

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



**ACTIVIDAD GSH-TRANSFERÁSICA CITOSÓLICA DE HÍGADO DE RATA:  
SUSCEPTIBILIDAD A IONES HIERRO**

PROFESOR PATROCINANTE  
Prof. María Eugenia Letelier M.  
Laboratorio de Farmacología  
Fac. Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

DIRECTOR DE MEMORIA  
Prof. María Eugenia Letelier M.  
Laboratorio de Farmacología  
Fac. Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**Juan Francisco Cortés Troncoso**

SANTIAGO DE CHILE

2007

**La perseverancia hace que la vida sea un camino lleno de éxitos y que las caídas sean solo una derrota pasajera.**

## **Agradecimientos**

*El camino al éxito necesita de muchas cosas pero lo mas importante es quienes te acompañan en el camino para alcanzar ese éxito, por eso quiero agradecer a mi papá, mamá, hermanos, a mis abuelos y a todos aquellos que estuvieron a mi lado, por haber hecho de este camino una agradable experiencia de vida. Gracias por todo.*

*La familia es la fuente del valor y de la perseverancia, por eso quiero agradecer a mis dos soles (mi hija y a mi compañera) quienes en tiempos difíciles estuvieron conmigo dando su apoyo y comprensión. FLORENCIA y MACARENA las amo.*

*En este largo camino las incertidumbres sobre el final siempre estuvieron presentes, por eso al llegar al final de este camino, quisiera agradecer a mi maestra la Doctora María Eugenia Letelier quien confió en mí y me guió hasta conseguir este gran sueño. Gracias por el tiempo concedido y las enseñanzas entregadas en las largas horas de trabajo.*

*El éxito no solo depende de uno, sino que también del equipo que te apoya. Gracias José y Alfredo por esas largas jornadas donde no solo compartimos desafíos sino que también experiencias de vida.*

*Por último quiero agradecer a la Sra. Guisela y Don José, quienes colaboraron en la obtención de este sueño.*

## ABREVIATURAS

DTT	: 2,4-ditiotreitol
DTNB	: Acido 5,5-ditio- <i>bis</i> -2-nitrobenzoico
TNB	: Acido 5-tio- <i>bis</i> -2-nitrobenzoico
MDA	: Malondialdehído
TBA	: Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	: Ácido tricloroacético

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Hipótesis.....	5
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	7
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
Reactivos.....	8
Animales de experimentación.....	8
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	9
Determinación de la actividad GSH-transferásica.....	10
Determinación de tioles totales.....	11
Lipoperoxidación.....	12
Consumo de oxígeno.....	13
Formación de aductos entre GSH y los iones Fe <sup>3+</sup> y Cu <sup>2+</sup> .....	13
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>V. REFERENCIAS.....</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Actividad GST citosólica total en presencia de Fe <sup>3+</sup> /ascorbato: Efecto de la concentración de Fe <sup>3+</sup> y del tiempo de incubación de los microsomas con Fe <sup>3+</sup> /ascorbato.	Pág. 16
Figura 2	Inhibición de la actividad GST citosólica inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato. Efecto de DTT y cisteína.	Pág. 20
Figura 3	Inhibición de la actividad GST inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato: Efecto de GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.	Pág. 22
Figura 4	Lipoperoxidación Microsómica inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato y Cu <sup>2+</sup> /ascorbato.	Pág. 23
Figura 5	Trazado experimental del consumo de Oxígeno inducido por Cu <sup>2+</sup> /ascorbato en presencia y ausencia de la fracción citosólica.	Pág. 24
Figura 6	Consumo de Oxígeno inducido por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato y Cu <sup>2+</sup> /ascorbato en ausencia y presencia de proteína citosólica.	Pág. 25
Figura 7	Formación de aductos GSH-Cu <sup>2+</sup> y GSH-Fe <sup>3+</sup> .	Pág. 26

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	GST Citosólica Hepática: Parámetros cinéticos.	Pág. 17
Tabla 2	Contenido de tioles citosólicos y actividad GST: Efecto de Fe <sup>3+</sup> /ascorbato, NEM y ácido mersalílico.	Pág. 19
Tabla 3	Formación de los aductos GSH-Cu <sup>2+</sup> y GSH-Fe <sup>3+</sup> .	Pág. 27

## RESUMEN

Previamente hemos demostrado que el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato puede inhibir la actividad enzimática de algunas proteínas tiólicas a través de dos mecanismos: oxidación inducida por ROS y unión inespecífica de  $\text{Cu}^{2+}$  a dichas proteínas. Así por ejemplo, la actividad GSH-transferásica citosólica total fue inhibida por  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  ya sea en ausencia o presencia de ascorbato. Al igual que el cobre, el hierro es un metal de transición y sus iones generan ROS a través de las reacciones de Haber Wiess y/o Fenton. Por lo tanto, los iones  $\text{Fe}^{3+}$  podrían por un lado oxidar grupos tiólicos de proteínas como también unirse a ellos inespecíficamente, inhibiendo así su actividad biológica.

En este trabajo describimos la inhibición de la actividad GSH-transferásica total citosólica de hígado de rata inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato. Esta actividad enzimática fue inhibida por concentraciones micromolares de  $\text{Fe}^{3+}$  en presencia de ascorbato, efecto que fue revertido por DTT y cisteína de una forma concentración-respuesta. Este efecto inhibitorio se describe en función de los parámetros cinéticos aparentes de la GST-transferasa. Por otra parte,  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato redujo el contenido de tioles microsómicos. Sin embargo, concentraciones micromolares de  $\text{Fe}^{3+}$  en ausencia de ascorbato, no alteraron la actividad control de la GSH-transferásica, a pesar de que se ensayaron

concentraciones hasta 500  $\mu\text{M}$ . Cabe señalar además, que en nuestras condiciones de ensayo, la capacidad redox de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  fue menor que la de  $\text{Cu}^{2+}$ , ya que se necesitaron mayores concentraciones de estos iones para obtener efectos lipoperoxidativos microsómicos similares ( $\text{Fe}^{3+}$  250  $\mu\text{M}$  vs  $\text{Cu}^{2+}$  250  $\eta\text{M}$ ). Los mecanismos que pueden explicar las diferencias observadas entre los iones cobre e hierro, se discuten al final de este manuscrito.

## ABSTRACT

We previously reported that  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbate may change some enzymatic activities of thiol proteins through two mechanisms: ROS-induced oxidation and unspecific  $\text{Cu}^{2+}$  binding to it. Thus, total cytosolic GST activity was inhibited by 50 or more  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  concentrations in either absence or presence of ascorbate. Similar to copper, iron is also a transition metal and the iron ions also generate ROS through Haber Weiss and/or Fenton reactions. Thus, iron ions may alter the biological activity of thiol proteins through ROS-induced oxidation and also by  $\text{Fe}^{3+}$ -binding to protein's thiol groups. The present work describes the inhibition of total cytosolic GST activity from rat liver by  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbate. Micromolar  $\text{Fe}^{3+}$  in the presence of ascorbate inhibited the total cytosolic GST activity, inhibition which was prevented by DTT and cysteine as a concentration-dependent manner. We further described this inhibition effect in terms of GST apparent kinetic parameters. In the similar assay conditions  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbate reduced the microsomal thiol content. Interestingly,  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  in the absence of ascorbate did not affect GST activity, although until 500  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  was used. Moreover, to develop similar microsomal lipoperoxidative effects, a greater iron ions concentration (250  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbate) than of copper (250  $\eta\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbate) was needed. Finally, we discuss the mechanisms which could explain the differences between copper and iron ions observed.

## I. INTRODUCCIÓN

La actividad GSH-transferasa (GSTs; EC 2.5.18) está representada por una familia de isoenzimas implicadas en la detoxificación de xenobióticos. Las GSTs catalizan el ataque nucleofílico del glutatión (GSH) a sustratos electrofílicos/lipofílicos, lo cual disminuye su reactividad hacia las biomoléculas disminuyendo así, el daño que un estrés oxidativo podría generarles [1]. Los sustratos de las GSTs poseen un carbono electrofílico además del sitio de unión del GSH; sin embargo la carencia de especificidad de la enzima hacia sus sustratos, permite que otros átomos al igual que el carbono sirvan como punto de ataque nucleofílico, entre ellos, el átomo del nitrógeno de ésteres orgánicos del nitrato y el átomo de azufre de los tiocianatos orgánicos [2, 3, 4]. Aunque estas isoenzimas muestran una baja especificidad hacia su sustrato, las GSTs han demostrado una especificidad absoluta hacia su cofactor endógeno, el GSH [5].

Desde el descubrimiento de la GSTs a principios de 1970 [4], se han descritos distintos roles de las isoenzimas de hígado de mamífero; entre ellos se pueden mencionar procesos celulares tales como: el metabolismo de drogas [1, 4, 6, 7, 8], transporte intracelular [5, 9, 10], defensa antioxidante [11, 12, 13], biosíntesis de leucotrienos [14, 15, 16], supervivencia celular [17, 18, 19] y multi-resistencia a drogas [11, 20, 21].

Las GSTs hepáticas involucran isoenzimas solubles y asociadas a membrana. Las enzimas humanas se nombran de acuerdo a su categoría como  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\omega$ ; estas letras griegas se acompañan con el tipo de subunidad que compone el tipo de isoenzima activa, el cual se designa por números árabes. Por ejemplo, el homodímero de la subunidad  $\mu$  del tipo 1 es M1-1, y el heterodímero del tipo 1 que está formado por 2 subunidades alfa del tipo 1 y 2, se denomina A1-2. Esta nomenclatura se utiliza en general para todas las GSTs citosólicas de vertebrados y se ha hecho extensible también a procariontes y otros organismos [22]. Se conocen 3 isoformas de la GST unidas a membrana, una de ellas parece estar implicada en el metabolismo de xenobióticos. La GST microsómica 1 es una proteína integral de membrana que ha sido caracterizada en ratas y seres humanos; se encuentra en grandes cantidades en el hígado y se encuentra localizada no sólo en la membrana microsómica sino también, en la membrana externa mitocondrial [6].

Las isoenzimas citosólicas y la microsómica exhiben diferencias en su peso molecular, su inducción por xenobióticos y sus características inmunoquímicas. Las GSTs microsómicas, a diferencia de la familia citosólica, comprende una familia pequeña (16 a 18 KD); estas isoenzimas se encuentran en mayor cantidad en el hígado y tienen una amplia especificidad por los sustratos lipofílicos y electrofílicos [6]. La GST microsómica también exhibe actividad glutatión peroxidásica, lo cual sugiere que esta enzima puede jugar un

rol importante en mecanismos de defensa contra la peroxidación de lípidos de membrana [12].

Cabe señalar además, que las isoenzimas solubles y de membrana se diferencian por su respuesta frente a detergentes, agentes reductores de grupos sulfhidrilos y agentes quelantes [23, 24, 25, 26, 27]. La GST microsómica hepática de rata ha demostrado ser activa como un dímero y/o trímero de subunidades idénticas unidas por su único residuo de cisteína [25]. Se ha reportado además, que el tratamiento de preparaciones purificadas con peróxido de hidrógeno, cambia la conformación microsómica dimérica y/o trimérica de la GST, conduciendo a un aumento de su actividad catalítica; inversamente, el tratamiento con 2,4-ditiotreitol (DTT) provoca una disminución de la actividad de la GST [26]. Por otra parte, se ha reportado que la formación de puentes disulfuros intra o inter-subunidades entre los residuos particulares de cisteína dentro de la secuencia amonoacídica, conduce a la inactivación de las enzimas citosólicas [28]. Al respecto, se ha reportado que la forma-P de la GST en la rata es inactivada por el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Los autores sugieren que la cisteína 47 y la cisteína 101 podrían estar implicadas en la formación de puentes disulfuros intra o intersubunidades, y que estos residuos podrían estar ubicados en una región importante relacionada con el sitio de unión del GSH; la formación del enlace disulfuro entre estos residuos provocaría un impedimento estérico que afectaría la unión del GSH [29].

Resultados similares fueron observados con la isoforma GST  $\pi$  de placenta humana; los autores demostraron que la inactivación oxidativa era revertida por el tratamiento con 2,4-ditiotreitol (DTT) [30]. En forma general, se ha aceptado que la especies reactivas del oxígeno (ROS) conducen a la activación de la GST microsómica y a la inactivación de las isoenzimas citosólicas.

Cabe hacer notar que el efecto oxidativo sobre la actividad GSH transferásica, ha sido evaluado utilizando como agentes oxidantes  $H_2O_2$  y  $Cu^{2+}$ /ascorbato. La toxicidad de los iones de cobre y de hierro se asocian a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) vía reacción de Fenton y/o Haber- Weiss, en las cuales los iones de estos metales catalizan la formación de radicales libres del oxígeno, tales como hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) [31]. Sin embargo, el ión cobre exhibe una alta afinidad por los grupos tiólicos y amino presentes en las proteínas. Recientes trabajos del laboratorio demostraron que los iones cobre en presencia de ascorbato, pueden modificar la actividad biológica de las proteínas por oxidación de los tioles proteicos y, en ausencia de ascorbato, por unión de los iones cobre a estos residuos aminoacídicos [32, 33]. Se demostró además, que ambos mecanismos estaban involucrados en la inhibición de la actividad catalítica de las GSTs citosólicas de hígado de rata, medida como la capacidad de la GST citosólica de conjugar 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu con GSH [34].

El cobre y el hierro son metales de transición, por lo tanto, es posible que los iones cobre no sólo puedan unirse a los grupos tiólicos de las GSTs citosólicas, sino también, los iones hierro. Por lo tanto, en el presente trabajo investigamos los efectos de  $\text{Fe}^{3+}$  y de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato (sistema generador de radicales libres del oxígeno) sobre la actividad total de la GST citosólica de hígado de rata.

## **HIPÓTESIS**

Los iones  $\text{Fe}^{3+}$  inhiben la actividad total GSH transferásica citosólica de hígado de rata sólo en presencia de ascorbato, es decir, a través de la oxidación de los grupos tiólicos de las isoformas de la GSH citosólica.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el efecto del  $\text{Fe}^{3+}$  en ausencia y presencia de ascorbato sobre la actividad total citosólica de hígado de rata.

### Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la concentración de hierro en presencia de ascorbato sobre la actividad total GST citosólica hepática de rata.
2. Determinar el efecto del tiempo de preincubación de la fracción citosólica con  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato sobre la actividad total GST citosólica hepática de rata.
3. Determinar los parámetros cinéticos ( $K_m$  para GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno,  $V_{max}$  y eficiencia catalítica  $V_{max}/K_m$ ) de la GST citosólica en ausencia y presencia del sistema  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato.
4. Determinar la concentración de tioles citosólicos en presencia y ausencia del sistema  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato.
5. Determinar la actividad GST citosólica en presencia de los agentes alquilante NEM y ácido mersalílico.

6. Determinar la capacidad de los sustratos GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno de prevenir la inhibición de la actividad GST citosólica inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato.
7. Comparar la actividad lipoperoxidativa de los sistemas  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, midiendo la lipoperoxidación en microsomas hepáticos de rata.
8. Comparar el consumo de oxígeno inducido por los sistemas  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.
9. Evaluar la formación de aductos entre GSH y los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ .

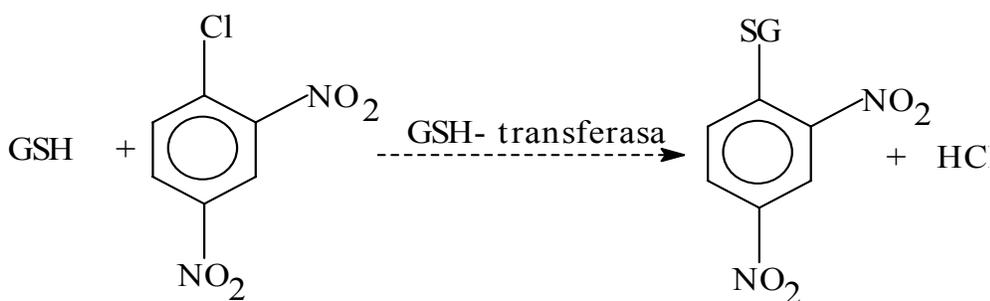
## II. MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Materiales.** El 1-cloro-2,4-dinitrobenceno fue obtenido en ACROS Organics (New Jersey, NJ, USA). El Glutati3n (GSH); la N-etilmaleimida (NEM); el 3cido mersal3lico; el 5,5'-ditiobis-(3cido 2-nitrobenzoico) (Ellman's reagent, DTNB); el 2,4-ditiotreit3l (DTT); la alb3mina de bovino (BSA) y el agente quelante CHELEX-100 (iminodiacetic acid sodium form in polystyrene matrix), fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El FeCl<sub>3</sub> y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron obtenidos de Merck Chile. El resto de los compuestos qu3micos a utilizar fueron de grado anal3tico. Todos los compuestos fueron preparados en soluci3n amortiguadora fosfato 50 mM, pH 7.4, previamente tratado con CHELE X-100.

**2. Animales de experimentaci3n.** Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley de tres meses de edad y con 200 a 230 g de peso corporal. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de pellet Kimber, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21° C. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Qu3micas y Farmac3uticas de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comit3 Ético Institucional.

**3. Preparación de microsomas hepáticos de rata.** Los microsomas fueron preparados por el método de fraccionamiento subcelular. 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 Douncen Wheaton tipo B, realizando 12 pases. El homogeneizado total se centrifugó a 9000 x g durante 15 min en una centrífuga 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; el sobrenadante corresponde a la fracción citosólica hepática. La cuantificación de la proteína citosólica se determinó por el método de Lowry y colaboradores, 1951 [35], utilizando albúmina de bovino fracción IV como estándar.

**4. Determinación de la actividad GSH-transferásica.** La actividad se midió de acuerdo a la técnica espectrofotométrica descrita por Habig y colaboradores, 1974 [4]. La reacción química catalizada por la GSH-transferasa es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato 0,1M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1mM; GSH 4mM; proteína citosólica 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El blanco contenía todos los reactivos, a excepción del GSH. La reacción se inició agregando el GSH a la cubeta muestra. La actividad se determinó midiendo la absorbancia del conjugado formado enzimáticamente a 340 nm, en forma continua durante 3 min a 20°C. Cabe señalar que con el objeto de minimizar la reacción no enzimática, la reacción enzimática se realizó a pH 6,5, la temperatura de incubación fue 20 °C y el control no enzimático se utilizó como referencia. La velocidad enzimática se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción del conjugado formado: 9,6  $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , descrito por Habig y colaboradores ,1974 [4].

**5. Determinación de tioles totales.** La cuantificación de los grupos tioles totales de la fracción citosólica se realizó espectrofotométricamente, utilizando el reactivo DTNB (ácido 5,5-ditio-*bis*-2-nitrobenzoico) de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y colaboradores, 2005 [33] con la única excepción de que las muestras fueron incubadas a 25°C, temperatura a la cual se realizaron también las mediciones de actividad enzimática. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es  $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína citosólica 10 µg/mL; DTNB 0,6 mM. Las muestras se incubaron durante 60 min a 25°C en un baño termostático con agitación constante. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión citosólica. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la proteína citosólica. A continuación, la absorbancia de los sobrenadantes se leyó a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV /VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. El contenido de TNB fue expresado en nmoles de tioles totales por mg de proteína citosólica.

**6. Lipoperoxidación.** La lipoperoxidación microsómica se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El malondialdehído generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm.

La mezcla de reacción contenía en concentraciones finales (en un volumen final de 1,0 mL): amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4; proteína microsómica 1 mg/mL; FeCl<sub>3</sub> 25 μM/ascorbato 1,0 mM o Cu SO<sub>4</sub> 25 μM/ascorbato 1,0 mM. Los controles contenían todos los reactivos, a excepción de los sistemas Fe<sup>3+</sup>/ascorbato o Cu<sup>2+</sup>/ascorbato (lipoperoxidación basal); los blancos contenían todos los reactivos a excepción de la proteína microsómica. Las mezclas se preincubaron durante 20 min a 37°C en un baño termostático, con agitación constante, antes de efectuar la reacción colorimétrica. Al cabo de estos períodos, se les adicionó a todas las muestras y blancos 500 μL de TCA 20% frío (4°C) y luego se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min, en una centrífuga refrigerada (4°C) Heraeus Sepatech modelo Suprafuge 22. Alícuotas de 500 μL de los sobrenadantes se mezclaron con 500 μL de TBA 35 mM y se incubaron durante 60 min a 50°C, para desarrollar la reacción colorimétrica. Al cabo de este período, se leyó la absorbancia de las muestras a 532 nm contra los blancos respectivos, en un espectrofotómetro

UNICAM VIS modelo 3, acoplado a un computador. La velocidad de generación de TBARS fue expresada en nmoles de TBARS formados/ min/ mg de proteína microsómica, utilizando el coeficiente de extinción ( $156 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) para el conjugado MDA-TBA descrito en Letelier y colaboradores, 2005a [32].

**7. Consumo de oxígeno.** Las mediciones del consumo de oxígeno se realizaron polarográficamente utilizando un electrodo Clark N° 5331 (Yellow Springs), en un oxígrafo YSI Incorporated Model 59, acoplado a un computador. La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1,6 mL: amortiguador fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5; proteína citosólica 100  $\mu\text{g}$  /mL;  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ ; ascorbato 1,0 mM. Las mediciones se realizaron a 25 °C, midiendo en forma continua la concentración de oxígeno del medio de reacción. Los resultados se expresaron calculando las pendientes de las rectas obtenidas que representan la disminución de la concentración de oxígeno en la mezcla de reacción vs el tiempo medido en segundos.

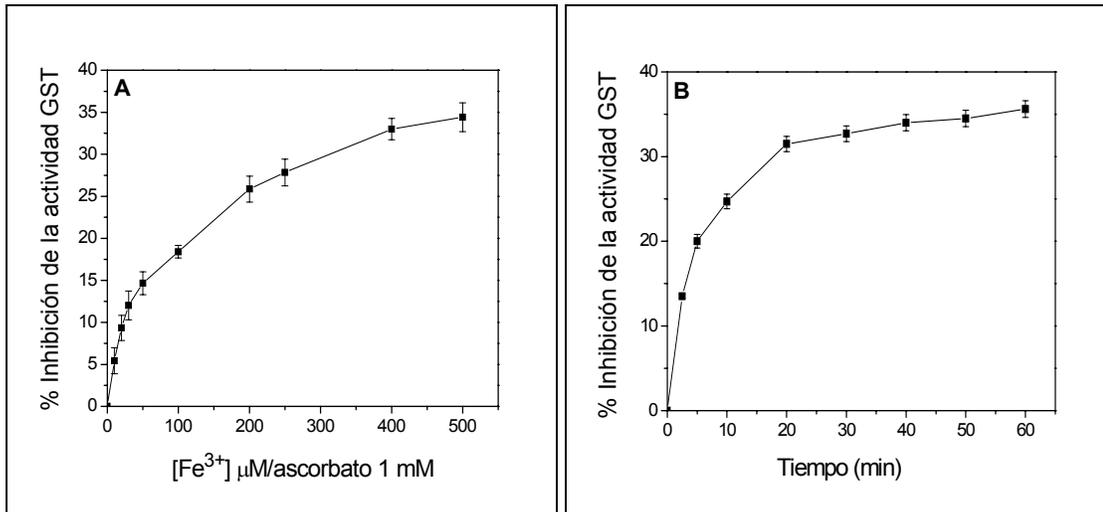
**8. Formación de aductos entre GSH y los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ .** Las distintas mezclas de reacción contenían en concentraciones finales (en un volumen final de 1,0 mL): a) amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4; GSH 50  $\mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  (50 a 250  $\mu\text{M}$ ); b) amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4; GSH 50  $\mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (50 a

250  $\mu\text{M}$ ). Los blancos contenían todos los reactivos a excepción de los iones. Las mezclas se incubaron durante 5 minutos y luego se determinó el espectro de absorbancia entre 240  $\text{nm}$  y 600  $\text{nm}$ . Es necesario señalar que en esta región del espectro la incubación de GSH,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , todos en forma aislada, no mostraron picos de absorbancia; por esta razón se utilizó como blanco la mezcla compuesta por amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 y GSH 50  $\mu\text{M}$ .

### III. RESULTADOS

**Efecto  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato en la actividad GST citosólica.** Estos resultados se muestran en la Figura 1. La preincubación de la fracción citosólica con distintas concentraciones  $\text{Fe}^{3+}$  (25  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ ) en presencia de ascorbato inhibió la actividad GST citosólica de una forma concentración- y tiempo- dependiente (Figura 1A y 1B respectivamente). Sin embargo,  $\text{Fe}^{3+}$  en el mismo rango de concentraciones y en ausencia de ascorbato, no modificó la actividad GST citosólica (datos no mostrados).

**Efecto  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato sobre los parámetros cinéticos de la GST citosólica hepática de rata.** La Tabla 1 muestra las constantes cinéticas aparentes de esta enzima determinadas en ausencia y presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato; estas constantes se obtuvieron de los diagramas de Lineweaver-Burk. La preincubación de la fracción citosólica con 200  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ / 1mM ascorbato durante 20 min y la posterior adición del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y GSH para determinar la actividad enzimática, disminuyó significativamente la  $K_m$  para GSH sin cambios significativos en el valor de  $K_m$  por 1-cloro-2,4-dinitrobenceno. La presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato disminuyó el valor de  $V_{max}$  aproximadamente en un 35%.



**Figura 1. Actividad GST citosólica total en presencia de Fe<sup>3+</sup>/ascorbato: Efecto de la concentración de Fe<sup>3+</sup> (A) y del tiempo de incubación de los microsomas con Fe<sup>3+</sup>/ascorbato (B).** Condiciones de ensayo **A**: La proteína citosólica (10 μg/mL) fue preincubada con Fe<sup>3+</sup>/ascorbato durante 10 min a 25°C antes de determinar la actividad enzimática. Condiciones de ensayo **B**: [FeCl<sub>3</sub>]: 200 μM; [ascorbato]: 1 mM. La actividad GST fue determinada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

**Tabla 1. GST Citosólica Hepática: Parámetros cinéticos**

	<b>1-cloro-2,4-dinitrobencono</b>		
	Km [mM]	Vmax μmol/min/mg de proteína citosólica	Eficiencia catalítica (Vmax/Km)
Actividad GST Control	0,098 ± 0.006	0,944 ± 0,052	9,6
Fe <sup>+3</sup> /ascorbato	0,108 ± 0.007	0,600 ± 0,038	5,6
	<b>GSH</b>		
	Km [mM]	Vmax μmol/min/mg de proteína citosólica	
Actividad GST Control	0,189 ± 0.011	0,944 ± 0,047	5,0
Fe <sup>+3</sup> /ascorbato	0,102 ± 0,006	0,600 ± 0,035	5,9

[FeCl<sub>3</sub>]: 200 μM; [ascorbato]: 1 mM. Los valores de Km y Vmax fueron obtenidos de los gráficos de Lineweaver-Burk. La actividad GST fue determinada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

**Actividad GST citosólica y grupos tiólicos.** Diferentes autores han demostrado que los grupos tiólicos de la GST están involucrados en la actividad catalítica de esta enzima. NEM y ácido mersalílico, reconocidos agentes S-alquilantes, presentan diferencias significativas en la potencia inhibitoria de la

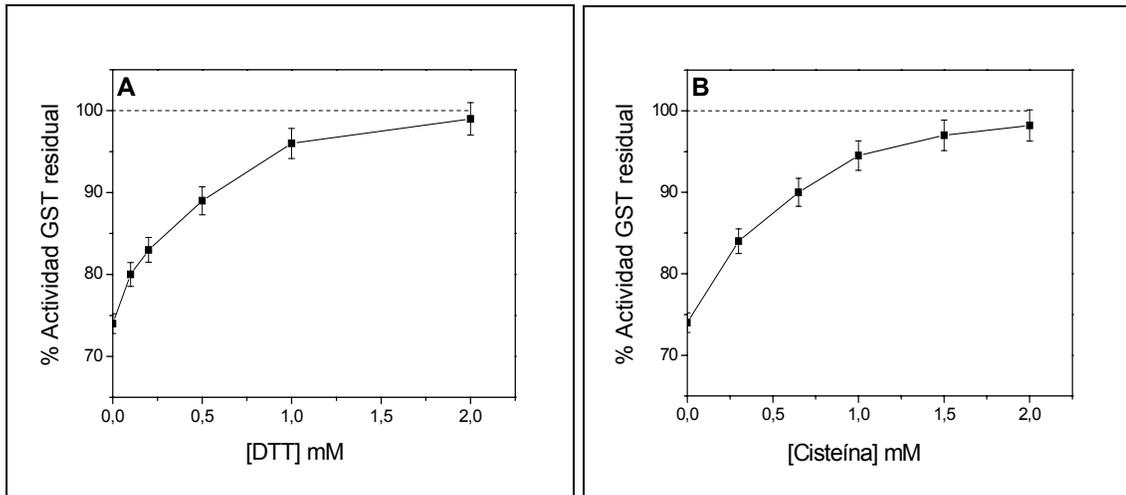
actividad GST citosólica; esto indica que distintos residuos de cisteína de las isoenzimas están involucrados en la actividad GSH transferásica [34]. Para evaluar la relación entre la pérdida de grupos tiólicos y la inhibición de la actividad GST citosólica, se determinaron los efectos de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato sobre el contenido tiólico citosólico en ausencia y presencia de NEM y ácido mersalílico; estos resultados se muestran en la Tabla 2. La pre-incubación de la fracción citosólica con 200  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato 1mM disminuyó el contenido tiólico citosólico (66,9 %). De la misma forma, 100  $\mu\text{M}$  NEM y 0,5  $\mu\text{M}$  ácido mersalílico disminuyeron el contenido tiólico citosólico en un 69,7 % y 21,5 %, respectivamente. La presencia simultánea de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y NEM, y  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y ácido mersalílico incrementaron estos porcentajes de disminución del contenido de tioles microsómicos a 82,3 y 25,4, respectivamente. Por otra parte, en las mismas condiciones experimentales,  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato, NEM y ácido mersalílico disminuyeron la actividad GST citosólica 27 %, 25% y 21 %, respectivamente. Sin embargo, la presencia simultánea de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y NEM, y  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y ácido mersalílico, incrementaron estos porcentajes desde 25% a 43% y desde 21% a 62%, respectivamente. Por otra parte, DTT y cisteína revirtieron la inhibición inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato de una forma concentración – respuesta; más aún, concentraciones 2 mM de ambos agentes reductores abolieron en un 100 % esta inhibición (Figura 2).

**Tabla 2. Contenido de tioles citosólicos y actividad GST:**

**Efecto de Fe<sup>3+</sup>/ascorbato, NEM y ácido mersalílico**

Condiciones	Tioles totales ( $\eta$ moles/ mg proteína)	% Pérdida de tioles	Actividad Residual ( $\mu$ moles de conjugado/ min/ mg proteína citosólica)	Inhibición Actividad GST (%)
Actividad GST Control	2,84 $\pm$ 0,206	0	0,944 $\pm$ 0,064	---
Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	0,94 $\pm$ 0,040	66,90	0,692 $\pm$ 0,047	26,7
NEM	0,86 $\pm$ 0,074	69,72	0,712 $\pm$ 0,047	24,6
NEM + Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	0,44 $\pm$ 0,060	82,25	0,542 $\pm$ 0,045	42,6
Ácido mersalílico	2,23 $\pm$ 0,294	21,48	0,749 $\pm$ 0,035	20,7
Ácido mersalílico + Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	2,12 $\pm$ 0,140	25,35	0,363 $\pm$ 0,036	61,5

[FeCl<sub>3</sub>]: 200  $\mu$ M; [ascorbato]: 1 mM; [NEM]: 100  $\mu$ M; [Ácido mersalílico]: 0,5  $\mu$ M. La proteína citosólica (10  $\mu$ g/mL) fue preincubada durante 10 min a 25°C con Fe<sup>3+</sup>/ascorbato, NEM o ácido mersalílico antes de determinar el contenido microsómico de tioles y la actividad GST. La determinación de tioles y la actividad GST fue ensayada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.

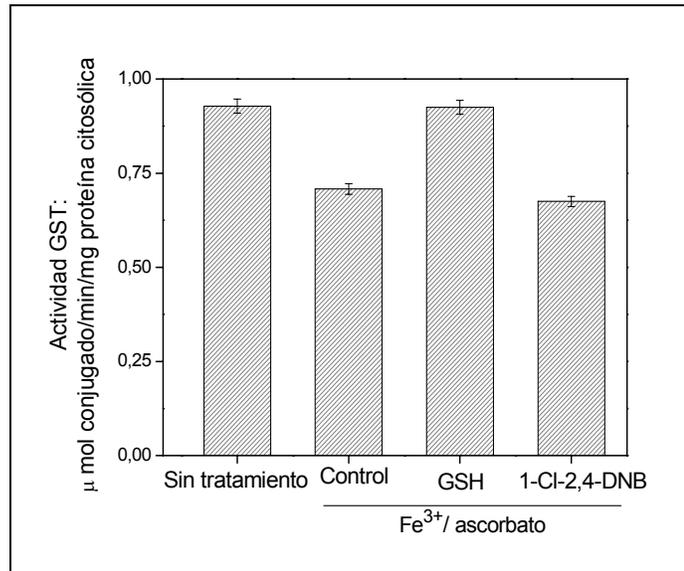


**Figura 2. Inhibición de la actividad GST citosólica inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato. Efecto de DTT y cisteína.** [ $\text{FeCl}_3$ ]: 200  $\mu\text{M}$ ; [ascorbato]: 1 mM; temperatura de incubación: 25°C. La proteína citosólica (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue preincubada durante 10 min con  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato en ausencia de DTT y cisteína para determinar la actividad GST. La actividad GST residual fue calculada considerando como 100%, la actividad control medida en ausencia de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y de los agentes reductores. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.

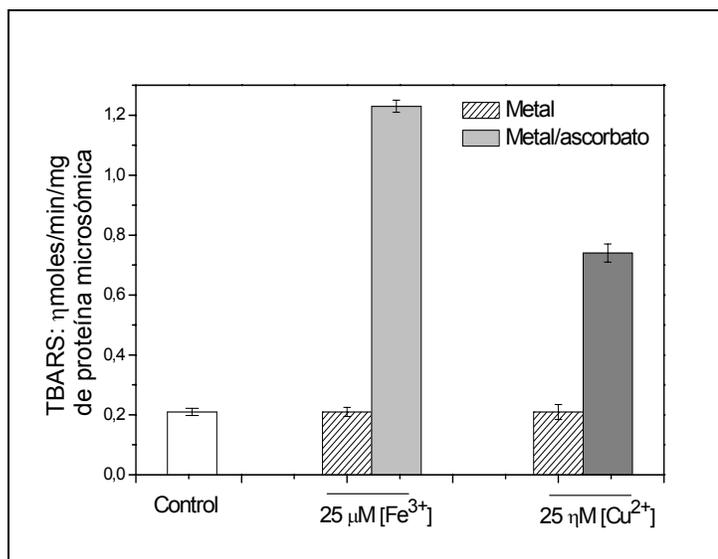
**Actividad de GST citosólica en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato: Efecto de la pre-incubación con GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.** Se ha sugerido que los grupos tiólicos críticos de la enzima GST citosólica pueden ser protegidos por la pre-incubación con el cofactor GSH; esto porque los residuos de cisteína redox-activos estarían localizados cercanos al sitio de unión del GSH [34, 36]. Así, para evaluar este efecto protector, la proteína citosólica fue preincubada durante 20 min con GSH y también con el xenobiótico 1-cloro-2,4-dinitro

benceno antes de adicionar  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y determinar la actividad GST citosólica. Como se muestra en la Figura 3, la pre-incubación de la fracción citosólica con GSH previno completamente la inhibición de la actividad GST citosólica inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato; sin embargo, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno no modificó esta inhibición.

**Lipoperoxidación microsomal inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.** Estos resultados se muestran en la Figura 4. Previamente se demostró que concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$   $1 \mu\text{M}$ , en ausencia de ascorbato, no inducían cambios en la lipoperoxidación basal [32]. Como una forma de comparar los efectos lipoperoxidativos de ambos sistemas pro-oxidantes, nosotros utilizamos  $\text{Cu}^{2+}$   $25 \mu\text{M}$ /ascorbato y  $\text{Fe}^{3+}$   $25 \mu\text{M}$ /ascorbato. Aunque las concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  fue 1000 veces superior a la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$ , los  $\eta\text{moles}$  de TBARS/min/mg de proteína microsómica producidos por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato fueron solamente 1,66 veces superior a los producidos por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.



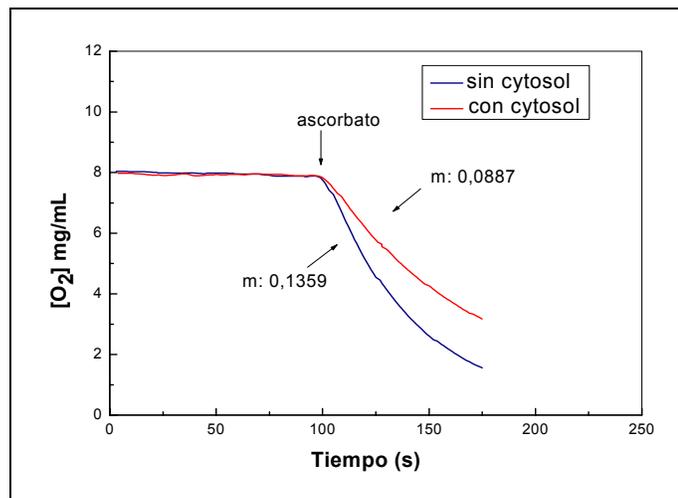
**Figura 3. Inhibición de la actividad GST inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato: Efecto de GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno.** [FeCl<sub>3</sub>]: 200 μM; [ascorbato]: 1 mM; temperatura de incubación: 25°C. La proteína citosólica (10 μg/mL) fue preincubada con GSH 4 mM o 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno 1 mM durante 30 min a 25°C; luego se adicionó Fe<sup>3+</sup>/ascorbato y las mezclas fueron incubadas 10 min antes de determinar la actividad GST. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.



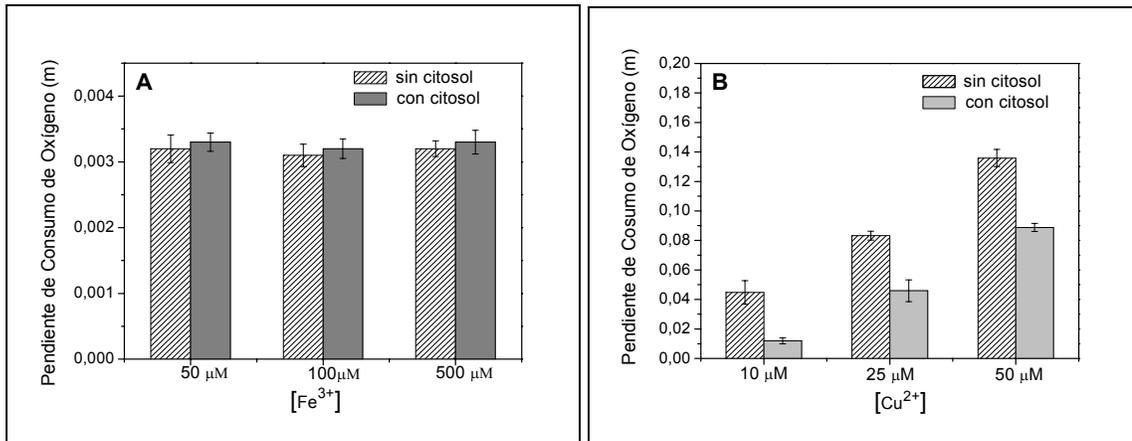
**Figura 4. Lipoperoxidación Microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato.** [FeCl<sub>3</sub>]: 25 μM; [CuSO<sub>4</sub>]: 25 nM [ascorbato] 1 mM. La lipoperoxidación microsómica fue determinada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

**Consumo de oxígeno inducido por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato: Efecto de la concentración de proteína citosólica.** La Figura 5 muestra un ejemplo de los trazados experimentales de consumo de oxígeno en ausencia y presencia de la fracción citosólica (100 μg de proteína citosólica). El consumo de oxígeno generado a través de la reacción de Haber-Weiss y/o Fenton se inició agregando el ascorbato a la mezcla de reacción; esto para darle tiempo a los iones metálicos de unirse a las proteínas citosólicas y luego, iniciar el consumo de oxígeno. Así, la Figura 5 muestra que la pendiente de consumo de

oxígeno medida en ausencia de la fracción citosólica es aproximadamente 1,5 veces superior (m: 0,1359) a aquella medida en presencia de la fracción citosólica (m: 0,0887). Por otra parte, el consumo de oxígeno inducido por el sistema  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato no fue dependiente de la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 6 A); sin embargo, en iguales condiciones, el consumo de oxígeno inducido por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato fue dependiente de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 6B) [32, 34].



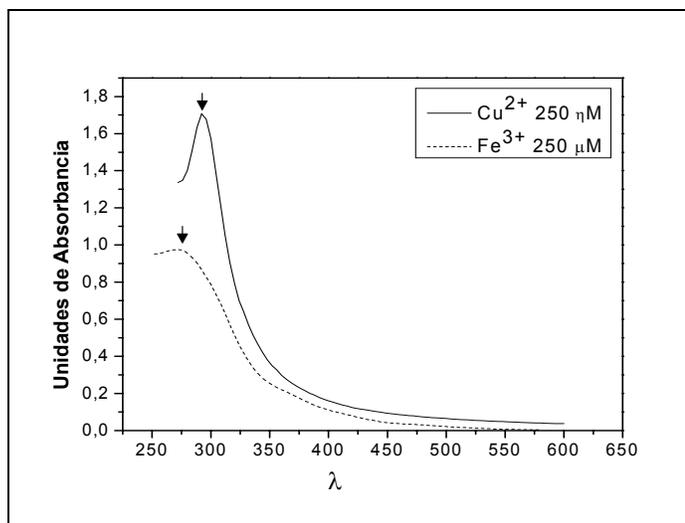
**Figura 5. Trazado experimental del Consumo de Oxígeno inducido por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato en presencia y ausencia de la fracción citosólica.** [Proteína citosólica]: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $[\text{CuSO}_4]$ : 50  $\mu\text{M}$  [ascorbato]: 1 mM. m: representa la pendiente de consumo de oxígeno. La técnica utilizada está descrita en Métodos.



**Figura 6. Consumo de Oxígeno inducido por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato (A) y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato (B) en ausencia y presencia de proteína citosólica.** [ascorbato]: 1 mM. La proteína citosólica (100 μg/mL) fue preincubada durante 10 min a 25°C con Fe<sup>3+</sup> (A) o Cu<sup>2+</sup> (B) antes de adicionar ascorbato y determinar el consumo de oxígeno. Cada valor de m representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

**Formación de aductos GSH- Cu<sup>2+</sup> y GSH- Fe<sup>3+</sup>.** Los resultados antes mencionados muestran que en las condiciones experimentales ensayadas existen notables diferencias entre las propiedades redox y la afinidad por los grupos tiólicos proteicos de los iones Fe<sup>3+</sup> y Cu<sup>2+</sup>. Con el fin de confirmar aún más esta hipótesis, estudiamos la capacidad de estos iones metálicos de unirse a GSH a través de los cambios espectrales inducidos por las mezclas formadas por GSH - Cu<sup>2+</sup> y GSH - Fe<sup>3+</sup>. Estos resultados se muestran en la Figura 7 y la Tabla 3. GSH 50 μM, Fe<sup>3+</sup> (entre 50 μM y 250 μM) y Cu<sup>2+</sup> (entre 50 ηM y 250 ηM) en forma independiente, no presentaron picos de absorbancia detectables

entre 240  $\eta$ M y 600  $\eta$ M. Sin embargo, al mezclar GSH con iones hierro y cobre, se observaron picos a 272  $\eta$ m y 292  $\eta$ m, respectivamente (Figura 7). Más aún, los valores de absorbancia de estos picos fueron dependientes de la concentración de los iones metálicos; sin embargo, aunque ensayamos concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  1000 veces mayores que las de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\mu\text{M}$  vs  $\eta\text{M}$ ), los valores de absorbancia obtenidos con  $\text{Cu}^{2+}$  fueron significativamente superiores a los obtenidos con  $\text{Fe}^{3+}$  (Tabla 3).



**Figura 7. Formación de aductos GSH- $\text{Cu}^{2+}$  y GSH- $\text{Fe}^{3+}$ .** [GSH]: 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas en el gráfico indican la longitud de onda de absorbancia máxima de cada aducto, GSH- $\text{Fe}^{3+}$ : 292  $\eta\text{m}$  y GSH- $\text{Cu}^{2+}$ : 272  $\eta\text{m}$ .

**Tabla 3. Formación de los aductos GSH-Cu<sup>2+</sup> y GSH-Fe<sup>3+</sup>**

Cu <sup>2+</sup> ηM	GSH-Cu <sup>2+</sup> (A.U. a 292 ηm)	Fe <sup>3+</sup> μM	GSH-Fe <sup>3+</sup> (A.U. a 272 ηm)
50	0,178 ± 0,008	50	0,189 ± 0,005
100	0,397 ± 0,005	100	0,394 ± 0,003
150	0,783 ± 0,006	150	0,567 ± 0,004
200	1,379 ± 0,007	200	0,786 ± 0,003
250	1,670 ± 0,009	250	0,972 ± 0,006

A.U.: Unidades de absorbancia; [GSH]: 50 μM; 292 ηm y 272 ηm corresponden a la longitud de onda máxima a la cual absorbieron los aductos GSH-Cu<sup>2+</sup> y GSH-Fe<sup>3+</sup>, respectivamente (Ver Figura 7). Cada valor de m representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

#### IV. DISCUSIÓN

Diversos investigadores han demostrado que la formación de puentes disulfuro intra-o inter-subunidad entre determinados residuos de cisteína en la secuencia aminoacídica de las isoformas de la GST, provocan la inactivación de las enzimas citosólicas [34, 36, 37]. Al respecto, los iones cobre e hierro en presencia de ascorbato generan radicales libres del oxígeno como anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) a través de la reacción de Haber Weiss y/o Fenton; estas especies propician la formación de puentes disulfuro entre residuos reactivos de cisteína, provocando la inhibición de la actividad observada; este fenómeno puede ser prevenido por agentes reductores como DTT, cisteína y GSH.

Recientemente hemos demostrado que el sistema  $Cu^{2+}$ /ascorbato puede inducir la oxidación de los grupos tiólicos de las proteínas, entre ellas la GST citosólica hepática; además, los iones  $Cu^{2+}$  pueden unirse inespecíficamente a los grupos tiólicos de los residuos cisteinílicos de las proteínas [34]. La unión de  $Cu^{2+}$  provoca el bloqueo de dichos residuos e induce la inhibición de la actividad GST, la cual a diferencia de aquella inducida por oxidación de sus grupos tiólicos, no puede ser prevenida por agentes reductores.

Tanto cobre como hierro son metales de transición, por lo tanto los iones  $Fe^{3+}$  podrían comportarse en forma similar a  $Cu^{2+}$ , es decir, los iones hierro no

sólo podrían inhibir la GST citosólica a través de mecanismos redox, sino además, podrían unirse a los residuos cisteínicos de la GST. No existen antecedentes en la literatura acerca de los efectos que los iones  $\text{Fe}^{3+}$  por sí solos podrían ejercer sobre la actividad GST citosólica. Con el fin de establecer posibles diferencias entre los mecanismos a través de los cuales los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  inhiben la actividad GST, en este trabajo estudiamos los efectos de  $\text{Fe}^{3+}$  en ausencia y presencia de ascorbato sobre la actividad GST citosólica total hepática de rata. Como era de esperar, el  $\text{Fe}^{3+}$  en presencia de ascorbato inhibió la actividad GST citosólica; sin embargo, el  $\text{Fe}^{3+}$  en ausencia de ascorbato no afectó esta actividad. Más aún, este efecto inhibitorio fue tiempo- y concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ -dependiente (Figura 1A y Figura 1B). Los parámetros cinéticos de la GST mostraron que  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato aumenta significativamente la afinidad de la enzima por su cofactor endógeno, GSH ( $p < 0.05$ ), mientras que la afinidad hacia el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu no fue modificada (Tabla 1). Generalmente un aumento de la afinidad por el sustrato debería aumentar la actividad catalítica de una enzima; sin embargo, la actividad GST citosólica. Probablemente,  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato disminuyó el número de moléculas activas de GST, dado que la oxidación de los grupos tiónicos puede conducir a la formación tanto de dímeros catalíticamente activos como no activos;

Cabe señalar además, que la incubación de la fracción citosólica con GSH antes de adicionar  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato, protegió la actividad GST citosólica, efecto

no observado con el xenobiótico 1-cloro-2,4-dinitrobenceno. Probablemente, la unión previa del GSH al sitio activo de la GST dificultaría que los residuos críticos de cisteína sufran oxidación, protegiendo así la actividad catalítica de esta enzima, postulado que es compartido también por otros autores [34, 37]. Es necesario hacer notar además, que el GSH libre puede ser oxidado por ROS a GSSH, por lo tanto, la unión de GSH al sitio activo de la GST podría impedir la reactividad redox de GSH, fenómeno que también ha sido reportado en otros sistemas y que requiere aún de mayor investigación [38].

Es necesario hacer notar que los experimentos de actividad enzimática representan la actividad GST total citosólica la cual está representada por varias isoformas. De aquí que los valores de los parámetros cinéticos mostrados, son sólo aparentes. Estos valores sin embargo, no están alejados de los datos descritos para isoformas citosólicas purificadas de la GST [39-40], por lo que nos atrevemos a postular que ellos representarían la media de las constantes cinéticas de todas las isoformas de la GST presentes en nuestras preparaciones citosólicas (Tabla 1).

La información concerniente a la interacción precisa responsable de la formación de los complejos enzima-sustrato que participan en la actividad catalítica de la GST, ha progresado enormemente con los estudios de las estructuras tridimensionales de las isoformas de las GST. Estos estudios muestran que interacciones no covalentes proteína-proteína están involucradas

en la formación del dímero catalíticamente activo de las diferentes isoformas de la GST. El sitio de unión del GSH (sitio G) y el del sustrato (xenobiótico o endobiótico) (sitio H) están constituidos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos [32, 37]. Sin embargo, la inactivación oxidativa de algunas GST hace suponer la participación de algunos residuos de cisteína en la formación de puentes disulfuro. Al respecto se ha reportado la existencia de dos diferentes grupos tiólicos reactivos que parecen estar ubicados en la región de unión del GSH [32, 37, 41]. Para probar este postulado, recurrimos a dos agentes alquilantes de grupos tiólicos, NEM y ácido mersalílico. La preincubación de la fracción citosólica con NEM 100  $\mu$ M y ácido mersalílico 0,5  $\mu$ M disminuyeron el contenido citosólico tiólico 69,7% y 21,5% en comparación con  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato que lo disminuyó solo en un 66,9% (Tabla 2). En estas mismas condiciones experimentales sin embargo,  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato, NEM 100  $\mu$ M y ácido mersalílico 0,5  $\mu$ M inhibieron la actividad GST citosólica en forma similar, 27%, 25% y 21%, respectivamente. Sin embargo, al incubar la fracción citosólica simultáneamente con  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato-NEM o  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato-ácido mersalílico, la inhibición de la actividad aumentó aproximadamente 2 (43%) y 3 veces (62%), respectivamente (Tabla 2). Aparentemente la pre-incubación con NEM incrementa la capacidad de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato de inhibir la actividad GST. Este efecto sinérgico puede ser consecuencia del cambio conformacional putativo inducido por la unión de NEM a las proteínas, lo cual expondría nuevos grupos tiólicos de la GST a la acción

redox ejercida por el sistema  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato. Sin embargo, este efecto sinérgico inhibitorio inducido por el ácido mersalílico parece ser independiente del efecto inducido por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato. Este hallazgo puede ser indicativo de la posición relativa de los grupos tiólicos reactivos de GST a ácido mersalílico y/o a ROS, lo cual también apoya la idea de la existencia de grupos tiólicos de diferente reactividad en las isoenzimas de la GST citosólica.

Hasta aquí, nuestros resultados sugieren que la modificación oxidativa de los grupos tiólicos, estaría involucrada en la inhibición de la actividad GST citosólica inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato. Más aún, a diferencia de los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , los iones  $\text{Fe}^{3+}$  en ausencia de ascorbato no serían capaces de modificar la actividad GST citosólica. Como una forma de dilucidar este postulado, desarrollamos nuevos experimentos tendientes a establecer la capacidad de los iones hierro de unirse a proteínas. En primer lugar, establecimos la capacidad comparativa de  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato de inducir consumo de oxígeno. A igualdad de concentración de ambos iones metálicos ( $50 \mu\text{M}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato indujo un consumo de oxígeno significativamente superior a aquel generado por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato; la pendiente de consumo de oxígeno inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato fue aproximadamente 4 veces superior a la inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato (Figura 6A y 6B). Más aún, la preincubación de  $\text{Cu}^{2+}$  con proteína citosólica, antes de adicionar ascorbato para generar el consumo de oxígeno, disminuyó la pendiente de consumo; este efecto sin

embargo, no fue observado con  $\text{Fe}^{3+}$ . Así, estos resultados confirman la idea que  $\text{Cu}^{2+}$  tiene una alta afinidad por los grupos tiólicos de las proteínas, no así el  $\text{Fe}^{3+}$ . Cabe señalar además, que el consumo de oxígeno inducido por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato fue dependiente de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  libre en la mezcla de reacción. Por lo tanto, la disminución del consumo de oxígeno al adicionar proteína citosólica a la mezcla de reacción, se debería a la disminución de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  libre en la mezcla provocada por la unión de estos iones a las proteínas tiólicas citosólicas (Figura 6B).

Hasta aquí los resultados confirman nuestra hipótesis, en la cual postulamos que la oxidación de los grupos tiólicos de GST inducida por ROS está involucrada en la inhibición de la actividad GST citosólica. Sin embargo, la afinidad de los iones cobre e hierro hacia los residuos cisteinílicos de las proteínas, parece ser diferente. Con el objeto de evaluar este postulado ensayamos la capacidad de GSH de unir iones cobre e hierro. En las condiciones experimentales ensayadas GSH,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en forma independiente, no mostraron picos de absorbancia entre las longitudes de onda 240 y 600 nm del espectro (Figura 7). Sin embargo, las mezclas de incubación GSH- $\text{Cu}^{2+}$  y GSH- $\text{Fe}^{3+}$  mostraron picos de absorbancia máxima a 292 nm y a 272 nm, respectivamente. Cabe señalar que para observar el pico resultante de la mezcla GSH- $\text{Fe}^{3+}$  fue necesario una concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  1000 veces mayor que la de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 7). Estos resultados confirman lo anteriormente

postulado en relación a la baja afinidad de  $\text{Fe}^{3+}$  por los grupos tiólicos en comparación a  $\text{Cu}^{2+}$ , indicando que los iones  $\text{Fe}^{3+}$  inhibirían la actividad GST citosólica mayoritariamente por oxidación de sus grupos tiólicos inducida por ROS y en mucho menor grado por unión inespecífica de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  a estos grupos de estas enzimas.

Es necesario hacer además algunos alcances fisiológicos. Las GSTs representan el 10 % del contenido total de proteína citosólica y su papel en los mecanismos de detoxificación es bien conocido [12, 14, 17, 25, 44, 45, 46]. El valor experimental de la  $K_m$  aparente para GSH fue de 0,19 mM. La concentración de GSH hepática citosólica fluctúa entre 0,5 y 10 mM, aproximadamente [42-43]. Así, bajo condiciones fisiológicas las isoformas hepáticas de las GSTs se mantendrían saturadas con GSH. La existencia de este complejo putativo GSH-GST podría representar un mecanismo fisiológico protector no sólo de esta notable enzima citosólica sino además, del GSH hepático.

## V. REFERENCIAS

- [1] R.N. Armstrong, Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.*, 10(1) (1997) 2-18.
- [2] L.A. Heppel, R.J. Hilmoie, Metabolism of inorganic nitrite and nitrate esters. II. The enzymatic reduction of nitroglycerin and erythreitol tetranitrate by glutathione. *J. Biol. Chem.*, 183 (1950) 129-138.
- [3] H. Ohkawa, R. Ohkawa, I. Yamamoto, J.F. Casida, Enzymatic mechanism and toxicological significance of hydrogen cyanide liberation from various organothiocyanates and organonitriles in mice and houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2 (1972) 95-112.
- [4] W. Habig, M. Pabst, W. Jakoby, Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249(22) (1974) 7130-7139.
- [5] N. Kaplowitz, Physiological significance of glutathione S-transferases. *Am. J. Physiol.* 239(6) (1980) G439-G444.
- [6] D.L. Eaton, T.K. Bammler, Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, 49(2) (1999) 156-164.

- [7] K. Thyagaraju, B. Hemavathi, K. Vasundhara, A.D. Rao, K.N. Devi, Comparative study on glutathione transferases of rat brain and testis under the stress of phenobarbitol and beta-methylcholanthrene. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6(8) (2005) 759-769.
- [8] K. Jr. Holovska, A. Sobekova, K. Holovska, V. Lenartova, P. Javorsky, J. Legath, L. Legath, M. Mareta, Antioxidant and detoxifying enzymes in the liver of rats after subchronic inhalation of the mixture of cyclic hydrocarbons. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56(6) (2005) 377-383.
- [9] J. Ketley, W. Habig, W. Jakoby, Binding of non-substrate ligands to the glutathione S-transferases, *J. Biol. Chem.*, 250(22) (1975) 8670-8673.
- [10] M. Lo Bello, M. Nuccetelli, A.M. Caccuri, L. Stella, M.W. Parker, J. Rossjohn, W.J. McKinstry, A.F. Mozzi, G. Federici, F. Polizio, J.Z. Pedersen, G. Ricci, Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers; a new role for an old enzyme. *J. Biol. Chem.*, 276(45) (2001) 42138-42145.
- [11] C. Peklak-Scott, A.J. Townsend, C.S. Morrow, Dynamics of glutathione conjugation and conjugate efflux in detoxification of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide: contributions of glutathione, glutathione S-transferase, and MRP1. *Biochemistry*, 44(11) (2005) 4426-4433.

- [12] E. Mosialou, R. Morgenstern, Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 275(1) (1989) 289-294.
- [13] B.P. Patel, U.M. Rawal, P.M. Shah, J.A. Prajapati, R.M. Rawal, T.K. Dave, P.S. Patel, Study of tobacco habits and alterations in enzymatic antioxidant system in oral cancer. *Oncology.*, 68(4-6) (2005) 511-519.
- [14] P.J. Jakobsson, J.A. Mancini and A.W. Ford-Hutchinson, Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. *J. Biol. Chem.*, 271(36) (1996) 22203-22210.
- [15] K.A. Scoggan, P.J. Jakobsson, A.W. Ford-Hutchinson, Production of leukotriene C4 in different human tissues is attributable to distinct membrane bound biosynthetic enzymes. *J Biol Chem.*, 272(15) (1997). 10182 -10187.
- [16] D. Anuradha, K.V. Reddy, T.C. Kumar, S. Neeraja, P.R. Reddy, P. Reddanna, Purification and characterization of rat testicular glutathione S-transferases: role in the synthesis of eicosanoids. *Asian. J. Androl.*, 2(4) (2000) 277-282.

- [17] S.C. Kampranis, R. Damianova, M. Atallah, G.Toby, G. Kondi, P.N. Tsihchlis, A.M. Makris, A novel plant glutathione S-transferase/oxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J. Biol. Chem.* 275(38) (2000) 29207-29216.
- [18] S.G. Cho, Y.H. Lee, H.S. Park, K. Ryoo, K.W. Kang, J. Park, S.J. Eom, M.J Kim, T.S. Chang, S.Y. Choi, J. Shim, Y. Kim, M.S Dong, M.J. Lee, S.G. Kim, H. Ichijo, E.J. Choi, Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1, *J. Biol. Chem.*, 276(16) (2001) 12749-12755.
- [19] T. Sakurai, C. Kojima, M. Ochiai, T. Ohta, M.H. Sakurai, M.P. Waalkes, K. Fujiwara, Cellular glutathione prevents cytolethality of monomethylarsonic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 195(2) (2004) 129-141.
- [20] S. Lien, A.K. Larsson, B. Mannervik, The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem. Pharmacol.*, 63(2) (2002) 191-197.
- [21] M.A. Harkey, M. Czerwinski, J. Slattery, H.P. Kiem, Overexpression of glutathione-S-transferase, MGSTII, confers resistance to busulfan and melphalan. *Cancer Invest.*, 23(1) (2005)19-25.

- [22] Mannervik, B., Awasthi, Y. C., Board, P. G., Hayes, J. D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W. R., Pickett, C. B., Sato, K., Widersten, M., and Wolf, C. R. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282 (1992) 305-308.
- [23] Morgenstern, R., and De Pierre, J. W. (1988) In *Glutathione Conjugation: Its Mechanism and Biological Significance* (Ketterer, B., and Sies, H., Eds.) pp 157-174, Academic Press, London.
- [24] Mosialou E, Piemonte F, Andersson C, Vos R, Van Bladeren P, Morgenstern R. Microsomal glutathione transferase: lipid-derived substrates and lipid dependence. *Arch Biochem Biophys.*, 320 (1995) 210-216.
- [25] M. Lo Bello, R. Petruzzelli, E. De Stefano, C. Tenedini, D. Barra and G. Federico. Identification of a highly reactive sulphhydryl group in human placental glutathione transferase by a site-directed fluorescent reagent. *FEBS.* 263 (1990) 389-391.
- [26] Y. Aniya, MW. Anders, Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by hydrogen peroxide: role for protein-dimer formation. *Arch Biochem. Biophys.*, 296 (1992) 611-616.

- [27] Y. Aniya, M. Shimaji, A. Naito, Increase in liver microsomal glutathione S-transferase activity by phenobarbital treatment of rats. Possible involvement of oxidative activation via cytochrome P450. *Biochem Pharmacol.*, 46 (1993) 1741-1747.
- [28] R. Morgenstern, J. De Pierre, Microsomal glutathione transferase. Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition. *Eur. J. Biochem.*, 134(3) (1983) 591-597.
- [29] H. Shen, S.Tsuchida, K. Tamai, K. Sato, Identification of cysteine residues involved in disulfide formation in the inactivation of glutathione transferase P-form by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 300(1) (1993) 137-141.
- [30] G. Ricci, G. Del Boccio, A. Pennelli, M. Lo bello, R. Petruzzelli, A.M. Caccuri, D. Barra and G. Federico, Redox forms of human placenta glutathione transferase. *J. Biol. Chem.*, 266 (32) (1991) 21409-21415.
- [31] B. Halliwell, Free radicals, antioxidants and human diseases: curiosity, cause and consequences. *Lancet*, 344 (1994) 721-724.

- [32] M.E. Letelier, A.M. Lepe, M. Faúndez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. .Speisky. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity, *Chem. Biol. Interact.*, 151 (2005a) 71-82.
- [33] 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 (2005b) 480–486.
- [34] 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.
- [35] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1) (1951) 265-275.
- [36] A. Shokeer, A.K. Larsson and B. Mannervik, Residue 234 in glutathione transferase T1-1 plays a pivotal role in the catalytic activity and the selectivity against alternative substrates. *Biochem. J.*, 388 (2005) 387-392.

- [37] H. Cheng, T. Tchaikovskaya, Y. Tu, J. Chapman, B. Qian, W. Ching, M. Tien, J. dD. Rowe, Y.V. Patskovsky, I. Listowsky and C.D. Tu, Rat glutathione S-transferase M4-4: An isoenzyme with unique structural features including a redox-reactive cysteine-115 residue that forms mixed disulphides with glutathione. *Biochem. J.*, 356 (2001) 403-414.
- [38] I. Jimenez, 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.
- [39] E.M. van der Aar, D. Buikema, J.N. Commandeur, J.M. te Koppele, B. van Ommen, P.J. van Bladeren, N.P. Vermeulen, Enzyme kinetics and substrate selectivities of rat glutathione S-transferase isoenzymes towards a series of new 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. *Xenobiotica*, 26(2) (1996) 143-55.
- [40] P.D. Fortin, G.P. Horsman, H.M. Yang, L.D. Eltis, A Glutathione S-Transferase Catalyzes the Dehalogenation of Inhibitory Metabolites of Polychlorinated Biphenyls. *J. Bacteriology*. 188 (12) (2006) 4424-4430.
- [41] Y. Ji, V. Toader and B.M. Bennett, Regulation of microsomal and cytosolic Glutathione S-Transferase activities by S-nitrosylation. *Biochem. Pharmacol.*, 63 (2002) 1397-1404.

- [42] S.K. Srivastava, S.C. Watkins, E. Schuetz, S.V. Singh, Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Mol. Carcinog.*, 33(3) (2002) 156-162.
- [43] B.H. Lauterburg, J.R. Mitchell, Regulation of Hepatic Glutathione Turnover in Rats *in vivo* and Evidence for Kinetic Homogeneity of the Hepatic Glutathione Pool. *J. Clin. Invest.*, 67(5) (1981) 1415-1424.
- [44] J.D. Hayes, D.J. Pulford, The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(6) (1995) 445-600.
- [45] S.P. Singh, A.J. Janecki, S.K. Srivastava, S. Awasthi, Y.C. Awasthi, S.J. Xia, P.Zimniak, Membrane association of glutathione S-transferase mGSTA4-4, an enzyme that metabolizes lipid peroxidation products. *J. Biol. Chem.* 277(6) (2002) 4232-4239.
- [46] T. Zhao, S.S. Singhal, J.T. Piper, J. Cheng, U. Pandya, J. Clark-Wronski, S. Awasthi, Y.C. Awasthi, The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, 367(2) (1999) 216-224.