

Efecto antioxidante de nuevo esteroide sintético (4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona) en cerebro de ratas adultas

David Calderón Guzmán¹, Eugene Bratoeff², Elena G. Ramírez López², Marisa Cabeza Salinas³, Norma Osnaya Brizuela⁴, Raquel García Álvarez⁴, Ernestina Hernández García¹

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto antioxidante de un nuevo esteroide sintético (4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona) en el cerebro de ratas adultas. Se utilizaron 12 ratas adultas de 500 g distribuidas aleatoriamente en grupos de 6, que fueron tratadas con 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (4mg/kg/día), ó vehículo, durante 5 días. Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y el cerebro disecado para realizar la medición de actividad Na⁺, K⁺ ATPasa y los niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) mediante espectrofotometría, y los niveles de GSH por espectrofluorometría. La actividad de Na⁺, K⁺ ATPasa y ATPasa total se incremento ligeramente en los grupos de animales con tratamiento del nuevo esteroide, y solo la ATPasa total presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), respecto a su grupo control. Los niveles de GSH y de peroxidación de lípidos disminuyeron, pero únicamente TBARS mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), en el grupo de animales con tratamiento del nuevo esteroide vs el grupo control. Los resultados sugieren que el 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona

administrado durante un corto periodo de tiempo, disminuye la peroxidación de lípidos y altera la fluidez de la membrana en cerebro de ratas adultas, como resultado de sus modificaciones estructurales.

Palabras clave: esteroides, peroxidación de lípidos, ATPasa, cerebro.

ANTIOXIDANT EFFECT OF NEW SYNTHETIC STEROID (4-CHLORO-17 α -ACETOXY-4-PREGNENE-3,20-DIONE) IN ADULTS RAT BRAIN

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the antioxidant effect of a new steroid (4-chloro-17 α -acetoxy-4-pregnene-3,20-dione) in rat brain. Twelve adults rats of 500g were randomly distributed in groups of 6 that were treated with 4-chloro-17 α -acetoxy-4-pregnene-3,20-dione (4 mg/kg/day), or vehicle, administered during 5 days. At the end of treatment all animals were sacrificed and the GSH levels in the brain were measured by fluorescence method, as well as lipid peroxidation (TBARS), Na⁺,K⁺-ATPase and total ATPase enzymatic activity by spectrophotometry methods. Na⁺,K⁺-ATPase and total ATPase activities increased, only the total ATPase activity increase was significant as compared to the control group ($p < 0.05$). In the group that received 4-chloro-17 α -acetoxy-4-pregnene-3,20-dione the GSH levels remained equal, as compared to the control group. The most important alteration was observed in the lipid peroxidation levels of the steroid group, because TBARS levels diminished

Recibido: 12 junio 2006. Aceptado: 21 julio 2006.

¹Lab. Neuroquímica. Instituto Nacional de Pediatría (INP). Secretaría de Salud (SSA). México. ²Lab. Química Farmacéutica. Facultad de Química. UNAM. México. ³Depto. de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco. México. ⁴Lab. Patología Experimental (INP). SSA. México. Correspondencia: David Calderón Guzmán. Av. Iman #1, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530. México, D.F. E-mail: solodavid2001@yahoo.com.mx

significantly ($p < 0.05$) in the group receiving the steroid vs the control group. The results of this study suggest that the steroid 4-chloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-dione in a single dose in short period of treatment altered the lipid peroxidation and the membrane fluidity both in brain adult animals, as consequence of their structural changes.

Key words: steroids, lipid peroxidation, ATPase, brain.

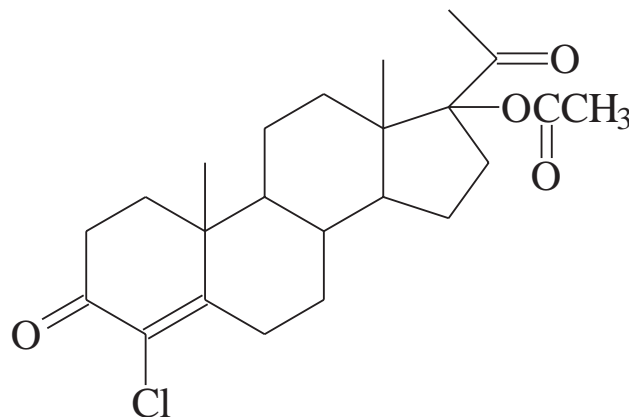
Los esteroides son biomoléculas con la estructura base del ciclopentanoperhidrofenantreno¹. Dos esteroides derivados del colesterol, son testosterona y progesterona². La testosterona se convierte en 5 α -dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa³, provocando varios desórdenes en el sistema endocrino (ES); la progesterona y sus metabolitos son biosintetizados por las células gliales en el sistema nervioso central (SNC) y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico⁴, lo cual explica la participación de los neuroesteroides en varios aspectos de la conducta sexual⁵, la actividad neuronal, el aprendizaje y la memoria⁶, entre otras funciones. Diversos estudios sugieren que los estrógenos pueden ser una útil herramienta en la terapia o prevención de enfermedades neurodegenerativas⁷, las cuales son inducidas principalmente por la presencia de radicales libres (RL) en el SNC.

Los RL son especies reactivas que poseen un electrón desapareado, provenientes de nitrógeno y oxígeno principalmente, este último ha sido implicado en mecanismos de disfunción del cerebro con desórdenes neurodegenerativos relacionados con la edad⁸. Una alternativa para combatir la presencia de estos radicales libres endógenos inducidos por el envejecimiento y la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, requiere de la presencia de glutatión (GSH), cuya deficiencia ocasiona estrés oxidativo (EO)⁹. Un mecanismo de acción propuesto para el GSH, es cuando el óxido nítrico (NO) interacciona con GSH reducido, formando S-nitrosoglutathión (GNSO), cuyo proceso depende de la presencia de oxígeno endógeno¹⁰. Esta interacción se explica como consecuencia del catabolismo del NO, el cual necesita de GSH para su difusión celular. El GSH es el principal regulador del equilibrio redox, y colabora en la protección de los tejidos que están expuestos a los agentes oxidantes, debido a que los radicales libres tienen como principal objetivo el daño sobre los lípidos de la membrana celular¹¹, la cual está integrada también por diversas proteínas, entre las que se encuentra la enzima Na⁺, K⁺ ATPasa, enzima res-

ponsable del intercambio iónico¹². Aunque se desconoce su mecanismo de acción, algunos estudios muestran que los estrógenos son antioxidantes naturales para la peroxidación de lípidos en la membrana¹³, haciendo hincapié en que sus modificaciones estructurales son básicas para su función como antioxidantes. Con base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antioxidante del nuevo esteroide sintético 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona en el cerebro de ratas adultas, mediante los siguientes indicadores bioquímicos: GSH, TBARS, Na⁺, K⁺ ATPasa y ATPasa total.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 ratas adultos (500 g), machos, de la cepa Wistar y se formaron aleatoriamente dos grupos de seis animales cada uno. El grupo control recibió el vehículo y el grupo problema fue tratado con el nuevo esteroide sintético 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (esquema 1) (4mg/kg/día), durante 5 días por vía intraperitoneal (i.p.). Ambos grupos fueron alimentados con dieta de roedor para bioterio y con agua libre demanda. Al término del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación y su cerebro fue colocado en NaCl 0.9% a 4°C; después se realizó la disección del cerebro en corte sagital. La mitad izquierda del cerebro se homogeneizó en 5 volúmenes de TRIS-HCl 0.05M, pH 7.2, para la determinación de la peroxidación de lípidos y la actividad de Na⁺, K⁺ ATPasa; y la mitad derecha se homogeneizó en 5 volúmenes de ácido perclórico (HClO₄) 0.1M, para la determinación de GSH. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su análisis. Durante el estudio, los animales fueron mantenidos en cajas cerradas y con fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad.



Esquema 1. Estructura química del nuevo esteroide sintético (4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona).

Todo procedimiento experimental cumplió con la autorización del Comité para el Uso y Cuidado de Animales de Bioterio de la Institución.

Determinación de la actividad de Na⁺, K⁺ ATPasa y ATPasa total

La técnica fue realizada utilizando aproximadamente 700 µg de proteínas del homogenado de cerebro en tris-HCl 0.05M, las cuales fueron incubadas durante 15 min en un medio conteniendo lo siguiente: 3mM MgCl₂, 7mM KCl, 100mM NaCl, con o sin ouabaina¹⁴. Después de este tiempo se añadieron 4 mM de tris-ATP y se incubaron por 30 min a 37°C con agitación en un baño Dubnoff Labconco. La reacción fue detenida con 100 µl de ácido tricloroacético al 10%. Las muestras fueron centrifugadas 100 g durante 5 min a 4 °C, y una alícuota del sobrenadante fue utilizada para medir el fósforo inorgánico (P_i) mediante el método propuesto por Bonting, *et al*¹⁵. La absorbancia se midió del sobrenadante a 660nm usando un espectrofotómetro helios-α de UNICAM, y la diferencia de esta absorbancia entre las soluciones con y sin ouabaina fue considerada como la actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa y expresada en µM Pi/g tejido húmedo/min, mientras que la ATPasa total fue obtenida en ausencia de ouabaina.

Técnica para medir peroxidación de lípidos (TBARS)

La determinación de la peroxidación de lípidos se llevó a cabo mediante la técnica modificada de Gutteridge, *et al*¹⁶, se homogeneizó cada tejido en 5 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4, del cual se tomó 1 ml y se le agregó 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA), conteniendo: 1.25 g de TBA, 40 g de ácido tricloroacético (TCA), y 6.25 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl), diluidos en 250 ml de H₂O

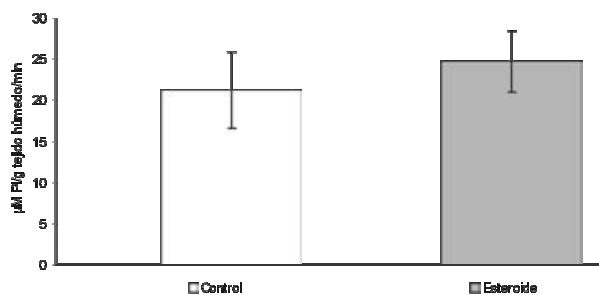


Figura 1. Actividad de Na⁺, K⁺ ATPasa en cerebro de ratas tratadas con 4-cloro-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona y en ratas control que sólo recibieron vehículo. Valores promedio ± D.E. (p=0.05).

desionizada, y se calentó a temperatura de ebullición por 30 min (thermomix 1420). Después se colocó las muestras en baño de hielo durante 5 min y se centrifugó a 3,000 g durante 15 min, (Sorvall RC-5B Dupont). Las absorbancias del sobrenadante fueron leídas por duplicado a 532 nm en espectrofotómetro (helios-α de UNICAM). La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron expresadas en µM de malondialdehído/g de tejido húmedo.

Técnica para medición de glutatión reducido (GSH)

Los niveles de GSH se midieron a partir del sobrenadante de tejido homogeneizado en HClO₄, obtenido después de centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min, de acuerdo a una modificación de la técnica reportada Hissin y Hif¹⁷. En un tubo de ensayo se colocaron 1.8 ml de amortiguador de fosfatos pH 8.0 con EDTA 0.2%, una alícuota de sobrenadante de HClO₄, 100µl de orto-ftaldialdehído (OPT) en concentración de 1mg/ml en metanol, toda la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad total, al término de la incubación las muestras

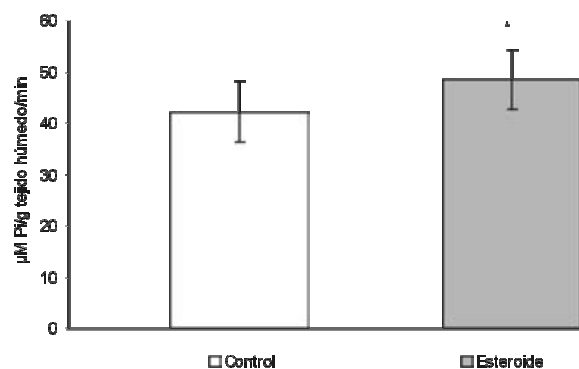


Figura 2. Actividad de ATPasa total en cerebro de ratas tratadas con 4-cloro-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona y en ratas control que sólo recibieron vehículo. Valores promedio ± D.E. (*p≤0.05).

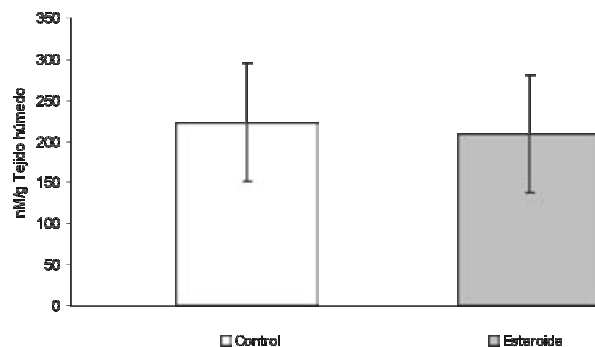


Figura 3. Niveles de GSH en cerebro de ratas tratadas con 4-cloro-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona y en ratas control que sólo recibieron vehículo. Valores promedio ± D.E. (p=0.05).

se leyeron en un espectrofluorometro Perkin Elmer LS 55, con longitudes de excitación 350 nm y emisión 420 nm. Se utilizó un *software FL Win Lab* versión 4.00.02. Los valores fueron inferidos en una curva estándar previamente estandarizada y se reportaron como nM/g de tejido húmedo.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística *de t de student* para muestras independientes. En los casos donde no existió homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de U de Mann Whitney. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos¹⁸.

RESULTADOS

La actividad de la enzima Na⁺, K⁺ ATPasa en cerebro de ratas con 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona fue similar en el grupo de animales tratados con esteroide sintético y en los animales del grupo control (vehículo). ($p \leq 0.05$) (figura 1).

La actividad de la enzima ATPasa total en cerebro de ratas con tratamiento de 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona fue mayor respecto a la del grupo control ($p \leq 0.05$) (figura 2).

Los niveles de glutatión en cerebro de ratas tratadas con 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona fueron similares en el grupo de animales con tratamiento de esteroide y en los animales del grupo control. ($p = 0.05$) (figura 3).

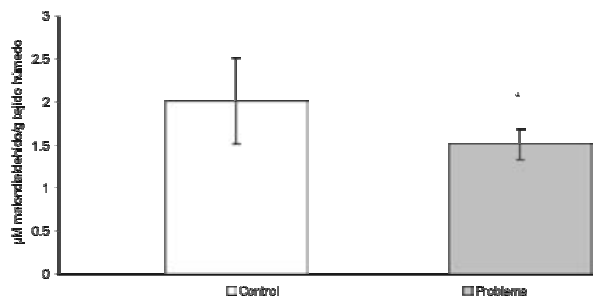


Figura 4. Niveles de peroxidación de lípidos en cerebro de ratas tratadas con 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona y en ratas control que sólo recibieron vehículo. Valores promedio \pm D.E. (* $p \leq 0.05$).

Los niveles de peroxidación de lípidos en cerebro de rata fueron significativamente menores en el grupo de animales con tratamiento de 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona que en los animales del grupo control. ($p \leq 0.05$) (figura 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La actividad enzimática de Na⁺, K⁺ ATPasa y ATPasa total (Ca²⁺ y Mg²⁺ ATPasa) se incrementó en el cerebro de ratas adultas tratadas con 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona, probablemente como consecuencia de una alteración de la fluidez de la membrana. Este incremento podría tener un efecto protector contra el daño neuronal, tal como lo sugieren los estudios realizados por Sato, *et al*¹⁹, quienes proponen que el uso de esteroides en el SNC impide la inhibición de la enzima Na⁺, K⁺ ATPasa, efecto asociado a enfermedades isquémicas y a la deficiencia de ATP en el cerebro.

La disminución en los niveles de peroxidación de lípidos en el cerebro de las ratas tratadas con 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona indica un efecto antioxidante de la integridad celular en el cerebro, que pudiera ser atribuido a la presencia de cloro en el anillo A, debido a que probablemente este halógeno en C-4 estabiliza la formación de la cetona α, β -insaturada en C-3, induciendo mayor efecto lipofílico al esteroide, el cual puede interactuar de forma semejante a la presencia de grupos hidroxilo. Estos resultados son semejantes a los reportados por Behl, *et al*²⁰, quienes sugieren que la actividad antioxidante neuroprotectora de los estrógenos es dependiente de la presencia de los grupos hidroxilo en el C-3 sobre el anillo A de la molécula esteroideal, pero es independiente de una activación de los receptores estrogénicos. Por otra parte, los estudios realizados por Green, *et al*²¹, sugieren que los esteroides con al menos tres anillos del núcleo esteroideal son necesarios para lograr actividad neuroprotectora de estrógenos, mientras que Sugioka, *et al*¹³, opinan que a pesar de desconocer el mecanismo para inhibir la peroxidación de lípidos mediante hormonas femeninas, quizás estos compuestos pueden donar átomos de hidrógeno de sus grupos hidroxilo e intervenir en las reacciones en cadena de los radicales peroxilo. Los hallazgos de este último autor pudieran explicar el comportamiento del éster acetoxi en C-17 sobre el anillo D, en el nuevo esteroide sintético estudiado; asimismo, la falta de efecto del esteroide sobre los niveles de glutatión en el cerebro. Es importante hacer notar que los estrógenos esteroideales tienen su aplicación principalmente en individuos femeninos, y que el nuevo compuesto sintético que se encuentra en experimentación, debe su origen y fue diseñado para sujetos experimentales masculinos^{22,23}, con el fin de obtener un compuesto con actividad antiandrogénica. Basándose en los resultados del presente estudio *in vivo*, se sugiere que el

compuesto 4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona posee actividad antioxidante y modifica parcialmente la fluidez de la membrana en cerebro de ratas adultas macho, como consecuencia de sus modificaciones estructurales.

REFERENCIAS

1. Tresguerres JA. Biosíntesis de las hormonas sexuales en el ovario. En: *Fisiología y patología*, Díaz de Santos, Madrid 1995.
2. Robel O, Baulieu EE. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab* 1994; 5:1-8.
3. Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T. FK143 a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase: *in vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52:357-63.
4. Baulieu E, Schumacher M, Koenig H. Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 1996;16:143-54.
5. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 1998; 19:302-30.
6. McEwen BS, Parsons B. Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22:555-98.
7. Tang MX, Jacobs D, Stern Y. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer disease. *Lancet* 1996; 348:429-32.
8. Driver AS, Kodavanti PR, Mundy WR. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:175-81.
9. Wu F, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134(3): 489-92.
10. Benuck M, Banay-Schwartz M, DeGuzman T, Lajtha A. Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats. *Brain Research* 1995; 678: 259-64.
11. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1629-4.
12. Aricioglu A, Aydin S, Turkozkan N, Durmus O. The effect of allopurinol on Na⁺,K⁺-ATPase related lipid peroxidation in ischemic and reperfused rabbit kidney. *Gen Pharmacol* 1994; 25:341-4.
13. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *Febs Letters* 1987; 210(1):37-9.
14. Calderón GD, Espitia VI, López DA, Hernández GE, Huerta GB, Coballase UE, et al. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na⁺/K⁺ - ATPase in adult rat brain. *Neurochem Res* 2005; 5:1-6.
15. Bonting SL, Simon KD, Haukins NM. Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1961;95:416-23.
16. Gutteridge MC, Halliwell B. *The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems*. Elsevier Science Publishers LTD. 1990.
17. Hissin PJ, Hif R. A fluometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissue. *Anal Biochem* 1974; 214-26.
18. Castilla Serna L. Estadística simplificada para la investigación en Ciencias de la Salud. Editorial Trillas. 2^o Edición. México, D.F. 1999.
19. Sato T, Tanaka K, Ohnishi Y, Teramoto T, Irifune M, Nishikawa T. Effects of steroid hormones on (Na⁺, K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. *Pharmacol Res* 2004; 49:151-9.
20. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, et al. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 1997;51:535-41.
21. Green PS, Gordon K, Simpkins JW. Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 63(4-6):229-35.
22. Bratoeff E, Ramírez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M. Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors. *Curr Med Chem* 1999; 6(12):1107-23.
23. Cabeza M, Quiroz A, Bratoeff E, Murillo ME, Ramírez E, Flores G. Synthesis and pharmacological evaluation of 4-halo progesterone derivatives as antiandrogen. *Chem Pharm Bull* 1999; 47(9):1232-6.