



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

**CARACTERIZACION DEL MECANISMO DE DEFENSA DE
ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS ENDOTELIALES
HUMANAS EXPUESTAS AL EFECTO DEL HUMO DEL
TABACO.**

Profesor Guía: Dra. Coralia Rivas Rocco.
Co-Tutor: Dr. Juan Carlos Vera.
Departamento de Fisiopatología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Tesis de Magíster presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de
Concepción

PERLA KATHARINNA STEPHANNIA SALGADO MEJÍAS
CONCEPCION – CHILE
2010

RESUMEN

El endotelio humano está constantemente expuesto a oxidantes intra y extracelulares, como los presentes en el humo de tabaco, ante los que se encuentra protegido por la acción de moléculas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, de las cuales la vitamina C y el glutatión constituyen los componentes no enzimáticos más importantes. La vitamina C debe ser adquirida desde la dieta y es transportada al interior de la célula tanto en su forma reducida (ácido ascórbico) como en su forma oxidada (ácido deshidroascórbico), siendo acumulada intracelularmente como ácido ascórbico, alcanzando concentraciones de 0,1 - 5 mM. A diferencia de la vitamina C, el tripéptido glutatión (GSH, γ -glutamyl-cistein-glicina) es sintetizado por todas las células, alcanzando concentraciones intracelulares de 0,5 a 10 mM, teniendo un papel fundamental en los procesos de detoxificación celular.

Resultados iniciales obtenidos en nuestro laboratorio indican que el glutatión, y no la vitamina C, sería el antioxidante celular que determina la capacidad de células endoteliales humanas para sobrevivir al estrés oxidativo inducido por exposición a los compuestos tóxicos solubles presentes en el humo del tabaco. Tanto el contenido inicial de glutatión como la capacidad de las células para sintetizar el tripéptido *de novo* parecen ser fundamentales para una respuesta antioxidante efectiva. De acuerdo a lo anterior, en este proyecto proponemos que es posible aumentar la resistencia de células endoteliales humanas al efecto tóxico de los componentes solubles del humo del tabaco, modificando farmacológicamente el contenido y la síntesis de glutatión celular, en forma independiente del contenido de vitamina C. Para ello, estudiamos el efecto de la exposición de células endoteliales ECV-304 a medio de cultivo condicionado con humo de cigarro, en la presencia o en la ausencia del inhibidor de la síntesis de glutatión L-butionina-(S,R)-sulfoximina (BSO), del precursor de la síntesis de glutatión N-acetilcisteína, o de ácido ascórbico.

Los objetivos desarrollados en este trabajo de tesis fueron: i) Establecer las condiciones experimentales para modificar en forma controlada y selectiva el contenido de glutatión de células endoteliales humanas. ii) Establecer el papel del contenido inicial de glutatión en la resistencia de las células ECV-304 al efecto tóxico de los componentes

solubles del humo del cigarro. iii) Establecer el papel de la síntesis *de novo* de glutatión en la resistencia de las células ECV-304 al efecto tóxico de los componentes solubles del humo del cigarro. iv) Establecer que el contenido de vitamina C no altera el efecto de la modificación farmacológica del contenido y la síntesis del glutatión celular sobre la resistencia de las células endoteliales humanas al efecto tóxico de los componentes solubles del humo del cigarro.

Aunque células endoteliales ECV-304 conteniendo glutatión sobreviven una exposición aguda y prolongada al humo del cigarro, células tratadas con BSO carentes de glutatión intracelular mueren rápidamente antes de completadas las 48 horas de cultivo. El tratamiento de las células endoteliales con N-acetilcisteína provocó un aumento del glutatión intracelular por un mecanismo que involucra la síntesis *de novo* de glutatión intracelular, ejerciendo un potente efecto protector contra el daño oxidativo producido por el humo del cigarro. En contraste, la vitamina C no tiene efecto protector del daño producido por estrés oxidativo inducido por el humo del cigarro en las células endoteliales ECV-304.

Nuestros resultados demuestran que es posible aumentar la resistencia de células endoteliales humanas al efecto tóxico de los componentes solubles del humo del tabaco, modificando farmacológicamente el contenido y la síntesis de glutatión celular, en forma independiente del contenido de vitamina C.