libres generados por la adición de  $H_2O_2$ . Los resultados demuestran que vitamina E, catalasa y manitol bloquean significativamente la inhibición en los parámetros bioeléctricos producidos por  $H_2O_2$  a dosis bajas (0.82 y 8.2), y por otra parte alopurinol y la superóxido dismutasa no cambian los efectos del  $H_2O_2$ .

Este trabajo muestra algunas evidencias de la participación del radical hidroxilo en la inhibición del transporte biológico en piel, y el bloqueo del efecto inhibitorio de  $H_2O_2$  sobre los parámetros bioeléctricos por antioxidantes.

### ABSTRACT

It has been demonstrated the injury effects of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on cells and tissues. The extracellular medium has little antioxidants mechanism. Therefore, it was shown the formation of the radical oxhidrile ( $OH^\cdot$ ) from  $H_2O_2$ , when traces of metal ions are present. We postulated the inhibition of this mechanism by antioxidants.

In this paper we report the effects of  $H_2O_2$  and of antioxidants on an ion transporting epithelium. With this object the short circuit current (SCC) and the potential difference (PD) were studied. These parameters were measured in the isolated abdominal toad skin of *Pleurodema thaul*. The skin was mounted in a Ussing type chamber. The addition of increasing doses of  $H_2O_2$  (mM: 0.82, 8.2 and 24.6) caused inhibition of both parameters, but, when skins were preincubated with vitamin E, catalase o manitol the results showed a significant block of this inhibition. On the other hand, alopurinol and superoxide dismutase do not modify the effects of  $H_2O_2$ . This work shows some evidences of the participation of  $OH^\cdot$  in the inhibition of biological transport measured by electric parameters and the blocked of this inhibition by some antioxidants.

KEYWORDS: Ion transporting epithelium. Free radicals.

### INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha apreciado un interés creciente por el estudio del efecto de los radicales libres sobre las estructuras biológicas. (Fridovich, 1976. Gerschman, *et al*, 1954. Vivaldi *et al*. 1983).

\*Financiado por Proyecto D.I. 20.33.41 Universidad de Concepción.

\*\*Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales (Casilla 2407), Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

El oxígeno molecular es el aceptador final de los electrones generados durante los procesos oxidativos de las células. Normalmente capta 4 electrones en forma simultánea a nivel de la citocromo-oxidasa mitocondrial, con lo cual es reducido a agua. Pero esta reducción no ocurre en un solo paso, sino que en forma seriada, generando sustancias intermedias; es así que cuando el  $O_2$  capta un electrón, éste se transforma en el ion superóxido ( $O_2^{\circ}$ ) el cual al captar un segundo electrón, da lugar a la formación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La reducción trivalente de esta especie da como resultado la formación del radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y pérdida de una molécula de agua. El ion superóxido y el radical hidroxilo forman parte de una familia de compuestos denominados radicales libres (Dormandy, 1969). La primera vez que se les describió fue relacionándolos con el proceso de rancidificación de las grasas (Dormandy, 1969). Actualmente se conoce que tienen mucha implicancia en una importante parte de enfermedades humanas (Di Guiseppi, *et al.* 1984. Gerschman *et al.* 1954). Los radicales libres son muy reactivos, químicamente inestables y suelen estar en concentraciones bajas, para el caso del  $OH^{\cdot}$ , el más reactivo de los radicales del oxígeno, el rango de concentraciones va de 0,1 mM a 1 nM, desplazándose muy poco de su lugar de formación (Southorn, 1988), la media del radio de acción del  $OH^{\cdot}$  en una célula es aproximadamente de 30 Å, y tiene un período de vida de sólo unos pocos microsegundos. (Hutchinson, 1957). Suelen suscitarse reacciones en cadena que, en circunstancias normales, ocurren lentamente, pero pueden apresurarse mucho si se introducen iniciadores en cadena (por ejemplo, otros radicales libres). En estas reacciones hay tres procesos importantes: 1) iniciación, cuando se producen radicales libres; 2) propagación, cuando se forman nuevos radicales libres como reacción en cadena; y 3) terminación, cuando se destruyen los radicales libres. (Robbins, 1975).

El peróxido de hidrógeno "per se" (Southorn, 1988) no es especialmente tóxico para las células, pero puede atravesar membranas celulares (Voetman, *et al.* 1980), y esto es de potencial importancia porque el medio extracelular posee pocos mecanismos de defensa antioxidantes, y en presencia de trazas de iones metálicos en transición, se puede formar el radical  $OH^{\cdot}$  a partir del  $H_2O_2$ .

(Southorn, 1988). Por otra parte, al peróxido de hidrógeno se le considera como una especie química de baja reactividad en comparación con los radicales libres. A bajas concentraciones el peróxido de hidrógeno es removido por una reacción con el GSH, formando GSSG y agua, en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (Southorn, 1988). A altas concentraciones el  $H_2O_2$  es catalizado por las catalasas y peroxidases (Southorn, 1988); pero estos mecanismos de defensa actuarían en el medio intracelular y en el complejo citocromo oxidasa respectivamente, y difícilmente los podremos encontrar en las membranas celulares, en donde el daño producido por el  $H_2O_2$  sugiere que este compuesto es precursor de uno de mayor reactividad (Cohen, 1978. Repine, *et al.* 1981); si este compuesto fuera un radical libre, podría anularse con especies antioxidantes específicas, tales como el manitol, la superóxido dismutasa, alopurinol, o inespecíficas como las vitaminas E o C, por ejemplo (Robbins, 1975. Southorn, 1988).

En preparación de piel abdominal aislada de anfibio y en particular de *Pleurodema thaul* se ha probado una gran variedad de compuestos con la finalidad de dilucidar sus posibles mecanismos de acción. Resultados muy similares a los encontrados en esta especie han sido obtenidos utilizando otras preparaciones. (Schilb, 1969. Wiesmann, *et al.* 1978).

Mucho se conoce acerca del funcionamiento de este epitelio en particular. Sus principales características lo enmarcan como uno de alta resistencia cuyos estratos celulares funcionan como una sola célula movilizandole sodio ( $Na^+$ ) desde el borde apical, a través de los canales sensitivos e insensitivos a amilorida, generando una extrusión mediante una ATPasa sodio-potasio en el borde basolateral (Ussing, *et al.* 1951).

Un transporte activo de cloruros ( $Cl^-$ ) se ve asociado a estas corrientes de sodio desde el medio interno (serosal) al extremo (mucosal), el que se lleva a cabo fundamentalmente en células glandulares (Mills, 1985), en esta asociación de transportes iónicos se puede cuantificar el efecto de drogas (Quevedo, *et al.* 1988. Sobrevia, *et al.* 1989) y de hormonas (Neumann, *et al.* 1986).

En este trabajo trataremos de dilucidar el mecanismo de acción del efecto del peróxido de hidrógeno en piel de batracio *Pleurodema thaul*.

## MATERIALES Y METODOS

Piel abdominal de sapo *Pleurodema thaul* fue removida y montada en cámara de lucita tipo Ussing (Ussing, *et al*, 1951) dejando un área circular de 1 cm<sup>2</sup> que fue expuesta por ambos lados a 3 ml de solución Ringer sapo ajustado a pH 7.4 y a una temperatura que osciló entre 18 y 20 °C, manteniéndose una adecuada oxigenación con abundante burbujeo.

El registro de potencial eléctrico transepitelial (DP) fue obtenido con un par de electrodos de calomelano con puentes de Agar-Ringer y la corriente de cortocircuito (CCC) con electrodos de Ag-AgCl no polarizables dispuestos a 15 mm de la piel. Ambos parámetros se registraron en un inscriptor Cole-Parmer de dos canales, determinando los cambios de DP a CCC y viceversa, mediante un fijador de voltaje automático (G. Metraux Electronique). La preparación se mantuvo durante 90 minutos en estabilización de su DP y CCC.

Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Kadus fue administrado al medio de baño mucosal o serosal, logrando en cámara concentraciones de mM: 0.82, 8.2 y 24.6.

La solución Ringer sapo presentó la siguiente composición (mM): NaCl 113.0; KCl 1.9; CaCl<sub>2</sub> 2.0; NaHCO<sub>3</sub> 2.3, y Glucosa 11.0.

Catalasa, Vitamina E, Manitol, Alopurinol y Superóxido Dismutasa (SOD) fueron también utilizados, inyectándoles intramuscularmente 60 minutos antes de reseca la piel abdominal.

## RESULTADOS

Concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no produjeron efectos significativos sobre los parámetros bioeléctricos DP y CCC, cuando se administraron al medio de baño serosal. En cambio, si se obtuvo variación significativa cuando se adicionaba al lado mucosal de la piel.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada al medio de baño mucosal en dosis crecientes de 0,82 mM, 8,2 mM y 24,6 mM generó un decaimiento dosis-dependiente en los parámetros bioeléctricos a través del tiempo (Fig. 1).

Pieles tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,82 mM preincubadas durante 30 min. con vitamina E (0.5 g/l) o

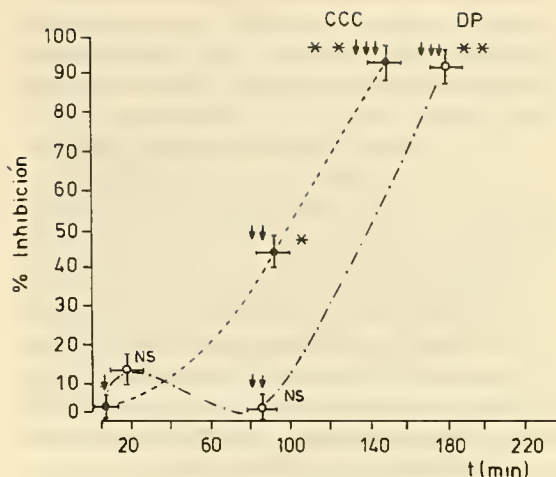


FIG. 1. Efecto de concentraciones crecientes (mM: I 0.82; II 8.2; III 24.6) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando se adicionaba al medio de baño mucosal de una preparación de piel abdominal aislada de sapo *Pleurodema thaul*, sobre el porcentaje de inhibición en la CCC (---) y la DP (-.-.-) a través del tiempo.  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , NS- no significativo; las barras horizontales y verticales indican el E.S.; test t de Student de datos pareados. n=5.

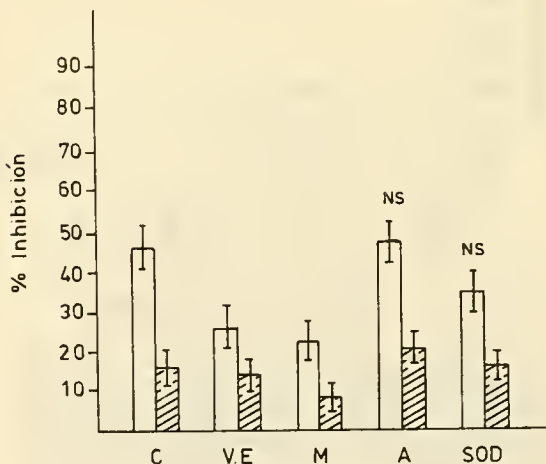


FIG. 2. Comparación entre el porcentaje de inhibición en la CCC (barra blanca) y DP (barra achurada) cuando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.82 mM se adicionaba al medio de baño mucosal (C), y cuando la piel fue preincubada con vitamina E 0.5 g/l (VE), manitol 0.1 g/l (M), alopurinol 0.013 g/l (A) y SOD 0.1 g/l (SOD).  $p < 0.01$ , NS — no significativo; las barras verticales indican el E.S.; test t de Student de datos pareados. n=5.

manitol (0.1 g/l) redujeron significativamente el decaimiento en la CCC y DP; en cambio alopurinol (0.013 g/l) o SOD (0.1 g/l) no alteraron la inhibición del efecto de  $H_2O_2$  (Fig. 2). Por otra parte, cuando  $H_2O_2$  8.2 mM se preincubaba 30 min. con catalasa (0.98 g/l) inhibió significativamente en un 65 + 3% la respuesta de decaimiento en la CCC y en un 80 + 5% la respuesta de decaimiento de la DP. (Fig. 3).

Otro grupo de pieles tratadas con  $H_2O_2$  8.2 mM y preincubadas durante 30 min. con vitamina E o manitol y con las mismas dosis, no alteraron significativamente el descenso de la CCC y DP con respecto a los decaimientos control (Fig. 4). El mismo resultado se obtuvo al agregar alopurinol (0.013 g/l) o SOD (0.1 g/l).

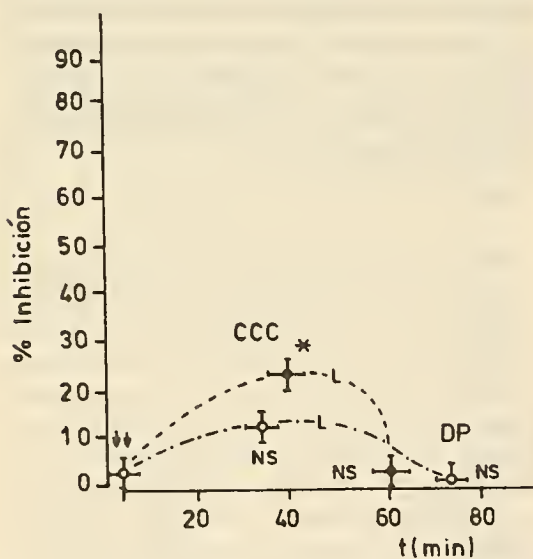


FIG. 3. Efecto de  $H_2O_2$  8.2 mM (ii), cuando la piel abdominal aislada de sapo *Pleurodema thaul* era preincubada con catalasa (0.98 g/l) durante 30 min., sobre el porcentaje de inhibición en la CCC (---) y la DP (••••), a través del tiempo  $p < 0.01$ . NS= no significativo; las barras horizontales y verticales indican el E.S.; test t de Student de datos pareados. n=5.

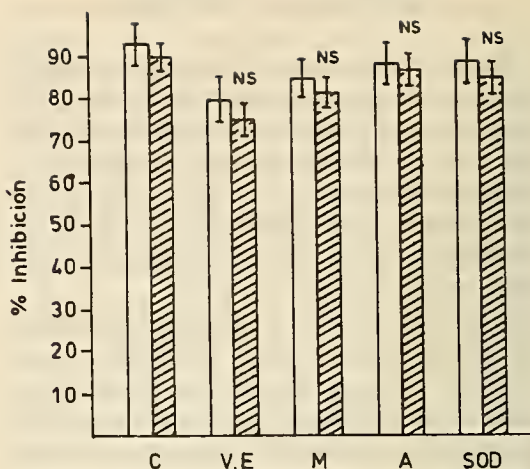


FIG. 4. Comparación entre el porcentaje de inhibición en la CCC (barra blanca) y DP (barra achurada) cuando  $H_2O_2$  8.2 mM se adicionaba al medio de baño mucosal (C), y cuando era preincubada con vitamina E 0.5 g/l (V.E.), manitol 0.1 g/l (M), alopurinol 0.013 g/l (A) y SOD 0.1 g/l (SOD).  $p < 0.01$ . NS= no significativo; las barras verticales indican el E.S.; test t de Student de datos pareados. n=5.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados indican que el efecto sobre los parámetros bioeléctricos DP y CCC es dosis dependiente e irreversible a altas concentraciones, cuando  $H_2O_2$  es adicionada al medio de baño mucosal. En cambio dosis de  $H_2O_2$  adicionada al lado serosal no provocaban cambios en la CCC y DP. Quevedo "et al" postula que esta diferencia de efectos podría deberse a que el  $H_2O_2$  por ser una molécula soluble en lípidos rápidamente actúa sobre las células transportadoras de iones de la piel cuando es adicionada al lado mucosal. En cambio, al agregarla al lado serosal, el  $H_2O_2$  debe atravesar una compleja y densa capa de capilares, fibrillas y glándulas, antes de alcanzar a las células transportadoras de iones. (Quevedo et al. 1990).

Al no producirse efecto inhibitorio en la caída de la CCC y DP cuando se administran dosis de  $H_2O_2$  a preparaciones preincubadas con alopurinol, se demuestra indirectamente la ausencia de radicales superóxido producto del catabolismo de las purinas.

Por otra parte, al preincubar con catalasa se observó un bloqueo de la inhibición casi total del efecto en la CCC y DP producido por la adición del  $H_2O_2$ . Esto podría explicar, ya que en el complejo citocromo oxidasa las catalasas y peroxidases tienen como sustrato al  $H_2O_2$ , el que se transforma en oxígeno y  $H_2O$  (Robbins, 1975), pudiendo ocurrir la misma reacción tanto en el citoplasma como en el exterior de la célula.

Vitamina E no presentó diferencias significativas con respecto al control cuando la dosis de  $H_2O_2$  era alta (8.2 mM) pero sí cuando ésta era inferior.

Vitamina E, vitamina C, glutatión reducido son sistemas reductores no enzimáticos (Voetman *et al*, 1980) que reducen los agentes oxidantes (Radicales libres), luego, es lógico encontrar que la vitamina E protege a las membranas celulares frente a bajas concentraciones de  $H_2O_2$ .

Podemos postular que el efecto inhibitorio del peróxido de hidrógeno sobre los parámetros bioeléctricos CCC y DP en piel de sapo *Pleurodema thaul*, es bifásico; con una mecánica de reacción a la concentración de 0.82 mM (Primera Etapa) y otra a 8.2 mM y 24.6 (Segunda Etapa).

La primera etapa sería producto del radical hidróxilo, el cual es formado posiblemente en el exterior de la célula, donde hay menos antioxidantes naturales, como el glutatión reducido. En esta etapa también produce daño el  $H_2O_2$ , pero en menor grado que el radical  $OH^{\cdot}$ .

La segunda etapa, puede depender de la concentración de  $H_2O_2$ , en donde al ser alta (8.2 mM) pueda producir un traspaso de la molécula de  $H_2O_2$  del lado extra al intracelular, siendo en esta etapa la acción del  $H_2O_2$  preponderante. Esta bifasidad en la mecánica de acción del  $H_2O_2$  puede indicar que los radicales  $OH^{\cdot}$  formados, estarían presentes en baja concentración, la que generaría la respuesta de la primera etapa; y que no podría competir con la alta concentración de su molécula formadora en la segunda etapa.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de la Dirección de Investigación N° 20.33.41, de la Universidad de Concepción.

## BIBLIOGRAFIA

- Cohen, G., 1978. "The generation of hidroxil radicals in biologic systems: toxicological aspects". *Photochem. Photobiol.* 28:669-675.
- Di Guiseppi, J. and Fridovich, I., 1984. "The toxicology of molecular oxygen". *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* 12:315-342.
- Dormandy, T.L., 1969. "Biological rancidification". *Lancet* 2: 684-688.
- Fridovich, J., 1976. "Free radicals in biology". Vol. 1, W.A. Pryer, Ed. Academic Press, New York. 239-267.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Owyer P. and Fenn, W.O., 1954. "Oxygen poisoning and H-irradiation: a mechanism in common". *Science* 119: 623-626.
- Hutchinson, F., 1957. "The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell". *Radiat. Res.* 7: 473-483.
- Mills, J., 1985. "Ion transport across the exocrine glands of the frog skin". *Pfluegers Arch.* 405 (Suppl. 1): 544-549.
- Neumann, V.K., Quevedo, L. and Concha, J., 1986. "Effect of progesterone on the Sodium transporting mechanism of Isolated toad skin". *Cell. Mol. Biol.* 32(6): 685-690.
- Quevedo, L., Carrasco, G., Morales, B. and Quevedo, L., 1990. "Blocking action of hydrogen peroxide on a high resistance epithelium". *Med. Sci. Res.* 18: 491-492.
- Quevedo, L., Neumann, V., Schmidt, E. and Cárdenas, H., 1988. "Action of Lycorine on Neuroadrenergic response of a Nerve-Skin preparation". *Cell. and Mol. Biol.* 34(3): 295-302.
- Repine, J.E., Fox, R.B. and Berger, M.E., 1981 "Hydrogen-peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reactive with staphylococcol iron to from hidroxil radical". *J. Biol. Chem.* 256(14): 7094-7096.
- Robbins, S.L., 1975. "Patología estructural y funcional". Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.U. 1ª Edición (en español), Mexico. pp. 1-13 y 25-55.
- Schilb, T., 1969. "Effects of a cholinergics agents on sodium transport across isolated turtle bladders". *Am. J. Phy-*

- siol. 216: 514-520.
- Southorn, P., 1988. "Free radicals in Medicine I: Chemical Nature and Biologic Reactions". *Mayo Clin. Proc.* Vol. 63 pp. 381-389.
- Sobrevía, L., Quevedo, L., Alarcón, J. & Concha, J., 1989. "Presencia de receptores colinérgicos en piel de sapo *Pleurodema thaul*. Rol del Calcio". *Bol. Soc. Biol. Concepción* 60: 231-238.
- Ussing, H. and Zerahn, K., 1951. "Active transport of sodium as the source of electric current in shortcircuited isolated frog skin". *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127.
- Vivaldi, E., Mancinelli, S. and Gunther, B., 1983. "Experimental hemorrhagic shock in dogs: standardization". *Res. Exp. Med. (Berl)*. 182: 127.
- Voetman, A.A. and Roos, D., 1980. "Endogenous catalase protects human blood phagocytes against oxidative damage by extracellularly generated Hydrogen peroxide". *Blood* 56(5): 842-852.
- Wiesmann, W., Sinha, S., Yater, J. and Flahr, S., 1978. "Cholinergic agents inhibits sodium transport across the isolated toad bladder". *Am. J. Physiol.* 235(6): F564-F569.