

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**  
**LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**



**POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INACTIVACIÓN DEL  
SISTEMA OXIDATIVO DEL CITOCROMO P450 POR IONES COBRE**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

**DIRECTOR DE MEMORIA**

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**José Antonio Jara Sandoval**

**SANTIAGO DE CHILE**

**2007**

*Labor Omnia Vincit*

*El trabajo todo lo vence*

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer a mis padres, sin cuyo apoyo fundamental no sería la persona que soy hoy; a mi hermana, y a Ximena, por su apoyo incondicional en todo aspecto de la vida, a mis amigos y compañeros por su envidiable paciencia.*

*La realización de este trabajo fue posible gracias a la admirable dedicación de la Profesora María Eugenia Letelier, quién ha sido indudablemente fundamental en mi formación profesional y personal.*

*Debo agradecer también a mis compañeros y amigos de laboratorio, Alfredo y Juan por su compañía, amistad y apoyo.*

*Por último agradezco a la Sra. Guisela, y Don José, quienes colaboraron desinteresadamente en este trabajo.*

## ABREVIATURAS

$O_2^-$	: anión superóxido
$OH\cdot$	: Radical hidroxilo
EDTA	: ácido etilen-diamino-tetraacético
GSH	: Glutati3n
PNA	: <i>p</i> -Nitroanisol
PNP	: <i>p</i> -Nitrofenol
TTM	: tri-etilen-tetra-amino-tetrahidro-cloruro

## ÍNDICE GENERAL

Página

<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Hipótesis.....	5
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
Reactivos.....	7
Animales de experimentación.....	7
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	8
Absorbancia de la monooxigenasa CYT P450 microsómica.....	9
O-desmetilación de <i>p</i> -nitroanisol.....	9
Análisis estadístico.....	11
<b>III. RESULTADOS</b> .....	12
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>V. REFERENCIAS</b> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1A	Efecto de $\text{Cu}^{2+}$ sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.	Pág. 12
Figura 1B	Efecto de $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.	Pág. 13
Figura 2A	Efecto temporal de $\text{Cu}^{+2}$ sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450.	Pág. 14
Figura 2B	Efecto temporal de $\text{Cu}^{+2}$ /ascorbato sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450.	Pág. 15
Figura 3	Efecto temporal de $\text{Cu}^{+2}$ $\eta\text{M}$ sobre el contenido microsómico de monooxigenasa citocromo P450.	Pág. 16
Figura 4A	Efecto de GSH sobre la pérdida temporal del contenido de monooxigenasa citocromo P450 provocada por el sistema $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.	Pág. 18
Figura 4B	Efecto de ditionito de sodio sobre la pérdida temporal del contenido de monooxigenasa citocromo P450 provocada por el sistema $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.	Pág. 17
Figura 5	Contenido de citocromo P450 en presencia de $\text{Cu}^{2+}$ . Efecto de GSH.	Pág. 20
Figura 6	Efecto de EDTA y TTM sobre la pérdida del contenido de monooxigenasa citocromo P450 en presencia de $\text{Cu}^{+2}$ .	Pág. 21
Figura 7	O-desmetilación de <i>p</i> -nitroanisol.	Pág. 23
Figura 8	O-desmetilación de <i>p</i> -nitroanisol en presencia de $\text{Cu}^{2+}$ .	Pág. 24
Figura 9	O-desmetilación de <i>p</i> -nitroanisol en presencia de $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.	Pág. 25
Figura 10	O-Desmetilación de <i>p</i> -nitroanisol en presencia de $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato y $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato/ditionito de sodio.	Pág. 26

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	O-desmetilación de <i>p</i> -Nitroanisol. Constantes Cinéticas	Pág. 26
---------	--	---------

Tabla 2	Porcentaje de inhibición de la o-desmetilación de <i>p</i> -nitroanisol.	Pág. 27
---------	--	---------

## RESUMEN

La toxicidad celular del cobre se ha relacionado con la capacidad que los iones de cobre libre tiene para catalizar, a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton, la producción de radicales libres del oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$  y  $HO^{\cdot}$ ); estos radicales inducen cambios en la estructura y/o función de las biomoléculas. Recientes investigaciones del laboratorio demostraron que diferentes enzimas tiólicas eran capaces de unir iones  $Cu^{2+}$  provocando pérdida de su actividad biológica. La monooxigenasa citocromo P450, enzima constituyente del sistema oxidativo citocromo P450, principal responsable de la biotransformación de xenobióticos lipofílicos, entre ellos los fármacos, es una proteína tiólica; ella une los sustratos a metabolizar en el primer paso del mecanismo catalítico, por lo tanto, la unión de cobre a esta enzima podría alterar la actividad catalítica del sistema oxidativo del citocromo P450.

En este trabajo probamos los efectos de  $Cu^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ /ascorbato (sistema generador de radicales libres del oxígeno) sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 y sobre la O-desmetilación de *p*-nitroanisol, reacción catalizada por el sistema citocromo P450. Tanto el  $Cu^{2+}$  como el  $Cu^{2+}$ /ascorbato disminuyeron la absorbancia máxima a 450 nm de esta monooxigenasa. La extensión de esta disminución fue dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de  $Cu^{2+}$ ; más aún, la disminución de la absorbancia fue prevenida por GSH, TTM y EDTA. Por otra parte,  $Cu^{2+}$  inhibió



la O-desmetilación de *p*-nitroanisol; la extensión de esta inhibición fue dependiente de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$ . Estos resultados parecen indicar que los mecanismos involucrados en esta inhibición están representados por la unión de los iones cobre a la monooxigenasa citocromo P450 y por los cambios redox provocados por la generación de radicales libres del oxígeno inducida por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato. La importancia farmacodinámica de estos resultados es discutida en el texto.

## ABSTRACT

Cellular copper toxicity has been related to the capacity of free copper ions to catalyze, through Haber-Weiss/Fenton reaction, the production of oxygen free radicals species ( $O_2^{\cdot-}$  y  $HO^{\cdot}$ ), so inducing oxidative changes to the structure and/or function of biomolecules. Recently, we have demonstrated that several thiol enzymes are capable to bind  $Cu^{2+}$ , so altering their catalytic activities. Cytochrome P450 monooxygenase, enzyme constituent of cytochrome P450 oxidative system is a thiol protein. This monooxygenase binds the substrates in the first step of the catalytic mechanism; therefore, copper-binding to this enzyme may occur, so altering the catalytic activity of this oxidative system.

In this work we assay the effects of  $Cu^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ /ascorbate on the cytochrome P450 monooxygenase spectrum and on the *p*-nitroanisole O-demethylation, enzymatic activity catalyzed by the cytochrome P450 system. Our results showed that  $Cu^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ /ascorbate decrease the monooxygenase absorbance to 450 nm as a copper concentration- and incubation-dependent manner. GSH, TTM and EDTA prevented this phenomenon. Moreover,  $Cu^{2+}$  inhibited the *p*-nitroanisole O-demethylation; the extension of this inhibitory effect was  $Cu^{2+}$  concentration-dependent. These results seem indicate that  $Cu^{2+}$  may inhibit the cytochrome P450 system activities by two mechanisms: copper-binding to the cytochrome P450 monooxygenase and oxidation induced by the oxygen free radicals generated by  $Cu^{2+}$ /ascorbate. The pharmacodynamic importance of these phenomena is discussed in the text.

## INTRODUCCIÓN

El cobre es un elemento traza esencial que juega un rol fundamental en la bioquímica de todos los organismos vivos. La estructura electrónica del cobre permite la interacción directa con el oxígeno molecular; esto capacita al cobre como cofactor proteico en reacciones redox fundamentales. Así, el cobre está involucrado en la estructura de diferentes enzimas; entre ellas podemos nombrar la superóxido dismutasa, la dopamina hidroxilasa, la lisil oxidasa y la ceruloplasmina. Esta diversidad de posibilidades hacen que el cobre sea esencial en fenómenos tales como: la respiración celular, la defensa contra radicales libres, la función neurotransmisora, la biosíntesis de tejido conectivo y el metabolismo celular de hierro. Las proteínas explotan la capacidad redox del cobre para llevar a cabo reacciones de transferencia electrónica y unir intermediarios reactivos, evitando así su reactividad inespecífica frente a biomoléculas [1-2]. Sin embargo, las propiedades que hacen que el cobre sea útil, también lo hacen potencialmente tóxico.

Las concentraciones de cobre fluctúan entre 0,1 y 10 mg de cobre/100 g de peso húmedo en el cuerpo humano; para evitar su reactividad es necesario mantenerlo secuestrado, lo cual se considera un mecanismo importante de prevención de daño oxidativo. La absorción de cobre desde el tracto gastrointestinal es seguida por su transporte a través de la circulación portal, mayoritariamente unido a albúmina y transcupreína, dos de las formas que

entregan este metal a los hepatocitos. Los iones cobre en el hígado son retenidos por las células del parénquima, excretados por la bilis o regresados al plasma. En la circulación poshepática la ceruloplasmina, la albúmina, la transcurreína y en menor extensión algunos aminoácidos como la histidina, constituyen las principales moléculas encargadas del transporte y distribución del cobre en el plasma circulante. La ceruloplasmina es el mayor transportador, ella da cuenta de  $\geq 75\%$  del cobre total plasmático; los otros transportadores dan cuenta del cobre plasmático circulante restante [1-2].

Por otra parte, la metalotioneína es la proteína que une el cobre en la célula; en el hígado es caracterizada principalmente por su alta capacidad de unir este metal (7-10 g-átomos/mol) y por su inusual composición aminoacídica, el 30% de sus aminoácidos corresponde a cisteínas y todas ellas están involucradas en la unión de metales [3]. Aunque la mayoría de las funciones biológicas de la metalotioneína se relacionan con el metabolismo del Zinc, esta proteína también une cobre con alta afinidad, lo cual ocurre bajo condiciones fisiológicas en el hígado y otros órganos [4-5]. La metalotioneína actúa además como un antioxidante, ella exhibe la más alta afinidad conocida hacia el radical libre  $\text{HO}\cdot$  y especies electrofílicas, las cuales son especies muy agresivas y reactivas hacia las moléculas biológicas [6]. Más aún, un amplio rango de compuestos químicos considerados como pro-oxidantes (Ej.: terbutilhidroperóxido, tetracloruro de carbono, Adriamicina y dietil-maleato) y condiciones que generan radicales libres como radiaciones  $\gamma$  y ultravioleta, se

ha demostrado que son buenos inductores de la metalotioneína [7-8]. La capacidad de la metalotioneína de unir cobre y de mantener sus propiedades antioxidantes intactas unida a cobre, parece estar íntimamente relacionada con la disponibilidad de GSH hepatocelular [9-10]. Se ha demostrado además, que Cu(I)-GSH actúa como un eficiente donador de Cu(I) a la superóxido dismutasa, la cual es inhibida por el tratamiento de células K562 con L-butionina sulfoximida, inhibidor específico de la síntesis de GSH [11]. Cabe señalar que GSH representa el principal mecanismo antioxidante no enzimático celular; él puede reducir radicales libres formando glutatión oxidado (GSSG) y actúa como cofactor de la GSH-peroxidasa y GSH-transferasa, enzimas que juegan un rol importante en el control de la capacidad antioxidante celular.

Si bien los iones cobre se encuentran en el organismo unidos a proteínas y a algunos aminoácidos, en ciertas condiciones de estrés oxidativo o excesiva ingesta de cobre, los iones cobre se liberan de sus sitios de unión a proteínas y se transforman en iones redox activos. Este fenómeno ocurre por ejemplo en isquemia-reperfusión, inflamación hepática fulminante provocada por la enfermedad de Wilson, enfermedad de Parkinson y artritis reumatoidea [12-16]. Se piensa que la toxicidad del cobre es producida al menos en parte, a través de la reacción de Haber-Weiss y/o Fenton en la cual los iones cobre catalizarían la formación de especies reducidas del oxígeno (ROS) tales como el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $HO^{\cdot}$ , las cuales iniciarían el daño oxidativo biológico a moléculas como

proteínas, lípidos y DNA hasta membranas, organelos subcelulares y células intactas [17-19].

Recientemente, hemos demostrado que los iones cobre además de unirse a las proteínas específicas que lo transportan en el plasma y en el interior de las células, se unen a ligandos tales como el grupo tiólico de la cisteína y el grupo amino de la histidina de proteínas globulares, alterando sus funciones biológicas [20]. La monooxigenasa citocromo P450 es una proteína tiólica constituyente del sistema oxidativo citocromo P450, que es el sistema más importante encargado de la biotransformación de xenobióticos lipofílicos como por ejemplo, fármacos psicotrópicos e hidrocarburos aromáticos. La monooxigenasa citocromo P450 está representada por una familia de isoenzimas, las cuales tienen 3 o 4 grupos tiólicos expuestos por mol cuando están insertas en la membrana microsómica, y 4 o 5 en sus formas solubilizadas [21-22]. Dado a que esta enzima une al sustrato a oxidar en el primer paso del mecanismo catalítico oxidativo, su importancia es crucial en la biotransformación de xenobióticos lipofílicos y su posterior excreción para evitar así su acumulación en el organismo.

En este trabajo estudiamos la unión y la actividad redox de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la monooxigenasa citocromo P450 presente en el retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas). Además, relacionamos estos efectos con aquellos del  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato considerado como sistema prooxidante. Nuestros resultados mostraron que los iones cobre se unen a la monooxigenasa

citocromo P450, fenómeno que sería el responsable de la inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450. Los iones cobre en presencia del agente reductor ascorbato podrían además inducir estrés oxidativo. Así, la inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol observada sería provocada por la unión de este metal a la monooxigenasa citocromo P450, y por su acción prooxidante.

## **HIPÓTESIS**

Los iones cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en ausencia y presencia de ascorbato inhiben la actividad catalítica del sistema oxidativo citocromo P-450. Esta inhibición es provocada por la oxidación de los componentes de la membrana microsómica y la unión de cobre a residuos tiólicos de la monooxigenasa citocromo P450.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar el efecto que produce el  $\text{Cu}^{+2}$  en ausencia y presencia de ascorbato sobre la actividad catalítica del sistema oxidativo citocromo P-450.

### Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la concentración de  $\text{Cu}^{+2}$  en ausencia y presencia de ascorbato sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P-450 microsómica.
- Evaluar el efecto temporal de  $\text{Cu}^{+2}$  en ausencia y presencia de ascorbato, sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P-450 microsómica.
- Determinar los efectos de agentes reductores tales como ditionito de sodio y GSH sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P-450 microsómica alterada por los iones  $\text{Cu}^{+2}$ .
- Evaluar la capacidad quelante de TTM y EDTA sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P-450 microsómica en presencia de iones  $\text{Cu}^{+2}$ .
- Determinar la O-desmetilación de p-nitroanisol, reacción catalizada por el sistema oxidativo citocromo P450, en presencia de  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}/$  ascorbato.



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos.** El sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), el ácido ascórbico, el fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), el formaldehído y el acetato de amonio fueron obtenidos de Merck Chile. El  $\beta$ -NADP; la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la glucosa-6-fosfato (G-6-P), el reactivo de Folin-Ciocalteu's, la albúmina de bovino (BSA), el glutatión reducido (GSH), el tri-etilen-tetra-amino-tetrahidro-cloruro (TTM), el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), el *p*-nitrofenol (PNP), el *p*-nitroanisol (PNA), la sal sódica del ácido iminodiacético en una matriz de poliestireno (CHELEX-100) fueron comprados en Sigma Chemical Company (St Louis, Mo. USA). Todos los demás reactivos fueron de grado pro-análisis.

Todos los compuestos fueron preparados en la solución amortiguadora fosfato 50 mM, pH 7,4 previamente tratada con CHELEX-100 para eliminar trazas de metales incluyendo cobre e hierro.

**Animales de experimentación.** En estos estudios se utilizaron ratas machos de 3 meses de edad de la cepa Sprague Dawley. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal (pellet Kimber), agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21°C. Estos animales se obtuvieron del Vivero de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

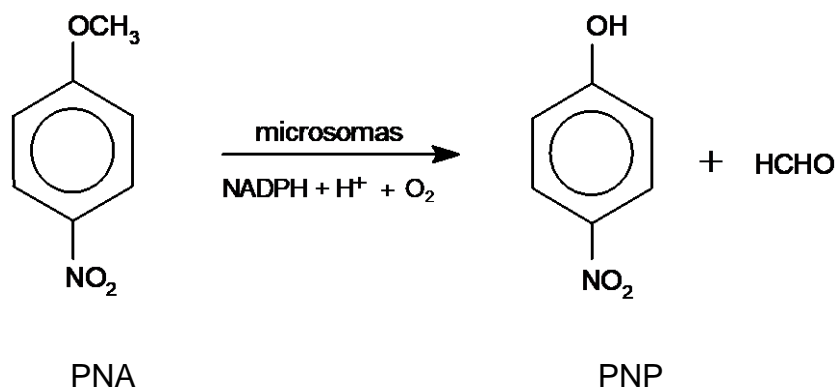
**Preparación de microsomas hepáticos de rata.** Los microsomas fueron preparados por el método de fraccionamiento subcelular descrito en Letelier y colaboradores, 1985 [23]. Los animales machos se mantuvieron en ayunas por 15 horas previas al sacrificio, con agua *ad libitum*, se sacrificaron por decapitación, se desangraron y los hígados fueron perfundidos, *in situ*, con cuatro volúmenes de 20 mL de NaCl 0,9% p/ V. Luego, los hígados se extirparon, se limpiaron de tejido conectivo y vasos sanguíneos, se pesaron, se cortaron en pequeños trozos y se prepararon homogeneizados al 20% en KCl 1,15% p/V. La homogeneización se realizó en forma manual en un homogeneizador Potter Elvejem. El homogeneizado total se centrifugó a 9000 x g durante 15 min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus Sepatech, modelo Suprafuge 22, para sedimentar células intactas, fragmentos celulares, núcleos y mitocondrias. El sedimento de esta centrifugación se eliminó y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante 1 hora (4°C) en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El sedimento de esta última centrifugación se denomina fracción microsómica y corresponde a la preparación enriquecida en retículo endoplásmico. La proteína de la fracción microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951 [24], utilizando albúmina de bovino, fracción IV como estándar.

**Determinación del contenido de citocromo P<sub>450</sub>.** La cuantificación del contenido de la monooxigenasa citocromo P<sub>450</sub> se realizará de acuerdo al método descrito por Omura y Sato, 1964 [20]. Este método aprovecha la capacidad del monóxido de carbono (CO) de coordinarse con la monooxigenasa citocromo P<sub>450</sub> reducida (Fe<sup>2+</sup>). Este complejo absorbe a 450 nm y su coeficiente de extinción es 91 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>.

La mezcla de reacción contendrá (concentraciones finales) en un volumen final de 1,0 mL: amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4; MgCl<sub>2</sub> 4,0 mM; 1,0 mg de proteína microsómica; ditionito de sodio 5,0 mM; monóxido de carbono a saturación. El blanco contendrá todos los reactivos, a excepción del monóxido de carbono. A continuación se realizará un barrido de absorbancia entre 390 y 500 nm, utilizando para ello un espectrofotómetro UNICAM VIS modelo 3, acoplado a un computador. La absorbancia de la monooxigenasa citocromo P<sub>450</sub> corresponde a la diferencia entre las absorbancias obtenidas a 450 y 490 nm. El contenido de citocromo P<sub>450</sub> será expresado en nmoles de monooxigenasa citocromo P<sub>450</sub> /mg de proteína microsómica.

**O-Desmetilación de *p*-nitroanisol.** La actividad O-desmetilante del citocromo P<sub>450</sub> se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y colaboradores, 1985 [23]. En ella se cuantifica el PNP formado en la reacción, utilizando las propiedades espectrales que presenta este compuesto de absorber a 410 nm, en medio básico.

La ecuación química que representa la reacción enzimática es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1,0 mL: amortiguador fosfato 50 mM pH 7,4; MgCl<sub>2</sub> 4,0 mM; 2,0 mg de proteína microsómica; diferentes concentraciones de *p*-nitroanisol (PNA) en el rango 0,5 mM a 6 mM; sistema generador de NADPH: glucosa-6-fosfato 10 mM, NADP 1,0 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5,0 Unidades. La reacción se inició agregando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa a las muestras. Los blancos contenían todos los reactivos a excepción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los blancos y las muestras se incubaron durante 20 min a 37 °C en un baño termostático, con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 250 µL de TCA al 10% p/V y separándolas por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. Alícuotas de los sobrenadantes se mezclaron con 250 µL de NaOH 1,0 M y se leyó la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro UNICAM VIS Modelo 3, acoplado a un computador.

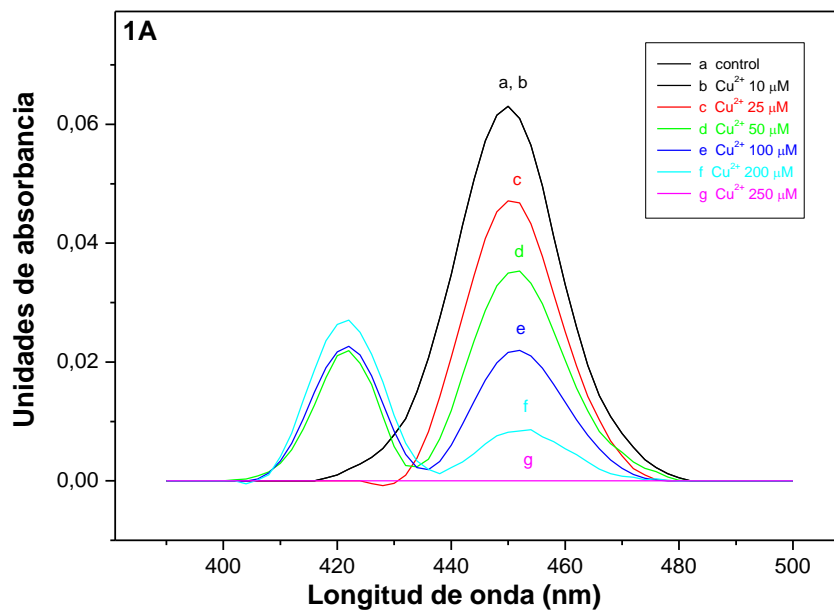
La cantidad de *p*-nitrofenol formada en la reacción enzimática se determinó utilizando *p*-nitrofenol como estándar. La linealidad del método se comprobó realizando una curva estándar de *p*-nitrofenol; las concentraciones utilizadas fluctuaron entre 10 y 100  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol, rango útil para los fines del ensayo enzimático. Por otra parte, la concentración de proteína microsómica y el tiempo de incubación ensayados fueron directamente proporcionales a la concentración de producto formado.

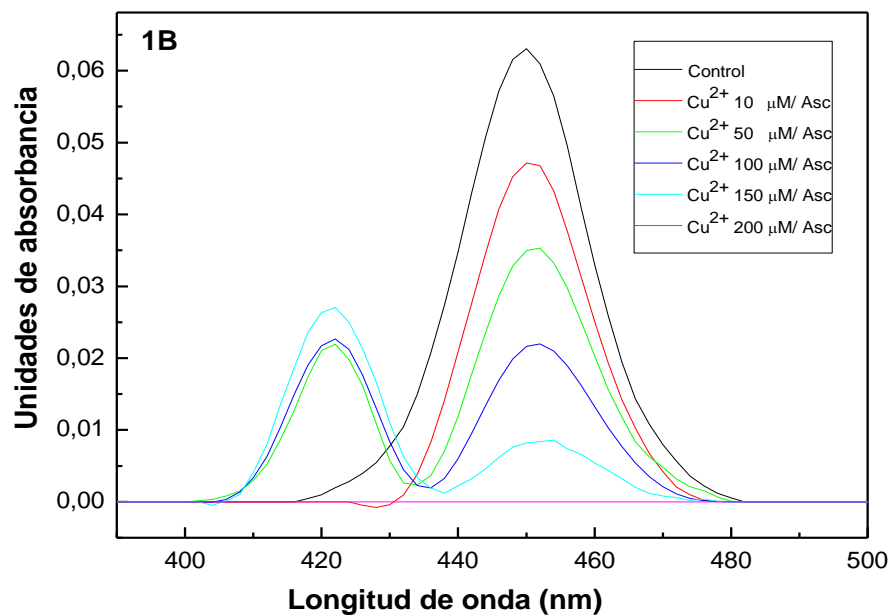
**Análisis estadístico.** Los resultados se expresaron como el promedio de los valores obtenidos de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación con sus promedios (*t*-test de Student's). Los valores fueron considerados significativamente diferentes con un  $p < 0,05$ . Los datos de los grupos en estudio fueron comparados usando el *t*-test de Student's para observaciones pareadas. Para realizar estos cálculos se utilizó el programa computacional ORIGIN 7.0

### III. RESULTADOS

#### Absorbancia de la Monooxigenasa Citocromo P450.

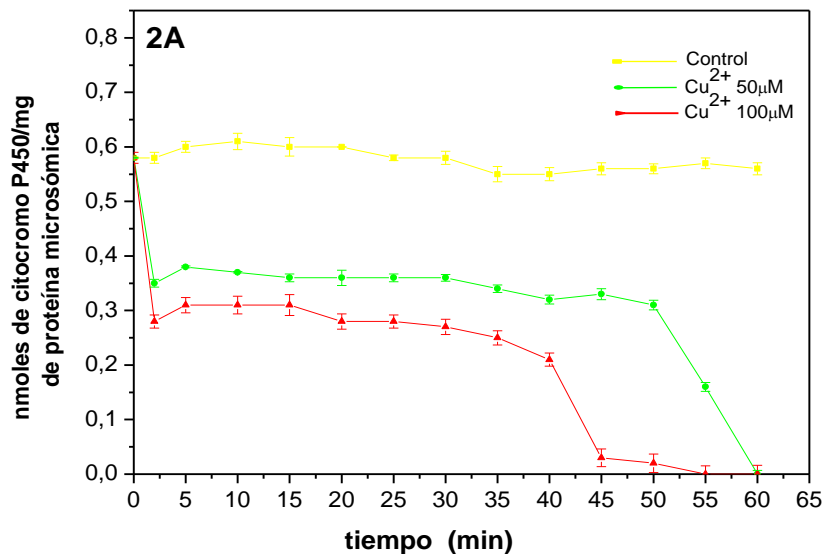
**A. Efecto de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.** La preincubación de los microsomas durante 15 min con concentraciones  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  en ausencia de ascorbato (Figura 1A) y en presencia de este reductor (Figura 1B) disminuyó la absorbancia máxima de la monooxigenasa citocromo P450 a 450 nm de una forma concentración-respuesta. En ambos casos, esta reducción fue acompañada de la aparición de un pico a 420 nm.



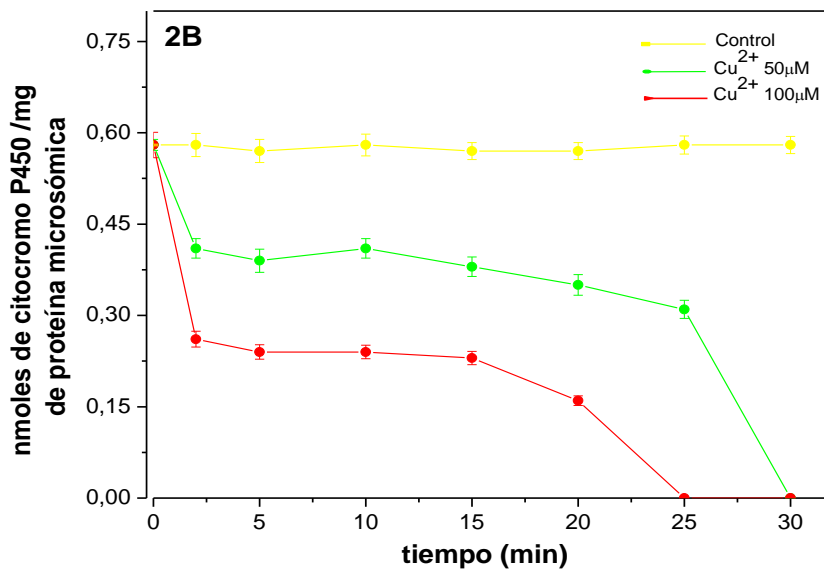


**Figura 1. Efecto de Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.** [Proteína microsómica]: 1mg/mL; [ascorbato]: 1mM. Los microsomas fueron incubados durante 15 minutos con las distintas concentraciones de Cu<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup>/ascorbato antes de medir el espectro de absorbancia. La técnica utilizada está descrita en Métodos.

**B. Efecto Temporal de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.** La incubación de los microsomas con  $\text{Cu}^{2+}$  50 y 100  $\mu\text{M}$  (Figure 2A) y  $\text{Cu}^{2+}$  50 y 100  $\mu\text{M}$ / ascorbato (Figure 2B), provocó una reducción inicial de la absorbancia a 450 nm de la monooxigenasa citocromo P450 de aproximadamente el 30%; esta reducción ocurrió entre 0 y 10 min de incubación. Luego, este proceso se hizo más lento hasta la desaparición total de la absorbancia que fue alcanzada a los 30 min y 25 min para  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ /ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$ /ascorbato, respectivamente, y 60 y 55 min para  $\text{Cu}^{2+}$  50 y  $\text{Cu}^{2+}$  100, respectivamente.

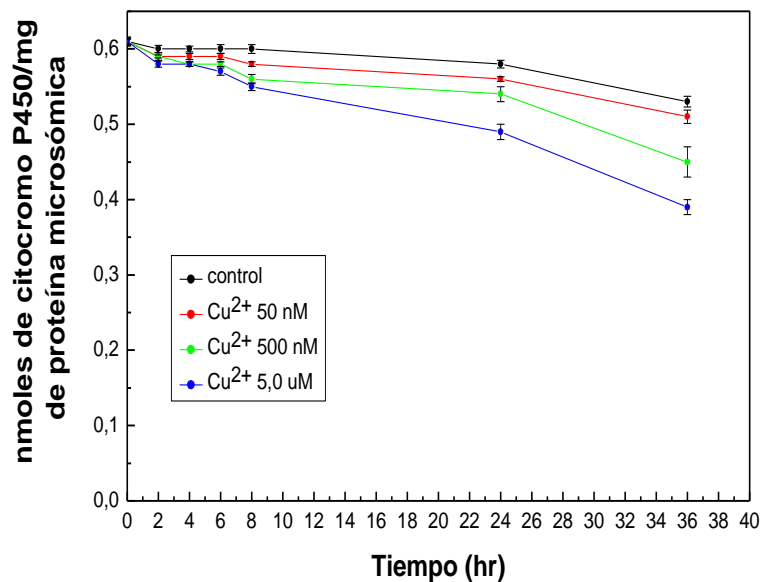






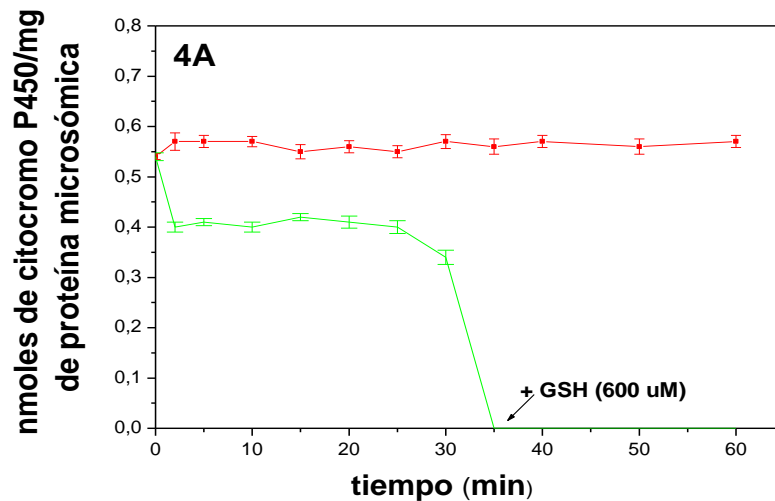
**Figura 2. Efecto temporal de Cu<sup>2+</sup> (2A) y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato (2B) sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450.** [Proteína microsómica]: 1mg/mL; [ascorbato]: 1mM. Los microsomas fueron incubados durante 15 minutos con las distintas concentraciones de Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato antes de medir el espectro de absorbancia. La concentración de ascorbato utilizada fue 1mM. La absorbancia del complejo monooxigenasa citocromo P450-CO fue convertida a nanomoles de enzima usando su coeficiente de extinción 91 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>. Los valores representan el promedio de 4 experimentos independientes ± S.D.

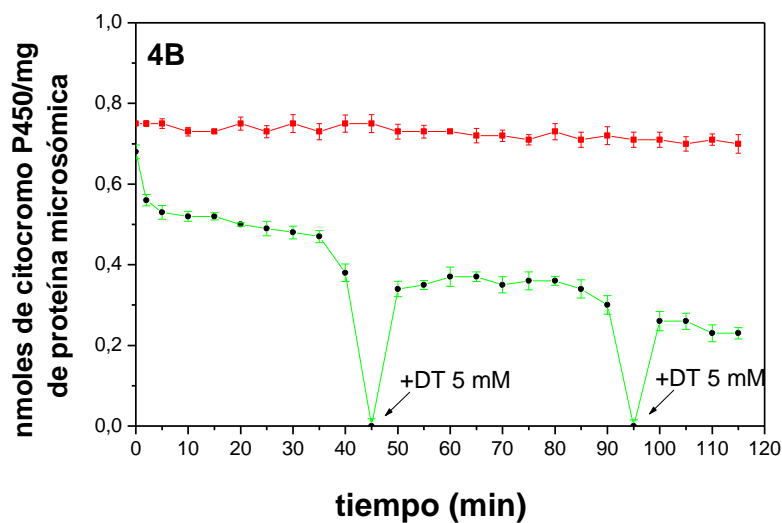
Cabe señalar que la disminución de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 a 450 nm, también se observó al incubar microsomas con concentraciones  $\eta\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , pero la reducción de la absorbancia fue mucho más lenta que a concentraciones  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ; estos resultados se muestran en la Figura 3.



**Figura 3. Efecto temporal de  $\text{Cu}^{2+}$   $\eta\text{M}$  sobre el espectro de absorbancia de monooxigenasa citocromo P450.** [Proteína microsómica]: 1 mg/mL; [Ditionito de sodio]: 5 mM. Las mezclas fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , con agitación constante. El contenido de citocromo P450 se midió según lo descrito en Métodos. La absorbancia del complejo monooxigenasa citocromo P450-CO fue convertida nanomoles de enzima usando su coeficiente de extinción  $91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Los valores representan el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.

**C. Efecto de ditionito de sodio y GSH sobre la disminución de la absorbancia de la Monooxigenasa Citocromo P450 inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.** Estos resultados se muestran en la Figura 4. El ditionito de sodio (5mM) revirtió parcialmente la reducción de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 provocada por  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ /ascorbato, pero este agente reductor no evitó la desaparición total de esta absorbancia a pesar de haber adicionado 2 veces consecutivas ditionito de sodio a la mezcla de reacción (Figura 4 A). En las mismas condiciones GSH 0,6 mM no tuvo efecto sobre la reducción de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 provocada por  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ /ascorbato (Figura 4 B).

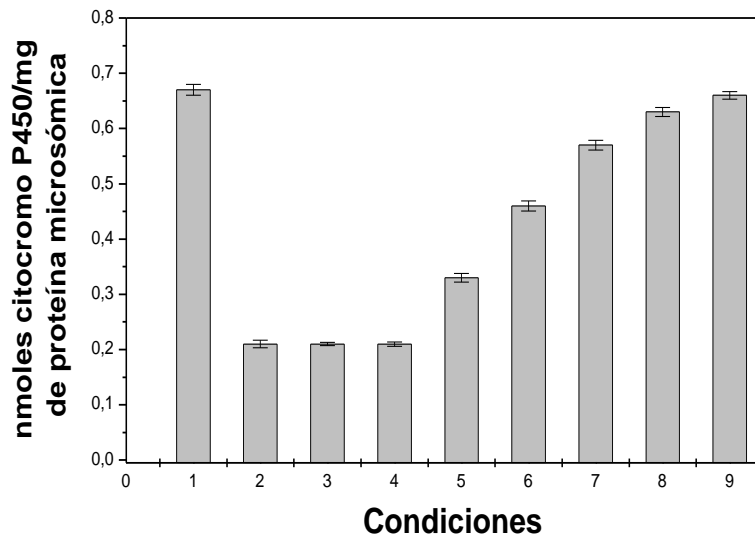




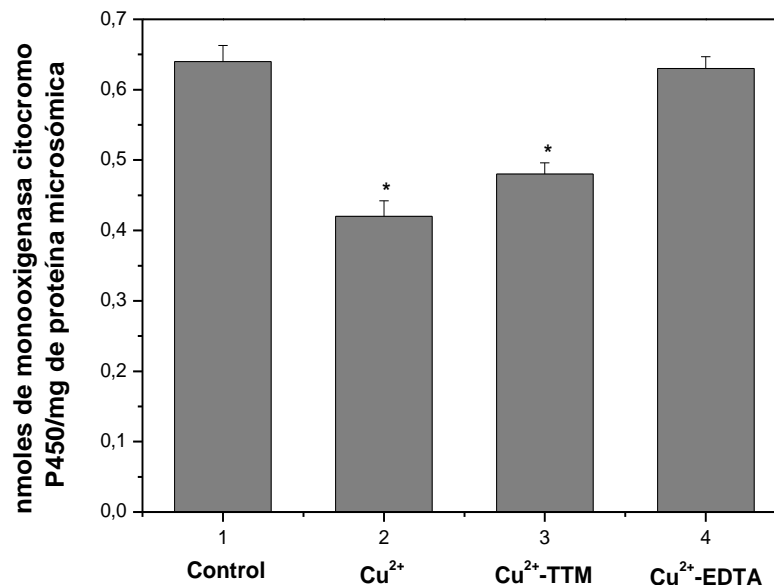
**Figura 4. Efecto de GSH (4A) y ditionito de sodio (4B) sobre la pérdida temporal de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 provocada por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.** [Proteína microsómica]: 1mg/mL; [ascorbato]: 1mM;  $[\text{Cu}^{2+}]$ : 50  $\mu\text{M}$ . La absorbancia del complejo monooxigenasa citocromo P450-CO fue convertida nanomoles de enzima usando su coeficiente de extinción  $91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.

**D. Efecto de GSH sobre la disminución de la absorbancia de la Monooxigenasa Citocromo P450 inducido por Cu<sup>2+</sup>.** Como se muestra en la Figura 4A, GSH no fue capaz de revertir la disminución del contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450 inducido por Cu<sup>2+</sup>/ascorbato. Sin embargo, existen antecedentes en la literatura que GSH es capaz de unir iones cobre [10]. Es por ello que probamos la capacidad de GSH de prevenir la unión de Cu<sup>2+</sup> a la monooxigenasa citocromo P450. Para ello, los microsomas fueron preincubados durante 10 min con diferentes concentraciones de GSH y luego 2 min con Cu<sup>2+</sup> 50 μM antes de determinar la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450. En esta condición, GSH previno la desaparición de la absorbancia de esta proteína inducida por Cu<sup>2+</sup> de una forma concentración-respuesta (Figure 5).

**E. Efecto de EDTA y TTM sobre la disminución de la absorbancia de la Monooxigenasa Citocromo P450 inducido por Cu<sup>2+</sup>.** La preincubación de los microsomas con las mezclas Cu<sup>2+</sup>50 μM - EDTA y Cu<sup>2+</sup>50 μM -TTM por 2 min, previno la desaparición de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 inducida por Cu<sup>2+</sup>. Cu<sup>2+</sup>-EDTA previno totalmente dicha desaparición; sin embargo, Cu<sup>2+</sup>-TTM la previno sólo parcialmente. Así, Cu<sup>2+</sup> 50 μM y Cu<sup>2+</sup>50 μM -TTM redujeron la absorbancia de esta enzima 37% y 28%, respectivamente (Figura 6).



**Figura 5. Monooxigenasa citocromo P450 en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ . Efecto de GSH.** La mezcla de incubación contenía: [Proteína microsómica]: 1 mg/mL; [Ditionito de sodio]: 5 mM; [ $\text{Cu}^{2+}$ ]: 50  $\mu\text{M}$ . Condiciones: (1) microsomas; (2) microsomas +  $\text{Cu}^{2+}$ ; (3), (4), (5), (6), (7), (8) y (9): microsomas + GSH 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$  y 1 mM, respectivamente. Los microsomas fueron preincubados durante 10 min con las distintas concentraciones de GSH antes de adicionar  $\text{Cu}^{2+}$ . Los valores representan el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.

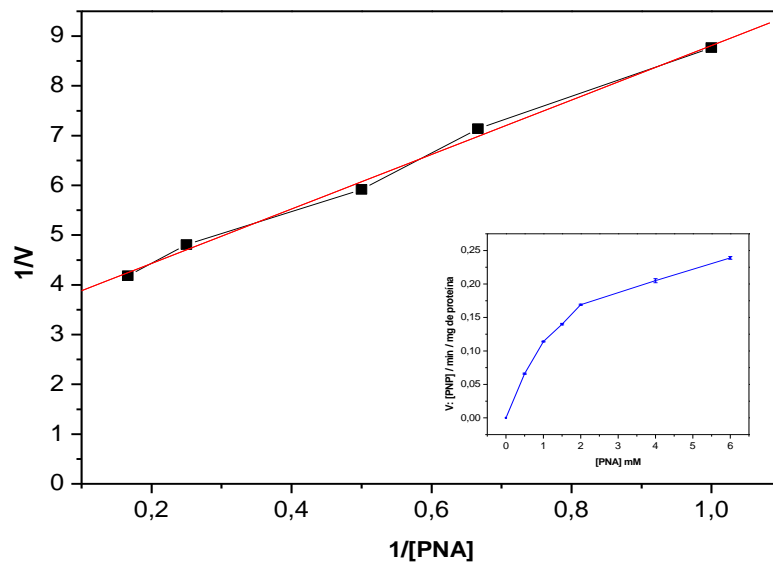


**Figura 6: Efecto de EDTA y TTM sobre la pérdida de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 en presencia de Cu<sup>2+</sup>.** [Proteína microsómica]:1mg/mL; [Cu<sup>2+</sup>]: 50 μM; [Ditionito de sodio]: 5 mM. El Cu<sup>2+</sup> fue previamente incubado con EDTA 1mM o TTM 1mM durante 10 min, antes de adicionarlos a los microsomas. La absorbancia del complejo monooxigenasa citocromo P450-CO fue convertida nanomoles de enzima usando su coeficiente de extinción 91 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>. Los valores representan el promedio de 4 experimentos ± S.D. \*p<0,05

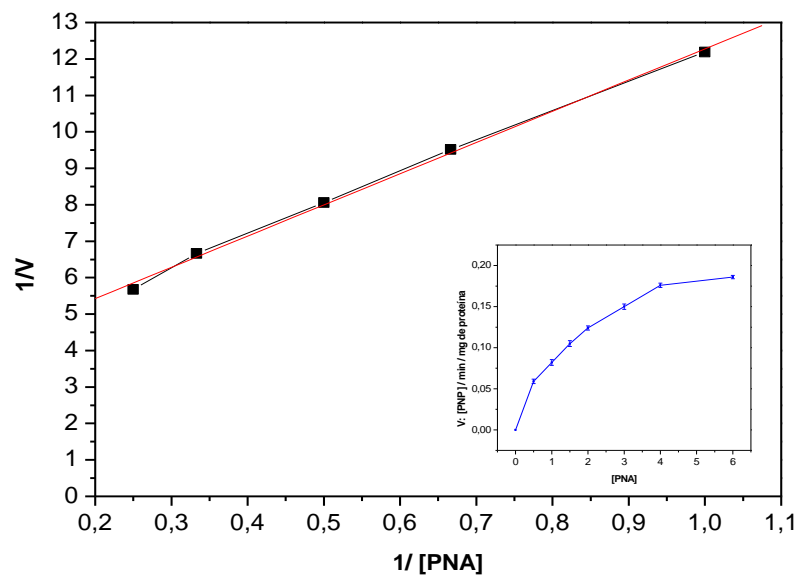
## **Actividad enzimática del sistema oxidativo citocromo P450.**

**A. Parámetros cinéticos de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol.** Con el objeto de evaluar si los efectos de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  /ascorbato sobre la monooxigenasa afectaban la actividad enzimática del sistema oxidativo citocromo P450, estudiamos los efectos de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  /ascorbato sobre los parámetros cinéticos:  $K_m$  aparente de *p*-nitroanisol,  $V_{max}$  y eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol. Las Figuras 7, 8 y 9 muestran los gráficos de Lineweaver-Burk para la O-desmetilación de *p*-nitroanisol en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  /ascorbato, respectivamente; los gráficos insertos muestran las curvas de saturación respectivas. La Tabla 1 muestra las constantes cinéticas  $K_m$  aparente para *p*-nitroanisol,  $V_{max}$  y eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  /ascorbato, obtenidas de los gráficos de Lineweaver-Burk, respectivos.  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$  en ausencia de ascorbato inhibió la  $V_{max}$  de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol sólo en un 10%; sin embargo,  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$  en ausencia de ascorbato inhibió la  $V_{m\acute{a}x}$  en un 60%. Asimismo, el valor de la  $K_m$  control para *p*-nitroanisol aumentó 1,4 veces en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$  en ausencia de ascorbato y 1,7 en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$  en presencia de ascorbato.

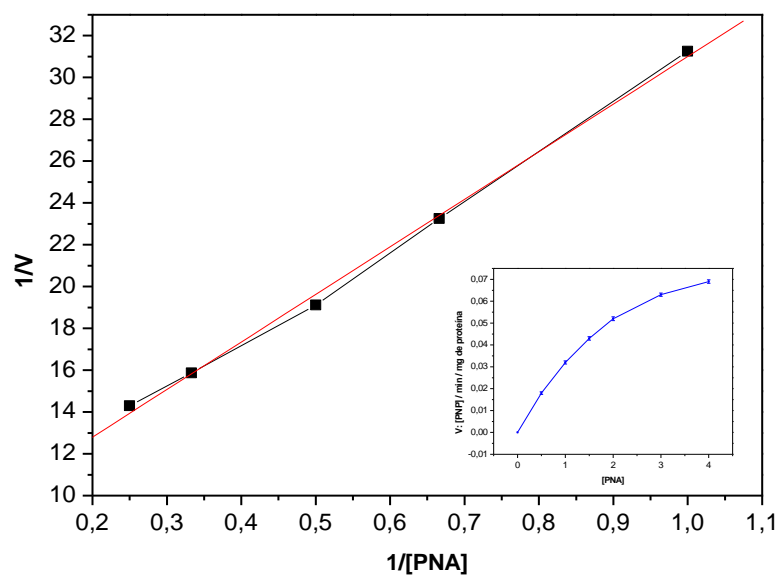




**Figura 7. O-desmetilación de *p*-nitroanisol.** La actividad enzimática se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores de velocidad ( $v$ ) están expresados en  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol formado/min/mg de proteína microsómica y representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  SD.



**Figura 8. O-desmetilación de *p*-nitroanisol en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ .** Los microsomas fueron preincubados durante 10 min con  $\text{Cu}^{2+}$  antes de adicionar el sistema generador de NADPH y determinar la actividad enzimática de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores de velocidad ( $v$ ) están expresados en  $\eta$ moles de *p*-nitrofenol formado/min/mg de proteína microsómica y representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  SD.



**Figura 9. O-desmetilación de *p*-nitroanisol en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.**

Los microsomas fueron preincubados durante 10 min con  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato antes de adicionar el sistema generador de NADPH y determinar la actividad enzimática de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores de velocidad ( $v$ ) están expresados en  $\mu\text{moles}$  de *p*-nitrofenol formado/min/mg de proteína microsómica y representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  SD.

**Tabla 1. O-desmetilación de *p*-Nitroanisol.  
Constantes Cinéticas**

Km [mM]	Vmax (nmoles PNP/min/mg de proteína)	Eficiencia Catalítica Vmax/ Km
<b>Control</b>		
1,64 ± 0,025	0,30 ± 0,006	0,183
<b>Cu<sup>2+</sup></b>		
2,30 ± 0,017	0,27 ± 0,004	0,117
<b>Cu<sup>2+</sup>/ascorbato</b>		
2,75 ± 0,020	0,12 ± 0,005	0,044

Cu<sup>2+</sup> [10 μM]; ascorbato [1 mM]. Los microsomas fueron incubados durante 10 min con Cu<sup>2+</sup> o con Cu<sup>2+</sup>/ascorbato antes de adicionar el sistema generador de NADPH e iniciar la reacción enzimática. Las condiciones de ensayo y la técnica utilizada están descritas en Métodos. Los valores de Km y Vmax representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

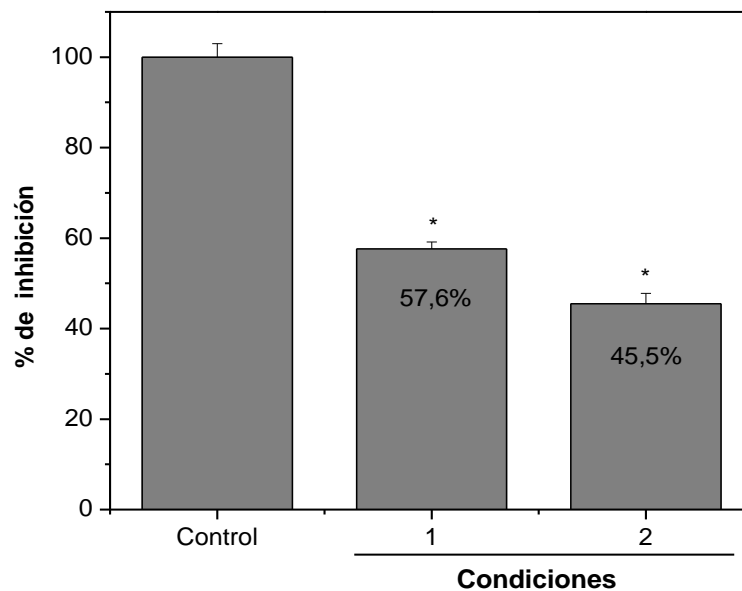
**B. Efecto de la concentración de proteína microsómica sobre el porcentaje de inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol.** Con el propósito de evaluar la influencia de la concentración de proteína microsómica sobre el porcentaje de inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol, en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de ascorbato. Realizamos el ensayo enzimático agregando concentraciones crecientes de proteína microsómica, obteniendo como resultado un menor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática del sistema oxidativo citocromo P450, a medida que aumentamos la concentración de proteína microsómica en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato (tabla 2).

**Tabla 2: Porcentaje de inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol.**

<b>Condiciones</b>	1 mg de proteína microsómica	3 mg de proteína microsómica	6 mg de proteína microsómica
Cu <sup>2+</sup> 50 µM	100±0.6	72±2.3	0±0.4
Cu <sup>2+</sup> 50 µM/ ascorbato	100±0.8	73±3.1	0±0.6
Cu <sup>2+</sup> 100 µM	100±1.2	100±2.6	39±1.9
Cu <sup>2+</sup> 100 µM/ ascorbato	100±1.5	98±2.9	38±1.7

[Ascorbato]: 1mM. Los valores indican el porcentaje de inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol; cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± SD.

**B. Posibles mecanismos inhibitorios de la actividad O-desmetilante de *p*-nitroanisol provocados por  $\text{Cu}^{2+}$ .** Con el propósito de estudiar si tanto las propiedades redox como de unión de los iones cobre podían estar involucradas en la inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol, los microsomas fueron incubados con una mezcla de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato y ditionito de sodio. Como lo muestra la Figura 10, este reductor revirtió parcialmente la disminución de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 provocada por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato (12%).



**Figura N° 10. O-Desmetilación de *p*-nitroanisol en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato/ditionito de sodio.** [Proteína microsómica]: 2 mg/mL; [PNA]: 1,5mM. **Condición 1:** los microsomas fueron preincubados durante 10 min con  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$  y ascorbato 1mM. **Condición 2:** los microsomas fueron preincubados durante 10 min con  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$  y ascorbato 1 mM, luego se agregó ditionito de sodio 5 mM a la mezcla de reacción e inmediatamente se inició el desarrollo de la actividad enzimática. Los porcentajes sobre las barras indican el % de inhibición de la reacción enzimática. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.  $p \leq 0,05$



#### IV. DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones demuestran que la toxicidad de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  es al menos en parte, el resultado de su capacidad de catalizar la reacción de Haber-Weiss y/o Fenton, a través de la cual se forman los radicales libres del oxígeno,  $\text{HO}\cdot$  y  $\text{O}_2\cdot^-$ . Ambos radicales son poderosos oxidantes que pueden provocar daño a biomoléculas [8-9]. Existen diferentes proteínas encargadas del transporte y el metabolismo de los iones cobre y la unión de este metal a estas proteínas anula sus propiedades redox. Así, la metalotioneína es la proteína que une iones cobre mayoritariamente en el hígado; ella contiene 30% de residuos de cisteína y todos ellos están involucrados en la unión de iones metálicos, entre ellos, los iones cobre [3, 5]. A su vez, la albúmina y la ceruloplasmina son las proteínas que participan en el transporte y distribución del cobre en el plasma; ellas también se caracterizan por su alto contenido de cisteínas [27-28]. Así, los grupos tiólicos de los residuos de cisteína de las proteínas encargadas del transporte, como del metabolismo del cobre, serían los responsables de la unión de este metal a dichas proteínas. Además, se ha demostrado que existe una relación entre el metabolismo del cobre y la disponibilidad de GSH intracelular [8-9]; estos antecedentes confirman la afinidad de los iones cobre por los grupos tiólicos de las proteínas.

La mayoría de las proteínas globulares contienen en su estructura aminoacídica residuos de cisteína; por lo tanto, sus grupos tiólicos podrían

también actuar como ligandos de los iones cobre. Al respecto, recientemente demostramos que las actividades catalíticas de algunas enzimas de biotransformación que son proteínas tiólicas, eran alteradas por  $\text{Cu}^{2+}$  [30-31]. Las isoformas de la monooxigenasa citocromo P450, constituyente del sistema oxidativo del citocromo P450, son también proteínas tiólicas [21-22]. Esta monooxigenasa une los sustratos lipofílicos en el primer paso del ciclo catalítico [20]; si la conformación de esta proteína es alterada, la actividad catalítica del sistema oxidativo citocromo P450 podría verse también alterada.

Nuestros resultados mostraron que el  $\text{Cu}^{2+}$  en ausencia y presencia de ascorbato modifica las propiedades espectrales de la monooxigenasa citocromo P450, efecto que fue dependiente de la concentración del metal como también del tiempo de incubación de los microsomas con los iones cobre (Figura 1, 2 y 3). Por otra parte, la presencia de los agentes quelantes EDTA y TTM previnieron este fenómeno total y parcialmente, respectivamente; ello indica que los iones cobre serían los responsables de los cambios observados (Figuras 1, 2, 3, 4, 6). Más aún, la preincubación de los microsomas con GSH también previno estos cambios, pero no fue capaz de revertirlos (Figuras 4 y 5); posiblemente, el poder reductor del GSH no es capaz de revertir los efectos redox de los iones cobre (Figura 4A). El GSH podría actuar no sólo como agente reductor sino además, como ligando de los iones  $\text{Cu}^{2+}$ . Investigaciones anteriores demostraron que la unión de cobre a los grupos sulfhidrilos de las proteínas no es desplazable por iones tales como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , señalando la

fuerza de este enlace (20). Este tripéptido no fue capaz de revertir la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la monooxigenasa citocromo P450, probablemente una vez formada la unión de este ión metálico a los grupos tiólicos de las proteínas, ésta tampoco puede ser desplazada por otros ligandos, como sería el GSH.

Como se planteó en la Introducción, existe la creencia que las propiedades redox del cobre serían la principal causa de su toxicidad. El efecto redox se manifestó en el estudio temporal de la disminución de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 al tratar los microsomas con  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato; la adición de ditionito de sodio revirtió parcialmente este efecto, aunque al prolongarse el ensayo en el tiempo, este reductor no fue capaz de mantener su efecto de reversión (Figura 4B). Cabe recordar que la monooxigenasa citocromo P450 es una proteína hemínica; esta enzima une sus sustratos en su forma  $\text{Fe}^{3+}$ . Sin embargo, la forma hemínica- $\text{Fe}^{2+}$  es la que une el monóxido de carbono (CO), complejo que presenta la absorbancia máxima característica a 450 nm. Probablemente, la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato provoca la oxidación del hierro hemínico de la monooxigenasa en cuya condición el CO no puede unirse a esta proteína; la adición de ditionito de sodio reduciría nuevamente el hierro hemínico, con lo cual se restablecería las condiciones para la formación del complejo, postulado que daría cuenta de la reaparición parcial de la absorbancia del complejo. Estos resultados confirmarían la existencia de dos mecanismos involucrados en la pérdida de la absorbancia de la monooxigenasa a 450 nm. Sin embargo, no sólo el hierro hemínico puede ser oxidado por

Cu<sup>2+</sup>/ascorbato, este sistema también puede oxidar los grupos tiólicos de la monooxigenasa citocromo P450, lo cual podría dar cuenta de los cambios espectrales de esta proteína observados, que muestran una disminución de la absorbancia a 450 nm y la aparición de un nuevo peak en la región de 420 nm (Figura 1).

Si bien la oxidación del hierro hemínico favorecería la unión de los sustratos de la monooxigenasa, la oxidación de sus grupos tiólicos provocaría cambios conformacionales que podrían alterar su actividad catalítica. Las isoformas de la monooxigenasa citocromo P450 contienen varios residuos cisteinílicos; la accesibilidad de ellos como la afinidad hacia Cu<sup>2+</sup> podría ser diferente. Cabe señalar además, que uno de ellos está localizado en el sitio de unión del sustrato (20-21). La alteración de este residuo cisteinílico podría ser la causa de la inhibición de la actividad enzimática del sistema oxidativo del citocromo P450 observada. Es por ellos que determinamos las constantes cinéticas: Km para el sustrato *p*-nitroanisol y la Vmax de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol en ausencia y presencia de Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato (Figuras 7, 8, 9 y Tabla 1). Para ello utilizamos la concentración de Cu<sup>2+</sup> 10 μM, la cual de acuerdo a antecedentes previos, modifica algunas actividades enzimáticas de biotransformación a través del mecanismo de unión y de las propiedades redox de los iones Cu<sup>2+</sup> (30-31). En estas condiciones la Vmax fue afectada severamente por la presencia de Cu<sup>2+</sup>/ascorbato, pero Cu<sup>2+</sup> en ausencia de ascorbato no modificó significativamente esta constante cinética. Asimismo, la

K<sub>m</sub> para el sustrato PNA fue aumentada 1,4 y 1,7 veces por Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato, respectivamente; estas diferencias entre los efectos de Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato se reflejaron también en la eficiencia catalítica del sistema oxidativo del citocromo P450, la cual fue disminuida por Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato 1,6 y 4 veces, respectivamente. Estos resultados parecen indicar que en este caso los efectos redox de los iones cobre primarían sobre los efectos de unión de este metal a la monooxigenasa citocromo P450. Sin embargo, se ha demostrado que en semejantes condiciones, al aumentar las concentraciones μM de Cu<sup>2+</sup>, los efectos de unión a proteínas de este metal primarían [20] antecedentes que fueron confirmados en los experimentos de efectos de Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato a la monooxigenasa citocromo P450 (Figura 1); no se observaron diferencias significativas en la disminución de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 provocada por la presencia de Cu<sup>2+</sup> 50 y 100 μM en ausencia y presencia de ascorbato.

Cabe señalar además, que la presencia de ditionito de sodio disminuyó parcialmente el porcentaje de inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol provocado por Cu<sup>2+</sup> 10 μM/ascorbato (Figura 10). Por otra parte, la extensión del efecto inhibitorio sobre la O-desmetilación de *p*-nitroanisol fue dependiente de la concentración de la concentración de Cu<sup>2+</sup> y proteína microsómica utilizada en los ensayos (Tabla 2). Así, al utilizar 1 mg de proteína microsómica en presencia de Cu<sup>2+</sup> 50 y 100 μM en ausencia y presencia de ascorbato, la O-desmetilación de *p*-nitroanisol fue inhibida 100%; en cambio, al utilizar 3 mg de

proteína, los resultados fueron dependientes de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$ : 50  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de ascorbato produjo una inhibición de 73% y  $\text{Cu}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de ascorbato, un 100%. Al aumentar la concentración de proteína microsómica a 6 mg, observamos que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de ascorbato, no produjo inhibición alguna sobre la O-desmetilación de *p*-nitroanisol; sin embargo, la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de ascorbato produjo una inhibición de alrededor de un 38%. Este es un resultado interesante que confirma el hecho de que la actividad catalítica del sistema oxidativo citocromo P450 es dependiente de la cantidad de monooxigenasa microsómica presente en la fracción microsomal hepática, ya que esta es la enzima que une al sustrato en el primer paso del ciclo catalítico de este sistema enzimático (21-22). Más aún, estos resultados confirman que a concentraciones 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  o superiores, los iones  $\text{Cu}^{2+}$  se unirían a los tioles proteicos primariamente, siendo entonces sus efectos redox secundarios.

Hasta aquí nuestros resultados confirman la hipótesis señalando que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  podrían alterar las actividades catalíticas del sistema oxidativo del citocromo P450 a través de dos mecanismos: la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a los residuos cisteinílicos de la monooxigenasa citocromo P450 y las propiedades redox de este ión metálico. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  en presencia de ascorbato, pueden generar radicales libres del oxígeno, los cuales oxidarían los grupos sulfhidrilos de los residuos cisteinílicos de la monooxigenasa citocromo P450. Cabe señalar en

este punto, que las actividades catalíticas del sistema oxidativo del citocromo P450 dependen de la integridad de los lípidos de la membrana microsómica [24-25]. Los radicales libres del oxígeno generados por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato provocan también peroxidación de los lípidos microsómicos, alterando así la conformación de la membrana [19]. Por lo tanto, este efecto redox también debe ser considerado en la inhibición de la O-desmetilación de *p*-nitroanisol.

Nuestros resultados confirman la idea que las proteínas tiólicas pueden unir no-específicamente los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , alterando así sus funciones biológicas. Es necesario hacer notar que las concentraciones fisiológicas plasmáticas de cobre fluctúan entre 0,9 y 1,2 mg/L (14 a 19  $\mu\text{M}$ , aproximadamente). Excesiva ingesta de cobre puede saturar la unión específica de estos iones a las cuproproteínas; en condición de estrés oxidativo los iones cobre pueden ser removidos de sus proteínas específicas, favoreciendo así, la unión inespecífica de estos iones a proteínas globulares tiólicas [17, 18, 32]. Este fenómeno tiene especial importancia en la farmacocinética de los fármacos que son preferentemente compuestos lipofílicos. Dado a que son xenobióticos, ellos deben ser biotransformados para ser eliminados del organismo. El sistema oxidativo citocromo P450 es la principal vía metabólica de los xenobióticos lipofílicos; por lo tanto, la inhibición de su actividad catalítica podría conducir a un aumento de sus niveles plasmáticos y a la aparición de reacciones adversas y/o efectos tóxicos de este tipo de fármacos.

## V. REFERENCIAS

1. M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.*, 63 (1996) 797S-811S.
2. M.C. Linder, L. Wooten, P. Cerveza, S. Cotton, R. Shulze, N. Lomeli, Copper transport, *Am. J. Clin. Nutr.*, 67 (suppl) (1998) 965S-971S.
3. M. Richards, Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism, *J. Nutr.*, 119 (1989) 1062-1070.
4. E.D. Harris, Copper transport: an overview, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196 (1991) 130-140.
5. I. Bremner, Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper, *J. Nutr.*, 117 (1987) 19-29.
6. P.J. Thornalley, M. Vasak, Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals, *Biochim. Biophys. Acta*, 827 (1985) 36-44.
7. K. Min, Y. Terano, S. Onosaka, K. Tanaka, Induction of hepatic metallothionein by nonmetallic compounds associated with acute-phase response in inflammation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111 (1991) 152-162.



8. L.R. Beach, R.D. Palmiter, Amplification of the metallothionein-I gene in Cd-resistant mouse cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78 (1981) 2110-2114.
9. I. Jiménez, P. Aracena, M.E. Letelier, P. Navarro, H. Speisky, Chronic exposure of HEPG2 cells to excess copper results in depletion of glutathione and induction of metallothionein, *Toxicol. In Vitro*, 16 (2002) 167-175.
10. I. Jiménez, H. Speisky, Effects of copper ions on the free radical-scavenging properties of reduced glutathione: implications of a complex formation, *Trace Elem. Biol. Med.*, 14(2) (2000) 161-167. M.R.
11. Ciriolo, A. Decideri, M. Pasi, G. Rotilio, Reconstitution of Cu, Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 11030-11034.
12. Freedman, J.; Ciriolo, M. and Peisach, J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264: 5598-5605.
13. Cordano, A. 1998. Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children. *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (suppl): 1012S-1016S.
14. G.J. Brewer, Wilson disease and canine copper toxicosis, *Am. J. Clin. Nutr.*, 67 (suppl) (1998) 1087S-1090S.

15. S.C. Luza, H. Speisky, Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity, *Am. J. Nutr.*, 63(5) (1996) 812S - 820S.
16. I.H. Scheinberg, I. Sternlieb, Wilson disease and idiopathic copper toxicosis, *Am. J. Nutr.* 63 (1996) 842S–845S.
17. N. Takeshi, M.L. In Sook, S. Noriyuki, I. Takakiro, Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J. B. Chem.*, 272(37) (1997) 23037-23041.
18. S. Goldstein, G. Czapsky, The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O<sub>2</sub>, *J. Free Radic. Biol. Med.*, 2 (1986) 3-11.
19. I. Sternlieb, Copper and the liver, *Gastroenterology*, 78 (1980) 1615-1628.
20. M. E. Letelier, A. M. Lepe, M. Faundez, J. Salazar, R. Marin, P. Aracena, H. Speisky, Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 151(2) (2005a) 71-82.
21. Mueller, E.J., Loida, P.J. & Sligar, S.G. In *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry 2nd edn.* (ed. Ortiz de Montellano, RR.) 83–124 (Plenum Press, NewYork; 1995).

22. M.A. Al'terman, S.A. Marekushev, L.A. Levchenko, A.V. Raevskii, V.M. Devichenskii, Cytochrome P<sub>450</sub> distribution in endoplasmic reticulum membranes of rat liver, *Biokhimiia*, 46(2) (1981) 222-229.
23. M.E. Letelier, E. Del Villar, E. Sánchez, Drug tolerance and detoxicating enzymes in *Octodon degus* and Wistar rats. A comparative study, *Comp. Biochem. Physiol.*, 80C (1) (1985) 195-198.
24. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A. L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
25. Omura, T. and Sato, R. 1964a. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239(7): 2370-2378.
26. Omura, T. and Sato, R. 1964b. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 239(7): 2379-2385.
27. P.P. Minghetti, D.E. Ruffner, W.J. Kuang, O.E. Dennison, J.W. Hawkins, W.G. Beattie, A. Dugaiczky, Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 6747- 6757.

28. M.L. Koschinsky, W.D. Funk, B.A. Oost, R.T.A. Mc Gillivray, Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 5086- 5090.
29. María Eugenia Letelier, Alejandra Pimentel, Patricia Pino, Ana María Lepe, Mario Faúndez, Paula Aracena and Hernán Speisky, Microsomal UDP-Glucuronyltransferase in Rat Liver: Oxidative Activation, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 96 (2005) 480–486.
30. M.E. Letelier, M. Martínez, V. Gonzalez-Lira, M. Faúndez, P. Aracena-Parks, Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper, *Chemico-Biological Interactions* 164 (2006) 39–48.
31. Jiménez, M. Gotteland, A. Zarzuelo, R. Uauy, H. Speisky, Loss of the metal binding properties of metallothionein induced by hydrogen peroxide and free radicals, *Toxicology*, 120 (1997) 37-46.