

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**

**LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**



**OXIDACIÓN DE AMINAS PSICOTRÓPICAS MEDIADA POR ESPECIES  
REACTIVAS DEL OXÍGENO Y SU RELEVANCIA FARMACOLÓGICA**

**Patrocinante:**

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología.

Departamento de Química

Farmacológica y Toxicológica.

**Director de memoria:**

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología.

Departamento de Química

Farmacológica y Toxicológica.

**Memoria de Título para optar al título de Químico Farmacéutico**

**SEBASTIÁN ANDRÉS SÁNCHEZ JOFRÉ**

SANTIAGO - CHILE

2009

*Todos los sueños son  
realizables, si algo no  
resulta inténtalo de nuevo*

*la perseverancia es nuestra única  
arma.*

*Ten conciencia de lo que eres,  
cree en ti siempre tu puedes  
ser capaz, ganarle a la vida, ten  
la fuerza que hoy día te arrima.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi Papá, Mamá y hermana, por apoyarme durante mi vida y saber llevarme por la senda que me ayudo a ser lo que estoy logrando ser. Gracias por todo el cariño, apoyo y fuerza. Los amo mucho.

Además quiero agradecer a Luis Medel, por estar conmigo en todos los momentos, compañero, amigo, considerado un hermano que me ayudo y fue gran apoyo para lograr terminar esta carrera. Gracias pelao.

A Loreto por darme las fuerzas y animo en este último periodo, me fortaleciste bastante para afrontar el duro proceso que me toco vivir, gracias por haber sido la vía de escape a la dura rutina vivida. Te quiero mucho.

Gracias a mis amigos: Iván C., Alejandro C.,Jaime A., Felipe C., Juan A. G., Seba Ll., Felipe R., Carolina O., Carmen R., Katherine Z., Elizabeth C., por su compañía, apoyo, ayuda, diversión y amistad. Los quiero mucho.

Gracias a mi querida profe María Eugenia Letelier, por su apoyo, confianza, enseñanza, afecto, preocupación, consideraciones que tuvo a mi persona y por sobretodo, darme la posibilidad de demostrar y ampliar mis capacidades, alentarme a ser más de lo que creía ser. Siempre le agradeceré la confianza depositada en mí. Gracias de todo corazón por todo.

A mis jefes, Patricio G., Robinson C. y Jaqueline G. por la formación entregada. A Paula, José, Alfredo, Lili, Andrea y Juan por su ayuda y enseñanzas.

## ABREVIATURAS

GSH	: Glutación reducido.
DMSO	: Dimetil sulfóxido.
SNC	: Sistema nervioso central
TRIS	: Hidroximetil-aminometano.
TCA	: Ácido tricloroacético.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	7
Objetivos generales.....	7
Objetivos específicos.....	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Reactivos.....	8
Animales de experimentación.....	9
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	10
Cuantificación de polifenoles totales.....	10
<i>N</i> -Desmetilación catalizada por el sistema CYP450.....	11
<i>N</i> -Desmetilación no-enzimática.....	12
Análisis estadístico.....	13

III. RESULTADOS.....	13
IV. DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	27
PROYECCIONES.....	27
V. REFERENCIAS.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>N</i> -desmetilación de aminopirina, no-enzimática v/s enzimática.	Pág. 15
Figura 2	<i>N</i> -desmetilación de aminopirina no-enzimática: efecto de la concentración de aminopirina.	Pág. 15
Figura 3	Efecto del tiempo de incubación sobre la <i>N</i> -desmetilación de aminopirina no-enzimática.	Pág. 16
Figura 4	Efecto de GSH sobre la <i>N</i> -desmetilación de aminopirina, no-enzimática	Pág. 17
Figura 5	Efecto de Matico sobre la <i>N</i> -desmetilación de aminopirina, no-enzimática.	Pág. 18
Figura 6	Efecto de Romero sobre la <i>N</i> -desmetilación de aminopirina, no-enzimática.	Pág. 20
Figura 7	Efecto comparativo de Matico y Romero sobre la <i>N</i> -desmetilación de aminopirina no-enzimática en presencia y ausencia de microsomas	Pág. 21
Figura 8	Efecto de GSH, Matico y Romero sobre la <i>N</i> -desmetilación no enzimática de aminos psicotrópicas.	Pág. 22

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentración de Polifenoles totales de los extractos herbales.	Pág. 13
---------	---	---------

## RESUMEN

### OXIDACIÓN DE AMINAS PSICOTRÓPICAS MEDIADA POR ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y SU RELEVANCIA FARMACOLÓGICA.

Numerosas publicaciones demuestran la asociación de diversas patologías del SNC a estrés oxidativo. En estas condiciones, los neurotransmisores como las catecolaminas y la serotonina, y fármacos como la cimetidina, sufren oxidación no-enzimática promovida por EROs. Así, estudiamos la desalquilación oxidativa no-enzimática de diversos fármacos amino-sustituídos. Este tipo de fármacos sufre biotransformación a través del sistema citocromo P450, mayoritariamente localizado en el retículo endoplásmico hepático. Para diferenciar la extensión de la reacción enzimática y no-enzimática medida en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato (sistema generador de especies radicalarias del oxígeno), utilizamos microsomas hepáticos de rata. En presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, la *N*-desmetilación enzimática de aminopirina representó el 30% de su *N*-desalquilación total, enzimática más no-enzimática. En las mismas condiciones, clozapina, fluoxetina y efedrina se *N*-desmetilaron en una extensión semejante a la aminopirina. Más aún, la *N*-desmetilación no-enzimática de todos los fármacos ensayados fue inhibida por GSH y los extractos secos de *Buddleja globosa* Hope (matico) y *Rosmarinus officinalis* (romero); la lipofilicidad de los antioxidantes parece jugar un rol fundamental en la extensión de su acción. Estos resultados apoyan la terapia asociada a antioxidantes de enfermedades del sistema nervioso central.

## ABSTRACT

### NON-ENZYMATIC OXIDATION OF PSYCHOTROPIC DRUGS DRIVEN BY REACTIVE OXYGEN SPECIES: PHARMACOLOGICAL RELEVANCE

The association of oxidative stress to various pathologies of the CNS has been increasingly acknowledged. Several neurotransmitters, such as catecholamines and serotonin, and drugs, such as cimetidine, undergo non-enzymatic oxidation by EROs. Thus, we studied the non-enzymatic oxidative dealkylation of various drugs bearing substituted amine groups. Lipophilic drugs that contain substituted amines in their structure undergo biotransformation through the cytochrome P450 system, which mainly occurs in the hepatic endoplasmic reticulum. We used rat liver microsomes to evaluate the *N*-demethylation of these drugs in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbate (a ROS-generating system), and to discriminate between the reaction catalyzed by the cytochrome P450 system and the non-enzymatic reaction promoted by ROS. We found that enzymatic *N*-demethylation of aminopyrine represented only a 30% of the total *N*-demethylation. In addition, clozapine, fluoxetine and ephedrine underwent the non-enzymatic reaction to a similar extent than aminopyrine. Moreover, non-enzymatic reactions of all tested drugs were inhibited by GSH and by dry extracts from leaves of *Buddleja globosa* Hope (matico) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). The lipophilicity degree of the antioxidant used appears to play a fundamental role in the extent of their inhibitory action. These results support the prospect of associating antioxidants in the treatment of CNS diseases.

## I. INTRODUCCIÓN

La serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), neurotransmisor/neuromodulador, es una amina biogénica sintetizada dentro de la neurona serotoninérgica cuyo pKa es 9,8 [1]. Su precursor es el triptófano, aminoácido esencial necesario en la dieta [2]. La triptofano hidroxilasa y la ácido amino-aromático descarboxilasa son las enzimas responsables que convierten el triptofano en serotonina [1-3]. Esta amina endógena es degradada a ácido-5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) [4], principalmente por la enzima monoamino-oxidasa-B (MAO-B), en las neuronas serotoninérgicas [5]. Otra vía metabólica de la serotonina, es su conversión a melatonina, por vía *N*-acetil-transferasa que transfiere un grupo acetilo desde la acetil-coenzima A, hacia el grupo amino de la serotonina para formar *N*-acetil-serotonina la cual es *O*-metilada por la enzima hidroxindol-*O*-metiltransferasa para transformarse en melatonina [6-7]. En el citosol, la serotonina citosólica se encuentra unida a una proteína transportadora protegiéndose así, de la acción de la MAO, y ser almacenada en las vesículas [8].

La serotonina ha mostrado tener múltiples acciones psicotrópicas; está implicada en patologías psiquiátricas como la depresión, esquizofrenia, desorden generalizado de ansiedad, fobia social, trastorno obsesivo-compulsivo, de pánico, post-traumático, cognitivo, disforia premenstrual, agresividad, trastornos del apetito, autismo, alcoholismo y abuso de drogas

[9]. Al igual que la serotonina, varios de los medicamentos utilizados en estas patologías son aminas, como por ejemplo la clozapina y la fluoxetina.

**Clozapina** es un medicamento derivado de la familia de los dibenzazepínico, eficaz en pacientes esquizofrénicos resistentes en tratamientos convencionales y con importantes “síntomas negativos”. Sin embargo, presenta una ventaja sobre las drogas utilizadas en el tratamiento de la esquizofrenia, ya que causa menos efectos extrapiramidales [10]. La clozapina es completamente absorbida por el tracto gastrointestinal; sufre metabolismo de primer paso, su biodisponibilidad con una dosis simple, fluctúa entre 27 y 50% y tiene un volumen de distribución amplio, 4,6 L/Kg [11]. Su metabolismo ocurre principalmente en el hígado y el metabolito mayoritario es la *N*-desmetil-clozapina y en menor porcentaje, la clozapina *N*-oxidada, el 8-hidroxi- y el 8-tiometil-derivados (cambio del átomo 8-Cl del anillo aromático por un grupo hidroxil- o tiometil-) [12-13]. Tanto clozapina como *N*-desmetil-clozapina antagonizan el receptor 5HT<sub>1C</sub> y en forma similar, antagonizan a los receptores D<sub>2</sub> y 5HT<sub>2A</sub> [13].

Dentro de los efectos adversos de la clozapina, podemos mencionar, agranulocitosis, que es provocada tanto por la clozapina o por su metabolito *N*-desmetil-clozapina; más aún, su aparición no depende de la dosis por lo cual el paciente debe ser monitoreado ya que se corre riesgo de muerte [13-14]. Otros efectos adversos conocidos, son los temblores, la sedación y fatiga que es el efecto adverso más común, el delirio, síntomas obsesivo-compulsivos y problemas cardiovasculares como taquicardia e hipotensión

ortostática. Existen además, reportes de casos de miocarditis, cardiomiopatías y trombosis venosa, aumento de peso, desarrollo de diabetes mellitus no insulina-dependiente en pacientes genéticamente propenso, efectos gastrointestinales como constipación y náuseas, e hiper-salivación a nivel del sistema nervioso autónomo. Se han descrito además, efectos tóxicos en el páncreas e hígado, disfunción sexual, galactorrea e incontinencia urinaria [15]. Todos estos antecedentes limitan el uso clínico de clozapina.

**Fluoxetina** es un agente antidepresivo de la familia de los inhibidores selectivos de serotonina [16]. Su acción terapéutica se basa en mejorar la transmisión serotoninérgica, a través de la inhibición de los transportadores de serotonina, con una acción mínima o nula acción en otros receptores. Este aumento de la neurotransmisión serotoninérgica, es la responsable de la actividad antidepresiva [17]. Además, la fluoxetina es utilizada en el tratamiento de trastornos obsesivo-compulsivos, bulimia nerviosa, ataques de pánico y obesidad [18].

La fluoxetina es ampliamente metabolizada en el hígado; se ha identificado un sólo metabolito, la nor-fluoxetina que se genera por *N*-desmetilación de la fluoxetina reacción catalizada mayoritariamente por el CYP 2D6, este metabolito es ligeramente más potente que la droga madre [19].

Los efectos adversos provocados por la fluoxetina, son considerados leves y transitorios; ellos se asocian mayoritariamente a la interrupción del tratamiento, produciéndose náuseas, dolores estomacales, vómitos,

insomnio, hiper-salivación, sedación, constipación, diarrea y temblores. También se han reportado casos de anorexia nerviosa y comúnmente disfunciones sexuales [20].

Bajas concentraciones de neurotransmisores han sido implicados en la patogenia de desordenes psiquiátricos y se cree que este fenómeno se debería al estrés oxidativo que estos pacientes presentan. Esta hipótesis se basa en que el cerebro es vulnerable a daño oxidativo, por diferentes razones que incluyen: alta utilización de oxígeno, bajas defensas antioxidantes neuronales, alta tasa de lípidos en su estructura que proporciona sustratos para la oxidación y presencia de metales de transición como cobre y hierro que son redox-activos [21]. Asimismo, se ha descrito que algunos neurotransmisores pueden ser degradados no enzimáticamente; así, la dopamina (DA) es fácilmente metabolizada vía MAO generando  $H_2O_2$  y ácido dihidroxi-fenil-acético (DOPAC) [22]. Sin embargo este neurotransmisor puede auto-oxidarse produciendo especies reactivas del oxígeno (EROs) y neuro-melanina. A su vez, el metabolismo no-enzimático de dopamina genera  $O_2^-$  y quinonas reactivas. La concentración de metales de transición en las neuronas dopaminérgicas es alta; el  $H_2O_2$ , uno de los EROs generados por auto-oxidación de DA puede reaccionar con estos metales, especialmente iones hierro y cobre, generando radicales libres del oxígeno, radical hidroxilo y anión superóxido a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton. En este caso, se sugiere que la formación del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) sería la causa de la

muerte celular producida por L-DOPA y DA [22-24]. Se ha evidenciado además, la oxidación de serotonina por cobre, lo cual conduce a la formación de un compuesto dimérico soluble, que se sugiere sería el responsable de la alta neuro-toxicidad provocada en ratones [25].

Por otra parte, la asociación de antioxidantes al tratamiento de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (Alzheimer, Parkinson), confirman al estrés oxidativo como causa del daño degenerativo observado en este tipo de patologías [26]. Así, en la esquizofrenia, los estudios que validan este postulado se han agrupado en tres categorías: a) aquellos relacionados con alteración en la homeostasis oxidativa a través de polimorfismo genético en enzimas oxidativas, cuantificación de antioxidantes, radicales libres y marcadores de daño oxidativo; b) los que involucran los mecanismos antioxidantes de las drogas antipsicóticas y c) la demostración de un beneficio cuando se aplica una terapia antioxidante. Además, se han evidenciado alteraciones del tipo oxidativas en la depresión, trastornos bipolares, desordenes ansiosos y autismo, [27]. Por otra parte, experimentos *in vitro* han confirmado la capacidad de algunas aminos de auto-oxidarse en presencia de  $Fe/H_2O_2$ . Así, cimetidina, fármaco que posee un grupo amino secundario terminal, en presencia de  $Fe/H_2O_2$  genera *N*-desmetil-cimetidina, cimetidina sulfóxido y *N*-desmetil-cimetidina sulfóxido [28].

Los antecedentes presentados muestran que el fenómeno de oxidación no-enzimática de mediadores neurológicos podría ser responsable, al menos en parte, de los mecanismos involucrados en las patologías del sistema nervioso. Más aún, el requerimiento de altas dosis de clozapina y fluoxetina para lograr sus efectos terapéuticos, podría estar relacionado con su metabolización no-enzimática que disminuiría la dosis efectiva. Así, un conocimiento más acabado del metabolismo no-enzimático de estos fármacos, como de los neurotransmisores involucrados en estas patologías psiquiátricas, podría ayudar a mejorar las estrategias terapéuticas de los pacientes. Así, estos antecedentes nos han hecho postular que fármacos amino-alifáticos con actividad psicotrópica se metabolizan vía no enzimática en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, sistema generador de especies radicalarias del oxígeno.

Los fármacos son xenobióticos para el organismo y especialmente aquellos de acción psicotrópica son liposolubles y por tanto son metabolizados principalmente en el retículo endoplásmico hepático, para luego ser eliminados vía renal. Es por ellos que para probar nuestro postulado, en este trabajo utilizamos microsomas hepáticos de rata organelo subcelular donde está localizado mayoritariamente el sistema oxidativo citocromo P450 (CYP450) que metaboliza los fármacos lipofílicos. Como sistema oxidante se utilizó  $\text{Cu}^{2+}$  y ascorbato, sistema generador de anión superóxido. Por otra parte, dado que los fármacos elegidos para este estudio son aminas alifáticas, se estudió su *N*-desalquilación enzimática a través del sistema

CYP450 y aquella no-enzimática provocada por EROs. Nuestros resultados muestran que efectivamente la *N*-desalquilación no-enzimática en condiciones de estrés oxidativo ocurre; más aún, esta reacción supera en velocidad y extensión a la reacción enzimática. La relevancia farmacológica de estos resultados y posibles estrategias terapéuticas para reducir la reacción no-enzimática se discuten en el texto.

## **HIPÓTESIS**

Fármacos con actividad serotoninérgica que poseen en su estructura grupos amino-sustituidos, se metabolizan vía no enzimática en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, sistema generador de especies radicalarias del oxígeno.

Además, postulamos que la capacidad antioxidante de los extractos naturales, son capaces de inhibir esta reacción.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la *N*-desmetilación no enzimática de clozapina, efedrina y fluoxetina inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, usando como modelo la *N*-desmetilación microsomal de aminopirina en presencia y ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar microsomas hepáticos de rata. Este sistema será utilizado como material biológico para cuantificar estrés oxidativo y medir actividad *N*-desalquilante de fármacos catalizada por el sistema CYP450.
2. Estudiar el efecto de la concentración de aminopirina y del tiempo de incubación de este fármaco con  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato sobre su *N*-desmetilación no-enzimática.
3. Cuantificar la actividad *N*-desmetilante de aminopirina en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato y aquella catalizada por el sistema CYP450.
4. Evaluar la *N*-desmetilación no-enzimática (en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato) de clozapina, fluoxetina y efedrina, respecto de la aminopirina.
5. Evaluar el efecto antioxidante de GSH y los extractos secos de matico y romero sobre la *N*-desmetilación de los fármacos en estudio.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Materiales

1. **Reactivos.** La albúmina de bovino fracción IV, el ácido-5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), el reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol, la  $\beta$ -Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (sal sódica) ( $\beta$ -NADP), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la glucosa-6-fosfato (G-6-P), el glutatión (GSH), la

aminopirina: (4-dimethylamino-2,3-dimethyl-1-fenil-3-pirazolin-5-ona), la 2,4-pentanodiona se obtuvieron de Sigma Aldrich. El  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , el ácido tricloroacético (TCA), el tartrato de sodio y potasio, el  $\text{CuSO}_4$  y el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , se obtuvieron de Merck Chile. La efedrina: [(1R,2S)-2-Methylamino-1-fenil-1-propanol, L- $\alpha$ -(1-Metilaminoetil)-benzil alcohol, la fluoxetina: [( $\pm$ )-N-Metil- $\gamma$ -[4-(trifluorometil)fenoxi]bencenopropanamina hidrocloreto], y la clozapina [8-Cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e][1,4]-diazepina] fueron donados por el Dr. Iván Saavedra, Director del Laboratorio de Bioequivalencia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

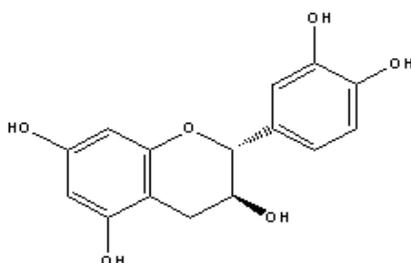
**2. Animales de experimentación.** Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente tres meses de edad y 200 a 230 g de peso corporal. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal de pellet Kimber, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21°C. Estos animales se obtuvieron del vivero del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## B. MÉTODOS

**1. Preparación de microsomas hepáticos de rata.** Los microsomas, fueron preparados por el método de fraccionamiento subcelular [29]. La proteína microsómica (fracción subcelular enriquecida en retículo endoplásmico hepático) se determinó mediante el método de Lowry y cols., 1951 [30], utilizando albúmina de bovino fracción IV como estándar.

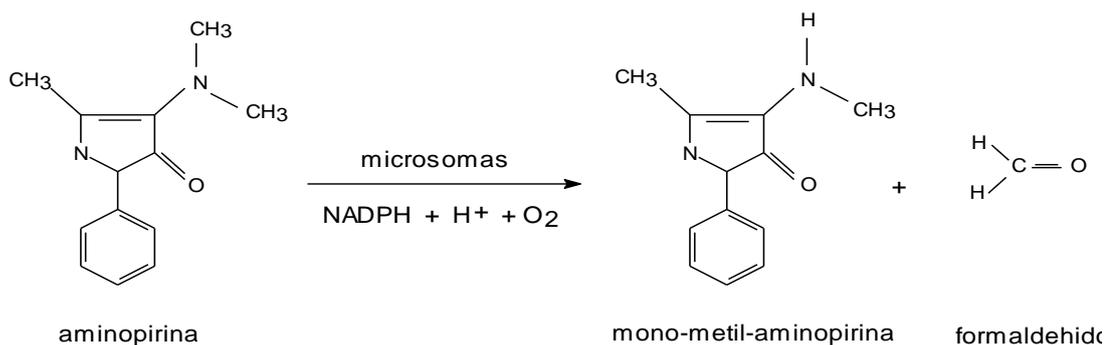
**2. Cuantificación de polifenoles totales.** La determinación de polifenoles totales de los extractos herbales se realizó de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2007 [31].

En un volumen final de 2mL la mezcla de reacción contenía: 20μL extracto herbal, 100μL de reactivo Folin Ciocalteau, 300μL de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 2mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos herbales. Todas las mezclas así obtenidas fueron incubadas a oscuridad durante 2hr. Al finalizar este periodo la absorbancia de las muestras fue registrada a 760nm en un espectrofotómetro UV3 UNICAM UV-VIS, usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad del método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar.



**Catequina**

**3. N-Desmetilación catalizada por el sistema CYP450.** La actividad N-desmetilante del sistema CYP450 se determinó por la técnica colorimétrica descrita en Letelier y cols., 2009 [31] midiendo la absorbancia del formaldehído formado producto de la reacción enzimática:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1mL: amortiguador TRIS 50mM, pH 8,5; MgCl<sub>2</sub> 4,0mM; proteína microsómica 2mg; concentraciones de los distintos extractos naturales, equivalentes a sus IC<sub>50</sub> determinados en los experimentos de lipoperoxidación microsómica; aminopirina 1mM; sistema generador de NADPH constituido por glucosa-6-fosfato 6mM, NADP 0,6mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5,0 Unidades.

Las muestras contenían todos los reactivos; los blancos, contenían todos los reactivos excepto la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La reacción enzimática se inició agregando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla se incubó durante 15min a 37°C en un baño termorregulado, con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 500μL de TCA frío (4°C) 10% p/V. Luego, las mezclas se centrifugaron a 9.000 x g durante 10min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus

Biofuge 15R, con el objeto de separar las proteínas. Alícuotas de 1mL de los sobrenadantes se mezclaron con 0,5mL de una mezcla constituida por 0,1mL de 2,4-pentanodiona y 25mL de acetato de amonio 4M. Luego se mantuvieron durante 2hr a temperatura ambiente y en la oscuridad. Al término de este período, se leyó la absorbancia de los blancos a 400nm contra sus muestras respectivas en un espectrofotómetro UV3 UNICAM UV-VIS, acoplado a un computador. El producto de la reacción se cuantificó usando como estándar formaldehído. La linealidad del método se comprobó realizando una curva estándar de formaldehído. La actividad enzimática se expresó en nmoles de HCHO formado/ min/ mg de proteína microsómica.

**4. N-Desmetilación no-enzimática.** La *N*-desmetilación no enzimática se estimó midiendo la velocidad de generación de formaldehido, producto de la *N*-desmetilación de los fármacos utilizados en este estudio e inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, sistema generador de radicales libres del oxígeno. En un volumen final de 1mL se mezclaron en concentraciones finales aminopirina 1mM (o los fármacos en estudio),  $\text{CuSO}_4$  25nM, ascorbato de sodio 1mM, todos ellos disueltos en amortiguador TRIS 50mM, pH 8,5. Los blancos contenían todos los reactivos con excepción del ascorbato de sodio. Muestras y blancos se incubaron durante 15min a 37°C con agitación constante; luego se les adicionó una mezcla de 2,4-pentanodiona: 12,5mL y acetato de amonio 4M: 0,05mL. Las mezclas se incubaron durante 2hr a oscuridad y al cabo de este período, se leyó la absorbancia de las muestras

utilizando como referencia, los respectivos blancos. Los resultados fueron expresados en nmoles de HCHO formado, usando HCHO como estándar.

**5. Análisis estadístico.** Los resultados están expresados como el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  SD. La significancia estadística de los resultados (ANOVA) y el análisis de regresión fueron desarrollados utilizando el programa computacional GraphPad PRISM 5.0. Los valores fueron considerados significativamente diferentes a un valor de  $p < 0.05$ .

### III. RESULTADOS

**Contenido de polifenoles totales.** El contenido total de polifenoles de los diferentes extractos herbales ensayados se muestra en la Tabla 1. El extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) fue el que presentó la mayor concentración de polifenoles totales ( $0,12 \pm 0,006$  mg de catequina/mg de extracto) y el extracto de *Buddleja globosa*, la menor ( $0,08 \pm 0,003$  mg de catequina/mg de extracto).

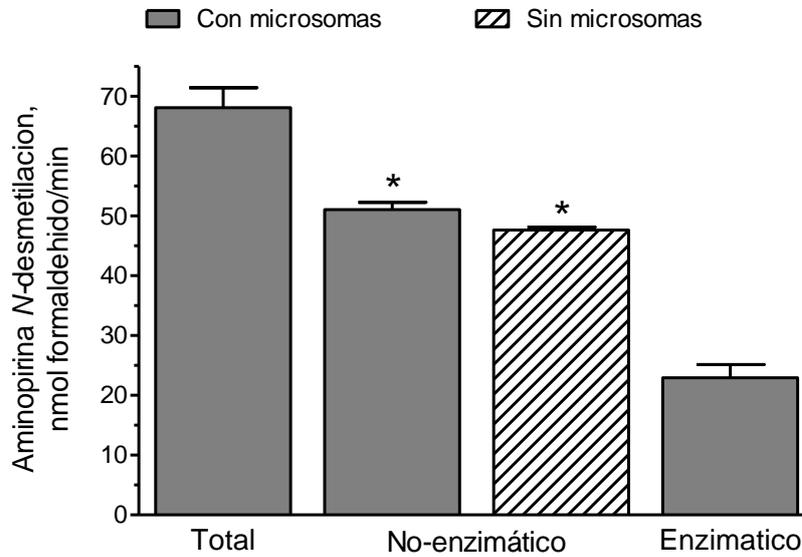
**Tabla 1. Concentración de Polifenoles totales de los extractos herbales**

<b>Extracto herbal</b>	<b>mg de catequina/ mg de extracto</b>
<i>Buddleja globosa</i>	$0,08 \pm 0,003$
<i>Rosmarinus officinalis</i>	$0,12 \pm 0,006$

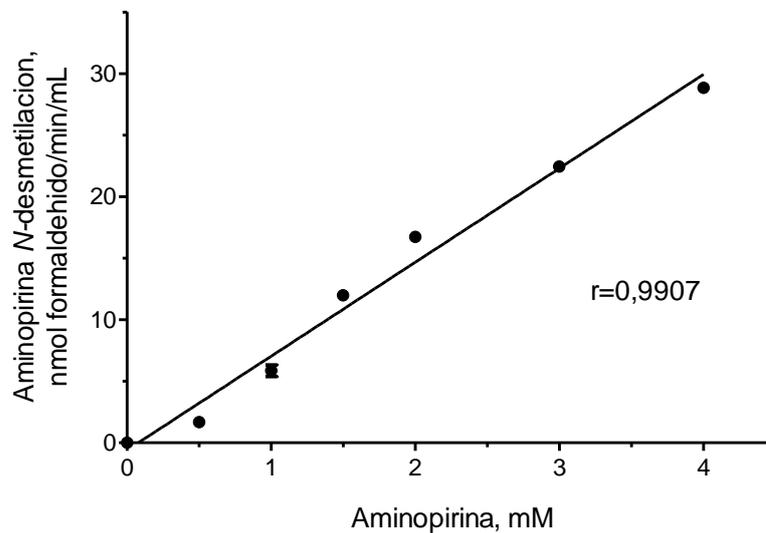
***N*-desmetilación de aminopirina.** El sistema CYP450 localizado mayoritariamente en el retículo endoplásmico hepático, cataliza la metabolización de los fármacos lipofílicos a través de diversas reacciones químicas. Una de ellas es la *N*-desalquilación de aminas secundarias y/o terciarias y es una de las vías a través de la cual se metaboliza la aminopirina, fármaco de la familia de las pirazolonas, con propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas [32]. Es por ello, que utilizamos este fármaco como control positivo de nuestro estudio, para ensayar la *N*-desmetilación enzimática y la no-enzimática causada por estrés oxidativo inducido por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.

Como se observa en la figura 1, en iguales condiciones de tiempo de incubación, la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática fue aproximadamente 2,2 veces mayor que la enzimática, independiente de la presencia o ausencia de microsomas.

Más aún, el rendimiento de la *N*-desmetilación no-enzimática fue lineal respecto de la concentración de aminopirina (figura 2); el coeficiente de regresión lineal (*r*) fue 0,9907.

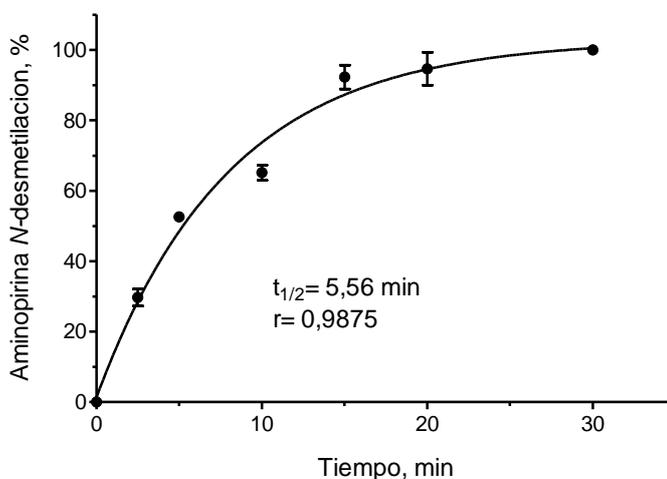


**Figura 1. N-desmetilación de aminopirina, no-enzimática v/s enzimática.** [Microsomas]: 2mg/mL, [Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 25ηM; [ascorbato de sodio]: 1mM, [Aminopirina]: 1mM. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. \*Valores no estadísticamente diferentes, p>0,05.



**Figura 2. N-desmetilación de aminopirina no-enzimática: efecto de la concentración de aminopirina.** [Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 25ηM; [ascorbato de sodio]: 1mM. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. r: coeficiente de regresión lineal.

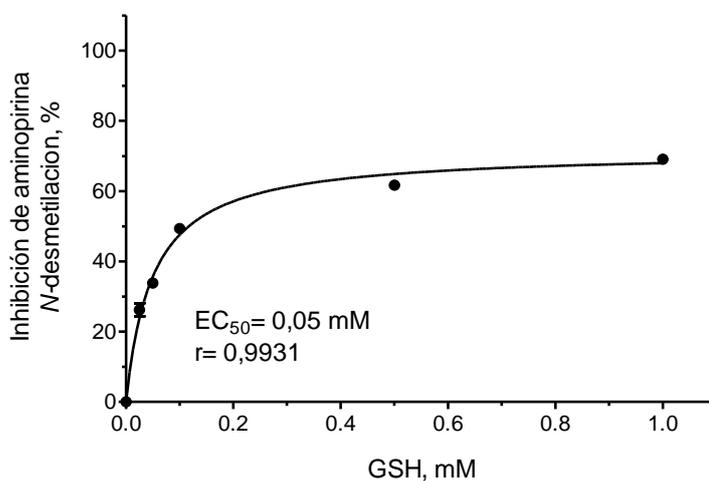
Por otra parte, al estudiar el efecto del tiempo de incubación de la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina, se observó que el porcentaje máximo de producto se obtuvo a los 30min de incubación de la mezcla; a su vez, el  $t_{1/2}$  fue 5,56min y el coeficiente de regresión de la curva, 0,9875. El tiempo de incubación elegido para los siguientes experimentos fue 15min, con la intención de obtener el máximo de producto de esta reacción y comparar la *N*-desmetilación no enzimática de la enzimática en los experimentos realizados con microsomas cuyo tiempo de incubación fue 30min, tiempo inserto en la linealidad de la reacción enzimática.



**Figura 3. Efecto del tiempo de incubación sobre la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática.** [Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 25 $\eta$ M; [ascorbato de sodio]: 1mM; [Aminopirina]: 1mM; volumen final: 0,5mL. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.  $t_{1/2}$ : tiempo requerido para obtener el 50% del producto proveniente de la reacción no-enzimática; r: coeficiente de regresión lineal.

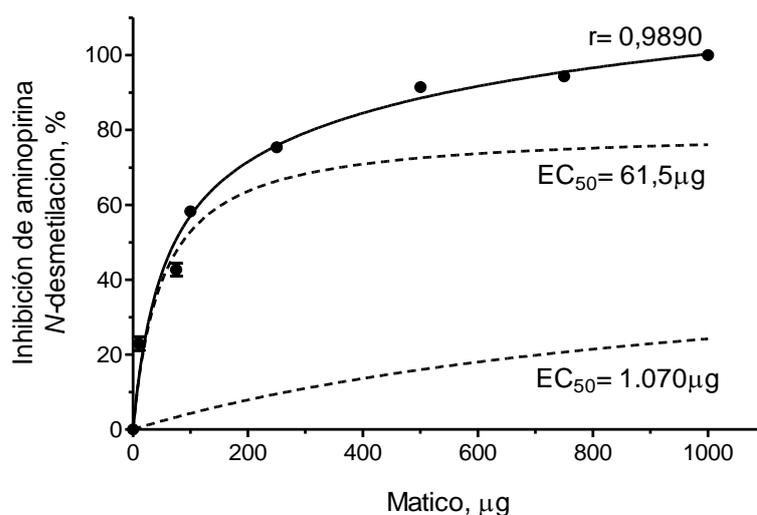
**Efecto de antioxidantes sobre la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina.** Como antioxidante endógeno, utilizamos GSH y como xenobiótico, dos extractos herbales de reconocida actividad antioxidante, proveniente de hojas de *Buddleja globosa* Hope (matico) y el otro, de *Rosmarinus officinalis* (romero).

**a. GSH.** Este tripéptido, reconocido atrapador de radicales libres del oxígeno, inhibió la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina; el efecto inhibitorio máximo alcanzado a la concentración 1mM fue 70% (figura 4). La mínima concentración de GSH utilizada fue 0,025mM la cual provocó un 26% de inhibición. El valor de  $IC_{50}$  calculado del gráfico semilogarítmico correspondió a 0,05mM.



**Figura 4. Efecto de GSH sobre la *N*-desmetilación de aminopirina, no-enzimática.**  $[Cu_2SO_4]$ : 25 $\eta$ M; [ascorbato de sodio]: 1mM; [Aminopirina]: 1mM; volumen final: 0,5mL. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.  $EC_{50}$ : concentración de GSH que inhibe el 50% la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina. r: coeficiente de regresión.

**b. Matico.** Los extractos herbales, preferentemente de las hojas de la planta, son reconocidos antioxidantes, especialmente por su capacidad de atrapar especies radicalarias y de quelar metales redox-activos. El extracto de matico seco utilizado en estos ensayos provenía de una extracción hidroalcohólica de hojas de matico. A diferencia del GSH, este extracto (1mg) inhibió totalmente la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato; la menor inhibición obtenida fue 23% y se obtuvo con 10 $\mu\text{g}$  de matico que fue la menor concentración ensayada (figura 5).



**Figura 5. Efecto de Matico sobre la *N*-desmetilación de aminopirina, no-enzimática.** [ $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ]: 25 $\eta\text{M}$ ; [ascorbato de sodio]: 1mM; [Aminopirina]: 1mM; volumen final: 0,5mL. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.  $\text{EC}_{50}$ : concentración de matico que inhibe el 50% la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina. r: coeficiente de regresión.

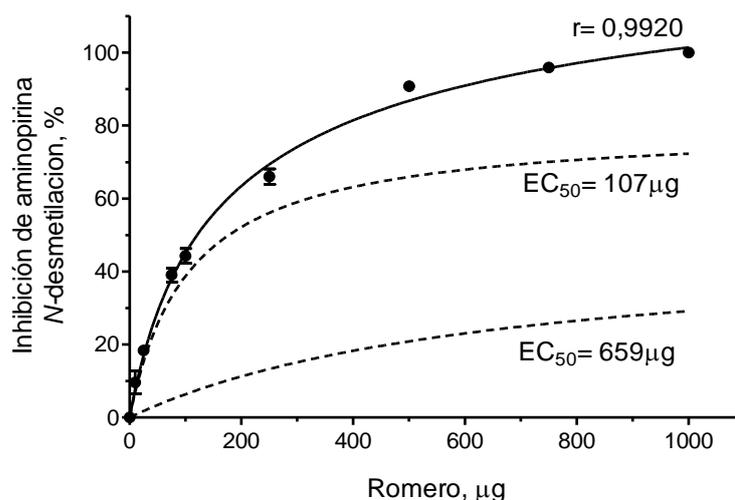
Cabe señalar que el análisis estadístico de la hipérbola obtenida al graficar los resultados, mostró dos componentes: uno de alto  $\text{EC}_{50}$  (1.070 $\mu\text{g}$ ) y otro de bajo  $\text{EC}_{50}$  (61,5 $\mu\text{g}$ ) (líneas punteadas); la suma de ambos componentes

correspondió exactamente al efecto hiperbólico total (línea continua) con contribuciones de 80% y 20%, calculadas a partir del efecto máximo (100%). El coeficiente de regresión de la curva hiperbólica ( $r$ ) que representa el efecto total, fue 0,9890.

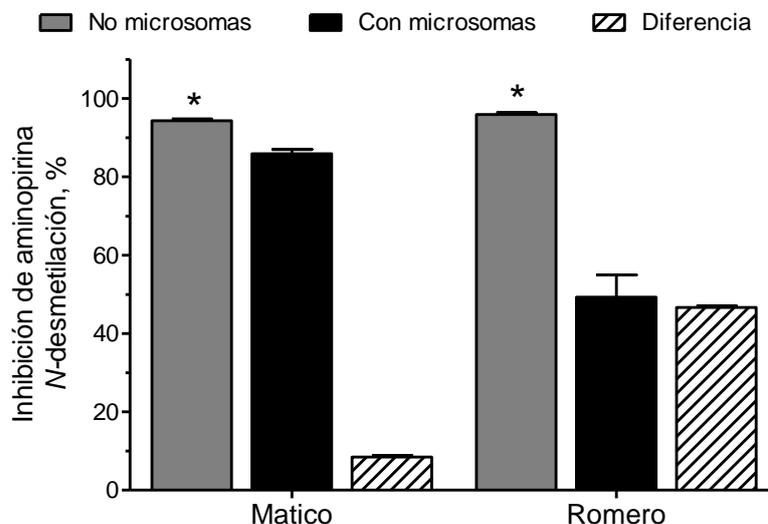
**b. Romero.** Al igual que el extracto de matico, el extracto de romero utilizado en estos ensayos fue un extracto seco proveniente de una extracción hidroalcohólica de hojas de esta planta. De la misma forma que matico, este extracto (1mg) inhibió totalmente la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato; la menor inhibición obtenida fue 9,6% y se obtuvo con 10 $\mu\text{g}$  de romero que fue la menor concentración ensayada (figura 6). El análisis estadístico de la hipérbola obtenida al graficar los resultados, mostró también dos componentes: uno de alto  $\text{EC}_{50}$  (659 $\mu\text{g}$ ) y otro de bajo  $\text{EC}_{50}$  (107 $\mu\text{g}$ ) (líneas punteadas); la suma de ambos componentes dio exactamente el efecto hiperbólico total (línea continua) con contribuciones de 80% y 20%, calculadas a partir del efecto máximo (100%). El coeficiente de regresión de la curva hiperbólica ( $r$ ) que representa el efecto total, fue 0,9920.

La figura 7 muestra la comparación de los efectos de los agentes antioxidantes herbales sobre la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática, inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato en ausencia y presencia de microsomas. En presencia de microsomas ambos romero y matico inhibieron en menor extensión la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática que en su ausencia; la diferencia en la inhibición de la *N*-desmetilación de

aminopirina no-enzimática en presencia y ausencia de microsomas sin embargo, fue mayor al ensayar romero. Estos resultados parecen indicar que las diferencias en las curvas de concentración de antioxidantes *versus* la actividad *N*-desmetilante de aminopirina inducida por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, podría deberse a la presencia de compuestos lipofílicos en los extractos herbales, que no sería el caso de GSH, que es un antioxidante polar.

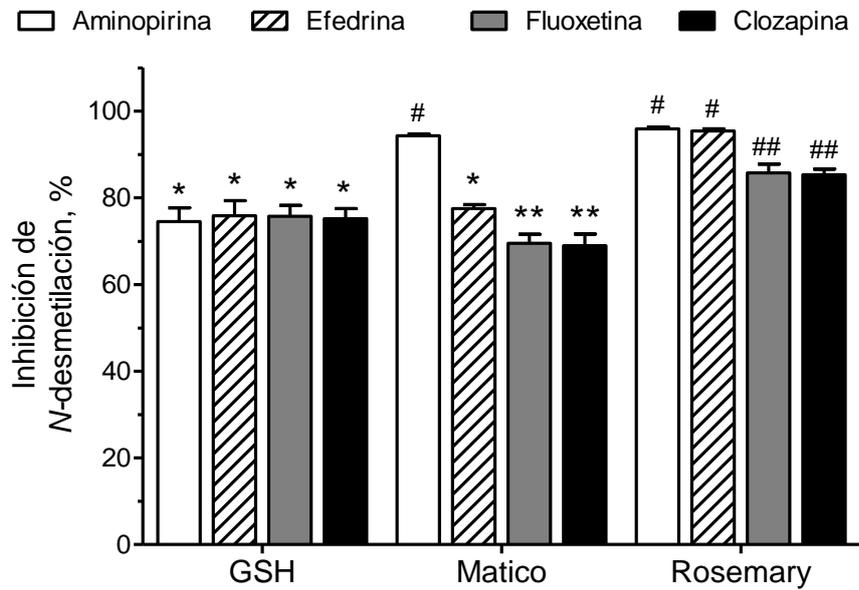


**Figura 6. Efecto de Romero sobre la *N*-desmetilación de aminopirina, no-enzimática.** [ $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ]: 25 $\eta\text{M}$ ; [ascorbato de sodio]: 1mM; [Aminopirina]: 1mM; volumen final: 0,5mL. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  S.D.  $\text{EC}_{50}$ : concentración de romero que inhibe el 50% la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina. *r*: coeficiente de regresión.



**Figura 7. Efecto comparativo de Matico y Romero sobre la *N*-desmetilación de aminopirina no-enzimática en presencia y ausencia de microsomas.** [Microsomas]: 2mg/mL; [matico]: 0,75mg; [romero]: 0,75mg; [Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 25ηM; [ascorbato de sodio]: 1mM; [Aminopirina]: 1mM. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. \*Valores no estadísticamente diferentes, p>0,05.

***N*-desmetilación no-enzimática de aminas psicotrópicas: Efecto de GSH, Matico y Romero.** La figura 8 muestra la comparación del efecto antioxidante de los extractos herbales y GSH sobre la *N*-desmetilación no-enzimática de los fármacos en estudio, inducida por Cu<sup>2+</sup>/ascorbato en ausencia de microsomas. GSH inhibió 76% aproximadamente la *N*-desmetilación no-enzimática de los 4 fármacos ensayados. Matico inhibió la *N*-desmetilación no-enzimática de aminopirina, efedrina, fluoxetina y clozapina 96%, 77,5%, 69,6% y 68,9%, respectivamente. A su vez los porcentajes de inhibición de la *N*-desmetilación no-enzimática obtenidos en presencia de romero para aminopirina, efedrina, fluoxetina y clozapina fueron 95,9%, 95,4%, 85,8% y 85,4%, respectivamente.



**Figura 8. Efecto de GSH, Matico y Romero sobre la N-desmetilación no enzimática de aminas psicotrópicas.** [GSH]: 1mM; [matico]: 0,75mg; [romero]: 0,75mg. [Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 25ηM; [ascorbato de sodio]: 1mM; [Aminopirina, Efedrina, Fluoxetina y Clozapina]: 1mM. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. \*Valores no estadísticamente diferentes entre sí, p>0,05. \*\*Valores no estadísticamente diferentes entre sí, p>0,05. #Valores no estadísticamente diferentes entre sí, p>0,05

#### IV. DISCUSIÓN

Existen numerosas publicaciones que señalan la asociación de diversas patologías a estrés oxidativo inducido por especies radicalarias del oxígeno. Así se ha descrito un aumento de estas especies reactivas en diversas patologías del sistema nervioso central, como es el Alzheimer, la esquizofrenia, la depresión la enfermedad de Parkinson [26-27]. Los diferentes neurotransmisores involucrados en dichas patologías, como lo son la serotonina y las catecolaminas, se encuentran disminuidos en estas patologías; más aún, todos ellos tienen en común ser sustancias de estructura amino terminal, como muchos de los fármacos (agonistas y antagonistas) que se usan en el tratamiento de ellas. Por otra parte, se ha descrito que en condiciones de estrés oxidativo la serotonina y las catecolaminas sufrirían oxidación no enzimática [33-34]. Los fármacos utilizados en el tratamiento de estas patologías provocan variados y extensos efectos adversos. Dado que estos fármacos son xenobióticos lipofílicos, deben ser oxidados, aumentando así su polaridad para ser excretados por la orina. Su biotransformación es catalizada preferentemente por el sistema CYP450. Es por ello, que en este trabajo se estudió la *N*-desmetilación enzimática y no-enzimática de diversos medicamentos de uso frecuente en la clínica psiquiátrica, utilizando como control aminopirina, fármaco analgésico y antiinflamatorio no-esteroidal, que posee un grupo amino terminal común a los fármacos psicotrópicos, el cual se oxida por *N*-desmetilación catalizada por el sistema CYP450.

Como esperado, la aminopirina fue *N*-desmetilada a través del sistema CYP450 de una forma concentración respuesta, reacción cuya magnitud fue dependiente del tiempo de incubación de los microsomas hepáticos con NADPH y aminopirina 1mM. Por otra parte, en ausencia de NADPH y en presencia del sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato, la *N*-desmetilación de este fármaco fue 2,2 veces superior, reacción no-enzimática que también sufrieron clozapina, fluoxetina y efedrina. La magnitud de este fenómeno (reacción oxidativa no-enzimática), podría explicar la aparición de los numerosos efectos adversos que se producen en los pacientes esquizofrénicos que se les suministra clozapina. Su principal metabolito es la *N*-desmetil-clozapina, responsable mayoritario de la agranulocitosis observada, efecto no dosis dependiente y que tiene una variación inter-individuo. Asimismo, el metabolito nor-fluoxetina de la fluoxetina, uno de los antidepresivo de mayor consumo a nivel mundial, es más potente que la fluoxetina. Este metabolito ha sido involucrado directamente en patologías como el trastorno bipolar, y por tanto, su obtención no-enzimática, facilitada por el estrés oxidativo del paciente, podría ser la causa del cambio de ánimo brusco del paciente, desde su estado normal a un estado de manía. Además, la fluoxetina y su metabolito inhiben el CYP 2D6, lo cual, en un paciente con polifarmacia, podrían conducir a mayores efectos adversos y/o problemas de intoxicación con el medicamento que se administra en forma conjunta.

Los antecedentes expuestos muestran que fármacos antioxidantes podrían disminuir la metabolización no-enzimática y por ende, los riesgos de

reacciones adversas y/o toxicidad de este tipo de fármacos. GSH, antioxidante endógeno polar, como también, los extractos de hojas de matico y romero previnieron la oxidación no-enzimática de los cuatro fármacos estudiados; más aún, el efecto máximo obtenido fue mayor en presencia de los extractos herbales (1mg, 100%) que de GSH (1mM, 71%). Por otra parte, el efecto provocado por los 3 antioxidantes tuvo un comportamiento concentración-respuesta hiperbólico. Más aún, si bien matico y romero previnieron en igual porcentaje (100%) la *N*-desmetilación no-enzimática, al comparar la concentración mínima ensayada (10µg) se notaron diferencias, matico logro inhibir esta reacción un 23% mientras que romero un 9,8%. El análisis estadístico de estos resultados mostró que las curvas hiperbólicas obtenida en ambos casos, eran el resultado de dos componentes con  $EC_{50}$  diferentes. Más aún, en ambos casos la extensión de este efecto inhibitorio del componente de menor  $EC_{50}$  fue similar para matico, romero y GSH. La diferencia observada entre GSH y los extractos herbales ensayados podría explicarse por la presencia en dichos extractos de principios antioxidantes de origen polar como no polar. Este postulado está en concordancia con los resultados obtenidos al comparar la *N*-desmetilación no-enzimática medida en presencia y ausencia de microsomas. En estas condiciones, matico se comportó como mejor antioxidante que romero, lo cual podría explicarse a la presencia en el extracto de romero de una mayor proporción de antioxidantes lipofílicos, los que al interactuar con la membrana microsómica, disminuirían la capacidad del extracto de atrapar las especies radicalarias del oxígeno, disueltas en el

medio de reacción. Cabe señalar además, que el extracto de romero inhibió la *N*-desmetilación de aminopirina catalizada por el sistema CYP450 en mayor porcentaje que el matico, otro antecedente que corrobora nuestro postulado (datos no mostrados).

Cabe destacar que estos fármacos al ser aminas, se comportan como electrolitos débiles y por tanto su solubilidad en los distintos compartimentos celulares va a depender del pH del medio el que afecta el estado de disociación de los fármacos. Dada la importancia farmacológica de estos resultados, hemos continuado esta investigación con el objeto de reafirmar la conveniencia de la terapia asociada a antioxidantes en enfermedades del sistema nervioso central.

## **CONCLUSIONES**

La hipótesis propuesta fue verdadera: los fármacos amino sustituidos, al menos los ensayados, sufren *N*-desmetilación no-enzimática cuando ellos son expuestos a especies reactivas del oxígeno.

En nuestras condiciones de ensayo, la *N*-desmetilación no-enzimática fue concentración y tiempo dependiente.

GSH y los extractos de matico y romero, reconocidos antioxidantes, fueron capaces de inhibir esta reacción no-enzimática.

## **PROYECCIONES**

Nuestros resultados muestran que una terapia concomitante de un agente antioxidante y fármacos que llevan en su estructura grupos amino-sustituidos, podría mejorar la calidad de vida de los pacientes, especialmente de aquellos que padecen afecciones psiquiátricas.

Sin embargo, para obtener un mejor efecto antioxidante se hace necesario evaluar la lipofilidad de los principios activos antioxidantes a utilizar en patologías del SNC; a mayor lipofilidad, su absorción a través de la barrera hemato-encefálica, se vería favorecido. Nuevos estudios se están realizando en el Laboratorio, para evaluar la eficiencia de antioxidantes de diferente procedencia y estructura molecular.

## VI. REFERENCIAS

1. Diksic M, Youngt S, 2001. Study of the brain serotonergic system with labeled O-methyl-L-tryptophan. *Neurochemistry*, 78(66): 1185-1200.
2. Young S, Leyton M, 2002. The role of serotonin in human mood and social interaction insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 71(4): 857-865.
3. Castiello R, Lynch P, Arbor A, 1972. Pellagra and the carcinoid syndrome. *Arch. Derm.* 105(4): 574-577.
4. Udenfriend S, Titus E, Weissbach H, Peterson R, 1956. Biogenesis and metabolism of 5-hydroxyildole compounds. *J. Biol. Chem.* 219: 335-344.
5. Fagervall I, Ross S, 1986. A and B forms of monoamine oxidase within the monoaminergic neurons of the rat brain. *J. Neurochem.* 47(2): 569-576.
6. Klein D, Weller J, Moore R, 1971. Melatonin metabolism: Neural Regulation of pineal serotonin: Acetyl Coenzyme A *N*-acetyltransferase activity. *Proc. Nat. Acad. SCI.* 68(12): 3107-3110.
7. Axelrod J, 1962. Purification and properties of phenylethanolamine-*N*-methyl transferase. *J. Biol. Chem.* 237(5): 1657-1660.
8. Tamir H, Gershon M, 1979. Storage of serotonin and serotonin binding protein in synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 33: 35-44.

9. Jones B, Blackburn T, 2002. The medical benefit of 5-ht research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71(4): 555-568.
10. Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, Park K, 1995. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *JPET.* 272: 964-990.
11. Shad M, 2008. Clozapine toxicity: A discussion of pharmacokinetic factors. *Asian. J. Psych.* 1(2): 47-49.
12. Elermann B, Engel G, Johansson I, Zanger U, Bertilsson L, 1997. The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in metabolism of clozapine. *J Clin. Pharmacol.* 44(5): 439-446
13. Fang J, Coutts R, Mckenna K, Baker G, 1998. Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 358(5): 592-599.
14. Mauri M.C, Rudelli R, Bravin S, Gianetti S, Giuliani E, Guerrini A, Orlandi R, Invernizzi. 1997. Clozapine metabolism rate as a possible index of drug-induced granulocytopenia. *Psychopharmacology.* 137(4): 341-344.
15. Young C, Bowers M, Mazure C, 1998. Management of the adverse effects of clozapine. *Schizophr. Bull.* 24(3): 381-390.
16. Beasley C, Masica Z, Potvin J, 1992. Fluoxetine: a review of receptor and functional effects and their clinical implications. *Psychopharmacology.* 107(11): 1-10.

17. Miledi R, Y.G. NI, 1997. Blockage of HT<sub>2c</sub> serotonin receptors by fluoxetine. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 94(5): 2036-2040.
18. Nichols J, Charlson J, Lawson G, 1994. Automated HPLC assay of fluoxetine and norfluoxetine in serum. Clin. Chem. 40(7): 1312-1316.
19. DeVane L, 1997. Metabolism and Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. Cell. Mol. Neurobiol. 19(4): 443-466.
20. Stokes P, Holtz A. 1997. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. Clin. Therapeutics. 19(5): 1135-1224.
21. Halliwell B, 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are now? J. Neurochem. 97(6): 1634-1658.
22. Miyazaki I, Asanuma, 2008. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. Acta. Med. Okayama. 62(3): 141-150.
23. Halliwell B, Gutteridge J, 2004. Free radicals in biology and medicine. Third Edition Oxford.
24. Waggoner D, Bartnikas T, Gitlin J, 1999. The role of copper in neurodegenerative disease. Neurobiol. Dis. 6(4): 221-230.
25. Virit O, Altindag A, Selek S, Yumru M, Bulut M, Erel O, Asuman H, Herken H, 2008. Increased plasma ceruloplasmin levels in schizophrenia. Bull. Clin. Psychopharmacol. 18: 282-287.

- 26.** Jiménez F, Alonso H, Ayuso L, Jabbour T, 2006. Estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 42: 419-427.
- 27.** Ng F, Beark M, Dean O, Bush A, 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *J. Psychopharmacol.* 11(6):851-876.
- 28.** Zbaida S, Kariv R, Fischer P, Silman-greenspan J, Tashma Z, 1986. Reaction of cimetidine with Fenton reagent. *Eur. J. Biochem.* 154(3): 603-605.
- 29.** Letelier ME, Lagos F, Faúndez M, Miranda D, Montoya M, Aracena P, González-ira V. 2007. Copper modifies liver microsomal UDP-Glucuronyltransferase) activity through different and opposite mechanism. *Chem. Biol. Interact.* 167(1): 1-11.
- 30.** Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 31.** Letelier E, Cortés J, Lepe N, Jara J, Molina-Berríos A, Rodríguez C, Iturra-Montecinos P, Faúndez M, 2009. Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *BLACPMA.* 8(2): 110-120.
- 32.** Prescott, L.F.1977. Anti-inflammatory agents and drugs used in rheumatism and gout. *Side Effects of Drugs Annual.* 1: 86 -102.

- 33.** Smythies J, Galzigna L. 1997. The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim. Biophys. Acta.* 2(4): 159-162.
- 34.** Huether G, Fettkötter I, Keilhoff G, Wolf G. 1997. Serotonin Acts as a Radical Scavenger and Is Oxidized to a Dimer during the Respiratory Burst of Activated Microglia. *J. Neurochem.* 69(5): 2096-2101.