



Facultad de Ciencias Médicas
UNLP

**Intoxicación por cobre.
Efectos sobre la composición lipídica y el sistema
de defensa antioxidante.**

- Tesis Doctoral -

Tesista: Nathalie Arnal

Director: Dr. Prof. Carlos A. Marra

Co-Directora: Dra. Prof. María J. Tacconi de Alaniz

La Plata, 2010

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias de la Salud de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de La Plata), fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP), bajo la dirección del Dr. Prof. Carlos Alberto Marra y la Co-dirección de la Dra. Prof. María J. Tacconi de Alaniz.

Dedicatorias

A mis padres y a los amores de mi vida, Leo y Clarita.

Reconocimientos

A la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, y al INIBIOLP, por haberme brindado los medios materiales necesarios para la ejecución de este trabajo.

A todo el personal administrativo, técnico y científico de las Instituciones intervinientes por haber colaborado desinteresadamente en su ejecución.

A los miembros de los Comités de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP por la meticulosa evaluación de los protocolos experimentales.

Al sostén económico en becas y subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) que permitieron el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradecimientos

A mis padres, Alicia y Marcelo, por haberme enseñado que en la vida hay que esforzarse para alcanzar los objetivos deseados y no permitirme bajar los brazos en los malos momentos.

A mis hermanos, Pablo, Mariana y Michelle por sus innumerables consejos.

A Leo por su aguante cotidiano y su apoyo incondicional, por ser mi cable a tierra. Muy especialmente te quiero agradecer por nuestra familia que ya tiene una semillita, Clarita.

A mi director de tesis, Carlos, que me abrió las puertas del laboratorio y confió en mí para la realización de esta tesis. Por facilitarme todos los recursos disponibles para que pudiera finalizar mi tesis a tiempo. Por sus charlas, consejos y valores.

A mi co-directora, Fita, por recibirme con los brazos abiertos en el laboratorio, por sus consejos, su buena voluntad y predisposición.

A Normi, Eva, Cristina y Graciela que fueron fundamentales en esta tesis, por su compañerismo y por ayudarme incondicionalmente en los experimentos.

A Mari por compañía diaria y su amistad.

A Ricardo Pollero porque sin quererlo, y seguramente sin saberlo, fue quien me hizo inclinarme por la investigación en bioquímica, además de haber sido quien me aconsejó para trabajar con el Dr. Marra, por lo que estoy eternamente agradecida.

TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Parte de los resultados experimentales derivados de este trabajo de Tesis Doctoral han sido comunicados en reuniones científicas de la especialidad o publicados en revistas internacionales con referato:

. XLIV Reunión anual de la sociedad argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.

- *“Copper, ceruloplasmin, and oxidative stress biomarker levels in human neurodegenerative disorders”*. Marra CA, Arnal N, Cristalli DO, Tacconi de Alaniz MJ. 44 Reunión Annual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz, Córdoba, Noviembre de 2008. Biocell (ISSN: 0327-09545) 32: 120 (2008). (Expositor).

- *“Copper overload in human A-549 cells: effects on lipid composition and antioxidant defense system”*. Arnal N, Tacconi de Alaniz MJ, Marra CA. 44 Reunión Annual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz, Córdoba, Noviembre de 2008. Biocell (ISSN: 0327-09545) 32: 93 (2008). (Expositor).

- *“Intoxication of professional sprayers: oxidative stress biomarkers and other biochemical parameters”*. Astiz M, Arnal N, Tacconi de Alaniz MJ, Marra CA. 44 Reunión Annual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz, Córdoba, Noviembre de 2008. Biocell (ISSN: 0327-09545) 32: 93 (2008).

Jornadas de Medicina

- *“Niveles de cobre, ceruloplasmina, y biomarcadores de estrés oxidativo en sangre periférica de pacientes con enfermedades neurodegenerativas y en sus parientes directos”*. Arnal, Nathalie; Cristalli, Diana; Alaniz, María Josefa Tacconi de; Marra, Carlos Alberto. III Jornadas de Investigación en Medicina. Facultad de Ciencias médicas de La UNLP. Octubre de 2008. (Expositor).

- *“Utilidad de varios biomarcadores sistémicos para la evaluación del riesgo de intoxicación en fumigadores profesionales”*. Astiz, Mariana; Arnal, Nathalie; Alaniz, María Josefa Tacconi de; Marra, Carlos Alberto. III Jornadas de Investigación en Medicina. Facultad de Ciencias médicas de La UNLP. Octubre de 2008.

XLV Reunión anual de la sociedad argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.

- *“Effects of copper overload on the survival of human derived cells in culture (Hep G2 and A 549)”*. Arnal N; de Alaniz MJT; Marra CA. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). San Miguel de Tucumán. Biocell (ISSN: 0327-09545) 33: 90 (2009). (Expositor).

- *“Oxidative stress in women using intrauterine device TCU380A”*. Arnal N, Tacconi de Alaniz MJ, Marra CA. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). San Miguel de Tucumán. Biocell (ISSN: 0327-09545) 33: 90 (2009). (Expositor).

- *“Differential response of cultured human cells exposed to copper overload and natural polyphenols”*. Arnal N: de Alaniz MJJ, Marra CA. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). San Miguel de Tucumán. Biocell (ISSN: 0327-09545) 33: 90 (2009). (Expositor).

Congreso de la Sociedad Argentina de Fisiología.

“Neurodegeneración y proteínas involucradas en la homeostasis del cobre”. Arnal N., Cristalli D. O., Alaniz María J.T de, and Marra C. A. Congreso de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Hospital Integrado Universitario, Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, Octubre de 2009. (Expositor).

Publicaciones:

Arnal, N.; Tacconi de Alaniz M.J.; Marra, C.A. 2010. Alterations in copper homeostasis and oxidative stress biomarkers in women using the intrauterine device Tcu380A. Toxicology Letters, Vol 192: 373-378.

Arnal, N.; Cristalli, D.O.; de Alaniz M.J.; Marra, C.A. 2010. Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. Brain Research, Vol 1319: 118-130.

Arnal, N., Astiz, M., Alaniz, M.J.T. de, Marra, C.A. Evaluation of health risk in copper-based pesticides sprayers: Comparative analysis between conventional biochemical parameters and oxidative stress biomarkers. Ecotoxicology and Environmental Safety (En revisión). 2010.

Astiz, M., Arnal, N., Alaniz, M.J.T. de, Marra, C.A. Occupational exposure characterization in professional sprayers: clinical utility of oxidative stress biomarkers. *Chemosphere* (en revisión). 2010.

Arnal, N.; Tacconi de Alaniz M.J.; Marra, C.A. Alteraciones en la homeostasis del cobre y biomarcadores de estrés oxidativo en mujeres con T_{Cu}380A. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* (en revisión).

Nathalie Arnal, Diana Olga Cristalli, Fernando Ariel Marra, María J. Tacconi de Alaniz, Carlos Alberto Marra. Biomarcadores periféricos de neurodegeneración en pacientes y sus parientes directos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* (en revisión).

Cristalli Diana Olga, Arnal Nathalie, Alaniz María J.T de, Marra Carlos Alberto. Predictive value of oxidative stress biomarkers in blood samples from first-degree relatives of patients with neurodegenerative disorders. Enviado a *Journal of Neurological Sciences*.

Nathalie Arnal; María J.T de Alaniz, Carlos A Marra. Carnosine as a better option than neocuproine to neutralize Cu overload induced-damages in cultured human cells. Enviado a *Chem Biol Interactions*.

Abreviaturas

A β : péptido beta-amiloide

AD: enfermedad de Alzheimer

ADN: ácido desoxiribonucleico

ALA: ácido lipoico

ALS: esclerosis amiotrófica lateral
ANOVA: análisis de la varianza
Aox: antioxidantes
APAF-1: *apoptotic-protease-activating factor 1*
APP: proteína precursora amiloide
ARE: elementos de respuesta antioxidantes
ARN: ácido ribonucleico
ATCC: *American Type Culture Collection*
ATP7: ATPasas transportadoras de iones Cu
BH: Bcl-2 homólogos
BSA: albúmina sérica bovina
CA: ácido cafeico
CAT: catalasa
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CLD: enfermedad de Creutzfeld-Jakob
CL: cuerpos de Lewy
Cl₃CH: cloroformo
COMM: copper metabolism gene MURR1
CP: carbonilos proteicos
CR: carnosina
CRP: ceruloplasmina
Ctr: copper transporter
Cu: cobre
Cu-DIU: dispositivo intrauterino con cobre
CUR: curcumina
DO: densidad óptica
DTNB: ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
EMAGs: ésteres metílicos de ácidos grasos
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK: *extracellularly regulated kinase*
FAD: flavina adenina dinucleótido
FRAP: capacidad reductora plasmática
FS: fosfatidilserina
GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa
GSH: glutatión reducido
GSK3 β : glucógeno-sintasa-quinasa-3 β
GSSG: glutatión oxidado
GT: glutatión transferasa
GMP_c: guanosina monofosfato cíclico
HNE: hidroxinonenal
HPLC: cromatografía líquida de alta *performance*
IAP: proteína inhibidora de la apoptosis
IL1 β : interleuquina-1-beta
ILAR: *Institute of Laboratory Animal Resources*
JNK: *c-Jun N-terminal kinase*
LDL: lipoproteína de baja densidad
oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada
LDH: láctico deshidrogenasa
LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level*
M: metal
MAPK: *mitogen activated proteína kinase*
MDA: malondialdehído
MEM: *Minimum Essential Medium*
MetOH: metanol
MTs: metalotioneínas
NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
NaOH: hidróxido de sodio
NCBC: cobre libre no complejo a ceruloplasmina
NCP: neocuproína
NEDD: N-1-naftil-etilendiamina
NIH: National Institute of Health
NO: óxido nítrico
NOAEL: *Non-Observed Adverse Effect Level*
NOS: óxido nítrico sintasa
NOx: nitritos y nitratos
NTC: *National Research Council*
OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: solución buffer de fosfato
PCT: proteína celular total
PD: enfermedad de Parkinson
PH: *pleckstrin homology*
PI: porcentaje de inhibición por minuto
PI3K/Akt: *phosphoinositide-3-kinase/Akt*
PIP₂: inositol-3,4-bifosfato
PIP₃: inositol-3,4,5- trifosfato
PKB: proteína kinasa B
PKD: proteína kinasa D
cPLA₂: fosfolipasa A₂ citoplasmática
PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados
RES: resveratrol
RNS: sustancias reactivas del nitrógeno
ROS: sustancias reactivas del oxígeno
SA: sulfanilamida
SAPK: *stress activated proteína kinase*
SDA: sistema de defensa antioxidante
SFB: suero fetal bovino
SNC: sistema nervioso central
SNpc: *pars compacta* de la sustancia nigra
SOD: superóxido dismutasa
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TGN: complejo trans del aparato de Golgi
TK: tirosina kinasas
TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
TNF α : factor de necrosis tumoral alfa
 α – Toc: alfa tocoferol
TPZ: tripiridil-triacina
UID: unidad enzimática
USA: Estados Unidos de Norteamérica
UV: ultravioleta
VD: demencia vascular

WHO: *World Health Organization*

XIAP: *X- linked inhibitor of apoptosis*

XO: xantino oxidasa

ÍNDICE

1- Introducción	
1.1 El cobre en relación con la industria y el medio ambiente	1
1.2 Ingesta de cobre.....	3
2 – Panorámica sobre el metabolismo del cobre en humanos	4

2.1 Metabolismo normal.....	4
2.2 Proteínas mayoritarias en la homeostasis del cobre.....	8
2.2.1 <i>Ceruloplasmina (CRP)</i>	8
2.2.2 <i>Metalotioneínas (MTs)</i>	9
2.3 Homeostasis del cobre en patologías humanas.....	10
2.3.1 <i>Enfermedades de Wilson y Menkes</i>	10
2.3.2 <i>Enfermedades neurodegenerativas</i>	11
3 – El cobre y los radicales libres.....	14
3.1 Definición de radical libre.....	14
3.2 Generación endógena de radicales libres.....	16
4 – Estrés oxidativo.....	18
4.1 Concepto de estrés oxidativo-nitrativo.....	18
4.2 Daños ejercidos por los radicales libres.....	18
5- Mecanismos de la toxicosis por cobre.....	23
5.1 Generalidades.....	23
5.2 Poblaciones en riesgo de sufrir toxicosis crónica por cobre.....	27
5.2.1 <i>Mujeres portadoras de dispositivos intrauterinos a base de cobre (TCu-DIUs)</i>	27
5.2.2 <i>Otras poblaciones bajo riesgo de sobrecarga por cobre</i>	28
5.3 Radicales libres inducidos por cobre y muerte celular programada	29
6- Sistema de defensa antioxidante (SDA).....	33
6.1 Componentes enzimáticos	34
6.2 Componentes no enzimáticos.....	38
6.2.1 <i>Antioxidantes hidrofílicos</i>	38
<i>Glutación</i>	38
<i>Vitamina C</i>	39
6.2.2 <i>Antioxidantes lipofílicos</i>	40
<i>Vitamina E</i>	40
6.2.3 <i>Antioxidantes anfifílicos</i>	42
<i>Ácido lipoico</i>	42

<i>Polifenoles</i>	42
7- Elección de los modelos experimentales.....	45
8- Hipótesis.....	47
9- Objetivos.....	48
9.A <i>En cultivos de células de origen humano</i>	48
9.B <i>En ratas de la cepa Wistar</i>	48
9.C <i>En humanos</i>	49
10- Materiales y métodos.....	50
10.1 Químicos.....	51
10.2 Esquema de trabajo.....	51
10.2.1 <i>Cultivos celulares</i>	51
10.2.1.1 Soluciones para los cultivos celulares.....	52
10.2.1.2 Experimentos realizados con cultivos celulares.....	52
10.2.2 <i>Ratas Wistar</i>	58
10.2.2.1 Tipos de protocolos experimentales.....	59
10.2.2.2 Obtención de muestras para análisis.....	62
10.2.2.3 Determinaciones de control experimental.....	63
10.2.3 <i>Determinaciones en humanos</i>	65
10.2.3.1 Recolección de muestras procedentes de humanos.....	65
10.2.3.2 Fumigadores profesionales.....	66
10.2.3.3 Mujeres con Cu-DIU.....	66
10.2.3.4 Pacientes con enfermedades neurodegenerativas.....	67
10.2.3.5 Aspectos bioéticos.....	68
11. Protocolos técnicos.....	68
11.1 Determinación de proteína celular total (PCT).....	68
11.2 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	68
11.2.1 <i>[NOx] por reducción con vanadio</i>	69
11.2.2 <i>Carbonilos proteicos (CPs)</i>	70

11.2.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	70
11.2.4 Ensayo FRAP.....	71
11.3 Determinaciones de componentes del sistema de defensa antioxidante (SDA)....	72
11.3.1 Enzimas del SD.....	72
11.3.1.1 Catalasa.....	72
11.3.1.2 Superóxido dismutasa (SOD).....	73
11.3.1.3 Glutatión transferasa (GT).....	73
11.3.1.4 Glutatión peroxidasa (GPx).....	74
11.3.1.5 Glutatión reductasa (GR).....	74
11.3.2 Componentes no enzimáticos del SDA.....	75
11.3.2.1 Vitamina E (α – tocoferol).....	75
11.3.2.2 Glutatión.....	76
11.4 Marcadores de apoptosis	76
11.4.1 Ensayo para caspasa-3	76
11.4.2 Mili (m)- y Micro(μ)- calpaínas.....	77
11.5 Homeostasis del cobre.....	78
11.5.1 Concentración de Cu.....	78
11.5.2 Determinación de metalotioneínas (MTs).....	78
11.5.3 Determinación de ceruloplasmina (CRP).....	79
11.5.4 Cobre libre o no ligado a CRP.....	79
11.6 Determinaciones complementarias.....	80
11.6.1 Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).....	80
11.6.2 Transaminasas (TGO y TGP).....	80
11.6.3 Análisis de lípidos totales.....	81
11.6.4 Análisis de EMAGs por c-GLC	82
11.7 Análisis estadístico.....	83
12. Resultados.....	84
12.1 Experimentos en cultivos celulares (efecto in vitro).....	85
12.1.1 Exposición a dosis crecientes de iones Cu^{++} y tiempo constante.....	85
12.1.2 Exposición a dosis crecientes de Cu durante distintos períodos de tiempo.....	96
12.1.3 Exposición de ambas líneas celulares a concentración fija de Cu^{++} y a distintos antioxidantes de origen natural (100 μM de ácido cafeico, resveratrol o curcumina).....	100

12.1.4 <i>Exposición de ambas líneas celulares a una concentración fija de Cu⁺⁺ y simultáneamente a agentes quelantes selectivos para Cu⁺ (Neocuproína 100 μM) y Cu⁺⁺ (Carnosina 100 μM)</i>	106
12.2 Experimentos en ratas (efecto in vivo).....	111
12.2.1 <i>Contenido de cobre en los lotes de alimentos</i>	112
12.2.2 <i>Contenido de cobre en agua</i>	112
12.2.3 <i>Contenido efectivo de cobre en plasma, niveles de proteínas homeostáticas y sistema de defensa antioxidante</i>	114
12.2.4 <i>Efectos sobre la composición de ácidos grasos</i>	121
12.2.5 <i>Estudios histopatológicos</i>	126
12.3 Humanos.....	128
12.3.1 <i>Usuaris de dispositivos intrauterinos a base de cobre (Cu-DIUs)</i>	128
12.3.2 <i>Profesionales dedicados a la fumigación de agroquímicos</i>	132
12.2.3 <i>Pacientes con enfermedades neurodegenerativas</i>	137
13. Discusión y conclusiones.....	146
13.1 Experimentos en sistemas no humanos.....	146
13.1.1 <i>Cultivos celulares</i>	146
13.1.2 <i>Experimentos en animales</i>	159
13.2 Experimentos en sistemas humanos.....	163
13.2.1 <i>Mujeres usuarias de dispositivos intrauterinos</i>	163
13.2.2 <i>Fumigadores profesionales de agroquímicos formulados a base de Cu</i>	166
13.2.3 <i>Pacientes con enfermedades neurodegenerativas</i>	170
14. Conclusión general.....	179
15. Referencias bibliográficas.....	181

INTRODUCCIÓN

1.1 El cobre en relación con la industria y el medio ambiente

El Cu es un metal de transición ampliamente usado en la industria para la manufactura de muchos productos tales como amalgamas con diversas aplicaciones, agroquímicos (especialmente fungicidas y micostáticos), esmaltes y pigmentos, reactivos para curtiembre, alguicidas de uso profuso en cuerpos de agua dulce, prótesis médico-quirúrgicas y dispositivos intrauterinos (DIU), entre otros. Por este motivo, no es sorprendente que el hombre contamine el medio ambiente con progresivas cantidades de cobre. La contaminación con este metal se produce mayoritariamente en la cercanía de las minas donde se extrae y procesa, y en las refinerías durante su purificación (Riedel, 2008). Los polvos de Cu que se liberan al aire y al agua reaccionan con el oxígeno y el azufre, que muchas veces son parte de los mismos minerales desde donde se refina el metal, generando compuestos aún más hidrosolubles y diseminables. El agua superficial que se contamina de esta manera puede drenar hacia los acuíferos y aumentar el nivel de cobre en ellos (Riedel, 2008) y por consiguiente en las redes de agua potable domiciliarias (Buchanan *et al.*, 1999).

Las zonas urbanas también son sitios de gran contaminación con Cu. Esto se debe, además de la cercanía con las fábricas, al uso profuso de combustibles fósiles. En las zonas rurales en cambio, la principal fuente de contaminación con cobre la constituye el uso excesivo o inapropiado de pesticidas, fungicidas y alguicidas. Si bien se sabe que en USA solamente, mueren alrededor de 300.000 personas por año en zonas rurales por causa de la exposición aguda a pesticidas formulados a base de cobre, es frecuente que se produzcan intoxicaciones por exposiciones crónicas debidas al consumo diario de vegetales que han sido tratados con agroquímicos (Gunay *et al.*, 2006). En áreas industrializadas el problema es mayoritariamente la exposición crónica a dosis bajas (Eddleston y Bateman, 2007). Los casos de exposición aguda se producen sobre todo por la ingesta de líquidos contaminados con Cu, o por el consumo accidental o *ex profeso* de grandes cantidades de sales de cobre (Uriu-Adams y Keen, 2005).

También se pueden encontrar grandes concentraciones de Cu en peces u otros animales marinos. Por ejemplo, en las ostras del río Thames (Inglaterra) y de la bahía de Chesapeake (Taiwan) se puede observar un color verde en la carne del molusco debido a la deposición de sales cúpricas, condición que causa intoxicación aguda en las personas que los consumen (Riedel, 2008). A su vez, Green-Ruiz y Páez-Osuna (2001) encontraron que en la ensenada Altata ubicada en la laguna Culiacán (México) -en la cual se eliminan los desechos de la actividad agrícola local- existe una relación directa entre la concentración

de Cr, Cu, Mn y Pb, y las descargas agrícolas registradas. En España, el Cu es el único compuesto aceptado como fungicida en la producción orgánica, y la Comisión de Regulación Europea permite un máximo de uso de 6 Kg/ha/año (EC/473/2002). Sin embargo, el umbral utilizado supera ampliamente lo establecido por esta comisión (Vicent *et al.*, 2009). De modo que el cobre puede ingresar a nuestro sistema por sobrecarga de la cadena nutricional a partir de suplementos para animales de cría, fórmulas comerciales para alimentación enteral o parenteral, o residuos de pesticidas y otros agroquímicos (Rotilio *et al.*, 2000).

Muchas otras fuentes de contaminación también nos pueden provocar sobrecarga de cobre. Por ejemplo, el uso de ciertos medicamentos como la torazina, los anticonceptivos orales (De la Cruz *et al.*, 2005) y también los dispositivos intrauterinos a base de cobre a los que luego haremos especial referencia (NTC, *National Research Council*, USA, ESADI, 1989; Cobine *et al.*, 2006; Leary *et al.*, 2007; Arnal *et al.*, 2010). La diálisis crónica puede ser fuente de sobrecarga de cobre (De la Cruz *et al.*, 2005), como así también la nutrición parenteral (Beshgetoor y Hambidge, 1998). Existe un gran número de casos de intoxicación por cobre debida a bebidas de circulación comercial, leche o agua supuestamente potable (Buchanan *et al.*, 1999; Uriu-Adams y Keen, 2005), la inhalación de polvos ricos en minerales de cobre (Nemery, 1990; Winge y Mehra, 1990) y la absorción dérmica de productos que los contienen (WHO; *World Health Organization*, 1999, IPCS Environmental Health Criteria 2000, Copper. Vammala, Finland; Hostynek y Maibach, 2003).

Recientemente se ha replanteado el problema del cobre en agua potable como un factor de riesgo para poblaciones susceptibles tales como niños, ancianos y personas de cualquier edad que sean heterocigotas para la enfermedad de Wilson (Uriu-Adams y Keen, 2005). Otras causas de toxicosis por sobrecarga de cobre se deben a cuestiones de tipo cultural tales como la preparación de alimentos en contenedores hechos con amalgamas de este metal (Pandit y Bhave, 1996; Gaetke y Chow, 2003; Hostynek y Maibach, 2003). En general, existe acuerdo en que los casos de sobrecarga por cobre resultan de una combinación de factores ambientales y predisposición genética (Tanner, 1998; Linder, 2001) y que las fuentes principales de sobre-exposición la constituyen el agua de bebida, los alimentos y los suplementos nutricionales (Muller y Klomp, 2009).

1.2 Ingesta de cobre

La ingesta diaria de cobre (Cu) varía enormemente dependiendo del tipo de dieta seguida. El Cu necesario para el mantenimiento de la fisiología normal en los humanos se obtiene tanto del agua como de los alimentos. El agua de bebida tiene una concentración promedio de 4-10 $\mu\text{g Cu/L}$, y en su mayoría se encuentra unido a la materia orgánica presente en ella (Barceloux, 1999). De esta forma se calcula que el agua aporta entre un 6 y un 13 % del Cu total requerido por día (Gaetke y Chow, 2003). Otra fuente de ingesta de cobre la constituye los alimentos ricos en este metal de transición que incluyen a las ostras, nueces, hígado, legumbres y granos de cereales, entre otros. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estimó las necesidades de ingesta mínima diaria para el cobre en humanos en 0.6 mg/día para mujeres y 0.7 mg/día para hombres (Gaetke y Chow, 2003). Sin embargo, actualmente no contamos con datos certeros sobre los índices LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) o NOAEL (*Non-Observed Adverse Effect Level*) que hayan sido determinados de manera confiable mediante experimentación en humanos. Por lo tanto, el así llamado “rango de ingesta segura” debería ser considerado meramente orientativo y tomado con precaución (Linder, 2001), especialmente, si consideramos las complejas y aún no conocidas interacciones que presenta la absorción intestinal de cobre con numerosos micro- y macro-nutrientes que han sido reportadas tanto *in vitro* (Huster *et al.*, 2005) como *in vivo* (Zerounian y Linder, 2002; Arredondo y Núñez, 2005). Asimismo se deben considerar otros factores como el contenido regional de cobre en alimentos [www.fav.org/imfoods/directory-en.stm; www.nal.usds.gov/fnic/foodcomp], la presencia de sustancias que aumenten o disminuyan su absorción (Thomas y Oates, 2003; Fraga, 2005), o de defectos genéticos como el síndrome de Menkes o la enfermedad de Wilson (Greger, 1999; Rotilio *et al.*, 2000; Bárány *et al.*, 2002), y otras condiciones médicas involucradas en su excreción biliar (Rotilio *et al.*, 2000; Strausak *et al.*, 2001). Especial atención debería prestarse a la presencia simultánea de interacciones con fármacos (Gaetke y Chow, 2003) y compuestos orgánicos tales como tioles y aminoácidos, entre otros. Por ejemplo, hay vitaminas que interfieren en su absorción (tales como la A, C, B3, B5 y B6) mientras que ciertos minerales la favorecen, en especial el calcio (Ca), hierro (Fe), sodio (Na), selenio (Se) y cobalto (Co). Finalmente, y tal como será oportunamente discutido, el cobre en agua es un problema de candente actualidad desde que su calidad es generalmente ignorada en la gran mayoría de las plantas de control de agua potable en el mundo.

Se sabe que alrededor del 50 % del cobre ingerido se absorbe en el intestino delgado y pequeñas cantidades en el epitelio estomacal (Beshgetoor y Hambidge, 1998;

Rotilio *et al.*, 2000). Como resultado de la absorción y metabolismo de este metal el hombre posee un promedio de 75 mg de Cu distribuidos principalmente en hígado, cerebro, corazón, riñones, páncreas, bazo, huesos y músculo esquelético (Campbell, 2001).

2 – Panorámica sobre el metabolismo del cobre en humanos

2.1 Metabolismo normal

El Cu es un metal esencial para todos los organismos vivos, especialmente para los mamíferos, ya que actúa como cofactor de importantes enzimas como la Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD), la citocromo-c-oxidasa de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la ceruloplasmina que es sumamente ubícu. También se lo encuentra en las tirosinasas (que intervienen en la ruta de biosíntesis de melanina), en la proteína hefaestina (encargada de la eliminación del hierro en las células del intestino), en las lisil-oxidases (que realizan el *cross-linking* entre elastina y colágeno), en las dopamina-monooxigenasas (necesarias para la producción de catecolaminas) y en las peptidil-glicil- α -amida-monooxigenasas (requeridas para la modificación de las hormonas neuropeptídicas). A pesar de ello, en su forma libre es sumamente tóxico por su capacidad de producir radicales libres tal como comentaremos más adelante (ver inciso 3). Es por eso, que todos los organismos, y en especial los humanos, contamos con un elaborado mecanismo de control del metabolismo de este metal (Puig y Thiele, 2002).

Desde las levaduras hasta los humanos, el Cu es captado por las células a través de una familia de proteínas transportadoras altamente conservadas denominadas Ctr (*copper transporters*) (Zhou y Gitschier, 1997). El ión cuproso (Cu^+) es el sustrato para esta superfamilia de pequeñas proteínas con tres dominios transmembrana que se caracterizan por presentar en el extremo N-terminal segmentos con uno a más motivos “Mets”. Los Mets son parte del dominio extracelular y están involucrados en la captación de iones Cu^+ facilitando su entrada (Balamurugan y Schaffner, 2006). Hay evidencias que indican que para que las Ctr sean funcionales deben conformar un complejo homotrimérico que se formaría sin consumo de ATP. Aparentemente su capacidad para incorporar Cu^+ es estimulada por iones K^+ extracelulares y facilitada por la baja concentración de iones cuprosos en el interior celular (10-100 μM) (Lee *et al.*, 2002).

El Cu extracelular, que en su mayoría es Cu^{++} , es reducido a Cu^+ por enzimas reductasas que se encuentran en la membrana plasmática para luego ser captados por las Ctr hacia el citoplasma (Hassett y Kosman, 1995). En el humano existen dos Ctr principales (${}_h\text{Ctr1}$ y ${}_h\text{Ctr2}$). La proteína ${}_h\text{Ctr1}$ es la principal proteína funcional. En el caso

de hCtr2 se sabe que su ARNm se expresa de manera constitutiva aunque su función no está totalmente dilucidada. También se sabe que cuando en el medio extracelular la concentración de iones cobre es elevada, disminuyen los niveles de hCtr1 en la membrana plasmática. En primera instancia, estas proteínas son internalizadas en vesículas rodeadas por clatrina cuya ubicación subcelular varía entre la región perinuclear y la membrana plasmática (Petris *et al.*, 2003). Si las concentraciones extracelulares de Cu son muy elevadas (en particular Cu⁺) los niveles de hCtr1 disminuyen de la superficie celular por auto-degradación (Petris *et al.*, 2003). Luego de atravesar la membrana plasmática, los iones Cu⁺ son transportados al compartimento secretor, a la mitocondria, y a las cuproenzimas citosólicas por medio de las *chaperonas* Cox 17, Atox1 (*anti-oxidant 1*) y CCS, respectivamente (**Fig. 1**). Cox 17 transporta los iones Cu hacia las proteínas mitocondriales SCO1 y SCO2, las cuales los incorporan en la citocromo-c-oxidasa de la cadena respiratoria (Bertinato y L'Abbé, 2004). Luego Atox1 transfiere estos iones metálicos hacia las ATPasas encargadas de exportarlo (ATP7A y ATP7B). Por otro lado, el complejo homodimérico formado por Cu-Atox actúa como factor de transcripción uniéndose a la región promotora del gen que codifica para la ciclina D (Muller y Klomp, 2009). Finalmente, las proteínas CCS le ceden los iones Cu a la enzima Cu/ZnSOD (Caruano-Yzermans *et al.*, 2006).

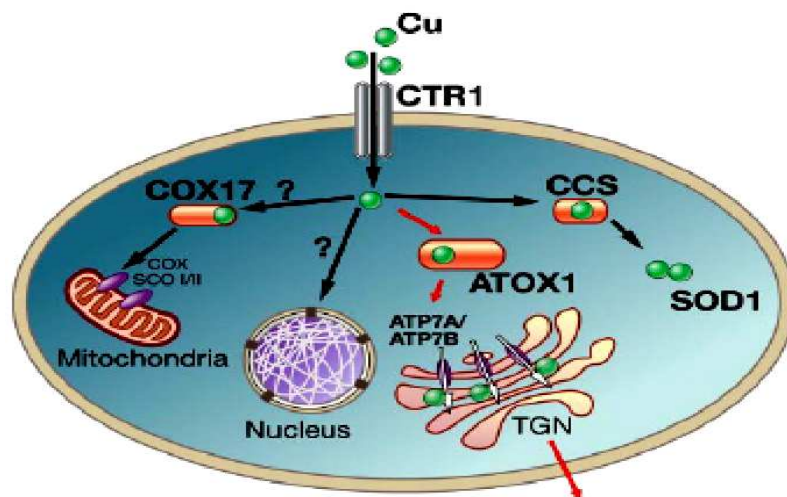


Figura 1: Esquema general de las principales proteínas involucradas en la distribución intracelular de los iones Cu. [Tomado de Lutsenko *et al.*, 2007].

Las proteínas ATP7 son una super-familia de ATPasas transportadoras de iones Cu que normalmente se localizan en el compartimento *trans* del aparato de golgi (TGN). Se

caracterizan por presentar 8 dominios transmembrana y motivos de unión a Cu (MXCXXC o dominios MBD) en el extremo N-terminal (**Fig. 2**). Aparentemente estos dominios estarían involucrados en la interacción con Atox1 regulando la transferencia de iones Cu desde la chaperona hacia la ATPasa (Lutsenko *et al.*, 2007). Estas ATPasas son responsables del transporte de los iones Cu desde el citosol a través de la membrana plasmática hacia otros compartimentos celulares o hacia el exterior de la célula utilizando la energía de hidrólisis del ATP. El paso central en la translocación del Cu es la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP hacia el residuo Asp dentro del dominio “P” de la ATPasa (**Fig. 2**) formando así un intermediario fosforilado. El pre-requisito para esta reacción es la unión del Cu a dominios de la enzima insertos en la propia membrana, mientras que la liberación de Cu estimula su desfosforilación (Lutsenko *et al.*, 2007).

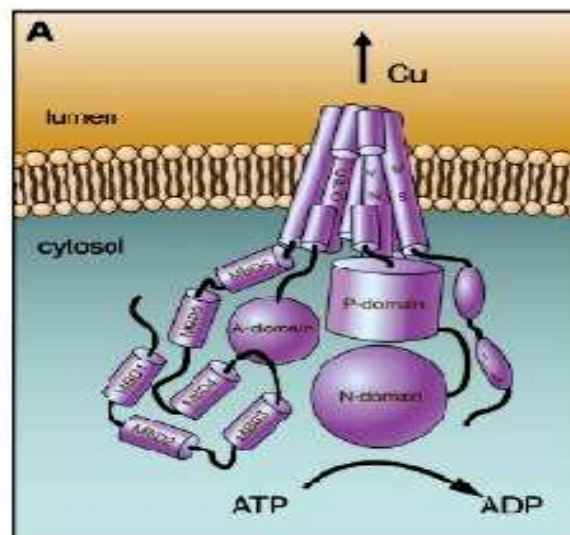


Figura 2: Esquema de la organización en dominios de las proteínas ATP7. Se pueden observar los seis dominios MBD que interactuarían con Atox 1, el dominio “P” el cual se fosforila, el dominio “N” de unión a nucleótido y el dominio “A” con actividad fosfatasa. [Tomado de Lutsenko *et al.*, 2007].

Existen dos isoformas de ATP7 (ATP7A y ATP7B) que desempeñan distintos roles fisiológicos. En los párrafos siguientes se mencionará brevemente la ruta vinculada a la actividad de ATPasas seguida por los iones Cu luego de ser incorporados dentro de las células intestinales a partir de la dieta. Se hará énfasis en la distribución selectiva de dichas proteínas y en enfermedades que involucran mutaciones en las mismas.

El Cu absorbido en el intestino es liberado a la circulación sistémica a través de la membrana basolateral de los enterocitos mediante la intervención de la proteína ATP7A. La mayor parte del Cu liberado desde el intestino es transportado hacia el hígado, que es el órgano regulador principal de la homeostasis del Cu (Lutsenko *et al.*, 2007). Concentraciones menores de este metal también son transportadas con destino a los riñones y tejidos periféricos. Cuando las concentraciones de iones Cu se encuentran dentro de los valores normales, las ATPasas se localizan predominantemente en el TGN desde donde distribuyen el Cu hacia cuproenzimas sintetizadas dentro de la denominada *vía secretora* (Petris y Mercer, 1999; Bertinato y L'Abbé, 2004). Los hepatocitos también utilizan esta vía secretora para la incorporación de iones Cu en la proteína CRP la cual será descrita en detalle a continuación en esta misma sección. Cuando las concentraciones de Cu extracelular son elevadas, las ATPasas se traslocan hacia la membrana plasmática para eliminar el exceso de iones (Camakaris *et al.*, 1995; Petris y Mercer, 1999; Cobbold *et al.*, 2002; Metha *et al.*, 2006). La bilis representa la principal vía de excreción de iones Cu, ya que el 80 % se elimina por esta ruta (Gaetke y Chow, 2003).

Las bases moleculares para la inducción de la relocalización de las ATPasas vinculadas al metabolismo del cobre son controversiales. Una posibilidad es que el Cu estimule el transporte de las ATPasas hacia la membrana plasmática desde el compartimento TGN mediante la unión de éstas con el citoesqueleto a través de la proteína adaptadora Murr1/COMMD1 (Petris y Mercer, 1999; Cobbold *et al.*, 2002; Pase *et al.*, 2004; Lutsenko *et al.*, 2007). Si bien este mecanismo fue propuesto en un primer momento para ATP7A, Hung *et al.* (1997) propusieron un proceso similar para la proteína ATP7B hepática. Alternativamente, se postula que la proteína ATP7A es constitutivamente reciclada entre ambos sectores, y que el aumento de Cu inhibiría la parte del ciclo en donde esta proteína es devuelta al TGN. Ambas vías aumentarían el número de transportadores en la membrana plasmática. Se ha demostrado que un dominio específico transmembrana es el mediador de la localización de ATP7A en el TGN. En contraste, aquellas proteínas ATP7A defectuosas en ese segmento son relocalizadas en el retículo endoplasmático. Resulta interesante señalar que los pacientes con mutaciones genéticas que expresan la variante ATP7A del RE presentan una forma moderada de la enfermedad de Menkes (descrita en otra sección) llamada "*síndrome del cuerno occipital*" (Kaler *et al.*, 1994).

2.2 Proteínas mayoritarias en la homeostasis del cobre.

2.2.1 Ceruloplasmina (CRP)

La ceruloplasmina (CRP) es una proteína enzimática y de transporte de cobre que es capaz de oxidar iones ferrosos a férricos, y con menor eficiencia los cuprosos a cúpricos. Es sintetizada y secretada al torrente sanguíneo principalmente por el hígado. Está constituida por una cadena única formada por 1046 aminoácidos y posee 6 dominios estructurales, los cuales parecen ser la repetición de 2 de dominios básicos. Se interpreta entonces que habría 3 dobles dominios homólogos que reflejarían la triplicación de un dominio ancestral (Vassiliev *et al.*, 2005). Los iones Cu obtenidos a partir de la proteína ATP7B se unen a los distintos dominios de la CRP de manera ordenada. Los dominios 2, 4 y 6, con conformación espacial de tetraedro distorsionado, unen al Cu^{++} de modo que este queda en el centro, coordinándose a dos átomos de N y dos de S. A esta disposición se la llama Cu I o “azul”. El dominio 6 posee también el único átomo de Cu que está coordinado alrededor de 4 átomos de N, presentando una configuración de cuadrado plano denominada Cu II. En el dominio 6 también encontramos un átomo de Cu III que se caracteriza por poseer un máximo de absorbancia a 330 nm. Por último, otro átomo de Cu II se encuentra unido al dominio 1.

Una vez que se incorporan los seis iones cúpricos la CRP es liberada a la circulación formando parte de la fracción α_2 -globulina del plasma humano. La mayor parte del Cu que circula por el torrente sanguíneo lo hace unido a esta proteína (Vassiliev *et al.*, 2005), mientras que una fracción menor lo hace unido a la albúmina, a pequeños aminoácidos como la histidina (Halliwell y Gutteridge, 1984), a las metalotioneínas y a la transcuproína, entre otros compuestos (Tapiero *et al.*, 2003). Resulta interesante mencionar que se ha descubierto un así llamado *pseudogen* de la CRP tanto en células hepáticas como no hepáticas. El ARNm codificado por este gen es traducido a un polipéptido de alrededor de 110 kDa, el cual es localizado en la matriz y en las membranas internas mitocondriales del hígado, cerebro, testículos y glándulas mamarias de rata. Se ha sugerido que su actividad ferroxidasa juega un rol importante en la síntesis de los *clusters* [Fe-S] utilizados en diversas rutas metabólicas celulares (Mehta *et al.*, 2006). También se ha propuesto que la función de esta CRP *mitochondrial* es la oxidación y detoxificación de los iones derivados del hierro (Fe^{++} , Fe^{+++}). Además, podría unir óxido nítrico (NO) y regular su concentración en las mitocondrias (Mehta *et al.*, 2006).

Por otro lado, se sabe que la CRP es un *reactante de fase aguda* ya que su concentración aumenta frente a inflamaciones e infecciones en general, reacciones

inmunitarias humorales o celulares, traumas físicos de diferente índole, etc. (Vassiliev *et al.*, 2005), y también se la ha propuesto como un estimulador angiogénico endógeno en los crecimientos neoplásicos (Gupte y Mumper, 2009); por todo lo cual la CRP es un biomarcador de indudable importancia clínica.

2.2.2 Metalotioneínas (MTs)

Las metalotioneínas (MTs) constituyen una superfamilia de proteínas ricas en restos de cisteínas y de bajo peso molecular que en condiciones fisiológicas coordinan múltiples átomos de metales de transición, especialmente Cu y Zn. En los humanos existen 7 genes ubicados en el cromosoma 16 que codifican para MT-I (MT1A, B, C, D, E, F, G, H y X), y genes únicos en el cromosoma 8 que codifican para el resto de las MTs (MT-II, MT-III y MT-IV) (West *et al.*, 2008). Las MTs tienen una estructura terciaria compuesta por un dominio α y un dominio β . El número máximo de iones metálicos que se pueden unir a ambos dominios depende de la coordinación de cada metal (4, 6 o 9 en el caso del Cu) (Kozłowski *et al.*, 2009).

El comportamiento de las MTs se basa en la química de sus grupos sulfhidrilos (SH-), los cuales pueden captar y transferir iones metálicos dentro de la misma molécula o entre moléculas. La complejación de metales protege al organismo de sus efectos tóxicos haciendo que la biodisponibilidad de los mismos disminuya sustancialmente y se ajuste al rango fisiológico (Southon *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2006). Generalmente, la expresión de las MTs aumenta con la elevación de la concentración de los metales (Southon *et al.*, 2004; Balamurugan y Schaffner, 2006; Monserrat *et al.*, 2007) y con el incremento en la concentración de ROS (Inoue *et al.*, 2009). En relación a lo dicho anteriormente existen trabajos que demuestran un aumento en la concentración de MTs I/II en la enfermedad de Alzheimer (West *et al.*, 2008) en donde el estrés oxidativo o la sobreproducción de ROS es un hallazgo constante (Bains y Shaw, 1997; De Leo *et al.*, 1998; Desport y Couratier, 2002; Rossi *et al.*, 2002; Emerit *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2004; Tórsdóttir *et al.*, 2006; Mangialasche *et al.*, 2009; Migliore y Coppedè, 2009; Song *et al.*, 2009), muy especialmente en cuanto a su relación con los niveles de cobre y la deposición de proteínas amiloides (Cerpa *et al.*, 2005). Los efectos neuroprotectivos de las MTs sugieren que estos péptidos juegan un rol central durante la etiopatogénesis del mal de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos relacionados. Algunas células (entre las que se destacan los hepatocitos) retienen más Cu que otras y pueden metabolizarlo con mayor eficiencia

debido a su respuesta genética para inducir la síntesis de grandes cantidades de MTs (Mehta *et al.*, 2006); sin embargo, las neuronas no se encuentran dentro de esta categoría.

Por otro lado, los integrantes de la superfamilia de las MTs tienen -además de su capacidad para almacenar cobre e intervenir en su metabolismo y destino celular- una reconocida actividad como antioxidantes (Selvaraj *et al.*, 2005; Vasák, 2005). En consecuencia, han ganado popularidad como biomarcadores de sobre-exposición ambiental al cobre (Hylland *et al.*, 1992).

2.3 Homeostasis del cobre en patologías humanas

2.3.1 Enfermedades de Wilson y Menkes

Existen varios desórdenes humanos que resultan de una falla en la homeostasis del Cu. Entre ellos se encuentran las enfermedades de Menkes y Wilson como las de origen genético más importante y frecuente, la cirrosis infantil Indú, la cirrosis infantil endémica del Tirol y la cirrosis idiopática cúprica (producida por un defecto genético y simultánea ingesta excesiva de Cu) (Mercer, 2001; Andrews, 2002).

Las enfermedades de Menkes (asociada al cromosoma X) y Wilson (autosómica recesiva) están ampliamente estudiadas y se caracterizan por presentar defectos genéticos en las ATPasas responsables de regular la liberación de Cu hacia la circulación y la bilis, ATP7A y ATP7B respectivamente. Estas proteínas son funcionalmente homólogas y presentan un 67 % de similitud estructural. Los genes que codifican para ambas ATPasas se expresan en distintos tejidos (Bertinato y L'Abbé, 2004). Como mencionamos en párrafos anteriores, ATP7B reside mayoritariamente en el compartimento TGN dentro de los hepatocitos, aunque también se expresa en los ganglios basales del cerebro, cerebro medio y retina (Lutsenko *et al.*, 2007). Es por eso que las mutaciones en esta proteína conllevan a la acumulación de Cu en los hepatocitos y en varias zonas del encéfalo (Shim y Harris, 2003).

Los pacientes que padecen defectos en ATP7B desarrollan principalmente enfermedades hepáticas, especialmente un tipo de cirrosis, como consecuencia de la acumulación de Cu. A su vez, los casos severos pueden evolucionar hacia desórdenes psiquiátricos por la formación de depósitos de Cu en el cerebro, no sólo por no poder eliminarlos debido a los defectos en ATP7B *in situ*, sino también por la infiltración del metal proveniente de la circulación general y en última instancia del hígado (Lutsenko *et al.*, 2007). La presencia en la córnea de depósitos de iones Cu en forma de anillos llamados "Kayser-Fleischer" es una de las principales características diagnósticas de la enfermedad

de Wilson. Estos depósitos son consecuencia de la inactivación de ATP7B expresada en el epitelio pigmentario de la córnea y el cuerpo ciliar durante el desarrollo de la retina (Lutsenko *et al.*, 2007).

Por otro lado, ATP7A se expresa mayoritariamente en el intestino, la placenta y el cerebro. Los iones Cu que entran en estos tejidos son necesarios para los requerimientos diarios de este metal en el organismo, para abastecer al feto en crecimiento y el desarrollo del cerebro, respectivamente. Las mutaciones en ATP7A son clínicamente evidenciables como deficiencias generalizadas de Cu que conllevan disminución en la actividad de cupro-enzimas como la Cu/ZnSOD, directamente involucradas en el sistema de defensa antioxidante celular, entre otras. Otra de las enzimas afectadas es la tirosinasa necesaria para la síntesis de melanina en los melanocitos. Esta enzima requiere dos iones Cu los cuales se incorporan dentro del TGN a través de ATP7A. Una vez madura, es transportada hacia los melanosomas donde ejerce su actividad sintética (Setty *et al.*, 2008). Los pacientes afectados presentan el cabello hipo-pigmentado y albinismo ocular (Shim y Harris, 2003; Setty *et al.*, 2008). También se afecta la lisil-oxidasa, cuya inactividad se traduce en anomalías del tejido conectivo y aneurismas. Los pacientes que sufren esta enfermedad desarrollan neurodegeneración severa y mueren dentro de los 5 años de vida (Shim y Harris, 2003).

2.3.2 Enfermedades neurodegenerativas

En relación a este tema existen diferentes cuadros fisiopatológicos humanos caracterizados por un metabolismo anormal del cobre. Haremos breve referencia a algunos de ellos, especialmente a los que serán motivo de estudio en este trabajo de tesis.

El Cu es un importante componente de proteínas esenciales para la función neuronal. No obstante, este metal ha sido involucrado en la patogénesis de muchos desórdenes neurodegenerativos como el mal de Alzheimer (AD), Parkinson (PD), y las demencias de origen vascular (VD) entre otros. Estas enfermedades se caracterizan por el desarrollo de degeneración neuronal y pérdida progresiva de sinapsis con el consiguiente deterioro de las funciones superiores, y también por un aumento de la concentración de Cu, Fe y Zn, especialmente en los tejidos del SNC. En este tipo de pacientes se ha demostrado que la incorporación de agentes quelantes de Cu previene la muerte neuronal (Armstrong *et al.*, 2001; Hipkiss, 2005; Velez *et al.*, 2008). La asociación de estas enfermedades con los metales de transición está caracterizada por el daño oxidativo (ver sección 5.2) a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. También se ha visto en los pacientes con AD,

esclerosis amiotrófica lateral (ALS) y personas con encefalitis espongiiforme (tipo Creutzfeld-Jakob o CJD) elevadas concentraciones de ROS en distintas regiones del cerebro, sobre todo en las áreas más afectadas (Cerpa *et al.*, 2005).

Todas las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de depósitos intra- o extra-celulares de proteínas que producen daño neuronal y contribuyen al desarrollo del cuadro fisiopatológico. Sin embargo, estos depósitos no pueden ser considerados los factores *iniciales* (etiopatogénicos) responsables de las enfermedades ya que los intermediarios solubles que luego formarán los agregados son más tóxicos que los depósitos en sí mismos (Kozlowski *et al.*, 2009).

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo incurable y progresivo. Se caracteriza por el gradual desarrollo de impedimentos cognitivos severos, pérdida de los diferentes tipos de memoria, cambios de personalidad, anomia, apraxia y una gran variedad de otros signos y síntomas que le son característicos. Una de las características histológicas más evidentes (aunque no patognomónica) de esta enfermedad la constituye el agregado de placas amiloides extracelulares en la neocorteza, conteniendo péptido β -amiloide ($A\beta$) (derivado de la proteína precursora amiloide, APP) y un entramado intracelular neurofibrilar rico en proteína tau hiperfosforilada (Butterfield *et al.*, 2007; Hooijmans y Kiliaan, 2008). El agregado de péptido $A\beta$ está asociado a un cambio conformacional de hélice- α a lámina- β , como consecuencia de la edad o de alguna condición patológica pre-existente y aún no bien esclarecida. Si bien la etiología del AD no resulta clara, hay mucha evidencia que sugiere la existencia de un estado de estrés oxidativo como pródromo a los síntomas que caracterizan a esta enfermedad (Bush, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Butterfield *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008). Cabe agregar que existen estudios que muestran que la lipoperoxidación, la oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos ocurren - e incluso preceden - a los impedimentos cognitivos leves (a veces no detectables) que representan los estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer.

La proteína precursora amiloide (APP), es una proteína transmembrana con una región extracelular que puede ser dividida en varios dominios entre los que se encuentra el dominio de unión a cobre (CuBD) (Kong *et al.*, 2008). Si bien muchos autores creen que el péptido $A\beta$ podría funcionar como un “antioxidante” eliminando los iones Cu circulantes (Bush *et al.*, 2003), existen estudios que demuestran la capacidad de los sitios de unión al Cu de catalizar su reducción a Cu^+ , sugiriendo que normalmente actuarían como *reductasas* (Cerpa *et al.*, 2005). De esta forma, el Cu^{++} incrementaría la toxicidad de $A\beta$

mediante la formación de ROS (Cuajungco *et al.*, 2000; Kozlowski *et al.*, 2009). No obstante saberse que la formación de ROS es uno de los motivos por los que las neuronas morirían en los pacientes con AD, no está muy claro si esto sucede durante la formación del agregado β -amiloide o una vez que este maduró (Andersson *et al.*, 2002).

Por otro lado, se cree que existirían anomalías en el sistema de transporte celular de los metales involucrados en la enfermedad de Alzheimer (en especial Fe y Cu) (Bush, 2003). A pesar de que hay avances para tratar de entender los orígenes de la enfermedad, todavía hay muchas cuestiones que aclarar. De hecho Crouch *et al.* (2009) publicaron que un aumento de la disponibilidad de Cu intracelular aumentaría la fosforilación de la enzima glucógeno-sintasa-kinasa-3 β (GSK3 β), disminuyendo así su actividad, y por ende la fosforilación de tau. En el mismo trabajo demostraron que alimentando ratas con Cu (10 mg/kg), éstas mejoraban sus aspectos cognitivos comparados con los controles, lo cual establece un dilema en relación a otras evidencias que indican un efecto opuesto o deletéreo.

La enfermedad de Parkinson (PD), al igual que AD, es una enfermedad con múltiples causas etiológicas de entre las que sobresalen la genética y los factores ambientales. Muchos investigadores han demostrado que factores ocupacionales (y otros vinculados al medio ambiente) están significativamente asociados a la incidencia, prevalencia y progreso clínico de esta enfermedad (Gorell *et al.*, 2004). Las personas que padecen esta enfermedad sufren de característicos temblores en reposo, lentitud en los movimientos (bradicinesia), rigidez e inestabilidad postural general con alteraciones de la marcha, la percepción, el psiquismo y de las habilidades cognitivas. Esto se debe a la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia nigra (SNpc). En los lugares afectados se pueden observar inclusiones citoplasmáticas redondas, hialinas, llamadas *cuerpos de Lewy* (CL) los cuales también se observan en las entidades clínicas denominadas *demencias a CL*. Estos cuerpos y las neuritas involucradas están compuestos por proteínas normales y truncadas, ubiquitinizadas, almacenadas en el citoplasma como productos no degradados del proceso neurodegenerativo (Ferrer, 2009). El componente mayoritario de los CL y de las neuritas aberrantes es la proteína α -sinucleína, la cual se encuentra anormalmente fosforilada, nitrada y oxidada, y por lo tanto mucho más propensa a la formación de agregados y fibras insolubles. Las caracterizaciones de la interacción del Cu⁺⁺ con la α -sinucleína demuestran que este metal acelera la agregación proteica a concentraciones fisiológicas sin alterar las estructuras fibrilares resultantes (Kozlowski *et al.*, 2009).

El estrés oxidativo también es un factor de indudable importancia en la patogénesis del PD. Hay una gran variedad de trabajos publicados que demuestran disminución en la actividad de las enzimas del SDA y un aumento en la oxidación de biomoléculas (Ferrer, 2009). Uversky (2007) ha publicado que altas concentraciones de metales, exposición a pesticidas y herbicidas, entre otros factores, facilitan la formación de fibras. Snyder y Friedman (1998) demostraron que un aumento en la concentración intracelular de Cu en células tratadas con L-DOPA y dopamina disminuiría la proliferación celular e incrementaría la formación de micronúcleos.

3 – El cobre y los radicales libres

Siendo que gran parte de los efectos tóxicos y deletéreos del cobre están mediados por la generación de radicales libres y especies altamente reactivas, que en definitiva conllevan al establecimiento de una situación de estrés oxidativo, dedicaremos algunos ítems a resumir los conceptos fundamentales referentes a estas cuestiones.

3.1 Definición de radical libre

Se conviene en llamar *radical libre* a cualquier especie atómica o estructura molecular capaz de existir de manera independiente (por eso el término “libre”) que posee uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los radicales libres son generalmente estructuras muy reactivas debido a que tienen una deficiencia electrónica en un orbital externo (antiguamente denominado “octeto incompleto”, ahora reemplazado por el concepto de singularidades en la ecuación de onda de Schrödinger). Esto los hace altamente electrofílicos y sus reacciones siempre tienden a restaurar la deficiencia electrónica.

Especies reactivas del oxígeno (ROS) en cambio, es un término genérico usado para referirse no sólo a radicales del oxígeno o de otros átomos altamente reactivos, sino también a especies no radicalarias derivadas de ellos (algunos ejemplos se muestran en la **tabla I**).

Tabla I: Principales especies reactivas del oxígeno (ROS)

Especies radicalarias	Especies no radicalarias
Ión superóxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\bullet}	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxilo, RO_2^{\bullet}	Oxígeno singulete, $^1\Delta gO_2$
Hidroperoxilo, HO_2^{\bullet}	Peroxinitrito, $ONOO^-$

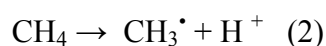
Existen también especies reactivas del nitrógeno (RNS), cuyo principal exponente es el óxido nítrico (NO^{\bullet}). A partir de esta molécula derivan todas las otras RNS (**tabla II**).

Tabla II: Algunas especies reactivas del nitrógeno (RNS)

Especies radicalarias	Especies no radicalarias
Óxido nítrico, NO^{\bullet}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de nitrógeno, NO_2^{\bullet}	Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3
	Ión nitrilo, NO_2^+
	Peroxinitrito, $ONOO^-$ (*)
	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$
	Ánión nitroxilo, NO^-

(*) El peroxinitrito puede ser considerado tanto RNS como ROS

También podemos encontrar radicales libres cuyo centro radicalario está formado por grupos tioles (1), o átomos de carbono (2), entre otros.



3.2 Generación endógena de radicales libres

Los radicales libres son compuestos normales o fisiológicos que se producen por efecto del metabolismo celular. Es el caso del NO^\bullet y el $\text{O}_2^{\bullet -}$, entre otros. El NO^\bullet es un gas sintetizado en bajas concentraciones de manera constante por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) la cual es activa en muchos tejidos. Se produce a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina, dando como productos L-citrulina y óxido nítrico (NO) (Schopfer *et al.*, 2003; Bove y van der Vliet, 2006; Butterfield *et al.*, 2007). La NOS es un homodímero que usa el poder reductor del NADPH para oxidar a la L-arginina. Entre ambos dominios existe una región de unión a la calmodulina que controla la activación de NOS en respuesta al Ca^{++} (Bove y van der Vliet, 2006).

El NO^\bullet actúa como mediador importante en el control del tono del músculo liso vascular y es sintetizado por una de las tres isoformas de la NOS, la denominada *endotelial* (eNOS). Una vez producido, el NO difunde hacia el músculo liso que integra los vasos sanguíneos para activar a la enzima guanilato-ciclasa. El consecuente aumento de GMP_C hace que se relaje el músculo disminuyendo así la presión arterial e incrementando la volemia. En el cerebro actúa como neurotransmisor, sintetizado por la isoforma NOS neuronal (nNOS). Existe, por último, en los macrófagos una isoforma de NOS inducible (iNOS) que produce este radical bajo ciertas circunstancias para actuar como agente anti-infeccioso al favorecer la producción de peroxinitrito por reacción con peróxido o superóxido generados *in situ* por los mismos macrófagos. El NO^\bullet tiene una vida media muy breve en los tejidos (de 3 a 10 segundos) ya que reacciona con el O_2 y el $\text{O}_2^{\bullet -}$ formando NO_2^\bullet y ONOO^- , respectivamente (Miersch y Mutus, 2005; Ciuffo *et al.*, 2007). A continuación el radical ONOO^- puede descomponerse para producir más especies reactivas tales como el OH^\bullet y el NO_2^\bullet o dismutarse generando NO_2^- y NO_3^- (Schopfer *et al.*, 2003; Ciuffo *et al.*, 2007), propiedad que se aprovechará en este trabajo para la determinación indirecta del NO. Además, el radical NO^\bullet puede autooxidarse produciendo las RNS anhídrido nitroso (N_2O_3) y NO_2^\bullet (Miersch y Mutus, 2005; Bove y van der Vliet, 2006).

Por otro lado, se sabe que los macrófagos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos están armados con mecanismos tanto dependientes como independientes del oxígeno para combatir a las bacterias (Halliwell y Gutteridge, 1984). Uno de los mecanismos dependientes del oxígeno involucra un sistema que genera ROS. Una vez que el microorganismo ha sido internalizado en la célula, la enzima NADPH oxidasa (localizada en la membrana plasmática del leucocito) convierte el O_2 contenido en el tejido circundante

en $O_2^{\cdot-}$. A continuación el $O_2^{\cdot-}$ se convierte de manera espontánea en H_2O_2 (Leonard *et al.*, 2004). Los iones superóxido que se escapan del fagolisosoma se convierten en peróxido de hidrógeno por acción de la enzima superóxido dismutasa, a la cual nos referiremos más adelante en este mismo capítulo (ver sección 6). Los iones superóxidos producidos por los macrófagos activados se pueden combinar con el óxido nítrico para formar (además de peroxinitrito) intermediarios que se descomponen y generan el radical altamente reactivo OH^{\cdot} .

Probablemente, la fuente más importante de producción de $O_2^{\cdot-}$ sea la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Si bien la enzima citocromo-oxidasa (citocromo a + a3) libera cantidades no detectables de electrones hacia el O_2 para formar este radical, componentes de la cadena transportadora ubicados anteriormente a la citocromo-oxidasa (complejos I y III) liberan un porcentaje mucho mayor de electrones (estimado en un 5 % del total consumido) para producir $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell y Gutteridge, 1999; Boonstra y Post, 2004). El complejo de la citocromo-oxidasa se satura a bajas tensiones de O_2 , mientras que los restantes complejos que contribuyen en la formación de $O_2^{\cdot-}$ incrementan la liberación de electrones para formar este radical a medida que aumenta la tensión de O_2 . Se ha sugerido que en condiciones fisiológicas de presión parcial de O_2 , entre el 1 y el 3 % del mismo se reduce a $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria (Halliwell y Gutteridge, 1999) y un dos por ciento a otros ROS. De hecho, muchas teorías acerca del mecanismo de envejecimiento descansan en la generación de ROS incrementada con el tiempo de vida.

También se ha demostrado que la fracción microsomal de varios tejidos puede producir ROS ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) cuando se la incuba con NADPH, y que esta producción aumenta con el incremento de O_2 . Este ROS es generado por un lado a partir de los integrantes del sistema del citocromo P450 o CYP, a través de dos vías. En primer lugar, los intermediarios del ciclo catalítico pueden ser desviados hacia un camino donde el O_2 es reducido a $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ en lugar de ser llevados hacia el sustrato correspondiente. En segundo lugar, los electrones escapan al O_2 desde la flavinas en el sistema NADPH-P450 reduciendo en forma incompleta al oxígeno (que es el segundo sustrato) y generando así especies radicalarias.

Por otro lado, en el retículo endoplasmático de las células hepáticas se encuentran las enzimas desaturasas (que introducen dobles enlaces en los ácidos grasos) las cuales también generan $O_2^{\cdot-}$. Estas enzimas requieren para su funcionamiento O_2 , NADH o NADPH, y citocromo b_5 . En este sistema los electrones son transferidos normalmente desde el NAD(P)H al citocromo b_5 , el cual luego los cede a las enzimas desaturantes. Sin

embargo, tanto el citocromo b_5 como la flavoproteína pueden liberar electrones usando como aceptor al O_2 para producir $O_2^{\cdot-}$.

Una última fuente endógena de ROS se localiza en la reacción catalizada por la enzima xantino oxidasa (XO). Esta enzima forma parte de un grupo denominado molibdeno/hierro-sulfuro-flavinhidroxilasas que catalizan la hidroxilación de purinas y compuestos relacionados (Valko *et al.*, 2006). En particular la XO cataliza la transformación de hipoxantina a xantina, y de xantina a ácido úrico, por lo que se trata de un proceso que además de ubicuo es sumamente activo en los mamíferos. En ambos pasos, el O_2 es reducido en un primer momento a $O_2^{\cdot-}$ para luego ser convertido en H_2O_2 (Valko *et al.*, 2006).

En suma, cualquier sistema biológico que produzca $O_2^{\cdot-}$ va a generar H_2O_2 por dismutación del mismo (ver sección 6). De hecho, los peroxisomas son las principales organelas productoras de H_2O_2 en las células en condiciones fisiológicas y al mismo tiempo la sede principal de la actividad catalásica que se encarga de neutralizarlo (Valko *et al.*, 2006).

4 – Estrés oxidativo

4.1 Concepto de estrés oxidativo-nitrativo

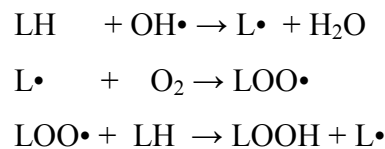
Se denomina estrés oxidativo-nitrativo, al desbalance existente entre la producción de ROS y RNS y el sistema de defensa antioxidante (SDA) con acumulación de radicales libres y especies no radicalarias altamente reactivas. Como mencionamos anteriormente, en condiciones celulares normales o fisiológicas existe una producción basal de especies radicalarias la cual es constantemente contrarrestada por el SDA. Cuando se generan más especies reactivas de las que el organismo puede combatir se genera un estado de estrés que por extensión puede abarcar a RNS además de ROS.

4.2 Daños ejercidos por los radicales libres

Una de las consecuencias características del exceso de ROS es la peroxidación de lípidos de membrana que produce cambios en la fluidez y permeabilidad de la misma y obviamente en la totalidad de sus propiedades funcionales (Gaetke y Chow, 2003). El proceso de peroxidación lipídica consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación que resultan ya ampliamente conocidas (Hallywell y Gutteridge, 1999). Los productos finales de la peroxidación lipídica son mayoritariamente el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Estos, y otros productos de fractura aldehídica y

cadena carbonada corta, son detectados y cuantificados a través de una variedad de metodologías dentro de las cuales la reacción con ácido tiobarbitúrico es el método más reconocido y más profusamente empleado en la literatura internacional. Por esa razón aprovecharemos esta metodología para estimar el daño a lípidos mediante la determinación de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).

El proceso de peroxidación lipídica actúa principalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y comienza generalmente con la extracción de un átomo de hidrógeno del carbono metilénico por alguna especie reactiva (ej: OH[•]). En condiciones aeróbicas se forma, a partir del PUFA sin el hidrógeno y con un electrón desapareado, un radical peroxilo (Gupte y Mumper, 2009) de acuerdo con el esquema reaccional siguiente:



LH: PUFA; L[•]: radical alcoxilo; LOOH: hidroperóxido lipídico

Los peróxidos, tanto los orgánicos como el mismo peróxido de hidrógeno, son especies inestables cuya reactividad va a estar determinada por su grupo R. El radical peróxido más simple es el dioxihidroperóxido (HOO[•]), que es el ácido conjugado del ión O₂^{•-}. Además de la mayoritaria influencia del grupo R, la química de este tipo de moléculas va a estar dada por el ambiente en el que se forman y por la concentración de oxígeno disuelto en el medio además de otros reactivos (Valko *et al.*, 2006). Esto los hace sumamente interesantes ya que pueden participar en una gran variedad de reacciones biológicas. Los radicales peróxidos están involucrados en el clivaje del ADN y la modificación de la estructura de las proteínas, además de aumentar sinérgicamente la inducción del daño al ADN por parte de los iones O₂^{•-}. La medición y detección de peróxidos lipídicos es la forma más empleada para evidenciar la implicancia de los radicales peróxidos en las toxicosis y otras enfermedades humanas (Valko *et al.*, 2006). A su vez, es sabido que el radical OH[•] reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN produciendo daños a nivel de las bases, de la pentosa, y también alteraciones de la conformación estructural de la molécula. Este daño al ADN resulta en un arresto celular o una inducción de la transcripción de ciertos genes, activación de vías de señalización vinculadas a la supervivencia celular, errores en la replicación e inestabilidad génica. Todas estas consecuencias están íntimamente asociadas con los efectos citotóxicos y con la

proliferación y carcinogénesis (Valko *et al.*, 2006). Las RNS, como el ONOO⁻ y el NO[•], también están implicadas en el daño al ADN. Se ha demostrado que el ONOO⁻ reacciona con la guanina formando 8-nitroguanina que debido a su estructura espacial es capaz de generar transversiones G:C → T:A (Hussain *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2006). A pesar de que la estabilidad de estas lesiones en el ADN es baja, en el ARN este aducto con el nitrógeno es de larga vida media. A su vez, el ONOO⁻ y otras RNS relacionadas pueden nitrar los residuos tirosina de distintas proteínas.

Los carbonilos proteicos (CPs) se hallan asociados al daño a proteínas de la misma forma que TBARS son marcadores del ataque a lípidos (Davydov *et al.*, 2004; Suji y Sivakami, 2008). Se trata de productos de la peroxidación de las cadenas laterales de restos de aminoácidos y químicamente son un grupo amplio caracterizado por la presencia de grupos oxo o ceto (>C=O). Estas moléculas son estables, lo que las hace excelentes biomarcadores para la detección de daño pro-oxidativo a péptidos y prótidos en general (Dalle-Donne *et al.*, 2003). La carbonilación resultaría del ataque nucleofílico a residuos laterales Cys, His y Lys principalmente, y sus derivados pueden ser luego incorporados en los productos aldehídicos finales de la peroxidación lipídica (HNE), o resultar en derivados carbonílicos reactivos generados como consecuencia de la reducción de azúcares (Dalle-Donne *et al.*, 2003). El contenido de CPs determinado como derivados fenilhidrazónicos es actualmente el método más empleado internacionalmente para cuantificar oxidación proteica. Su uso como indicador de la presencia de estrés oxidativo con daño a proteínas tiene algunas ventajas respecto de las determinaciones de TBARS como marcadores de peroxidación lipídica. Los CPs son degradados por las células al cabo de horas/días, mientras que muchos de los productos de peroxidación lipídica son detoxificados en cuestión de minutos si es que el SDA opera en forma óptima.

Los mecanismos anteriormente mencionados, que afectan a los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, no tienen el mismo impacto según sea el tejido en cuestión. Por ejemplo, los pulmones son muy vulnerables a los daños oxidativos debido a su localización, anatomía, alta presión parcial de oxígeno y a su particular fisiología. El epitelio pulmonar se encuentra constantemente expuesto a agentes oxidantes endógenos generados como parte del propio metabolismo y de procedencia exógena (humo del cigarrillo, contaminantes atmosféricos de origen industrial o exposición a químicos por causa profesional o accidental). Además, están en contacto directo con el O₂ inhalado haciendo que las células pulmonares sean el primer blanco para la inducción de daño causado por este gas. Por este motivo, los tejidos pulmonares están eficientemente

protegidos por un fluido epitelial que posee pequeñas moléculas antioxidantes, como GSH, vitamina E, C, β -carotenos (Rahman *et al.*, 2006), enzimas del SDA y otras relacionadas al metabolismo del Cu como la misma CRP. Además, expresan proteínas enriquecidas con grupos tioles (tioredoxinas) y actividades de tioredoxina-reductasas y glutaredoxinas, entre otras. Estas proteínas serían las responsables de mantener el estado redox tisular dentro de las cotas fisiológicas (Kinnula *et al.*, 2004).

En todos los tejidos, pero en especial en el pulmonar, cuando la concentración de NO^{\bullet} es muy elevada, éste compite con el O_2 por su entrada al complejo IV (citocromo-c-oxidasa) de la cadena respiratoria generando un estado de hipoxia metabólica. Asimismo, se puede observar una sobrecarga de producción de ROS en los pulmones cuando se acumulan células inflamatorias (principalmente macrófagos y neutrófilos) (Rahman *et al.*, 2006). Estas células se caracterizan por una producción exagerada $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} en pacientes con asma, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), fibrosis idiopática, etc (Wallaert *et al.*, 1990; Crystal, 1991). Se ha sugerido que las reacciones de los radicales libres contribuyen de este modo a la fibrogénesis que caracteriza a estas patologías de manera directa o a través de la respuesta inflamatoria crónica (Poli y Parola, 1997). Numerosas citoquinas y factores de crecimiento involucrados en la activación de estas células inflamatorias y en la patogénesis de la fibrosis pulmonar están reguladas de manera directa o indirecta por ROS (Rahman *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha visto que existe un aumento en la concentración de la enzima NOS en las fibrosis pulmonares (Saleh *et al.*, 1997) y un aumento de la expresión de iNOS durante la formación *in vitro* e *in vivo* de granulomas (Tsuji *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 1996; Facchetti *et al.*, 1998). Se piensa además, que los ROS son los responsables de la inducción del EPOC en fumadores (Rahman y MacNee, 1996). A pesar que los tratamientos con GSH o N-acetil-L-cisteína incrementan los niveles de cisteína y GSH, no está claro si estos tratamientos tienen un efecto favorable en la prevención de la enfermedad y de la fibrogénesis (Meyer *et al.*, 1995; Buhl *et al.*, 1996; Rahman y MacNee, 1996), lo cual nos lleva otra vez a sopesar la enorme importancia protectora que reviste el buen funcionamiento del SDA en todos sus constituyentes.

El cerebro es especialmente vulnerable al nivel de ROS por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los cuales son blanco fácil para la peroxidación lipídica. A su vez, presenta poca actividad de SOD, CAT y GPx, en comparación con otros órganos (Pastore *et al.*, 2003). La defensa primaria del cerebro está mediada por el GSH, cuya concentración depende de la disponibilidad de cisteína y del precursor CysGly

sintetizado por la astrogliá. Kannan *et al* (1999) demostraron que existe cierta incorporación del GSH hacia el cerebro desde la sangre, pero la tasa de suministro no alcanzaría para satisfacer apropiadamente la demanda endógena del SNC por lo que la astrogliá parecería ser la responsable final del nivel de GSH en las neuronas. Otros vitámeros antioxidantes estarían también en baja concentración y la presencia de metales de transición, como el cobre y el hierro, agravaría la precaria condición antioxidante de estos tejidos que se ven sometidos constantemente al embate de reacciones tipo Fenton catalizadas por los cationes de estos metales.

Además del pulmonar, otro tejido que será específicamente estudiado en este trabajo de tesis es el hepático por encontrarse primariamente involucrado en el metabolismo de xenobióticos. Se sabe que el metabolismo de un xenobiótico puede resultar en daños aún mayores que los infringidos por el compuesto a depurar. Desde este punto de vista el hígado resultaría ser el órgano con mayor chance de exposición debido a su condición de filtro primario en el sistema circulatorio. Algo similar sucede con el tracto gastrointestinal por su exposición directa luego de la ingesta. En el caso específico de la sobrecarga por cobre, el intestino delgado está especialmente expuesto y lleva a cabo el rol primario de la captación y homeostasis del metal.

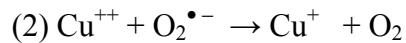
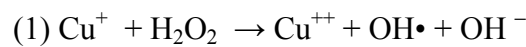
Por lo tanto, la hepatotoxicidad será un marcador muy importante en la evaluación del efecto por sobre-exposición al metal. Por otro lado, el hígado es sin duda el tejido que mejor soporta tanto una sobrecarga de cobre como una situación de estrés pro-oxidativo de cualquier origen por tener altas actividades específicas de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (CAT, GT, GR, GPx, entre otras). Además, produce grandes cantidades de GSH exportable al plasma y al resto de los tejidos, y es capaz de empaquetar en lipoproteínas a los antioxidantes liposolubles obtenidos de la dieta. Recordemos que este órgano funciona como un filtro de primera línea en la depuración y metabolismo del exceso de cobre.

En otra parte de nuestro modelo experimental la sobrecarga de cobre se hará efectiva en ratas por vía oral. En otro de los diseños experimentales, emplearemos sobrecarga por inyección i.p, y en este caso, el cobre se dirigirá al parénquima hepático post-absorción mesentérica vía sistema porta. La inyección i.p funcionaría evitando las variables de absorción inter-especie e inter-individuo que podrían estropear la reproducibilidad de los resultados, y de esta forma opera *bypassando* los mecanismos de regulación de captación a nivel epitelial que sólo estarían presentes en la exposición oral al metal. Con este recurso se puede ponderar el efecto del intestino en la homeostasis del cobre bajo sobrecarga.

5- Mecanismos de la toxicosis por cobre

5.1 Generalidades

Los mecanismos subyacentes a los efectos de intoxicación por Cu en humanos no son muy comprendidos. El Cu es un metal de transición que, al igual que el resto de este tipo de metales (excepto el Zn), tiene electrones desapareados en sus orbitales externos. Por este motivo es que estos metales pueden ser considerados radicales libres. El Cu, al igual que el hierro puede participar en las reacciones tipo Fenton (1) y Häber-Weiss (2) produciendo ROS:



Es sabido que las sales de Cu^+ reaccionan con el H_2O_2 con mayor eficiencia que el Fe^{++} (Halliwell y Gutteridge, 1984). De modo que el principal mecanismo de toxicosis mediada por cobre puede descansar en su habilidad para provocar sobreproducción de ROS y subsecuente daño pro-oxidativo a lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Miersch y Mutus (2005) publicaron que el ión Cu^+ puede oxidar rápidamente los grupos S-nitrosotioles de proteínas, al igual que lo hace el ión cúprico en presencia de GSH, cisteínas o ascorbato. Este hecho es de suma importancia ya que de este modo los iones derivados del Cu pueden interferir con vías de señalización de las cuales las proteínas oxidadas forman parte. En relación a esto, existe amplia evidencia que indica que un aumento de ROS (como consecuencia de la presencia de concentraciones elevadas de iones Cu) puede inducir la autofosforilación de receptores TK (tirosina kinasas) de la membrana plasmática celular (Ostrakhovith *et al.*, 2002). Esta activación del receptor puede provocar a su vez la activación de la vía de PI3K/Akt (*phosphoinositide-3-kinase/Akt*), en donde la PI3K es reclutada hacia la membrana plasmática a través de su dominio SH2. Una vez en la membrana, PI3K fosforila al fosfolípido PIP_2 (inositol-3,4-bifosfato) produciendo PIP_3 (inositol-3,4,5-trifosfato) el cual es necesario para captar proteínas con dominio PH (*pleckstrin homology*), tales como Akt (también llamada proteína-kinasa B, PKB) y PKD1 (proteína-kinasa D1). Por último, PKD fosforila y activa a Akt (Paez y Sellers, 2003), el cual también desencadenará la activación e inhibición de proteínas mediante fosforilaciones. A su vez, es muy interesante observar que el Cu^{++} puede activar de manera directa (ligando independiente) la vía de PI3K/Akt (Ostrakhovith *et al.*, 2002). La

activación de receptores TK por ROS también se relaciona de manera directa con la vía de las MAPK (*mitogen activated proteína kinase*). Muchos investigadores han demostrado que los iones Cu pueden inducir la activación de la vía de las MAPK, en especial incrementando la actividad de ERK (*extracellularly regulated kinase*), como consecuencia de un aumento de ROS (Wu *et al.*, 1999; Nawaz *et al.*, 2006). Si bien la vía de ERK se asocia con proliferación celular, Nawaz *et al* (2006) han demostrado que un aumento en la actividad de ERK conduciría también a un aumento en la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7, además de fosforilar e inactivar a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, conduciendo a una muerte celular programada. En contraposición, Mattie *et al* (2008) no observaron un incremento de la actividad de ERK en células expuestas a Cu, pero si observan una mayor actividad de p38 y JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinase/stress activated proteína kinase*), otras de las vías de transducción de señal en donde intervienen las MAPK que conducen a activar vías de muerte celular programada.

Por todo lo mencionado en los párrafos anteriores podemos notar que queda mucho por dilucidar en cuanto a los efectos pro- o antiapoptóticos de los iones Cu, ya que, si bien comentamos que la vía de las MAPK conduce a la apoptosis, es sabido que como consecuencia de la activación de Akt se fosforilan otras caspasas (como la 9) y la proteína Bad inhibiendo la señal de muerte programada.

A su vez, se sabe que el Cu induce un aumento de la concentración de los iones Ca^{++} en el interior de la célula (Nawaz *et al.*, 2006). Estos incrementos en los niveles de Ca^{++} citosólico conducen a una relocalización hacia la membrana plasmática de cPLA₂ (fosfolipasa A₂ citoplasmática) activando la enzima de manera parcial. La activación total de cPLA₂ se produce sólo por la fosforilación concomitante en residuos serina y es llevada a cabo por distintas proteínas dependiendo del tipo de célula (Hirabayashi *et al.*, 2004). Es importante notar que la fosforilación de cPLA₂ puede ser producida por MAPK (Hirabayashi *et al.*, 2004), cuya actividad puede ser estimulada como mencionamos anteriormente por concentraciones elevadas de iones Cu. Como es sabido, las fosfolipasas A₂ catalizan la hidrólisis y liberación mayormente de ácido araquidónico desde la posición *sn*-2 de glicerofosfolípidos. El ácido araquidónico es luego metabolizado a prostaglandinas por la vía de las ciclooxigenasas, y a leucotrienos por la vía de lipoxigenasas (Hirabayashi *et al.*, 2004). Ambos tipos de derivados lipídicos son reconocidos mediadores de inflamación.

Por otro lado, es ampliamente conocido que la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) aumenta el riesgo aterogénico. La exposición de las LDL a Cu^{++} es

una de las formas más comunes de iniciar esta oxidación *in vitro* (Steinberg, 1997). Si bien la relevancia de estos iones en la iniciación de la oxidación de las LDL *in vivo* no es del todo clara, es posible que en ausencia de agentes quelantes el Cu^{++} sea reducido a Cu^+ convirtiendo a los hidroperóxidos en radicales alcoxilos (Gaetke y Chow, 2003). En ausencia de hidroperóxidos, la oxidación sería iniciada por los radicales OH^\bullet generados a partir de la reducción del O_2 por el Cu^+ (Burkitt, 2001). Los iones Cu^{++} se pueden unir a un número finito de sitios en la molécula de LDL que corresponden a residuos histidina de las apolipoproteínas B-100 (Perugini *et al.*, 1998; Gaetke y Chow, 2003). Perugini *et al.* (1997, 1998) publicaron la formación de un aumento progresivo de TBARS en LDL humanas aisladas, producto de la oxidación de los PUFAs por reducción de Cu^{++} a Cu^+ .

El aumento de ROS y la peroxidación de LDL pueden desencadenar estímulos pro-inflamatorios induciendo cambios en el fenotipo de las células endoteliales. Estos cambios permiten el paso de partículas de LDL modificadas y de ciertas estirpes de leucocitos a través de la barrera endotelial, atrapándolos en el espacio sub-endotelial. Los depósitos sub-endoteliales así formados estimulan la entrada de macrófagos, linfocitos CDn entre otros, y la liberación de enzimas como la mieloperoxidasa y la iNOS induciendo la formación de ROS/RNS con generación subsiguiente de peroxinitrito. De este modo, se forman mayores cantidades de LDL oxidadas (LDLox) las cuales pierden su capacidad de unirse a receptores de LDL en las superficie celular (Silverstein, 2009). A su vez, las LDLox presentan afinidad por una familia de receptores expresados en los macrófagos, llamados *receptores scavenger* que reconocen e internalizan las LDLox. Los cambios provocados por esta señal extracelular hacen que los macrófagos acumulen grandes cantidades de colesterol y otros lípidos. Luego de un período prolongado, los macrófagos se habrán transformado en células espumosas integrantes de una estructura compleja denominada “placa aterogénica”. Uno de los receptores *scavenger* más estudiados es el CD36 el cual se encuentra presente, además de macrófagos, en células dendríticas, células endoteliales de los capilares y plaquetas (Silverstein, 2009). Se cree que la incorporación de LDLox en las plaquetas es la que provoca la activación y agregación de las mismas (Silverstein, 2009). CD36 además de reconocer a las LDLox, reconoce también moléculas de fosfatidilserina presentes en la cara externa de la membrana plasmática en células apoptóticas. Además, se sabe desde hace tiempo que el cobre puede asimismo incrementar el nivel de colesterol LDL contribuyendo al desarrollo de la aterogénesis (Ferns *et al.*, 1997). Estos eventos, especialmente los que llevarían a la formación de células espumosas

y a la modificación y agregación plaquetaria son sin duda factores pro-trombogénicos relevantes.

Por otro lado, Mazière *et al* (1997) demostraron que las LDLox inducen un aumento de la unión de AP1 al ADN de fibroblastos. Los sitios de unión a AP1 en el ADN son muy importantes en la regulación de la transcripción de citoquinas involucradas en procesos inflamatorios como el TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), IL1 β (interleuquina 1- β), y además son sitios importantes de regulación de la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y diferenciación celular (Mazière *et al.*, 1997). De modo que la etiopatogénesis de la aterosclerosis se encuentra íntimamente relacionada con mecanismos asociados a la inflamación y proliferación compensatoria de fibroblastos.

Por todo lo referido anteriormente, se cree que una de las vías por las que los iones Cu ejercen su efecto tóxico es produciendo un aumento del estrés oxidativo en múltiples tejidos del organismo. Por otro lado, también provocan una marcada perturbación del sistema endócrino (Banerjee *et al.*, 1999; Green-Ruiz y Páez-Osuna, 2001; Prakasam *et al.*, 2001; Ranjbar *et al.*, 2002; Gaetke y Chow, 2003; Ranjbar *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2006; Jia y Misra, 2007; López *et al.*, 2007; Lukaszewicz-Hussain, 2008; Muniz *et al.*, 2008; Astiz *et al.*, 2009). Uno de los mecanismos de los iones Cu para interferir con el normal funcionamiento del sistema endócrino es desplazando de sus posiciones naturales a otros metales que actúan como cofactores, modificando de esta forma la funcionalidad de muchas proteínas transportadoras, receptoras y enzimáticas. Esto ocurre por ejemplo con la estructura de los denominados *dedos de Zn* que posee la proteína receptora de estrógenos y de otros esteroides para unirse al sitio aceptor sobre el ADN. Cuando existe un aumento de Cu en relación al Zn, este último es reemplazado por el Cu haciendo que el receptor pierda su función específica o la modifique (Predki y Sarkar, 1992; Ziyatdinova *et al.*, 2006).

Además de los mecanismos antes mencionados, se sabe desde hace muchos años que el cobre tiene efectos como inmunosupresor (Pocino *et al.*, 1991; Bumgardner *et al.*, 1993; Massie *et al.*, 1993; Wataha *et al.*, 2002). Se han publicado trabajos que demuestran una disminución de la respuesta inmune humoral en ratas tratadas de forma sub-crónica con Cupravit®, un fungicida a base de Cu (Elsabbagh y El - Tawil, 2000), y en un experimento muy controlado realizado en humanos, se ha descrito que el cobre incrementa los niveles de interleuquinas pro-inflamatorias (como la IL-6) y disminuye la respuesta a la sensibilización con la cepa Beijing de la influenza humana (Turnlund *et al.*, 2004).

También está ampliamente demostrado que el cobre tiene importantes efectos como agente citotóxico y genotóxico desarrollando un indudable papel en la etiopatogénesis de las neoplasias (Burrell, 1993). Este último mecanismo descansa en la producción de daño en la estructura molecular del ADN por vía indirecta (ROS) o directamente por formación de complejos con grupos funcionales de las bases nitrogenadas que las modifican introduciendo mutaciones, o dificultando el proceso de reparación de errores (Irons *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2003; Letelier *et al.*, 2005).

De modo que queda mucho por investigar sobre el mecanismo por el cual el cobre provoca toxicosis aguda o crónica, aunque parecería estar definitivamente aceptado que al menos el estrés oxidativo-nitrativo inducido por este metal juega un papel esencial en el proceso fisiopatológico de sus múltiples efectos deletéreos.

5.2 Poblaciones en riesgo de sufrir toxicosis crónica por cobre

5.2.1 Mujeres portadoras de dispositivos intrauterinos a base de cobre (TCu-DIUs)

Debido a que los dispositivos intrauterinos del tipo TCu se han asociado al incremento crónico del nivel de este metal en sangre, las mujeres usuarias de DIUs serán especialmente estudiadas en este trabajo de Tesis.

Los dispositivos intrauterinos a base de cobre (Cu-DIUs), constituyen una amplia familia de dispositivos fabricados desde principios de los '70, utilizados por más de 150 millones de mujeres en el mundo (Nelson, 2007; Sivin, 2007; Hubacher *et al.*, 2009). Los DIUs son sumamente eficaces para evitar el embarazo; sin embargo y, al igual que cualquier otro método anticonceptivo, pueden causar efectos secundarios graves como el embarazo ectópico o la enfermedad inflamatoria pelviana, anemia, o síntomas molestos como dolor y pérdida profusa de sangre (Sivin, 2007). Hoy en día existen en el mercado varios dispositivos con partes recubiertas de Cu. El *Copper-7*, la *V de Shanghai*, y los modelos *T* de cobre fabricados en varios formatos tales como *TCu-200*, *TCu-220* y *TCu-380A*, y aquellos que conllevan un fino alambre de plata en el centro (*TNova*, *TCu-380Ag*), como así también los dispositivos *Multiload*. El número que forma parte de los nombres comerciales de los dispositivos se refiere a la superficie del artefacto recubierto de cobre y expresada en mm².

Los DIUs actúan produciendo reacciones bioquímicas y celulares caracterizadas por cambios en el tejido endometrial (mayor permeabilidad vascular, edema, infiltración del estroma con leucocitos, neutrófilos, otras células mononucleares y macrófagos activados). Estas reacciones se deben a la presencia del cuerpo extraño y hacen que el

endometrio no sea un sitio propicio para la implantación del óvulo en el caso que éste sea fecundado. Los DIUs que contienen Cu aumentan la acción anticonceptiva liberando Cu^{++} al medio intrauterino, lo que afecta las enzimas del epitelio endometrial, resulta genotóxico disminuyendo la cantidad de ADN viable de las células del mismo e impide el metabolismo del glucógeno y la absorción de estrógenos por la mucosa uterina (WHO, 1999).

Los iones cúpricos también disminuyen la motilidad espermática, dificultan la reacción acrosomal y aumentan el espesor y la densidad del mucus cervical haciendo que sea más improbable el encuentro entre los espermatozoides y el óvulo. Sumado a todo lo dicho anteriormente, existen investigaciones donde se recuperaron óvulos en distintos segmentos del tracto genital y a distintos tiempos después del período de ovulación en mujeres con Cu-DIUs que muestran severas alteraciones, y mujeres sin el dispositivo. En usuarias del DIU, los estudios indican una ausencia casi total de óvulos en la cavidad uterina y una menor tasa de recuperación en las trompas de Falopio en comparación con las no usuarias (WHO, 1999). El examen microscópico de los óvulos recuperados en las trompas de las mujeres con TCu-DIU que tuvieron relaciones sexuales durante el período fértil indicó que la mayoría mostraba señales atróficas, mientras que al menos el 50 % de los óvulos de las mujeres *control* mostraron características compatibles con las de un embrión normal. Por lo mencionado antes, es muy poco probable que la eficacia de los DIUs provenga principalmente de su capacidad para interferir la implantación en si misma. Es más probable que ejerzan sus efectos anticonceptivos fuera del útero y que interfieran con diversas etapas del proceso reproductivo que ocurren antes que el óvulo llegue a la cavidad uterina. De modo que parece muy probable que los fluidos del útero y de las trompas se modifiquen por la implantación del DIU y así alteren la viabilidad de ambos gametos reduciendo la posibilidad de su encuentro e impidiendo la fecundación. Los iones cobre liberados por el DIU juegan un papel fundamental en la prosecución de estos efectos y, tal como veremos, el estrés oxidativo-nitrativo es una consecuencia directa de su implanatación.

5.2.2 Otras poblaciones bajo riesgo de sobrecarga por cobre

Como ya hemos mencionado, la industrialización profusa de minerales de cobre y el empleo del metal purificado en múltiples manufacturas (industria del esmaltado, pinturas, aceites sintéticos, agroquímicos, medicamentos, electrónica, etc.) provoca la

exposición de poblaciones específicas de trabajadores involucrados en ellas a altos niveles de cobre y puede ser responsable de toxicosis crónica producida por este metal.

Un caso que será contemplado especialmente en este trabajo de Tesis es el de los fumigadores profesionales que emplean agroquímicos derivados del cobre como agentes fungicidas o micostáticos tópicos en cultivos de cítricos. Hemos encontrado una sola publicación en la literatura internacional en donde, si bien no se determinó el cobre como tal, se investigó el nivel de ceruloplasmina en fumigadores profesionales de una región de la India (Prakasam *et al.*, 2001). De modo que este problema requiere incrementar los esfuerzos por investigar sus consecuencias en un intento por prevenir los daños a la salud de la población y también sentar las bases para fundamentar nuevas regulaciones sobre buenas prácticas agropecuarias.

Otra población que será investigada de modo particular en este trabajo es la integrada por pacientes con afecciones neurodegenerativas ya que se sabe que el cobre está asociado de manera poco clara aún con una mayor incidencia y una mayor prevalencia de estos desórdenes en humanos, y se sostiene que juega un papel central en su etiopatogenia (Markesbery, 1997; Squitti *et al.*, 2002; Squitti *et al.*, 2003; Squitti *et al.*, 2005; Halliwell, 2009). Muchos cuadros de demencia en humanos derivan de repetidos accidentes isquémicos, consecuencia de enfermedad aterogénica de larga data. El cobre está asociado a riesgo cardiovascular y aterogénesis tal como queda claro a partir de extensos y confiables estudios epidemiológicos transversales y longitudinales (Leone *et al.*, 2006; Ghayour-Mobarhan *et al.*, 2008). Parte de la población de pacientes estudiados en este trabajo estuvo conformada por dementes por ACV isquémico o con trastorno cognitivo de base aterogénica.

5.3 Radicales libres inducidos por cobre y muerte celular programada

La apoptosis es un mecanismo irreversible, activo y progresivo de muerte celular por medio del cual las células se disgregan manteniendo un entorno fisiológico prácticamente carente de reacción inflamatoria local, o sistémica (una gran diferencia con la necrosis o necrobiosis). Se trata de un proceso genéticamente muy controlado en el que las células individuales dentro de un tejido mueren en forma selectiva. Estas células presentan características morfológicas únicas producidas como consecuencia de la activación de una cascada de señalización interna.

Durante la apoptosis, la fosfatidilserina (FS) que normalmente se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, es translocada activamente hacia la cara

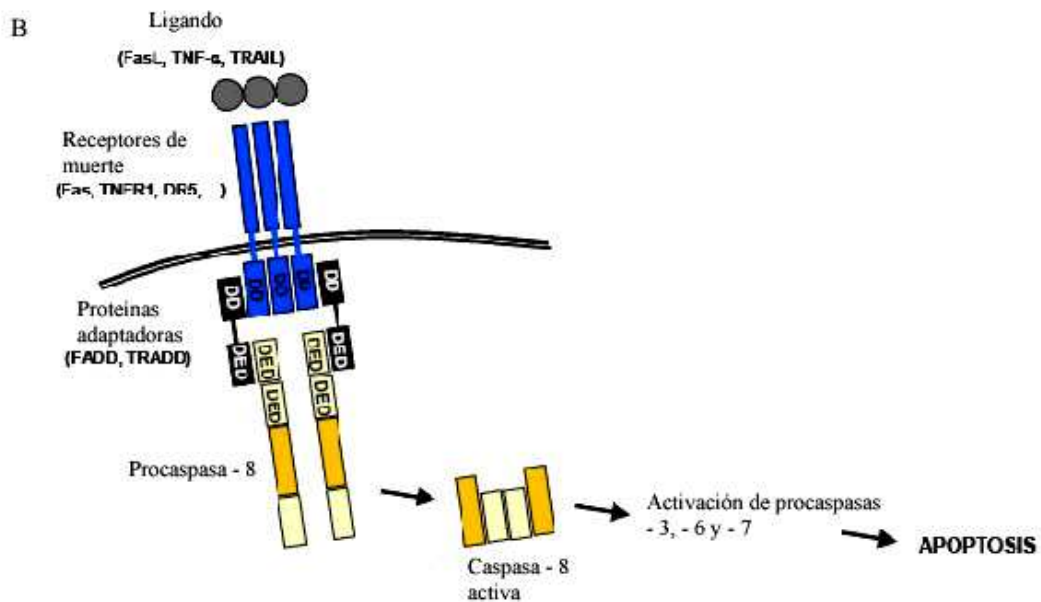
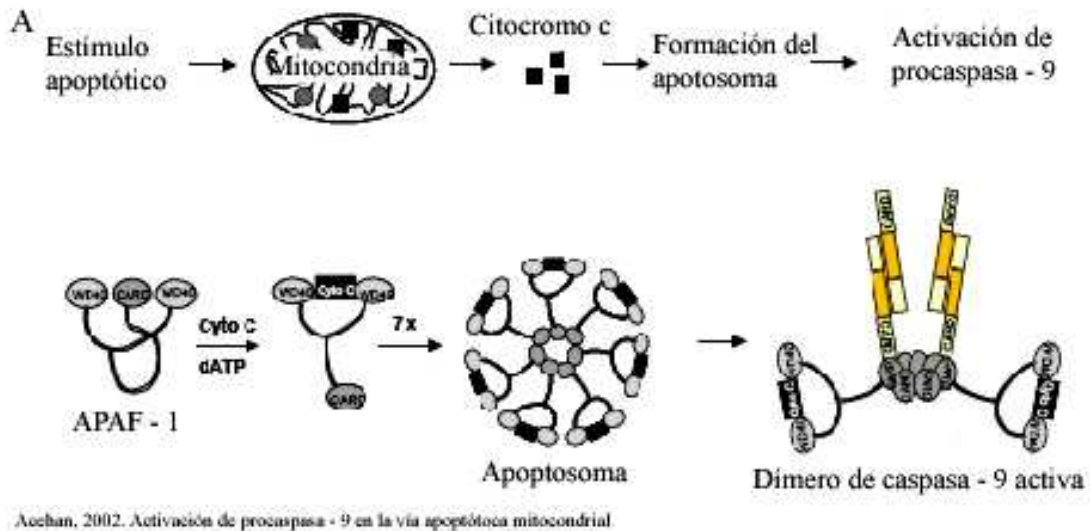
extracelular por enzimas denominadas *flopasas*. De este modo, las células en apoptosis exponen su FS para ser reconocidas y eliminadas por los macrófagos (Allen *et al.*, 1997).

Como ya hemos mencionado, algunos metales de transición dentro de los cuales se encuentra el cobre, son activos generadores de ROS cuando se hallan en exceso, induciendo apoptosis por la vía intrínseca redox-dependiente (Kozlowski *et al.*, 2009). Las alteraciones en la cascada apoptótica pueden desencadenar muchas enfermedades humanas, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes y muchos desórdenes neurodegenerativos.

Desde el punto de vista mecanístico, el proceso de apoptosis está altamente conservado en todas las especies, siendo ejecutado a través de una cascada de activaciones secuenciales que en principio descansa sobre caspasas iniciadoras y efectoras. Las caspasas son una familia de enzimas cisteína proteasas involucradas en este tipo de muerte celular, las cuales son sintetizadas como pro-enzimas (o zimógenos). La procaspasa efectora (procaspasa-3) es activada a caspasa-3 por la caspasa-9 u -8, dependiendo de la vía comprometida (Wang, 2000). La primera de ellas se activa a través de una ruta dependiente de la mitocondria. En esta ruta se libera desde la matriz mitocondrial al citoplasma citocromo-c que se compleja con la proteína APAF-1 (*apoptotic-protease-activating factor 1*) formando un *apoptosoma* el cual luego activará la procaspasa-9, y por último la procaspasa-3 (**Fig. 3A**).

Otra ruta de apoptosis involucra a receptores de muerte celular con dominios expuestos al medio extracelular (FAS, TNF α , entre otros). Estos receptores reclutan proteínas citoplasmáticas adaptadoras (FADD, TRADD, etc), las cuales también poseen dominios de muerte, para luego asociar a procaspasa-8 y activarla (Wang, 2000). Una vez activada la caspasa 8 también es capaz de clivar a la procaspasa-3 para que sea funcional (**Fig. 3B**).

Se cree que el radical NO \cdot ejerce un efecto antiapoptótico nitrosilando los sitios activos de algunas de las integrantes de esta familia de caspasas (Miersch y Mutus, 2005). Por ejemplo, se ha demostrado la nitrosilación de caspasa-3 en linfocitos humanos que expresan NOS (Mannick *et al.*, 1999). La activación de estas enzimas conduce a señales características de muerte celular programada tales como fragmentación del ADN en escalera, condensación de la cromatina y formación de burbujas apoptóticas o *blebs* de membrana plasmática (Mufti *et al.*, 2007).



Aoehan, 2002.

Figura 3: Vías de activación de caspasas. A, vía de activación intrínseca; B, vía extrínseca.

Existen proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que otorgan protección a las células mediante su unión a determinadas caspasas, bloqueando de este modo su función. La XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) es una proteína perteneciente a las IAPs que ha sido muy estudiada, demostrándose que se une tanto a caspasa-9, -3 como a la -7 (Chai *et al.*, 2001). La activación de la cascada apoptótica involucra la inactivación de XIAP mediante su unión a Smac/DIABLO y Omi/HtrA2. Estas dos últimas proteínas son liberadas desde la matriz mitocondrial hacia el citoplasma ante estímulos que comprenden una compleja red de controles interdependientes. Se ha descubierto que XIAP cumple un

rol importante en el metabolismo del Cu ya que se la ha encontrado *in vivo* unida a COMMD1. COMMD1 es una proteína que se une al extremo amino terminal de ATP7B, regulando su función a través de algún mecanismo no dilucidado hasta el momento. A su vez, pertenece a una familia de proteínas COMMD que van desde la 1 a la 10, caracterizadas por la presencia de un dominio en el extremo carboxilo terminal llamado COMM (*copper metabolism gene MURRI*). Aparentemente XIAP actuaría como una ubiquitina-ligasa promoviendo la degradación de COMMD1 (Burstein *et al.*, 2004). La acumulación de Cu intracelular conduciría a propiciar su unión con XIAP, con el consecuente cambio de conformación de la misma. Este cambio conformacional la hace incapaz de inhibir la actividad de las caspasas (Mufti *et al.*, 2006, 2007). La unión de Cu con XIAP no sólo produce un cambio conformacional en XIAP, sino que además disminuye la vida media de la misma. Todo esto favorece un aumento de la susceptibilidad celular hacia agentes estimuladores de la apoptosis.

Existe además otra familia de proteínas llamadas Bcl-2 que incluye proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L, entre otras) y pro-apoptóticas. Los miembros pro-apoptóticos pueden ser divididos en dos grandes grupos: aquellos que poseen múltiples dominios –BH (Bcl-2 homólogos) como Bax y Bak y aquellos con sólo uno de estos dominios (Bid, Bad, Bim, Noxa, PUMA, etc.) (Yin, 2006). Bid es activada en respuesta a estímulos de muerte celular y proteínas tales como caspasas (-8, -2, -10) y calpaínas (m y/o μ), para luego activar a Bax y Bak, quienes inducen la liberación (por medio de la formación de poros) de factores pro-apoptóticos desde la mitocondria (citocromo-c, Smac/DIABLO, APAF-1, etc.).

Un mal funcionamiento mitocondrial ocasionado por un aumento de ROS se relaciona con la inducción de la formación de poros de transición, que aumentan la permeabilidad de la misma y permiten la salida de las proteínas intramitocondriales pro-apoptóticas.

Por otro lado, se ha demostrado que existen otras dos enzimas citoplasmáticas relacionadas con la muerte celular. Si bien las calpaínas fueron descritas como proteasas asociadas a muerte celular por necrosis, hoy se sabe que también se encuentran activadas en la vía apoptótica (Botha *et al.*, 2004). Estas enzimas pertenecen a dos grandes grupos: las microcalpaínas o calpaínas-1 (μ -calpaínas) y las milicalpaínas o calpaínas-2 (m-calpaínas). Difieren en su sensibilidad frente al Ca⁺⁺ pues se activan a concentraciones micro- o mili-molares, respectivamente. Ambas son proteínas heterodiméricas conformadas por una subunidad catalítica y una regulatoria las cuales son codificadas por

distintos genes (Huang y Wang, 2001). Para que estas enzimas sean funcionales tienen que formar un trímero con los aminoácidos Cys-His-Asn de la subunidad catalítica. Cuando no están activadas, el residuo de Cys se encuentra a unos 10 Å de distancia de los residuos His-Asn, por lo cual no pueden formar una tríada catalítica. Huang y Wang (2001) demostraron que en presencia de Ca^{++} se produciría un cambio conformacional que mantendría cerca a estos residuos de manera que puedan formar la tríada catalíticamente activa. Sin embargo, otros autores proponen que frente a concentraciones elevadas de Ca^{++} intracelular se traslocaría la calpaína inactiva desde el citosol a la membrana plasmática para activarse en presencia de fosfolípidos y proteínas de membrana (Ray y Banik, 2003).

Tanto las μ - como las m-calpaínas actúan sobre los mismos sustratos, entre los que se encuentran las proteínas del citoesqueleto, proteínas de membrana, factores de transcripción, proteín-quinasas, fosfatasas, etc. (Ray y Banik, 2003). Las calpaínas se encuentran normalmente inhibidas por la proteína calpastina o calpastatina. Esta proteína posee 4 regiones inhibitorias, cada una capaz de unirse a una molécula de calpaína (Ray y Banik, 2003).

6- Sistema de defensa antioxidante (SDA)

Los efectos de los radicales libres y de las especies radicalarias (ya sean ROS o RNS) son contrarrestados fisiológicamente por la acción de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Se le llama *antioxidante* a cualquier sustancia que previene la formación de agentes oxidantes, secuestrándolos para quitarlos del circuito fisiológico, reduciéndolos y por lo tanto inactivándolos, reparando el daño causado por los mismos una vez que éste ya ha sido producido, o combinando dos o más de estos efectos protectivos (Asikainen y White, 2005). De manera similar, Halliwell y Gutteridge (1999) definen como *antioxidante* a cualquier molécula que estando presente en bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, *detenga o elimine la capacidad pro-oxidante del mismo*. Esta defensa es de suma importancia ya que le otorga a los sistemas biológicos la mínima protección necesaria para llevar adelante una fisiología compatible con la vida.

A continuación describiremos en forma conceptual cuáles son los componentes de las dos fracciones mayoritarias del SDA.

El SDA es una compleja red de componentes *scavengers* (o neutralizadores) de radicales libres integrado por actividades enzimáticas y sustancias cuyo potencial redox y afinidades químicas los habilitan para secuestrar los denominados *propagadores de cadena*. Los principales componentes aparecen en la siguiente lista:

Los componentes más importantes del SDA

(1) Componentes enzimáticos

1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

- Cu/ZnSOD (cytSOD)
- MnSOD (mtSOD)
- (Fe) SOD y (Se) SOD

1.2 Oxido nítrico sintasas (NOS)

- nNOS (I)
- eNOS (III)
- iNOS (II)
- mtNOS

1.3 Catalasa (CAT)

1.4 Glutación peroxidasa (GPx)

1.5 Glutación transferasa (GT)

1.6 Glutación reductasa (GR)

1.7 Hemo-oxigenasa I

1.8 NAD-Diaforasas

1.9 G-6-P Deshidrogenasa

(2) Componentes no enzimáticos

2.1 Proteicos/peptídicos

- Glutación reducido (GSH)
- Ceruloplasmina / Metalotioneínas
- Ferritina
- Transferrina
- Albúmina

2.2 Vitámeros y derivados

2.2.1 Liposolubles

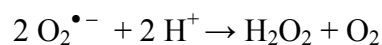
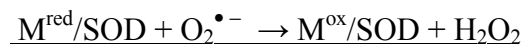
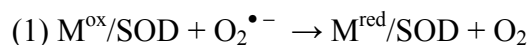
- Tocoferoles
- Tocotrienoles
- Retinoides
- Carotenos y licopenos

2.2.2 Hidrosolubles

- Ascorbato
- Flavonoides conjugados
- Polifenoles, pirogalatos, tanatos
- Luteínas, zeaxantinas, ubiquinoles
- Plasmalógenos
- Bilirrubina
- Uratos
- Oligoelementos (Mn, Se, Zn)

6.1 Componentes enzimáticos

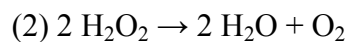
Entre los componentes enzimáticos desarrollados por las células para combatir a los radicales libres se encuentra la enzima SOD (superóxido dismutasa) descubierta en el año 1969 por Mc Cord y Fridovich. La SOD se expresa esencialmente en todas las células del cuerpo. Presenta tres isoformas que, si bien difieren principalmente en la naturaleza del metal que compone el sitio activo de la enzima (Cu, Zn para la citosólica; Fe para la extracelular o EcSOD y Mn para la mitocondrial), poseen un mismo mecanismo de dismutación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (1).



M^{ox} : metal oxidado; M^{red} : metal reducido

La secuencia de aminoácidos de las Cu/ZnSOD es similar entre organismos procariotas y eucariotas. Está formada por dos subunidades, cada una de las cuales posee un átomo de Cu y otro de Zn. La MnSOD que está presente en organismos superiores, posee en general cuatro subunidades que pueden contener entre 0.5 y 1 átomos de Mn cada una. A pesar de la diferencia en el número de metales Mn que pueden presentar, la secuencia de aminoácidos parece conservarse entre todos los organismos. Es sabido que a medida que aumenta la concentración de H₂O₂ las isoenzimas SOD disminuyen su actividad debido a daños en su estructura y especialmente en su sitio catalítico (Rahman *et al.*, 2006), de modo que trabajan en conjunto con otras enzimas que remueven los peróxidos inorgánicos y orgánicos, tales como la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), respectivamente.

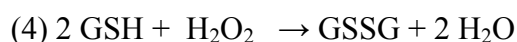
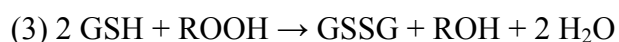
La enzima CAT, descubierta en el año 1900 por Loew, también se expresa en todos los tejidos del cuerpo aunque se encuentran niveles superiores en el hígado, riñones y eritrocitos (Nishikawa *et al.*, 2009). Dentro de las células, esta actividad se concentra especialmente en los peroxisomas y se encarga de catalizar la conversión de H₂O₂ en agua y O₂ (2).



Existe un solo gen ampliamente conservado entre especies que codifica para esta enzima. Si bien está presente en todos los tejidos, hay mayores concentraciones en el hígado, pulmones, riñones y eritrocitos. La CAT está formada por cuatro subunidades cada una de las cuales presenta un grupo *hemo* unido al sitio activo. En humanos se han encontrado mutantes deficientes en esta enzima los cuales se pueden dividir en dos categorías: *acatalasémicos*, cuando la actividad de CAT se encuentra por debajo del 10 % respecto de los valores normales, e *hipo-catalasémicos* cuando la actividad alcanza valores de hasta la mitad de la actividad normal (Nishikawa *et al.*, 2009). Existen varias publicaciones que demuestran disminución de la actividad de SOD y CAT en pacientes con cáncer, en donde a su vez se observa un estado de estrés oxidativo-nitrativo con presencia de elevadas concentraciones de TBARS (Senthil *et al.*, 2004; Beevi *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2007). Sin embargo, este no parecería ser un comportamiento general en células cancerosas ya que Devi *et al* (2000) han publicado un aumento en los niveles de SOD concordantes con concentraciones elevadas de anión O₂^{•-} en pacientes con leucemia comparados con controles sanos.

La enzima GPx también remueve H₂O₂ como la catalasa, pero a diferencia de CAT acopla su reducción a la oxidación de GSH y puede extender su especificidad catalítica hacia otros peróxidos orgánicos. Pertenece a una superfamilia de proteínas selenio (Se)-dependientes llamadas *selenoproteínas*.

En humanos existen cinco isoformas de GPx cuyos sustratos son los peróxidos orgánicos y los inorgánicos, a los cuales descompone a la vez que oxida al GSH (3) y (4).



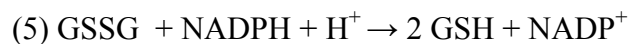
GPx1 es la normalmente llamada sólo *GPx* y es la más sensible a los cambios en los niveles de Se en el medio. Además de la concentración de Se, la enzima es sensible a factores como el estrés oxidativo.

El aumento de la actividad de esta enzima como biomarcador es un tema muy controversial en enfermedades que involucran estrés oxidativo. Existen publicaciones que indican aumentos en los niveles de GPx1 y otras que no encuentran variaciones significativas. Tal es el caso de los asmáticos en donde se observa un claro estado de estrés oxidativo con concomitante aumento de la actividad de GPx1 (Reeves y Hoffmann, 2009). GPx2 es una isoforma expresada mayoritariamente en células del tracto gastrointestinal y en el hígado, mientras que GPx3 es el único miembro de esta familia que es secretado hacia el exterior celular constituyendo aproximadamente el 20 % del Se encontrado en el plasma (Reeves y Hoffmann, 2009). Esta última es producida y liberada a la sangre principalmente por las células que rodean al túbulo proximal y a la cápsula de Bowman en el riñón. También se encuentra en el corazón y en la glándula tiroides. La GPx4 es expresada en varios tejidos y su ubicación dentro de las células puede variar entre el citoplasma, la mitocondria y el núcleo, dependiendo del tipo celular en cuestión. Seiler *et al* (2008) demostraron que la inactivación de GPx4 en el hipocampo produce neurodegeneración debido a un aumento de señales pro-apoptóticas.

Esta enzima además de combatir un aumento del estrés oxidativo en las células, es transformada en estadios tardíos de la espermatogénesis en una proteína estructural de la membrana mitocondrial del espermatozoide. Se asocian bajos valores de GPx4 en los espermatozoides con infertilidad masculina, aunque se cree que esto no se debería a un déficit de Se sino a la presencia de variantes polimórficas (Reeves y Hoffmann, 2009). Por último, se cree que GPx6 sólo se encuentra durante el desarrollo embrionario y en el

epitelio olfatorio en adultos. Esta proteína no ha sido aún caracterizada en cuanto a su función en la célula y su posible relación con enfermedades.

La enzima glutatión reductasa (GR) es otra enzima perteneciente a las selenoproteínas. Es de localización fundamentalmente citoplasmática y contiene flavina-adenina dinucleótido (FAD) en cada una de las dos subunidades que la componen. Consume equivalentes de reducción del NADPH, provenientes principalmente de la ruta de las pentosas fosfato, para convertir al GSSG en GSH (Halliwell y Gutteridge, 1999) (5).



Durante la catálisis, el NADPH reduce al FAD el cual transfiere luego los electrones al puente disulfuro que forman las cisteínas en el GSSG para reducirlo. Al igual que para todas las selenoproteínas, los valores de Se circulantes son importantes en el mantenimiento de su actividad biológica. Sin embargo, se han dado situaciones controversiales en las cuales existe elevada actividad de selenoproteínas con niveles plasmáticos de Se disminuídos (Arteel y Sies, 2001). Esta situación se ha interpretado como una inducción de la actividad de estas enzimas frente a una situación de estrés oxidativo, con el fin de neutralizar el exceso de especies reactivas.

Otra enzima de defensa antioxidante y glutatión-dependiente es la glutatión transferasa (GT). Esta enzima, presente en relación con la membrana de algunas organelas o en el citoplasma, forma parte de la familia de enzimas detoxificadoras de fase II y cataliza la conjugación del GSH con numerosos xenobióticos. Los productos conjugados pueden ser excretados a través de la bilis, o pueden ser convertidos en ácido mercaptúrico (u otros compuestos) en el riñón y ser eliminados por la orina (Kim y Lee, 2007).

El aumento de la expresión de esta enzima frente a agentes tóxicos no sólo representa una forma de detoxificación celular, sino también una forma de prevenir ciertos tipos de cáncer. Esto fue demostrado por Smith *et al* (1977), quienes publicaron que una disminución de GT aumentaba la genotoxicidad de ciertos químicos xenobióticos en los hepatocitos. A su vez, GT juega un rol importante en la regulación de la señalización intracelular asociándose con ciertas kinasas involucradas en la respuesta celular al estrés, apoptosis y proliferación. Un ejemplo de este mecanismo es la inhibición de JNK (*c-Jun aminoterminal kinase*) por GT. JNK es una kinasa activada en respuesta al estrés oxidativo e implicada en la señalización pro-apoptótica. En condiciones fisiológicas o normales, la actividad catalítica de JNK se mantiene en niveles muy bajos gracias a su unión con GT.

En cambio, bajo condiciones de estrés oxidativo JNK es *glutathionilada* por GT quedando libre y activa (Townsend y Tew, 2003). Se sabe fehacientemente que la expresión de GT está regulada por el estado redox celular. En situaciones de estrés aumenta la unión del factor de transcripción Nrf2 a las secuencias de los *elementos de respuesta antioxidantes* (ARE) en el ADN, incrementando de este modo la expresión de GT (Kim y Lee, 2007). De modo que se la considera un *sensor* capaz de transmitir las variaciones redox a la maquinaria pro-apoptótica (Adler *et al.*, 1999). Si bien en las reacciones catalizadas por GPx y GR el glutatión es reciclado por la GT, la reposición de GSH por esta vía resulta insuficiente en situaciones de estrés oxidativo. Por esta razón, para mantener su concentración intracelular es necesario que se sintetice nuevo GSH. Las enzimas dependientes de glutatión aumentan su síntesis en respuesta a los ARE, los cuales son a su vez estimulados por diferentes mediadores del estrés oxidativo (Pastore *et al.*, 2003).

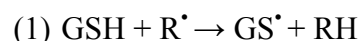
6.2 Componentes no enzimáticos

6.2.1 Antioxidantes hidrofílicos

Se trata de un grupo muy amplio de sustancias de origen natural o de semisíntesis, entre las cuales sólo haremos referencia al glutatión y al ascorbato debido a sus indudables roles protagónicos dentro del sistema de defensa antioxidante en mamíferos.

Glutatión

El glutatión (L- γ -glutamyl-L-cisteinglicina) es considerado el *buffer* redox de las células. Es el antioxidante hidrosoluble más abundante en el núcleo (3-5 mM), el citosol (1-10 mM) y la mitocondria (3-15 mM). Este antioxidante, mantiene especialmente el estado redox de los grupos sulfhidrilos de las proteínas. Las proteínas oxidadas reaccionan con el GSH formando un complejo entre ambos (proteína-SSG), que luego es reducido por la GT (ver ítem 6.1) y otras enzimas como la glutaredoxina y la tioredoxina. De esta manera se restauran los grupos -SH de las proteínas. La reacción del GSH con los radicales libres ocurre de la siguiente manera (1):



El radical sulfuro GS^{\bullet} generado se dimeriza y forma glutatión oxidado (GSSG) (2):



Ante una situación pro-oxidativa el GSSG se acumula dentro de las células. La relación GSH/GSSG se utiliza entonces como un biomarcador confiable y muy sensible del estado redox celular (Pastore *et al.*, 2003).

El glutatión también participa en reacciones de trans-hidrogenación involucradas en la formación y mantenimiento de los grupos –SH de otras moléculas como la coenzima A, varias enzimas y proteínas. Además, juega un rol importante en la detoxificación de una gran cantidad de xenobióticos con los cuales se conjuga para que luego sean excretados por vía urinaria o fecal en forma de ácidos mercaptúricos (Pastore *et al.*, 2003).

El GSH también es capaz de reducir a los radicales ascorbilo y tocoferilo, devolviéndolos a sus formas de vitámeros activos. Esta capacidad está específicamente determinada por el estado redox del par GSSG/2GSH. Los valores de su potencial de reducción dependen tanto de la relación GSH/GSSG como de la concentración *absoluta* de GSH, teniendo una relación directamente proporcional con esta última variable. La exposición a ROS/RNS, o compuestos capaces de generar ROS (como el HNE), pueden incrementar la concentración de GSH estimulando su biosíntesis a nivel genómico por regulación transcripcional de la expresión de γ -glutamyl-cisteinil-sintetasa (la enzima que controla la biosíntesis del tripéptido). Por otro lado, el GSH *per se* puede actuar como quelante de iones Cu disminuyendo así su capacidad de producir radicales libres.

Por último, cabe remarcar que la función antioxidante principal del glutatión consiste en su rol como componente de las rutas enzimáticas desarrolladas para combatir la sobreproducción de ROS en donde participan activamente las enzimas GPx y GR.

Vitamina C

La vitamina C (ascorbato, ácido ascórbico) actúa como cofactor de muchas enzimas entre las que se destacan la prolina-hidroxilasa y lisina-hidroxilasa, involucradas en la biosíntesis del colágeno. Por esta razón es importante para el mantenimiento del tejido conjuntivo y la cicatrización de heridas, o en los procesos de reparación tisular en general. La carencia de vitamina C se asocia con enfermedades como el escorbuto y la fragilidad en las paredes de los vasos sanguíneos. También ayuda a la absorción del hierro en el estómago al reducirlo a su estado ferroso, y favorece la utilización del ácido fólico ayudando a la conversión del folato en tetrahidrofolato. Las plantas y muchos animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos y otros primates carecemos de la enzima gulonolactona-oxidasa necesaria para la transformación de L-gulono- γ -lactona

en L-ascorbato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Por este motivo, debemos incorporarla a partir de la dieta.

Desde el punto de vista estructural, esta molécula tiene dos grupos hidroxilos ionizables, razón por la cual se comporta como un diácido (AscH_2). A pH fisiológico, el 99 % de la vitamina C se encuentra como AscH^- (el 0.05 % como AscH_2 y el 0.04 % como Asc^{2-}). AscH^- reacciona con los radicales cediéndoles su electrón. De esta manera se genera el radical libre *ascorbilo* ($\text{Asc}^{\bullet-}$) que presenta muy poca reactividad.

A pesar de su importancia como antioxidante, un consumo excesivo de vitamina C conlleva ciertos riesgos como la disminución de la actividad biológica de la vitamina B12 en el intestino (Zadák *et al.*, 2009). Resulta interesante señalar que cierta evidencia experimental indica que la vitamina C poseería efectos mutagénicos, sobre todo en presencia de metales de transición (tales como el Cu^{++} y Fe^{++}) (Odin, 1997). Por otro lado, el consumo excesivo de ascorbato puede causar daño renal por formación de litiasis mixta de oxalato y ascorbato cálcico, y se cree que en ciertas condiciones nutricionales puede ser pro-oxidante en lugar de antioxidante, dependiendo del nivel de otros compuestos reductores y oligonutrientes presentes en la dieta.

6.2.2 Antioxidantes lipofílicos

También es un grupo integrado por una gran cantidad de compuestos con dispares estructuras químicas, capacidades antioxidantes y rangos efectivos de protección. Se destaca el α -tocoferol por ser el de mayor incumbencia fisiológica en mamíferos superiores tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

Vitamina E

Esta molécula está presente en la naturaleza bajo diferentes formas, entre las cuales, el α -tocoferol es el vitámero más activo en humanos. Es considerado el antioxidante lipofílico primordial empleado por las células y se obtiene a partir de la dieta (aceites vegetales y granos integrales, principalmente). Al ser liposoluble es fácilmente absorbido en el lumen intestinal. Se dispone entre los lípidos de las bicapas de las biomembranas a las cuales protege frente al ataque por ROS/RNS. A pesar de su afinidad por los tejidos grasos y de generar depósitos en tejidos de lento recambio (cerebro, cerebelo, suprarrenales, pániculo adiposo periférico y visceral, ovarios y testículos) no se han registrado efectos adversos ante la suplementación dietaria con vitamina E (Zadák *et al.*, 2009). Es por eso que se la utiliza como una de las estrategias de tratamiento en las

enfermedades neurodegenerativas humanas que se caracterizan por presentar estrés oxidativo-nitrativo (Kamat *et al.*, 2008). En el SNC se ha corroborado su efecto protector frente a la peroxidación de los PUFAs, los cuales son especialmente abundantes en cerebro.

Por otro lado, se sabe que la vitamina E actúa como agente anti-mutagénico. En experimentos donde se usaron mutágenos que actúan directamente sobre el ADN, se pudo apreciar que este efecto se ejerce en etapas en donde hay síntesis de ADN, y no cuando la célula se encuentra en una fase estacionaria (Odin, 1997).

Desde el punto de vista estructural, esta molécula está formada por dos ciclos a los que se les une una larga cola hidrocbonada (Fig. 4).

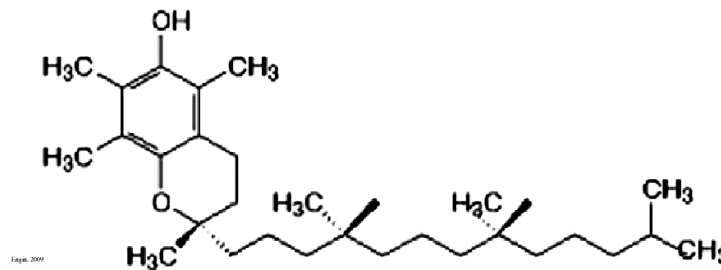


Figura 4: Estructura molecular de α -tocoferol.

El grupo hidroxilo libre del anillo aromático es el responsable de las propiedades antioxidantes de la molécula. Toda la evidencia experimental reunida hasta ahora indica que el α -tocoferol y la vitamina C actúan en conjunto. Durante el reestablecimiento de los lípidos de membrana a su estructura original luego de ser peroxidados, se consume vitamina E generándose el radical *tocoferilo*. El ascorbato regenera a este radical devolviéndolo a su forma biológicamente activa (Fig. 5).

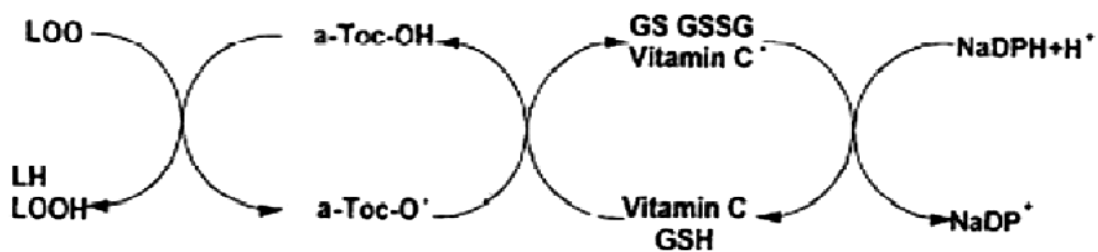
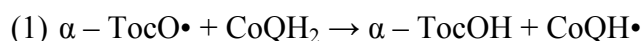


Figura 5: Mecanismo antioxidante del α -tocoferol. LOO, radical peroxilo; LH, molécula lipídica; LOOH, peróxido lipídico; a-Toc-OH, α -tocoferol; a-Toc-O \cdot , radical tocoferilo; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; vitamin C \cdot , radical ascorbilo.

Cabe mencionar aquí que de manera similar el ubiquinol (Coenzima Q; o QH₂) puede también regenerar al radical tocoferilo (1):



Otra vitamina liposoluble con importancia como antioxidante es la vitamina A (a través de sus vitámeros activos retinol, retinoico, retinal) al igual que sus precursores (los β -carotenos).

6.2.3 Antioxidantes anfílicos

Dentro de este grupo de sustancias, los más relevantes por su profuso uso clínico en humanos son el ácido lipoico y los polifenoles a los cuales les dedicaremos un comentario especial.

Ácido lipoico

El ácido lipoico (ácido 1,2-ditioilano-3-pentaenoico o ALA) se encuentra ampliamente distribuido en todos los compartimentos celulares debido a que es soluble tanto en ambientes acuosos como lipídicos. Es un cofactor esencial en reacciones de descarboxilación de α -cetoácidos. Su capacidad antioxidante se basa en suprimir los radicales libres del oxígeno (Packer *et al.*, 1997; Flora, 2007), pero también actúa como complejante de metales (incluido el Cu⁺⁺) disminuyendo así su incorporación en reacciones productoras de radicales libres como las de Häber-Weiss y Fenton (Benov, 2001; Liu *et al.*, 2007). Por último, tiene la capacidad de regenerar las vitaminas C y E a partir de sus radicales ascorbilo y α -tocoferilo, respectivamente. Todos estos efectos beneficiosos del ALA no parecerían ser de mucha importancia *in vivo* debido a sus bajas concentraciones tisulares; sin embargo, se lo ha empleado en numerosos tratamientos farmacológicos en enfermedades neurodegenerativas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Polifenoles

Es sabido que la dieta mediterránea se encuentra asociada a una baja prevalencia de enfermedades cardiocirculatorias, cáncer, y trastornos neurodegenerativos. Se supone que esta protección adicional la confieren las propiedades antioxidantes de los polifenoles presentes en los alimentos (insaponificable del aceite de oliva, frutos rojos y vegetales crudos) sumado al consumo de grasas especialmente monoinsaturadas y poliinsaturadas n-

3 provenientes de la ingesta de pescados, como así también al incremento de la proporción de fibra dietaria (Yang *et al.*, 2007).

Los productos naturales de las plantas han sido usados tanto con propósitos culinarios como medicinales. Muchos son metabolitos secundarios producidos como defensa frente a enfermedades o infecciones. En la India existe una variante de la medicina halopática denominada *ayurveda*, basada en la utilización de drogas derivadas de las plantas para la curación de enfermedades (algunas consideradas tumorales como el cáncer) (Goel *et al.*, 2008). Por ejemplo, la curcumina (diferuloil-metano) es un polifenol derivado de la hierba perenne *Curcuma longa* comúnmente llamada “turmerico”. Es usada como especia para la producción de los *currys* y de los *masalas* y, debido a su intenso color amarillo, como colorante en quesos, mantecas, y productos de pastelería. A su vez, es usada hace cientos de años en diferentes partes del mundo como ingrediente activo en preparaciones terapéuticas. En la medicina ayurvédica y en las de otras culturas orientales se usa la curcumina para tratar varias enfermedades respiratorias (asma, hiperactividad bronquial y alergia, entre otras), así como para desórdenes hepáticos, anorexia, diabetes, resfríos, sinusitis, dolores estomacales y como antiinflamatorio (Goel *et al.*, 2008). Numerosos estudios realizados en ratas tratadas con curcumina demostraron que este compuesto es un potencial agente quimioprotector en el cáncer.

El resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) también es un compuesto polifenólico derivado de las plantas que se usa como antioxidante en el tratamiento de la gonorrea y de la hiperlipemia (Saiko *et al.*, 2008). Este compuesto se extrajo por primera vez en 1940 a partir de las raíces de la planta *Veratrum grandiflorum* vulgarmente llamada “heléboro”. Más recientemente, se descubrió que también se encontraba en una gran cantidad de otras especies de plantas (viñedos, la planta del maní, frutos tropicales como el mango, entre otras). Los franceses, a pesar de tener una dieta rica en grasas saturadas, presentan casi un 40 % menos de infartos cardíacos que en el resto de Europa. Se cree que existe una correlación entre el consumo de vinos tintos muy ricos en polifenoles y la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Si bien este punto es muy discutido, algunos autores suponen que el resveratrol podría ser uno de los principios activos del vino tinto que protegería al sistema cardiovascular (Saiko *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayor clase de polifenoles encontrados en las plantas pertenece a la familia del ácido hidroxicinámico cuyo principal representante es el ácido cafeico (ácido 3,4-hidroxicinámico). El café es la principal fuente de este compuesto, pero también se lo encuentra en el cacao, manzanas, peras, frutillas, alcaucil y berenjenas (Clifford, 1999). Se ha demostrado que presenta

actividad antioxidante *in vitro* y que posee múltiples propiedades farmacológicas incluyendo efectos antiinflamatorios y antitumorigénicos.

Existen muchos estudios que indican que los polifenoles se comportan como antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro* (Young *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2002; Eybl *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006; Gladine *et al.*, 2007). Cai *et al.* (2002) han publicado la existencia de un comportamiento antioxidante sinérgico entre los polifenoles agregados derivados del te verde y los antioxidantes presentes en microsomas extraídos de células hepáticas de rata. Además, otros autores demostraron que cuando se agregan a la dieta de ratas extractos de semillas de uva (*Vitis vinifera*) y de romero (*Rosmarinus officinalis*) aumentan significativamente los niveles de vitamina E en el hígado, sugiriendo una interacción sinérgica entre los compuestos (Gladine *et al.*, 2007).

Sin embargo, hay una gran cantidad de trabajos científicos que demuestran que los polifenoles también pueden actuar como pro-oxidantes *in vitro*, sobre todo en presencia de metales de transición (Zeng *et al.*, 2006; Bhat *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Muchos investigadores coinciden en que distintos polifenoles como los curcuminoides, flavonoides y estilbenos, rompen la doble hélice del ADN en presencia o ausencia de iones Cu (Jacobi *et al.*, 1998; Yoshino *et al.*, 2004; Azmi *et al.*, 2006; Bhat *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). El cobre se encuentra presente en relación con la cromatina, muy cerca del ADN, particularmente de las bases guanina. El grupo de Azmi *et al.* (2006) propone que los iones Cu asociados al ADN serían removidos por acción de los polifenoles como el resveratrol y otros.

Otras evidencias experimentales indican que el Cu^{++} sería reducido por los polifenoles a Cu^+ , y la reoxidación a Cu^{++} estaría acompañada de la formación de ROS y de la generación de un ambiente propicio para la inducción de la apoptosis en sus mecanismos dependientes del potencial redox endocelular (por ejemplo activación de caspasas o calpaínas). En otros casos, la acción pro-oxidante sería consecuencia de los productos de degradación de la misma molécula de polifenol original (Andueza *et al.*, 2009). Justamente, esta acción pro-oxidante es utilizada en farmacoterapia como mecanismo para combatir algunos tipos de cáncer (Notas *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Finalmente, y a pesar de ser un tema controversial, mencionaremos que algunas evidencias señalan que ciertos polifenoles tendrían efectos protectores frente a la acción neurotóxica de los péptidos β -amiloides (Smith *et al.*, 2007; Sul *et al.*, 2009).

7- Elección de los modelos experimentales

Tal como hemos mencionado, el presente trabajo se focalizó en el estudio del impacto de la sobrecarga de cobre en los tejidos pulmonar y hepático. El hígado se seleccionó por ser el principal órgano blanco en la intoxicación por metales y por su capacidad para manejar de forma central muchos de los parámetros fundamentales de la homeostasis del cobre. Es además, el órgano que podría responder más adecuadamente a las injurias pro-oxidantes y sustentar la respuesta sistémica. En los experimentos con ratas se estudió también el rol del intestino como filtro en el ingreso del Cu al sistema sanguíneo y esto se llevó a cabo por medio de la selección de la vía de administración de la sobrecarga.

Por otro lado, los pulmones son órganos complejos formados a partir de diferentes tipos celulares y en este tejido el daño causado por la exposición a agentes tóxicos no afecta de igual manera a las células que lo componen. Por ejemplo, la exposición a O₂ puede dañar severamente a las células alveolares tipo I y conducir a un aumento compensatorio de la proliferación en las células alveolares de tipo II, las cuales poseen un mejor sistema de defensa antioxidante. Este tejido sería un buen ejemplo de injurias producidas por sobrecarga del metal incorporado durante la inhalación de aire contaminado con partículas ricas en cobre (industria del esmaltado y de electrónica, actividades agropecuarias), o por adquisición del metal por vía sistémica una vez que se hayan superado el filtro intestinal y la acción homeostática del hígado.

En el otro extremo de la respuesta de daño sistémico inducido por sobrecarga de Cu se encontrarían los órganos del SNC, que de todos los tejidos de nuestro organismo resultan ser los más pobres en su capacidad adaptativa y potencial de defensa contra agresiones pro-oxidativas/nitrativas.

Ante la imposibilidad de contar con tejidos humanos para efectuar los experimentos, se realizaron aproximaciones mediante el uso de modelos de cultivos de células humanas de estirpe hepática (HepG2) y pulmonar (A-549). En otros experimentos se emplearon ratas de la cepa Wistar por su reconocido metabolismo cercano al humano en muchos de sus aspectos primordiales, y finalmente se empleó sangre obtenida de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, mujeres usuarias de Cu-DIUs, y fumigadores profesionales expuestos a sobrecarga involuntaria de cobre.

La validación de estos modelos de estudio descansa en frondosa evidencia experimental obtenida tanto *in vivo* como *in vitro* usando ratas o ratones, cultivos celulares y sangre humana para la investigación de los efectos adversos causados por la sobrecarga

de metales de transición (Wu *et al.*, 1999; Strausak *et al.*, 2001; García-Fernández *et al.*, 2002; Turnlund *et al.*, 2004; Kinnula *et al.*, 2004; De la Cruz *et al.*, 2005; Letelier *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2006; Labieniec y Gabryelak, 2006; Liu *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2007; Squitti *et al.*, 2008).

8- HIPÓTESIS

Considerando lo resumido en la parte introductoria se **hipotetizan** las siguientes premisas de trabajo:

1. La sobrecarga por cobre sería capaz de provocar estrés oxidativo-nitrativo que conlleva a daño de biomoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ADN. Este daño podría ser observado en sistemas monocelulares, en los que no intervengan múltiples tejidos, de modo que se desarrollaría íntegramente dentro de los confines de las células y se establecería con independencia del tipo celular en cuestión, aunque con magnitudes y particularidades distintivas.
2. El daño guardaría relación con la sobrevida celular, de modo que podría ser estimador de la muerte por apoptosis o necrosis asociada a la toxicosis por el metal.
3. Cuando el daño ocurre en animales enteros, se desatarían mecanismos de compensación que comprenderían a diferentes componentes del sistema homeostático del cobre y del sistema de defensa antioxidante. Estas respuestas podrían ser empleadas en la caracterización y en la progresión del daño.
4. Los biomarcadores de daño y de respuesta podrían ser herramientas útiles en la evaluación de la sobrecarga por cobre en poblaciones humanas especialmente expuestas a este metal y surgirían como nuevas estrategias de probable empleo en clínica, ya sea como índices pronósticos o de caracterización/progresión del cuadro. Incluso, serían útiles como elementos de evaluación de estrategias terapéuticas en sobrecargas ya establecidas, o de prevención de riesgo en poblaciones susceptibles.

9- OBJETIVOS

Para poder desarrollar experimentalmente las hipótesis de esta tesis se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

(9.A) En cultivos de células de origen humano

9.A.1 Exponer las células de las estirpes HepG2 y A-549 a concentraciones progresivas de cobre (como iones cúpricos), y a diferentes tiempos de tratamiento, para causar sobrecarga del metal y determinar en ellas biomarcadores de daño a lípidos y proteínas.

9.A.2 Determinar la respuesta del sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en función de la sobrecarga.

9.A.3 Investigar la respuesta del sistema homeostático del cobre frente a la sobrecarga por determinación de los niveles del propio metal y de las proteínas complejantes directamente involucradas (MTs y CRP).

9.A.4 Relacionar los daños anteriores con la sobrevivencia celular efectuando determinaciones de actividad pro-apoptótica, necrótica y otros parámetros de proliferación.

9.A.5 Investigar el efecto de complejantes selectivos para iones cúprico y cuproso en los daños inducidos por el metal.

9.A.6 Estudiar la reversibilidad del daño por medio de la co-incubación con sustancias antioxidantes.

(9.B) En ratas de la cepa Wistar

9.B.1 Investigar el impacto sistémico (daño y respuesta) de la sobrecarga de cobre en animales tratados con dietas semisintéticas suplementadas con cobre a dosis extrapolables con las que se registran en patologías humanas. Comparar el daño en hígado y pulmón con lo observado en los sistemas de cultivo de células de origen hepático y pulmonar.

9.B.2 Estudiar la respuesta del daño en función de la vía de sobrecarga para estimar el papel homeostático del intestino y del hígado durante el establecimiento de la toxicosis.

9.B.3 Efectuar estudios histopatológicos y correlacionarlos con los biomarcadores bioquímicos para conocer mejor los efectos de la sobrecarga en el hígado y pulmones de los animales tratados.

(9.C) En humanos

9.C.1 Estudiar muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson y Demencias Vasculares), como así también de sus parientes directos, para establecer si existe algún patrón que las relacione con el metabolismo del cobre y su posible utilidad clínica.

9.C.2 Investigar la homeostasis del cobre en sangre periférica de mujeres en período fértil portadoras de dispositivos intrauterinos a base de cobre para determinar si existe daño oxidativo asociado y en ese caso caracterizarlo.

9.C.3 Evaluar el riesgo por daño debido a sobrecarga por cobre en fumigadores profesionales que emplean agroquímicos formulados en base a este metal, y determinar la posible utilidad de los biomarcadores de daño como elementos de prevención de riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Químicos

Las drogas utilizadas para hacer todas las determinaciones de esta tesis fueron adquiridas a Sigma Chem. Co. (USA o Buenos Aires), Merck Co. (Darmstadt, Alemania), Fluka (Berlín, Alemania), Anedra (Buenos Aires, Argentina) o Carlo Erba (Milán, Italia). Algunas determinaciones detalladas a continuación en este mismo capítulo fueron realizadas utilizando kits comerciales de Sigma (CA, USA), Promega (Ill, USA) o Wiener Lab (Rosario, Argentina). El cobre empleado en forma de sulfato cúprico pentahidratado fue provisto por Sigma-Aldrich y fue de calidad ultrapura (electrolítica grado máximo). Los antioxidantes utilizados y los quelantes fueron adquiridos a Sigma Chem. Co. (CA, USA). Todos los estándares empleados en la calibración de las técnicas fueron de grado ultrapuro, y adquiridos de las fuentes previamente mencionadas. Los gases (5 bandas) fueron provistos por AGA (La Plata).

10.2 Esquema de trabajo

Se realizaron distintos experimentos utilizando materiales biológicos obtenidos de tres fuentes experimentales:

10.2.1 Cultivos celulares

10.2.2 Ratas Wistar

10.2.3 Humanos

10.2.1 Cultivos celulares

Se cultivaron las líneas celulares HepG2 (hepatoma humano) y A-549 (carcinoma de epitelio alveolar humano) obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*) en medio MEM (*Minimum Essential Medium*, adquirido a Gibco, USA) esterilizado con filtros de nitrato de celulosa de 0.2 μm de tamaño de poro (Sartorius Membrane Filter, Alemania). El medio MEM se suplementó con 10 % de suero fetal bovino estéril (Natocor, Córdoba, Argentina). Las células se incubaron en estufa a 37 °C.

Los experimentos se realizaron en semi-confluencia y el procedimiento para la amplificación de los cultivos consistió en resembrarlas previa tripsinización de las monocapas. Antes de desprender la monocapa con solución de tripsina (ver composición más adelante), las células fueron lavadas con solución estéril de buffer fosfato (PBS) a pH 7.40. La tripsina fue esterilizada usando los ultrafiltros anteriormente descritos, mientras que el PBS se esterilizó en autoclave (120 °C/15 minutos).

Durante el mantenimiento de las líneas celulares se utilizaron botellas de vidrio de tipo Khöle tapadas con tapones de silicona esterilizados en autoclave (20 ° C/ 15 minutos). En la ejecución de los experimentos, las células se sembraron en botellas descartables (Falcon Inds., adquiridas de LICSA, Buenos Aires) aptas para cultivo celular y de superficies variables y estandarizadas de acuerdo con cada protocolo. Todos los procedimientos experimentales se efectuaron en bancos de flujo laminar horizontal (Filtrar Modelo C-100, Cultech, Bs.As.)

La sobrecarga con cobre se llevó a cabo con solución estéril de sulfato cúprico extra-puro, cuya preparación será descripta a continuación. Este tipo de suplementación con Cu^{++} es la más utilizada en protocolos de sobrecarga reconocidos internacionalmente (Mondal *et al.*, 2007).

10.2.1.1 Soluciones para los cultivos celulares

Solución madre de sulfato cúprico: se preparó a razón de 25 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de agua bidestilada. Luego se la esterilizó usando un microfiltro de 0.22 micrones y se la mantuvo alicuotada a 4 ° C (en heladera) hasta el momento de su uso.

Solución para tripsinizado: por cada 500 mL se emplearon 4.00 gr de NaCl, 10 gr de KCl, 0.10 gr de $\text{H}_2\text{PO}_4\text{K}$, 1.57 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.10 gr de estreptomycin, 0.01 gr de rojo fenol, 0.20 gr EDTA y 1.25 gr tripsina. Una vez disueltos los componentes, se activó la solución (autocatálisis) por calefacción en un baño de agua a 37 ° C durante un período de 60 minutos. Se la esterilizó por ultrafiltración y se alicuotó en envases estériles para luego conservarla en freezer a -18 ° C hasta el momento de su uso.

Solución buffer fosfato (PBS): por cada 1000 mL se disolvieron 8.00 gr de NaCl, 0.20 gr de KCl, 0.20 gr de $\text{H}_2\text{PO}_4\text{K}$ y 3.14 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. La solución fue esterilizada en autoclave durante 15 minutos a 115 ° C y se la conservó alicuotada en heladera a 4 ° C hasta el momento de su uso.

10.2.1.2 Experimentos realizados con cultivos celulares

(Tipo A) Exposición de ambas líneas celulares a dosis crecientes de Cu^{++} (0, 20, 40, 80 y 160 μM) durante un periodo fijo de 24 hs.

(Tipo B) Exposición de ambas líneas celulares a dosis crecientes de Cu^{++} (0, 40 y 80 μM) durante distintos períodos de tiempo (1-5 días).

(Tipo C) Exposición de ambas líneas celulares a una concentración fija de Cu^{++} (100 μM) y simultáneamente a distintos antioxidantes de origen natural (100 μM de ác. cafeico, resveratrol o curcumina).

(Tipo D) Exposición de ambas líneas celulares a una concentración fija de Cu^{++} (100 μM) y simultáneamente a agentes quelantes selectivos para Cu^+ (neocuproína 100 μM) o Cu^{++} (carnosina 100 μM).

Descripción de los aspectos básicos de los potocolos generales

Protocolo del tipo A

Se emplearon 40 botellas de tipo Khöle en semi-confluencia para cada línea celular. Cada lote de 40 botellas fue subdividido en 2 lotes de 20, y ambos fueron tratados con concentraciones crecientes de Cu^{++} (20, 40, 80 y 160 μM) durante 24 hs. Los controles fueron suplementados con volúmenes equivalentes de PBS libre de cobre. Uno de los sub-lotes se destinó al análisis del sistema de defensa antioxidante (SDA) y el otro al análisis de la composición lipídica.

Para poder analizar la actividad del SDA se prepararon homogenatos a partir de cada botella de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se descartó el medio de cultivo y se lavó cada monocapa dos veces con 5 mL de PBS (pH 7.4). Se agregaron 4 mL de PBS a cada botella y se rasparon las superficies de cultivo con *policeman* cuidando de desprender toda la monocapa. Se pasó la suspensión anterior a un tubo Falcon (CA, USA) de 15 mL. Luego, se lavaron las botellas dos veces (2 mL c/vez) con PBS, y ambas alícuotas fueron *pooleadas* con la suspensión celular original. Se centrifugó cada tubo a 500 x g/5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 mL de PBS y se lo agitó en un *shaker* hasta obtener una suspensión homogénea que luego fue transferida a un homogeinizador manual de acero (Khontes, Ill, USA) sobre lecho de hielo. El homogenato fue realizado mediante 10 golpes consecutivos con el homogeinizador manual y controlando la lisis por microscopía óptica.

Del homogenato se tomaron muestras para determinar proteína celular total (PCT), capacidad antioxidante total mediante el ensayo FRAP, producción de RNS ($[\text{NO}_x]$), peroxidación lipídica (TBARS), daño a proteínas (carbonilos proteicos, CPs), actividad de enzimas del SDA y concentración de antioxidantes mediante las metodologías que se describirán seguidamente.

Para el análisis de la composición de ácidos grasos de lípidos totales se obtuvieron los respectivos ésteres metílicos (EMAGs). En principio los lípidos totales fueron extraídos por la técnica de Folch (Folch *et al.*, 1957) y luego de saponificar el extracto total, se procedió a la extracción del insaponificable que fue descartado. La acidificación se realizó con exceso de HCl (c) y fue seguida por una re-extracción de los ácidos grasos libres y derivatización con trifluoruro de boro en metanol al 10 % (P/V) bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

Protocolo del tipo B

En primer término, y con el fin de estandarizar el procedimiento experimental, se preparó una suspensión *inóculo* en condiciones de trabajo reproducibles que luego se utilizó para la siembra de todas las botellas del experimento.

Para la preparación del inóculo se utilizaron 10 botellas tipo Khöle en semi-confluencia para cada línea celular. Las monocapas fueron pasadas a suspensión con la técnica usual de tripsinización y se formó un *pool* para cada línea en una probeta estéril, previamente siliconada, de 100 mL. Una vez obtenidas las dos suspensiones, se llevaron a un volumen final de 65 mL con medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Las suspensiones celulares fueron luego transferidas a un erlenmeyer estéril y siliconado para poder agitarlas y evitar la formación de acúmulos.

El siliconado del material se hizo por impregnación de la superficie del mismo con una dilución de Sigmacote (Sigma Chem. Co. Bs. As.) al 25 % (V/V) en hexano. Se escurrió el excedente y luego se secó en estufa a 100 ° C. Este paso se repitió 3 veces y luego se enjuagó extensamente el material con agua bidestilada y se lo volvió a secar en estufa.

De cada suspensión celular se sembró 1 mL por botella de cultivo descartable Falcon de 25 mL de capacidad (60 botellas por cada experimento). Una vez sembradas, se les agregó a cada una 4 mL de medio MEM suplementado con 10 % SFB y una alícuota conveniente de solución de Cu⁺⁺ (concentraciones finales 40 u 80 µM, según correspondiera). Se incubaron en estufa a 37 ° C. Los controles fueron suplementados con volúmenes equivalentes de PBS libre de cobre. De esta manera quedaron conformados 3 lotes: uno control, y dos suplementados con Cu⁺⁺ 40 µM y 80 µM.

De todas las preparaciones celulares se tomó 1 mL de la suspensión original para hacer las determinaciones correspondientes al *tiempo cero* del experimento.

Cada 24 hs, y durante 4 días, se retiraron de la estufa 4 botellas de cada lote. Una de las botellas fue utilizada para determinar viabilidad celular mediante una solución de trypan blue 1:10 en PBS. Para ello, se descartó el medio de cultivo y se lavó 2 veces la monocapa con 2 mL de PBS cada vez. Luego se agregaron 2 mL de la solución del colorante y se incubó a temperatura ambiente por 30 segundos. Pasado el tiempo indicado, el exceso de colorante fue escurrido y se observó la muestra al microscopio invertido con aumento mediano (40 X) para contar el porcentaje de células teñidas. Las tres botellas restantes fueron destinadas a la medición de PCT y de la actividad de láctico-deshidrogenasa (LDH).

Para la determinación de la actividad de LDH como marcadora de lisis celular se recolectó el medio de cultivo de cada botella en un tubo Falcon de 15 mL, procesando las muestras en forma independiente. Se centrifugó 10 minutos a 6000 x g durante 20 min para eliminar los restos de detritos celulares que podrían falsear los resultados. Seguidamente, se colocó 1 mL de cada sobrenadante en un Eppendorf de 1.5 mL. Antes de proceder a su análisis todos los sobrenadantes fueron ultrafiltrados por Millipore de 0.22 μm a fin de asegurar la eliminación de posibles restos membranosos provenientes del cultivo. Las muestras fueron almacenadas en un freezer a -20°C hasta el momento de su uso. Las mediciones fueron realizadas utilizando el kit comercial LDH- UV/Optimix Cinético de Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina).

Protocolo del tipo C

Para la preparación de la suspensión inóculo se emplearon 24 botellas tipo Khöle en semi-confluencia para cada línea celular. La suspensión celular se preparó siguiendo los mismos pasos que en el protocolo del tipo B; sin embargo, y debido al mayor número de botellas de cultivo inicialmente empleadas, el volumen final al que se llevó cada suspensión fue de 290 mL.

De cada suspensión celular se dispensaron 5 mL en 112 botellas de cultivo Falcon descartables de 25 mL (aprox. 35 cm^2) (56 por línea celular) y se les agregaron 10 mL de medio MEM suplementado con 10 % de SFB. Luego fueron colocadas en estufa a 37°C durante 24 hs (día "0" del experimento). Al completarse el día 1 (24 hs post-siembra), se les cambió el medio a todas las botellas y se las dejó crecer durante 24 hs más. Los tratamientos correspondientes fueron realizados durante los días 2 y 3 del experimento con una diferencia de 24 hs según se describe a continuación.

Las 56 botellas de cultivo correspondientes a cada línea celular fueron subdivididas en 5 grupos. El grupo *control negativo* estuvo conformado por 4 botellas las cuales no recibieron tratamiento (PBS). El grupo *control positivo* estuvo integrado por 4 botellas que fueron suplementadas con CuSO₄ (100 µM) en el día 3 del experimento. Los tres grupos restantes estuvieron conformados por 16 botellas cada uno. Ocho botellas de cada uno de estos tres grupos fueron suplementadas con un tipo de polifenol en el día 2 del experimento (ácido cafeico, resveratrol o curcumina); en cambio las restantes ocho botellas fueron suplementadas con los polifenoles en el día 3. A su vez, de las ocho botellas tratadas con polifenol en el día 2, se separaron cuatro a las que se les agregó CuSO₄ (100 µM) en el día 3 del experimento. Las botellas se incubaron por otras 24 hs hasta llegar al día 4 del experimento. El siguiente esquema muestra las adiciones en forma resumida.

Protocolo general del tipo C				
Día cero: siembra estandarizada.				
Día 1: cambio de medio y comienzo de los tratamientos.				
Día 2 y 3: continúan los tratamientos diferidos.				
Día 4: se procesan todos los lotes.				
Lotes	Cafeico 100 µM	Resveratrol 100 µM	Curcumina 100 µM	Cu ⁺⁺ 100 µM
Control*	--	--	--	--
Control Cu	--	--	--	Día 3
CA/Cu-A	Día 2	--	--	Día 3
RES./Cu-A	--	Día 2	--	Día 3
CUR/Cu-A	--	--	Día 2	Día 3
CA/Cu-B	Día 3	--	--	Día 3
RES/Cu-B	--	Día 3	--	Día 3
CUR/Cu-B	--	--	Día 3	Día 3
CA-A	Día 2	--	--	--
RES-A	--	Día 2	--	--
CUR-A	--	--	Día2	--
CA-B	Día 3	--	--	--
RES-B	--	Día 3	--	--
CUR-B	--	--	Día 3	--
Incubación por otras 24 horas para llegar al día 4 en que se procesan.				

* Se trataron con alícuota equivalente de PBS; "A" y "B" indican los lotes con tratamientos diferidos a 24 hs de distancia.

Al concluir el cuarto día de experimento todas las botellas se procesaron como se indica a continuación:

1. Se tomó una alícuota de 1 mL de medio de cultivo de cada una de las muestras para determinar actividad de LDH siguiendo el procedimiento antes descrito.
2. Se descartó el medio sobrante y se lavaron las monocapas dos veces con 5 mL cada vez de PBS helada.

3. Se agregaron 5 mL de PBS a cada botella lavada para suspender la monocapa con *policeman*.
4. Las suspensiones se transfirieron luego a tubos Falcon graduados de 15 mL.
5. Se enjuagó cada botella con 5 mL de PBS que fueron *pooleados* en el tubo correspondiente mantenido en lecho de hielo.
6. Las muestras fueron centrifugadas a 600 x g durante 10 minutos.
7. Los sobrenadantes fueron descartados y los pellets resuspendidos en 2.5 mL de PBS.
8. Del volumen total, y previa resuspensión en *shaker*, se tomaron alícuotas de 30 µL para medir viabilidad celular siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior.
9. El resto de la suspensión fue homogeneizada manualmente tal como ya se ha detallado utilizando un homogeneizador manual de acero mantenido en lecho de hielo.
10. De cada homogenato celular se tomaron alícuotas de 50 µL para determinar PCT (microtécnica de Lowry). El resto fue distribuido en 3 Eppendorfs de 1.5 mL destinados a mediciones de parámetros del SDA, tanto enzimáticos como no enzimáticos, y a la composición de ácidos grasos de lípidos totales.

Protocolo del tipo D

Para preparar el inóculo de siembra se emplearon 10 botellas tipo Khöle en semi-confluencia para cada línea celular de acuerdo con el procedimiento ya descrito. Seguidamente, se llevó cada suspensión a un volumen final de 65 mL. De las suspensiones originales se dispensaron 2 mL en cada una de las 40 botellas de cultivo descartables Falcon de 25 mL empleadas en este experimento (20 por cada línea celular) a las cuales también se les agregó 10 mL de medio MEM suplementado con 10 % de SFB. A continuación se colocaron las botellas en estufa a 37 ° C durante 24 hs (día 1). Al cumplirse 24 horas post-siembra, el medio de cultivo fue renovado por medio fresco y se permitió alcanzar la semiconfluencia cultivando otras 24 hs (día 2).

Al tercer día se inició el protocolo de tratamiento de la siguiente manera. Se dividieron las 20 botellas pertenecientes a cada una de las líneas en 5 grupos de 4 botellas cada uno: grupo *control negativo* al cual no se le realizó ningún tratamiento (PBS), el grupo *control positivo* al que se le agregó CuSO₄ (100 µM) y 4 grupos con tratamiento con agentes quelantes específicos (100 µM de neocuproína para Cu⁺ o 100 µM de carnosina para Cu⁺⁺, ambos adquiridos a Sigma). A dos de los grupos tratados con quelantes, uno de neocuproína (NCP) y otro de carnosina (CR), también se les agregó CuSO₄ (100 µM),

mientras otros dos lotes *espejo* actuaron de metacontroles sin el catión. El siguiente esquema muestra las adiciones en forma resumida.

Protocolo general del tipo D				
Día cero: siembra.				
Día 1: cambio de medio a todas las botellas.				
Día 2: crecimiento logarítmico en medio sin suplementos.				
Día 3: se inician tratamientos según cada lote.				
Día 4: las monocapas se lavan y procesan.				
Tratamientos por lote y destino analítico				
Lotes	Cu ⁺⁺ 100 µM	NCP (o CR) 100 µM	Cu ⁺⁺ + NCP (o CR) 100 µM (c/u)	Destino
Control*	--	--	--	[NOx], CPs, TBARS
Cu	X	--	--	[NOx], CPs, TBARS
Cu/complej.-A	X	X	--	[NOx], CPs, TBARS
Cu/complej.-B	X	--	X	[NOx], CPs, TBARS
Incubación por otras 24 horas. Día 4: procesamiento.				

* Se trataron con alícuota equivalente de PBS; "A" y "B" indican los lotes con tratamientos diferidos a 24 hs. de distancia.

Una vez que las botellas fueron tratadas se las incubó en estufa por otras 24 hs. Pasado el tiempo establecido, todos los lotes fueron procesados siguiendo los pasos 2-10 detallados en el experimento precedente y fueron destinados al análisis de [NOx], CPs y TBARS como biomarcadores de daño por estrés oxidativo-nitrativo.

10.2.2 Ratas Wistar

Los experimentos realizados *in vivo* se llevaron a cabo con ratas de la cepa Wistar endocriadas en nuestro bioterio. Los animales se mantuvieron en cajas de acero inoxidable con camas de viruta de pino esterilizada que se renovaron diariamente. Se criaron en ambiente climatizado a 25 ± 3 °C y humedad relativa del 60 % con ventilación forzada y bajo ciclos lumínicos automáticos de 12 hs. La sanidad de los animales se constató mediante las prácticas recomendadas internacionalmente según el ILAR (*Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council*). La alimentación sólida y el agua de bebida se suministraron *ad-libitum*.

Las dietas constituyeron la parte esencial del protocolo y fueron confeccionadas en nuestro laboratorio de acuerdo con lo establecido para esta cepa de ratas según Reeves *et al* (1993). Todos los procedimientos de manipuleo de los animales siguieron las normativas del NIH (*"Guide for the care and use of laboratory animals"*; *National Research Council, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1985 Publication N° 85 - 23 (rev)*,

National Institute of Health, Bethesda, MD) y el protocolo fue revisado y aceptado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP bajo el acta 4, Protocolo de control N° 00382/08).

10.2.2.1 Tipos de protocolos experimentales

(2.1.A) Exposición de las ratas a sobrecarga de Cu a través de alimento sólido conteniendo el metal como suplemento de carbonato cúprico a concentraciones supranormales.

(2.1.B) Exposición de las ratas a sobrecarga de Cu contenido en preparados para inyección intraperitoneal.

Descripción de los aspectos generales de cada tipo de protocolo

Tipo (2.1.A)

La concentración de cobre (CuCO_3) en la dieta sólida considerada *suficiente* o control (C) se determinó en concordancia con lo recomendado internacionalmente (Davis y Newman, 2000; Cockell *et al.*, 2005). La sobrecarga oral elegida se considera moderada en virtud de recientes reportes de otros autores (Irato y Albergoni, 2005) y fue muy similar a los valores de acumulación de cobre recientemente reportados para pacientes con enfermedad de Wilson (Medici *et al.*, 2007). Con el fin de poder establecer el ingreso diario de cobre por vía oral se hizo necesario determinar una curva promedio de ingesta de dieta sólida/día/rata a lo largo de toda la duración del experimento. Una curva característica se muestra en la **Fig. 6**.

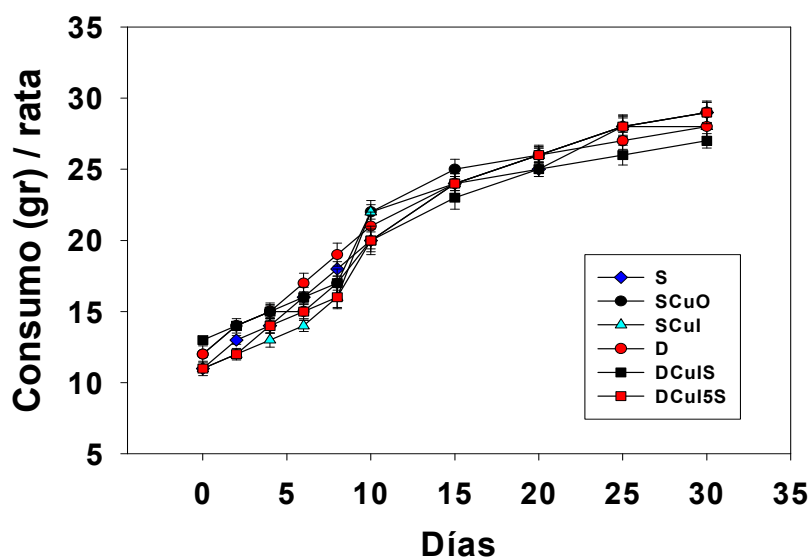


Figura 6: Curva promedio de ingesta de dieta sólida/día/rata de cada lote de animales a lo largo del tratamiento. S, ratas alimentadas por vía oral con una concentración de Cu de 7 ppm; SCuO, ratas alimentadas por vía oral con exceso de iones Cu (35 ppm); SCuI, ratas alimentadas por vía oral con 7 ppm de iones Cu y por vía intraperitoneal (ip) con un exceso de iones cúpricos equivalentes a 35 ppm; D, ratas alimentadas por vía oral con concentraciones trazas de Cu; DCuIS, ratas alimentadas por vía oral con concentraciones trazas de iones Cu y por vía ip con una concentración de 7 ppm; DCuIS5, ratas alimentadas con trazas de Cu por vía oral y exceso de iones Cu (35 ppm) por vía ip.

Tipo (2.1.B)

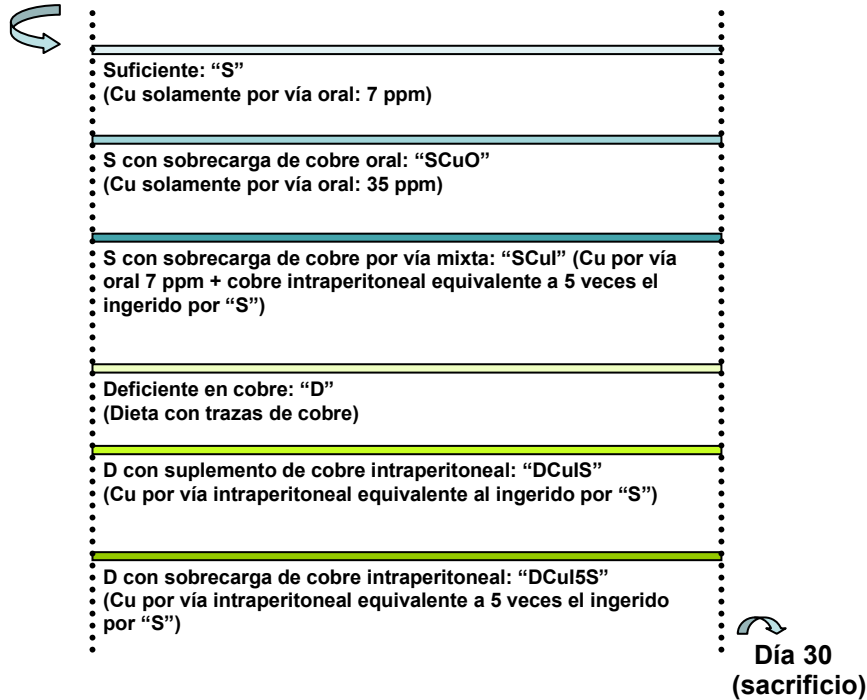
Las inyecciones intraperitoneales se llevaron a cabo con agujas atraumáticas de bisel trifacetado 0.30 x 13 30G1/2 de BD *Precision Glide* (Becton Dickinson Industries Ltd., USA) y jeringas de 1 mL *Coronet* (Shina Co., Corea del Sur) esterilizadas/apirógenicas, cuidando de no lesionar ninguna víscera de la cavidad abdominal. La solución vehículo del carbonato cúprico se seleccionó mediante ensayos previos, siendo la más apropiada un buffer PBS pH 7.40 adicionado con Tween®-20 al 1 % Riedel-de Haën (ultra-puro, UK). Se empleó en este preparado la misma fuente mineral de cobre que en el *mineral mix* recomendado para la dieta sólida (CuCO₃).

A partir de la curva correspondiente al lote de ratas alimentadas por vía oral con una concentración de 7 ppm (normal o suficiente) graficada en la **Fig. 6** se obtuvieron factores de ajuste del volumen de inyección intraperitoneal que proporcionaron la cantidad promedio de cobre a ser inyectada por animal y por día para equiparar lo adquirido por vía oral (lote IPN) o con sobrecarga de 5 veces lo normal (lote IPS). En ningún caso el volumen de inyección superó los 200 µL/rata/día. Al sacrificar los animales no se constató

lesión alguna en peritoneo o en zonas aledañas al sitio de las inyecciones (alternativamente flancos sub-diafragmáticos derecho/izquierdo).

La siguiente figura (**Fig. 7**) resume las bases del tratamiento experimental indicando las características salientes de cada tratamiento.

Día 0 post-destete



En la tabla que se muestra a continuación (**tabla III**) aparecen los detalles más importantes inherentes al esquema de tratamiento antes mencionado. La metodología seguida se describe más adelante en esta misma sección.

Tabla III: nomenclatura de los lotes experimentales y principales características asociadas a la dieta y vías de sobrecarga

Parámetros	S	SCuO	SCuI	D	DCuIS	DCuI5S
Nomenclatura del lote	S	SCuO	SCuI	D	DCuIS	DCuI5S
Suplemento	Ninguno	+ CuCO ₃	+ CuCO ₃	Ninguno	+ CuCO ₃	+ CuCO ₃
Vía(s)	--	Oral	Oral / Ip	--	Ip	Ip
Cu vía Ip	--	--	5 veces el ingerido por el lote S	--	Equivalente al ingerido por el lote S	5 veces el ingerido por el lote S
Contenido de Cu dietario (mg/Kg)	7.7 ± 0.1 ^a	37.6 ± 0.3 ^b	7.5 ± 0.2 ^a	0.1 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b
Peso inicial (g)	175.6 ± 0.5	177.1 ± 1.4	174.3 ± 1.5	170.2 ± 1.1	178.8 ± 2.5	181.0 ± 2.5
Peso final (g)	280.1 ± 6.0	282.2 ± 3.6	283.3 ± 3.2	279.0 ± 2.7	285.7 ± 4.6	288.4 ± 3.0
Ganancia de peso (g)	104.4 ± 4.0	105.1 ± 3.5	109.0 ± 2.9	108.8 ± 2.2	106.9 ± 2.0	107.4 ± 3.1
Velocidad de ganancia (g/día)	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.2
Ingesta inicial (g/díay/rat)	11.5 ± 0.8	10.8 ± 1.1	10.8 ± 0.5	11.1 ± 0.7	10.8 ± 1.1	10.9 ± 1.1
Ingesta final (g/díay/rat)	30.0 ± 2.3	27.9 ± 1.9	26.6 ± 0.8	25.8 ± 1.2	27.9 ± 1.9	25.8 ± 0.6
Tasa de eficiencia nutricional*	9.0 ± 0.4	9.7 ± 0.5	10.0 ± 0.3	9.8 ± 0.5	9.9 ± 1.0	9.8 ± 0.7
Eficiencia nutricional inicial*	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5	4.6 ± 0.3
Fe dietario (mg/Kg)	46.8 ± 0.7	45.5 ± 1.1	44.6 ± 1.0	45.5 ± 1.1	44.7 ± 1.1	45.5 ± 1.1
Zn dietario (mg/Kg)	66.3 ± 2.2	64.6 ± 2.9	65.4 ± 2.1	64.9 ± 2.5	66.1 ± 3.0	64.6 ± 2.9
TBARS en alimento (nmoles MDA/Kg)	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.04

Cada valor está expresado como el promedio ± SDs. *, Ganancia de peso corporal (g)/ingesta (g)]. Los resultados de contenido de cobre que resultaron significativamente diferentes se indicaron con distintas letras super-escritas ($p < 0.01$; ANOVA + Tukey).

10.2.2.2 Obtención de muestras para análisis

Los pasos seguidos en la obtención de los órganos de interés (que serán explicados a continuación) fueron los mismos en ambas series (S y D) de experimentos.

Una vez concluidos los tratamientos se sacrificaron los animales a las 9 a.m. del día 35 mediante decapitación en guillotina sin anestesia. Con el fin de homogeneizar en todas las ratas los eventos metabólicos dependientes de la ingesta, se las ayunó durante las 12 horas previas al momento de su sacrificio.

La sangre se colectó en tubos de polipropileno de 15 mL graduados y con tapa a rosca, conteniendo 50 µL de anticoagulante *W* de Wiener Lab. (Rosario Argentina) que se mezcló con la sangre por suave inversión. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos en frío en una centrífuga Rolco de mesa con el fin de obtener el paquete globular y el plasma. Se separó por cuidadosa aspiración el plasma sobrenadante del cual se tomaron alícuotas para el análisis de la composición de ácidos grasos (ver determinaciones complementarias) y otras para la determinación del contenido de proteína total (Lowry *et*

al., 1951). El resto se fraccionó en tubos Eppendorf y se congeló en ultrafreezer a - 70 ° C hasta el momento de su análisis.

Se extrajeron cerebro, pulmones, hígado, riñones, corazón, testículos y un trozo de intestino de aproximadamente 20 cm correspondiente a la porción inmediatamente post-pilórica. En todos los casos la remoción de los órganos fue rápida implementándose por medio del trabajo simultáneo de varios operadores y se realizó sobre lecho de hielo recibiendo los tejidos en solución homogenizadora cuya composición fue 0.25 M en sacarosa, 0.04 M en buffer fosfato (pH 7.4), 0.04 M en NaCl, 0.15 M en KCl y 0.06 M en EDTA disódico. Los órganos fueron deprivados de material extraño, y decapsulados si correspondiera. En todos los casos se tomó el peso del órgano libre de tejidos anexos y de exceso de líquido. El intestino fue extensamente lavado en solución homogenizadora hasta liberarlo de cualquier posible contenido residual al ayuno. Todos los órganos fueron cortados en porciones pequeñas reservándose una cuña representativa de cada uno en solución PBS con formol (Sigma Chem. Co, USA) al 10 % para ulteriores estudios histopatológicos.

Por razones de espacio, en este trabajo sólo se informarán los resultados obtenidos de muestras de plasma, hígado y pulmones a fin de establecer posibles comparaciones con los datos provenientes de estudios con los cultivos de las líneas celulares HepG2 y A-549.

Después de homogenizar las muestras en un equipo ULTRA-TURRAX (CA, USA) se tomaron alícuotas para dosaje de proteínas tisulares (Lowry *et al.*, 1951) y el resto se fraccionó en tubos Eppendorf para su ultra-congelación hasta su análisis.

10.2.2.3 Determinaciones de control experimental

El control de las condiciones experimentales involucró las siguientes determinaciones:

1. Contenido de Cu en alimento sólido.
2. Contenido de Cu en preparados para inyección intraperitoneal.
3. Concentración de cobre en agua de bebida.
4. Contenido de Cu en heces de ratas controles y tratadas.
5. Determinación de TBARS en alimento.
6. Determinación de los contenidos de hierro y zinc en dietas y agua de bebida.
7. Parámetros de ingesta.

En todos los casos las muestras se tomaron cada vez que se preparaba un lote de dieta semisintética o durante el cambio diario del agua de los bebederos. Se tomaron

muestras de heces de todos los lotes al mismo tiempo, una vez por semana a lo largo de todo el experimento. Algunos de los datos correspondientes a estos controles experimentales ya se informaron en la tabla precedente y otros serán comentados oportunamente.

Una vez obtenidos los materiales biológicos se procedió a determinar:

1. Peso de órganos.
2. Concentración de Cu en homogenatos tisulares (fracción soluble y total).
3. Composición de ácidos grasos de lípidos totales.
4. Enzimas del sistema de defensa antioxidante (SOD, CAT, GPx, GR).
5. Antioxidantes hidro- y lipo-solubles (GSH total, oxidado y reducido, y cociente GSH/GSSG; α -tocoferol, ensayo FRAP).
6. Biomarcadores de daño pro-oxidativo ([NOx], TBARS, CPs).
7. Proteínas involucradas en la homeostasis del cobre (MTs y CRP).

En el caso especial de la determinación del cociente GSH/GSSG se bloqueó al GSH mediante alquilación con divinilpirina (Sigma Chem., Co. USA) a concentración final 3 mM. Alícuotas de 100 μ L de homogenato o plasma se diluyeron con 900 μ L de solución de ácido sulfosalicílico al 5 %. Después de agitar y reposar por 5 minutos se centrifugaron las muestras a 5000 g por 15 minutos en frío y el sobrenadante se ultracongeló hasta la determinación por vía enzimática.

Para las otras determinaciones se procedió como se describirá más adelante en este mismo capítulo.

Durante todo el período experimental los animales se pesaron y, tal como se detalló antes, se controló por diferencia de peso el alimento sólido que consumieron diariamente como así también el volumen de agua de bebida. Con estos datos se calcularon la velocidades de ganancia de peso en cada lote y la eficiencia de ingesta como $[\text{ganancia de peso (g)}/\text{ingesta (g)}].10^2$.

Para la determinación de TBARS en alimentos se tomaron muestras de 300 mg de cada lote, que se suspendieron en 3 mL de agua bidestilada. Luego de centrifugar a 10.000 rpm por 15 minutos el sobrenadante se procesó a razón de 250 μ L por tubo para la determinación de TBARS como se indicará en la sección de protocolos técnicos usando una alícuota equivalente de agua bidestilada como blanco de reacción. Los resultados se expresaron en nmoles de malondialdehído (MDA)/Kg de dieta lista para el consumo.

Asimismo, se tomaron alícuotas de 3 mL de agua de bebida que se diluyeron al doble con HNO₃ (1 N) y se ultra-filtraron por Millipore de 0.45 μ. Estas muestras se inyectaron directamente en un equipo de absorción atómica marca *Perkin-Elmer 1100 B Spectrophotometer* equipado con una lámpara catódica *Perkin-Elmer UU/300* (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) y filtros apropiados para la determinación de Fe, Cu y Zn. Los datos se expresaron en mg/L. La calibración se llevó a cabo con standards Tritrisol® de Merck (Darmstadt, Alemania).

Porciones de alimento (200 mg), tejidos (150 mg) y heces (300 mg) se secaron a peso constante en estufa a 100 ° C por una noche aproximadamente. Luego cada residuo seco se pesó con precisión en una balanza analítica marca Precisa XB-220A (Ginebra, Suiza) y se procedió a mineralizarla con mezcla H₂SO₄ (c): ácido perclórico (c) [1:1] por 8 horas a 40 ° C en bloque termostatzado *HBL 8240 de HB-Line Instruments Inc.* (Mel Rose Park, Ill, USA). El digesto se centrifugó en tubos pirex a 10.000 rpm por 15 minutos y luego se ultrafiltró el sobrenadante por Millipore de 0.45 μ. Se diluyó el filtrado con agua ultrapura Carlo Erba (Milán, Italia) y se leyó por absorción atómica en el equipo antes mencionado. Los resultados se expresaron en mg/Kg de alimento o en μg o ng/g de peso seco según correspondiera. En algunos casos se procedió a centrifugar el homogenato a 10000 g por 15 minutos obteniéndose una fracción denominada “soluble” en la cual se procedió a determinar el contenido de cobre previa mineralización con mezcla sulfúrico:perclórico. En este caso se expresaron los resultados en términos de μg por mg de proteína.

10.2.3 Determinaciones en humanos

Se hicieron determinaciones de concentración de iones Cu y proteínas homeostáticas del mismo (MTs y CRP) en el plasma obtenido a partir de sangre periférica (vena antecubital) de humanos expuestos a iones cobre por diferentes vías.

Estudiamos muestras de fumigadores profesionales (dedicados a la aplicación de agroquímicos basados en cobre en plantaciones de cítricos en la Pcia. de Entre Ríos, Argentina) y de mujeres usuarias de dispositivos intrauterinos a base de cobre (TCu-DIUs). También se analizaron muestras de plasma de pacientes con enfermedades neurodegenerativas (AD, PD y VD) y de parientes directos de pacientes debido al sospechado rol que desempeña el cobre en la etiopatogenia de estas dolencias. Los protocolos serán descriptos más adelante en este mismo capítulo.

10.2.3.1 Recolección de muestras procedentes de humanos

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital de personas con ayuno de 12 horas. La sangre fue colectada en tubos de polipropileno de 15 mL graduados y con tapa a rosca, conteniendo heparina (10 UI/mL) como anticoagulante y conservada en frío hasta el momento de su uso. Se empleó material descartable certificadamente estéril y apirogénico y se siguieron las normas de bioseguridad recomendadas internacionalmente.

La sangre se centrifugó para obtener elementos figurados y plasma usando una centrífuga de mesa Rolco a 1400 g (equivalente al punto 3) por 15 min. Las alícuotas se rotularon en forma encriptada y se ultra-congelaron hasta su análisis.

A continuación se describirán las características correspondientes a las poblaciones seleccionadas.

10.2.3.2 Fumigadores profesionales

Para realizar este estudio transversal/observacional se tomaron muestras de 31 fumigadores con promedio de edad de 26 ± 4.6 (40 % mujeres), quienes trabajaban en el control de plagas de plantaciones de cítricos en el este de Entre Ríos, Argentina. Estas personas estuvieron en contacto con mezclas de agroquímicos formulados a base de cobre durante los últimos 10 años. El grupo control estuvo compuesto por 32 personas de promedio de edad de 25 ± 5 (43 % mujeres) pertenecientes a la misma área geográfica que nunca tuvieron actividades en relación con pesticidas. Se puso especial atención en seleccionar personas para ambos grupos que tuvieran características similares en cuanto a hábitos nutricionales y estado clínico general. Para esto, se escogieron personas sin enfermedades u otras características metabólicas que pudieran interferir en la ingesta, absorción y metabolismo del Cu. Se siguió un extenso criterio de inclusión/exclusión que contempló (entre otras cosas) enfermedades crónicas, infecciones o infestaciones de cualquier etiología, desórdenes nutricionales, tratamientos farmacológicos, embarazo o cirugías de cualquier tipo en el último año, abuso de alcohol o drogas, hábito de fumar, etc.

A pesar de que hubo diferencias en la proporción de fumadores y no fumadores entre el grupo de fumigadores (48 %) y control (69 %), éstas no fueron relevantes al momento de hacer los análisis estadísticos. Para poder considerar este distractor, se realizó un cálculo de ponderación entre variables que resultó en el siguiente ajuste:

$$\{[TF - (CF)^2/CNF] \cdot 100\}/TF$$

T indica el total de las personas expuestas a pesticidas, C controles, F fumadores y NF no fumadores. Sin embargo, las conclusiones estadísticas no se vieron modificadas por este factor.

10.2.3.3 Mujeres con Cu-DIU

También se trató de un estudio observacional y seccional aunque en este caso se generaron sub-poblaciones clasificadas según el tiempo de uso del dispositivo.

Se pre-seleccionaron casi un centenar mujeres a partir de una misma área geográfica (La Plata y alrededores), aunque sólo se incluyeron como grupo problema 34 mujeres portadoras del mismo dispositivo intrauterino TCu380A (Durbin PLC Co.-South Harrow, UK). Este dispositivo con Cu es de amplio uso en hospitales públicos y en consultorios privados. El grupo control estuvo formado por 39 enfermeras de los establecimientos en los cuales se obtuvieron las muestras problema. Al igual que en el grupo de fumigadores, se hizo énfasis en que las mujeres que formaran parte de esta experiencia tuvieran características similares en cuanto a sus hábitos nutricionales, su condición clínica general, que no presentaran enfermedades crónicas, y a los fines de resumir, no tuvieran ningún otro desorden o estuvieran siendo tratadas farmacológicamente de modo que esto pudiera interferir con el metabolismo del Cu.

10.2.3.4 Pacientes con enfermedades neurodegenerativas

Este estudio fue también seccional y observacional. Las personas que lo integraron fueron seleccionadas de hospitales públicos e instituciones privadas pertenecientes a una misma área geográfica (La Plata y alrededores). En todos los casos se incluyó un grupo de parientes directos (la gran mayoría hijos/as de los pacientes) sin sintomatología neurológica evidenciable a través de estudios clínicos, neurológicos y complementarios; y otros dos grupos pareados por edades y sexos, que conformaron los controles del experimento.

Todos los integrantes fueron sometidos a un riguroso proceso de inclusión/exclusión que involucró estudios clínicos, neurológicos, radiológicos y de laboratorio. A su vez, se puso mucha atención al momento de clasificar los estadios clínicos para Alzheimer (AD) y mal de Parkinson (PD) a modo de satisfacer los criterios establecidos por el *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*, la *Alzheimer's Disease Association and Related Disorders* (Mc Kahn et al., 1984), y la *American Psychiatric Association* (1987). Los PD también fueron clasificados según

Hoehn y Yahr (1967) y compatibilizados con los criterios anteriores. Luego de la evaluación de todos los resultados obtenidos de los exámenes neurológicos y complementarios, los pacientes fueron sub-clasificados en tres categorías según sus estados evolutivos: leve (L), intermedio (I) o severo (S) para cada una de las tres patologías.

10.2.3.4 Aspectos bioéticos

Todas las personas analizadas firmaron un consentimiento escrito o, en el caso de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas, se obtuvo la aprobación de un tercero responsable a cargo del mismo o cuidador legalmente responsable. La confección de los consentimientos siguió los contenidos éticos de la Convención de Helsinki re-elaborada en el año 2000 (Salako, 2006). A su vez, los consentimientos informados fueron revisados y aprobados por los comités de Bioética del Hospital San Roque de Gonnet (Acta PT/22-303) y de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (COBIMED/Comité Institucional de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, Acta N° 5 bajo el protocolo de control N° 00389/08).

11. Protocolos técnicos

11.1 Determinación de proteína celular total (PCT) (Lowry *et al.*, 1951)

Fundamento

Esta técnica se basa en el desarrollo de un cromóforo de color azul-violáceo que detecta grupos aromáticos derivados de los aminoácidos en presencia del reactivo de Folin, en medio fuertemente alcalino.

Procedimiento

De cada muestra se cargaron las alícuotas en tubos rotulados de manera adecuada. Por otro lado se llevó a cabo una calibración en un rango de concentraciones de 5 a 100 μg de proteína (BSA, o albúmina sérica bovina)/tubo de reacción empleando una solución de BSA de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Una vez cargadas todas las alícuotas se llevaron a un volumen final de 3 mL agregando solución digestora (tartrato de Na y K al 2.7 % (P/V) conjuntamente con solución A (20 gr de Na_2CO_3 ; 4 gr de NaOH/L y 1 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (P/V) en agua bidestilada).

Luego se agitaron las muestras y se reposaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, cada tubo se trató con 300 μL del reactivo de Folin diluido en

agua bidestilada (1:1) seguido de rápida agitación. Se dejaron reposar por 30 min hasta que se estabilizara el color para luego determinarles la absorbancia a 750 nm.

La concentración de PCT se calculó en mg/mL para cada una de las muestras de cada experimento y al menos por triplicado para cada punto experimental.

11.2 Biomarcadores de estrés oxidativo

11.2.1 [NOx] por reducción con vanadio (Miranda *et al.*, 2001)

Fundamento

Granger *et al* (1996), y luego innumerables publicaciones que le sucedieron hasta el presente, establecieron que existe una fuerte correlación entre la producción endógena de óxido nítrico (NO) y los niveles de nitritos/nitratos ([NOx]), y que esto no depende de factores exocelulares (tales como la dieta en animales enteros o la composición del medio de cultivo). De este modo, midiendo los niveles de [NOx] se puede estimar cuantitativamente la producción de NO. Se sabe también que este dato correlaciona de manera confiable con el nivel instantáneo de peroxinitrito (Miranda *et al.*, 2001).

Esta técnica se basa en la reacción de Griess que da como producto final un cromóforo con un pico de absorbancia máxima a 405 nm. Este cromóforo se produce a partir de la diazotización de la sulfanilamida por el ácido nítrico (NO_2^-), seguida de la formación de un complejo con aminas bicíclicas como la N-1-naftil-etilendiamina (**Fig. 8**). Antes de efectuar la reacción de Griess se reduce todo el nitrato presente en la muestra a nitrito utilizando cloruro de vanadio (III) como agente reductor a baja temperatura.

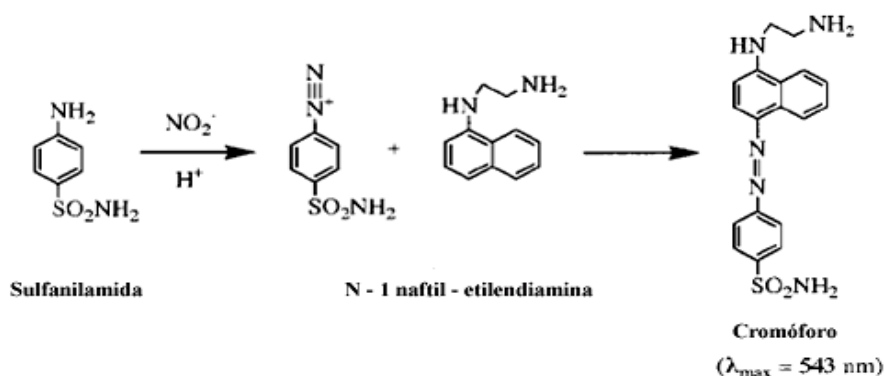


Figura 8: Esquema de la reacción de Griess [Tomado de Miranda *et al.*, 2001].

Procedimiento

Los homogenatos se desproteinizaron previamente con metanol (MetOH) y Cl_3CH en partes iguales. Las muestras se reposaron sobre lecho de hielo 15 min y se centrifugaron

a 5000 g por 20 min. Se tomaron alícuotas de cada sobrenadante y se llevaron a volumen final de 200 μL con agua bidestilada. Luego se agregaron 150 μL de VCl_3 en HCl 1 M y 150 μL del reactivo de Griess premezclado (volúmenes iguales de sulfanilamida al 2 % en ácido clorhídrico al 5 % y N-1-naftil-etilendiamina al 0.1 % en agua bidestilada).

Luego de agitar en vortex, se incubaron las muestras 30 minutos a 37 ° C y se leyó en un espectrofotómetro Cintra-20 (Sydney, Australia) a una longitud de onda de 405 nm contra agua bidestilada (como blanco de reacción).

Para realizar los cálculos se trazó una curva de calibración en un rango de concentración 1 a 500 μM , utilizando una solución standard de NaNO_3 (Merk, ultrapuro) 1.42 mM en agua bidestilada.

11.2.2 Carbonilos proteicos (Reznick y Packer, 1994)

Fundamento

Esta técnica detecta la formación de grupos carbonilos u “oxo” que se forman en las proteínas debido a la oxidación de los aminoácidos de las cadenas laterales por ROS. Estos carbonilos reaccionan con la 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) para formar dinitrofenilhidrazonas de color caoba que pueden ser leídas por espectrofotometría.

Procedimiento

Alícuotas apropiadas de las muestras se llevaron a volumen final 1.5 mL con PBS. Se agregaron 1.5 mL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM en HCl 2 N y se incubaron las muestras en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se agregó a cada tubo 2 mL de una solución de NaOH 2 N y 1 mL de etanol absoluto para evitar la turbidez debida a restos de proteína desnaturalizada. Luego de cada agregado se agitó de inmediato en vortex. De esta manera se obtuvieron complejos de color caoba que se leyeron a 505 nm en el espectrofotómetro Cintra-20.

La curva de calibración se efectuó utilizando una solución standard de piruvato de sodio 2.30 mM, empleando alícuotas entre 40 y 100 μL .

11.2.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Yagi K, 1976)

Fundamento

Esta técnica se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con productos secundarios de la peroxidación lipídica, tales como el malondialdehido (MDA), 4-

hidroxihexanal y 4-hidroxinonenal, para formar aductos de color rosado que pueden ser leídos en un espectrofotómetro a una DO de 532 nm.

Procedimiento

Se tomaron alícuotas que se diluyeron con PBS a un volumen final de 200 μ L. Luego se adicionaron 200 μ L de SDS al 8.10 % y se agitó teniendo cuidado de no hacer excesiva espuma. A continuación se añadieron 1.5 mL de buffer acético/acetato 100 mM (pH 3.50), 1.5 mL de TBA al 0.8 % y 600 μ L de agua bidestilada. Las muestras fueron incubadas a 95 ° C durante 60 minutos. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y se les agregó 1 mL de agua bidestilada y 3 mL de alcohol isobutílico agitando vigorosamente en shaker. La fase orgánica se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm. Para determinar las concentraciones de TBARS en las muestras problema, se realizó una curva de calibración utilizando como testigo una solución comercial de MDA (bis-dimetil-acetal o 1,1,3',3'-tetrametoxipropano) en el rango de concentraciones 4.5 a 36.0 nmoles de MDA/tubo.

11.2.4 Ensayo FRAP (Benzie y Strain, 1996)

Fundamento

A pH ácido se puede determinar la habilidad de cualquier líquido biológico para reducir iones férricos a ferrosos. Esto se puede cuantificar colorimétricamente por formación de un complejo (cromóforo) entre el hierro ferroso y la tripiridil-triacina (TPZ) de intenso color azul con un pico de absorción a los 583 nm. Se trata de una reacción no específica que tiene en cuenta todos los componentes con capacidad reductora (bilirrubina, ácido úrico, vitámeros, etc.).

Procedimiento

Se tomaron 3 mL de la solución *reactivo de trabajo* compuesta por buffer acético/acetato 300 mM (pH 3.60), solución de TPZ 10 mM (Sigma) en HCl 40 mM y solución de cloruro férrico 20 mM (Mallincrodt, USA) mezcladas en proporción 83: 8.5: 8.5, respectivamente. A 3 mL de este reactivo dispensado en una cubeta de 1 cm de paso de luz y termostatizada a 25 ° C, se le agregaron 100 μ L de muestra. Tras la mezcla inmediata por inversión se obtuvieron los datos de DO (583 nm) vs tiempo durante 4 minutos mediante registro continuo. De cada curva se calculó la pendiente (velocidad) de incremento de DO y se la comparó con la pendiente obtenida para un plasma standard

(Sigma) cuya capacidad antioxidante resultaba conocida. A su vez, el valor de FRAP de esta muestra de referencia se determinó por calibración con una solución comercial de concentración conocida de Trolox® (diacetato de α -tocoferol). Las muestras ensayadas para FRAP se trataron previamente con solución de uricasa en exceso disuelta en buffer fosfato 300 mM/glicerol 20 mM (pH 7.40) de forma tal de asegurar la destrucción total del ácido úrico presente, el cual contribuye significativamente al poder antioxidante. De esta manera se pudo cuantificar al resto de los antioxidantes biológicamente activos sin la interferencia de este compuesto endógeno.

11.3 Determinaciones de componentes del sistema de defensa antioxidante (SDA)

11.3.1 Enzimas del SD

11.3.1.1 Catalasa (Aebi, 1984)

Fundamento

La descomposición del H_2O_2 se puede registrar en el UV (a 240 nm) como una disminución de la absorbancia vs tiempo en una mezcla de reacción a la que se le agrega material biológico previamente tratado para la determinación de la actividad catalásica. La diferencia de absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la enzima.

Procedimiento

Se dispensaron alícuotas (0.5 mL) de solución sustrato constuída por peróxido de hidrógeno (Sigma, 70 volúmenes) al 0.34 % en buffer de reacción y se diluyeron con 2.5 mL de buffer $KH_2PO_4/Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 50 mM; pH: 7.0) en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se agregaron 30 μ L de la muestra y tras mezclar rápidamente por inversión se leyó el cambio de DO a 220 nm durante aprox. 2 min en espectrofotómetro de doble haz contra un blanco de reacción sin muestra. De acuerdo con la técnica original la alícuota incorporada al ensayo fue previamente tratada con Tritón X-100 y etanol con el fin de activar las formas oligomerizadas de la enzima. A partir de las curvas obtenidas se calculó el valor de k usando la siguiente ecuación:

$$k = (2.30/t) \cdot \log (DO_{\text{final}} - DO_{\text{inicial}})$$

La actividad específica de la enzima fue calculada considerando la concentración de proteínas que le correspondía a cada muestra.

11.3.1.2 Superóxido dismutasa (SOD) (Misra y Fridovich, 1972)

Fundamento

Esta técnica se basa en la inhibición de la oxidación espontánea de la epinefrina a adenocromo que ocurre a pH 11 y a velocidad constante (cinética de orden cero) cuando la concentración inicial de sustrato decae muy lentamente.

Procedimiento

En una cubeta de cuarzo se colocaron 970 μ L de buffer carbonato/bicarbonato 50 mM; pH 11.0 en EDTA 0.1 mM y se adicionaron 20 μ L de epinefrina ultra-pura 30 mM disuelta en ácido acético al 0.05 %. Luego de agregar la alícuota de muestra se mezcló por inversión y se leyó la DO en espectrofotómetro Cintra de doble haz a una longitud de onda de 480 nm durante 3 minutos. Para poder hacer el cálculo de concentración de SOD en las muestras se realizó una cinética de reacción sin homogenato para obtener la velocidad de auto-oxidación o de referencia de la epinefrina (Δ ref). Una unidad enzimática (UID) es aquella que inhibe al 50 % la auto-oxidación.

$PI = (\Delta \text{ SOD} / \Delta \text{ ref}) \cdot 100$ (PI: porcentaje de inhibición por minuto)

$UID = PI / 50$

Para calcular la actividad específica de SOD se calculó el cociente entre el valor de UID de cada muestra y el valor correspondiente de concentración proteica (mg/mL).

11.3.1.3 Glutación transferasa (GT) (Habig *et al.*, 1974)

Fundamento

La enzima GT cataliza reacciones en las cuales el anión tiolato actúa como grupo nucleofílico. Esto implica que cualquier compuesto que posea grupos electrofílicos podría ser eventualmente atacado. Existen, por lo tanto, una extensa variedad de sustratos posibles para esta enzima. La metodología empleada por Habig *et al* (1974) recurre a la capacidad de la enzima para transformar 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) en presencia de glutatión reducido.

Procedimiento

En una cubeta de cuarzo se colocaron 800 μ L de buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.5), 50 μ L de buffer fosfato sódico 10 mM (pH 6.5), 50 μ L de la solución de CDNB 20 mM y 50 μ L del GSH 20 mM. Luego de mezclar por inversión, se agregaron las alícuotas correspondientes de muestra, se mezcló otra vez por inversión y se registró el

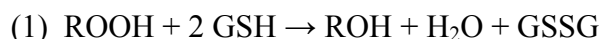
cambio de DO en espectrofotómetro Cintra de doble haz a una longitud de onda de 340 nm durante 3 minutos. Se calculó la actividad específica de la enzima para cada muestra en términos de nanomoles de producto/min.mg de PCT, siendo $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

11.3.1.4 Glutación peroxidasa (GPx) (Flohé y Gunzler, 1984)

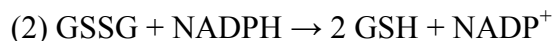
Fundamento

Las GPx son isoenzimas que catalizan la reducción de hidroperóxidos a expensas de GSH (1). El método cinético de Flohé y Gunzler permite determinar el total de la actividad GPx utilizando el GSSG formado en la reacción (1) para reducirlo nuevamente a GSH a expensas de NADPH en una reacción acoplada que cataliza la glutatión reductasa (GR) (2).

GPx



GR



Procedimiento

Se agregaron 550 μL de buffer fosfato de potasio 0.1 M/EDTA 1 mM (pH 7.0), 100 μL de GSH 10 mM, 100 μL GR (Sigma) (0.24 unidades de actividad enzimática/tubo), 10 μL de ázida sódica 100 mM y la alícuota correspondiente de homogenato en una cubeta de cuarzo de un cm de camino óptico. Se incubaron las muestras a 37 ° C por 10 minutos. Luego se añadieron 100 μL de NADPH 3 mM y se mezcló por inversión para registrar la cinética de cambio de la DO a una longitud de onda de 340 nm por 3 minutos. Para realizar los cálculos se tomó como una unidad enzimática a la oxidación de un mmol de NADPH/min, siendo $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La actividad específica se obtuvo considerando la cantidad de unidades de la muestra y el valor correspondiente de proteína (mg/mL).

11.3.1.5 Glutación reductasa (GR) (Carlberg y Mannervik, 1985)

Fundamento

Esta técnica se basa en la cinética de transformación del GSSG a GSH por la GR a expensas de NADPH de forma tal que se sigue la aparición de NADP^+ en el UV a 340 nm.

Procedimiento

Se colocaron en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico 500 μL de buffer fosfato de potasio 0.2 M/ EDTA 2 mM (pH 7), 50 μL de NADPH 2 mM en buffer

TRIS/HCl 10 mM (pH 7), 50 μ L de GSSG 20 mM y 350 μ L de agua bidestilada. Luego se incubaron las muestras a 37 ° C durante 3 minutos y se agregó la alícuota en ensayo mezclando por inversión. Las cinéticas fueron registradas por doble haz en el espectrofotómetro Cintra contra el blanco de reactivos a 340 nm por 3 minutos. Se calculó la actividad específica de la enzima para cada muestra en términos de micromoles de producto/min.mg de proteína, siendo $\epsilon = 6.22 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

11.3.2 Componentes no enzimáticos del SDA

11.3.2.1 Vitamina E (α – tocoferol)

Fundamento

Los vitámeros E (α - y γ -tocoferol fundamentalmente) se determinaron, luego de extraerlos de la muestra por el método de Buttriss y Diplock (1984), empleando la técnica de HPLC descrita por Bagnati *et al* (1998). Esta técnica permite detectar y cuantificar tanto α - como γ -tocoferol con límites de detección de 0.5 y 1 ng, respectivamente. Los análisis se realizaron en un equipo Merck-Hitachi 4200 con bomba inteligente. Se empleó una columna de fase reversa: Econosil-C₁₈ 10 U, longitud: 250 mm, I.D.: 4.6 mm de Alltech Associates, Inc. (Deerfield, IL, USA). La columna se conectó a un *Direct-connect Cartridge Guard Column System* de la misma marca comercial. La fase móvil fue acetonitrilo - diclorometano - metanol (67-19-14) y la elusión fue isocrática a 1.5 mL /min. La detección se realizó mediante detector UV a 292 nm para α - y β -tocoferoles con un detector Merck-Hitachi L4200 UV-Vis variable perteneciente al mismo equipo.

Procedimiento

Se tomaron alícuotas de material biológico (200 μ L de plasma, 400 μ L de homogenato celular, 100 μ L de homogenatos titulares) y se les agregaron 50 μ L de una solución de EDTA 200 mM. Se trataron luego con 200 μ L de una solución de ascorbato al 0.5 % y se incubaron 3 minutos a 70 ° C. Tras el agregado de 300 μ L de una solución saturada de KOH en etanol absoluto, se gasearon los tubos con N₂ y se saponificaron las muestras a 70 ° C por 30 minutos. Luego de enfriar, se trataron con 1 mL de agua bidestilada y se extrajeron con dos porciones de hexano de 3 mL cada una que fueron *pooleadas*. Se evaporaron los extractivos bajo corriente de N₂ y se disolvió el residuo en 300 μ L de fase móvil. Se ultrafiltraron las muestras antes de la inyección usando filtros Millipore (NY, USA) de 0.45 μ m. La calibración se realizó en cada lote analizado con una solución de α - tocoferol (Sigma, USA) en etanol absoluto en el rango 5-50 μ M con un

comportamiento lineal para todo el rango y coeficientes de variación inter- e intra-ensayo de 5.0 y 4.4 %, respectivamente.

11.3.2.2 Glutación (Anderson y Meister, 1980)

Fundamento

En esta técnica se expone a la muestra a cantidades excesivas de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para transformar todo el GSH presente en GSSG (Fase 1). En una segunda fase de la reacción el GSSG se reduce a GSH por una reacción acoplada catalizada por la GR NADPH-dependiente. A medida que la GR produce GSH éste reacciona con el DTNB remanente generando ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). La velocidad de aparición de TNB se puede monitorear a 412 nm, y resulta directamente proporcional a la concentración de glutación en la muestra.

Procedimiento

Se agregaron 500 μ L de buffer fosfato sódico 140 mM/ EDTA 6.3 mM (pH 7.50), 0.7 mL de la solución de NADPH (0.25 mg/mL), 283 μ L de la mezcla de DTNB 6 mM en ácido tricloroacético (TCA) al 5 % y la alícuota correspondiente del homogenato. Se incubó a 30 ° C por 10 minutos (Fase 1). Luego se agregaron 2.8 μ L de una solución conteniendo 5 UI de la enzima GR (Sigma, USA). Se mezcló por inversión y se colocó inmediatamente en el holder del espectrofotómetro de doble haz Cintra termostatzado a 25 ° C para registrar la cinética de la reacción (Fase 2) durante un período de 2 minutos. Para realizar los cálculos se repitieron los pasos anteriores utilizando varias alícuotas de una solución testigo de GSH en buffer fosfato sódico (con 2/3 del volumen en solución de TCA al 5 %) lo cual permitió calibrar el método.

11.4 Marcadores de apoptosis

11.4.1 Ensayo para caspasa-3 (kit comercial Sigma Chem. Co, USA)

Fundamento

Este ensayo se basa en la hidrólisis del péptido sintético que oficia de sustrato específico para esta enzima denominado acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina (Ac-DEVD-pNA), resultando en la liberación de la porción pNA. La pNA tiene un pico de absorción máximo a 405 nm.

Procedimiento

Se colocaron 30 μL de muestra obtenida en condiciones de inhibición completa de actividad proteolítica por medio de un cócktel especialmente diseñado por Sigma (USA) o de caspasa-3 (control positivo) en tubos rotulados. El ensayo se efectuó en dos series de muestras conteniendo o no 10 μL del inhibidor de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO (32 mM en DMSO). A todas las muestras se les agregó luego la correspondiente alícuota de buffer de ensayo (HEPES 200 mM a pH 7.4, CHAPS 1 %, DTT 50 mM y EDTA 20 mM) para llegar a un volumen final de 990 μL . La reacción se inició con el agregado de 10 μL del sustrato de caspasa-3 20 mM en cada tubo. Luego se incubaron las muestras en la oscuridad y a 37 ° C durante 2 hs. A continuación se midió la absorbancia a 405 nm usando una cubeta de cuarzo. Para poder hacer los cálculos de actividad se realizó una curva de calibración utilizando una solución standard de p-nitroanilina. La actividad de caspasa-3 se calculó en μmoles de pNA liberados/min.mL de muestra basándose en la siguiente fórmula y se corrigieron por el contenido de proteína en la alícuota.

$$\text{Actividad} = \text{DO} \times \text{factor de dilución} / \epsilon (10.5 \text{ mM}) \times t \times \text{volumen}$$

Todos los reactivos empleados en este ensayo fueron provistos con el kit comercial.

11.4.2 Mili (m)- y Micro (μ)- calpaínas (Botha et al., 2004)

Fundamento

El ensayo se basa en la hidrólisis de caseína ultra-pura por acción de las calpaínas y posterior aislamiento de los fragmentos proteolíticos que se miden por absorbancia en el UV a 280 nm. Regulando el nivel de calcio en el medio se selecciona el tipo de calpaína que se desea determinar.

Procedimiento

Se tomó la alícuota correspondiente de homogenato y se llevó a un volumen final de 500 μL usando buffer de reacción TRIS/acetato 100 mM (pH 7.5) el cual contenía 5 mM o 500 μM de CaCl_2 según se quisiera determinar la actividad de mili- o micro-calpaínas. Luego se mezcló por inversión y se dejó incubando por 24 hs a 25 ° C. Se agregaron 400 μL de solución de TCA 5 %, volviendo a mezclar por inversión e incubando 2 minutos más a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 6000 g. Se separó el sobrenadante por aspiración para luego medir la absorbancia a 280 nm contra el blanco de reacción conformado por TRIS/acetato 100 mM (pH 7.5) sin el agregado de calcio. Los cálculos se hicieron considerando como una unidad de calpaína aquella cantidad de enzima que produce una absorbancia de 0.01 a 280 nm en

30 minutos de reacción. La actividad específica se expresó considerando el contenido proteico de la muestra (mg/mL) y se expresó en unidades /min.mg.

11.5 Homeostasis del cobre

11.5.1 Concentración de Cu (Berkovitch et al., 2003)

Las muestras fueron digeridas tomando alícuotas de 100 μL y adicionándoles una mezcla formada con 4 mL de HNO_3 y 1 mL HClO_4 (Carlo Erba, 99 % pureza). Luego, se calentaron a 120 ° C por 60 minutos en un bloque de calentamiento regulable. Los digestos se enfriaron y diluyeron con agua ultrapura (18 $\text{m}\Omega\text{-cm}$ /Carlo Erba, Milan, Italia). Esta solución fue ultrafiltrada usando una membrana Millipore de 0.22 μm (*Milli-Q Purification System*, de Millipore, CA, USA). Se inyectaron alícuotas de esta dilución en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer-1100B equipado con una lámpara catódica Perkin-Elmer (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, USA). El ancho espectral fue de 1 nm. Todas las medidas se hicieron en tres canales simultáneos y en el modo de máximo espectral (324.1 nm). Las calibraciones fueron realizadas usando una solución estándar de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en 0.5 N HNO_3 (Tritrisol de Merck Co., Darmstadt, Alemania). Los coeficientes de variación intra- $[(\text{SD}/\text{X}).100]$ e inter- $[(\Delta\text{SD}/\text{X}).100]$ experimentales fueron de 10.5 y 6.0 %, respectivamente. La concentración de Cu en un pool de muestras de 55 voluntarios sanos (promedio de edad: 42 ± 4.1) fue de $802 \pm 55 \mu\text{g/L}$ (12.6 μM). Este resultado concuerda con otros publicados previamente (Terrés-Martos *et al.*, 1997; Bercovithc *et al.*, 2003).

11.5.2 Determinación de metalotioneínas (MTs) (Bienengrüber et al., 1995)

Fundamento

Esta técnica se basa en la capacidad de las MTs de captar Ag^+ . La concentración de Ag^+ puede ser cuantificada utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica. Conociendo la estequiometría de formación del complejo se puede inferir la concentración de MTs.

Procedimiento

Se tomaron las correspondientes alícuotas de muestra y se colocaron en tubos de borosilicato convenientemente rotulados agregándoles buffer glicina 0.5 M (pH 8.5) hasta completar 800 μL . Luego se agitaron las muestras en agitador manual. A continuación se añadieron 500 μL de solución de trabajo (20 $\mu\text{g Ag}^+/\text{mL}$), se mezcló por inversión y se

dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Se continuó agregando 100 µL de un hemolisado de glóbulos rojos (aprox. 15 gr de hemoglobina/dL) y calentando en baño de agua a 100 ° C por 1 minuto y medio. Luego se centrifugaron los tubos a 1200 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se repitió la etapa anterior en el sobrenadante centrifugando de la misma manera. Luego se aspiró con cuidado el sobrenadante con una pipeta Pasteur. El aspirado se colectó en un tubo de vidrio con tapa a rosca. Antes de guardarlo en frío y oscuridad hasta su uso, se lo acidificó con HNO₃ al 3 % (500 µL cada 1.5 mL de muestra). La concentración de Ag⁺ se midió por absorción atómica de la misma manera que se realizó para el Cu y utilizando el mismo equipo. Para realizar los cálculos se consideró que 1 µg de Ag⁺ representa 3.55 µg de MTs (Bienengräber *et al.*, 1995).

11.5.3 Determinación de ceruloplasmina (CRP) (Cerón y Martínez-Subiela, 2004)

Fundamento

Este método se basa en la actividad enzimática de la CRP que puede catalizar la conversión de p-fenilendiamina en un cromóforo púrpura cuya aparición se puede medir en un espectrofotómetro a 550 nm y resulta ser proporcional a la concentración de CRP.

Procedimiento

Las muestras fueron incubadas a 37 ° C en buffer acético/acetato de sodio 50 mM (pH 5.5). Las DO se midieron en la fase inicial de la reacción (3 minutos) usando un equipo SpectraMax M2/M2^e Multi-Detector Microplate Reader (Molecular Devices Analytical Technologies-Sunnyvale, CA, USA). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 8.3 y 4.4 %, respectivamente. La velocidad inicial de reacción para cada muestra fue calculada automáticamente y convertida en concentración de CRP por comparación con el standard (Sigma Chem. Co. Buenos Aires, Argentina) conteniendo 50 unidades de CRP-oxidasas/mg de proteína. Las mediciones de CRP en muestras de plasma de 55 sujetos sanos dieron en promedio 259 ± 41 mg/L. Esto concuerda con resultados previos en humanos (Prakasam *et al.*, 2001).

11.5.4 Cobre libre o no ligado a CRP (NCBC)

Con los datos de Cu y CRP se calculó el porcentaje de Cu que no está unido a la CRP utilizando la siguiente fórmula debida a Twoney *et al.* (2007):

$$(([\text{Cu}] - 47.2 \times [\text{CRP}]) \times 100 / [\text{Cu}])$$

La concentración de Cu fue expresada en µmol/L y la CRP en g/L

11.6 Determinaciones complementarias

11.6.1 Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) (Kit de Wiener Lab.)

Fundamento

Esta técnica se basa en la reacción dependiente de nucleótido de adenina que transforma al piruvato en L-lactato y es catalizada por la LDH. Se llevó a cabo utilizando un kit comercial para determinación cinética en el UV de Wiener Lab. (Rosario, Argentina; Catálogo: 1521304).

Procedimiento

Se agregaron 3 mL de NADH 0.2 mM (reconstituido en buffer TRIS 80 mM; pH 7.2) en una cubeta termostaticada a 25 ° C, y 100 µL de muestra. Se mezcló y se pre-incubó por 30 segundos luego de los cuales se midió la absorbancia inicial y el cambio de DO/min durante los siguientes tres minutos (pendiente cinética) a 340 nm. Para realizar los cálculos de actividad de LDH se empleó la siguiente ecuación:

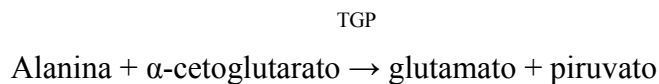
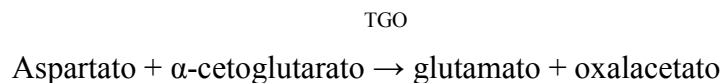
$$\text{LDH (U/I)} = \Delta A/\text{min} \times \text{factor}$$

El factor de cálculo varía dependiendo de la temperatura de reacción que en nuestro caso fue de 25 ° C.

11.6.2 Transaminasas (TGO y TGP) (Kit de Wiener Lab.)

Fundamento

Esta técnica se basa en las siguientes reacciones:



El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) produciendo en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

Procedimiento

Se colocaron 0.5 mL del sustrato indicado para cada enzima en tubos independientes. Para la determinación de la TGO se empleó solución de aspartato 100 mM

y 2 mM de α -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mM (pH 7.4) y para la de TGP solución de alanina 200 mM y 2 mM de α -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mM (pH 7.4). Luego se agregaron 100 μ L de muestra mezclando por suave agitación. Los tubos se dejaron incubando 30 minutos a 25 ° C. Pasado el tiempo se agregaron 0.5 mL de 2,4-DNPH y se dejó nuevamente incubando 10 minutos a 37 ° C. Por último se añadieron 5 mL del diluyente/revelador constituido por NaOH 4 mM. Después de 2 minutos se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Cintra a 505 nm. Las actividades se expresaron en UI/L de plasma o de medio de cultivo, según correspondiera. Todos los reactivos utilizados en este ensayo fueron provistos por el comerciante.

11.6.3 Análisis de lípidos totales

Fundamento

La composición de ácidos grasos se analizó mediante una primera etapa en la que se extrajeron los lípidos totales a través de la técnica de Folch *et al* (1957) basada en la extracción con mezcla cloroformo: metanol (2:1) y seguida de partición en solución salina. Después de la evaporación de la solución clorofórmica se saponificaron los lípidos complejos por calefacción a 85 ° C con KOH al 10 % en etanol bajo atmósfera de nitrógeno. El saponificado fue extraído con hexano para liberarlo del insaponificable y luego de acidificar con exceso de HCl (c), se re-extrajo para obtener los ácidos grasos libres.

Tras evaporación a temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno, se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAGs) (Morrison y Smith, 1964) que fueron destinados al análisis cromatográfico. Para esto, se redisolviéron los ácidos grasos en trifluoruro de boro en metanol (Fe₃B/MetOH al 10 %; P/V) adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania) y se calefaccionó por 90 minutos a 75 ° C en atmósfera de nitrógeno. Los ésteres metílicos (EMAGs) se extrajeron con tres porciones de hexano de 2 mL cada una que fueron *pooleadas*. En este procedimiento se bloquea el extremo carboxilo de los ácidos grasos anulando la polaridad inherente a este grupo funcional al tiempo que se mejora su coeficiente de partición. De esta forma se optimiza la interacción de las muestras con los rellenos o fases estacionarias usualmente empleadas (Morrison y Smith, 1964).

Procedimiento

Para aplicar el análisis a células, las monocapas fueron lavadas 2 veces con 5 mL de PBS cada vez. Luego se agregaron otros 5 mL de PBS para suspender las células por medio de un *policeman*. Se trasvasó cada suspensión a un tubo de vidrio de base cóncava y tapa con junta standard esmerilada, mantenido en lecho de hielo. A continuación se lavaron por última vez las botellas de cultivo con 2 porciones de 2 mL de PBS cada una, las cuales fueron añadidas a la suspensión de células. Luego se centrifugaron los tubos a 800 x g por 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los pellet fueron resuspendidos en 5 mL de PBS agitando en agitador manual hasta obtener una solución homogénea. De allí se tomaron 50 μ L para determinar proteína celular total (PCT). El resto de la suspensión se volvió a centrifugar descartando el sobrenadante. Los pellets se trataron con 5 mL de Folch agitando despacio. Las muestras fueron gaseadas con N₂ y guardadas a -4 ° C toda la noche para efectuar la partición tal como describe en la técnica original. El extractivo orgánico se pasó por filtro de papel contenido en un mini-embudo de vidrio con un lecho de sulfato sódico anhidro para secarlo. Se las almacenó bajo atmósfera de N₂ a -18 ° C hasta el momento de sembrarlas para su análisis por cromatografía gas-líquido capilar computarizada (c-GLC)

El procedimiento seguido para otras muestras biológicas (plasma, homogenatos tisulares) fue idéntico al descrito con la sola adaptación de la alícuota de partida.

11.6.4 Análisis de EMAGs por c-GLC

Los EMAGs se ultrafiltraron por medio de mini-fitros Millipore de membranas de PVDF resistentes a solventes. Se inyectaron (en volumen no mayor a 1 μ L) en una columna capilar montada en un equipo Hewlett Packard HP/6890 Series GC System Plus (Avondale, PA) que se dispuso en serie con el integrador y una terminal de análisis de datos. Los EMAGs se identificaron mediante sus tiempos de retención relativos (usualmente al ácido esteárico y al araquidónico) y se emplearon standares puros adquiridos a Sigma (USA) o a Serdary Research (Canadá). La distribución de masas se recalculó sobre los datos de área bajo la curva considerando los picos mayoritarios y expresando los datos como moles por ciento del total. Los detalles concernientes al equipo y fases empleadas en la partición se encuentran publicados (Marra y Alaniz, 1989).

11.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de Student-t test o bien mediante el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el software de *GB-STAT Professional Statistics Program* (versión 8.0) de Dynamic Microsystems Inc. (Silver Springs, MD, USA). Como complemento del test de ANOVA, y en los resultados que así lo requirieron, se realizó el test de Tukey de comparación múltiple. Las curvas de ajuste por mínimos cuadrados, correlaciones, regresiones (lineales y no lineales) y las gráficas científicas fueron efectuadas mediante el programa *Sigma Plot Scientific Graphing Software* (versión 9.0) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA) o con el programa *Systat* (versión 12 para Window) de SPSS Science (Chicago, IL). Los estudios de correlación fueron realizados por el método de Pearson como lo describen Kelimbaum y Kupper (1997) o por el test no paramétrico de Spearman. En todos los casos las hipótesis nulas fueron rechazadas con un $p < 0.05$ o 0.01 que correspondían a diferencias *significativas* (*) o *muy significativas* (**), respectivamente.

RESULTADOS

12.1. Experimentos en cultivos celulares (efecto *in vitro*)

12.1.1 Exposición a dosis crecientes de iones Cu^{++} (0, 20, 40, 80 y 160 μM) durante un período fijo de 24 hs.

La **figura 9** muestra el aumento de la incorporación de Cu en ambas líneas celulares (HepG2 y A-549) luego de la exposición a distintas concentraciones extracelulares del metal. Este incremento resultó ser muy significativo cuando se expusieron los cultivos a concentraciones de Cu 80 y 160 μM . Sin embargo, frente a concentraciones 40 μM la significación estadística dependió de la línea celular. Resultó ser mucho más importante ($p < 0.01$) en HepG2 mientras que fue significativa al nivel $p < 0.05$ en cultivos de A-549. Si bien se pudo observar que existió cierto ingreso de iones Cu cuando se expusieron las células a concentraciones 20 μM , estos valores no resultaron ser significativos. A su vez, podemos observar claramente que la entrada de iones Cu a las células tendría una fase exponencial, para luego alcanzar una meseta o *plateau* en donde su incorporación se encontraría reducida (más evidentemente en HepG2 que en A-549).

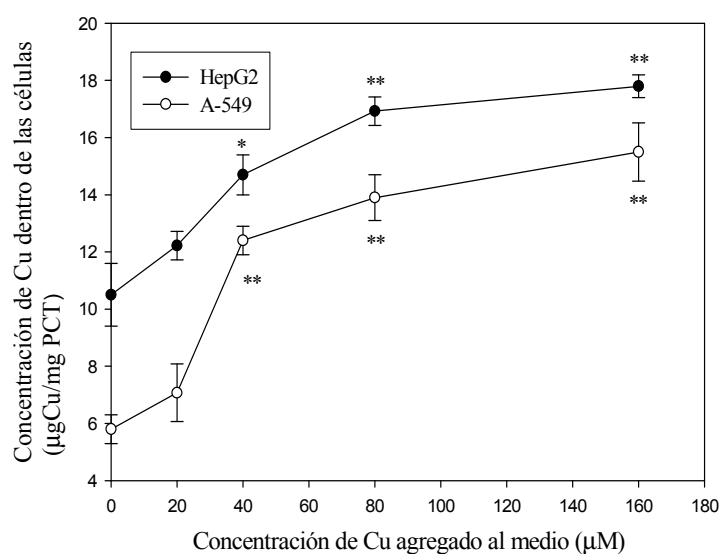


Figura 9: Concentración de Cu en el interior celular ($\mu\text{gCu/mg PCT}$) vs concentración de Cu (20-160 μM) en el medio extracelular. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Las diferencias significativas respecto al control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$).

La **figura 10** muestra los resultados de las determinaciones de los biomarcadores de estrés oxidativo luego de la exposición a Cu^{++} . Para facilitar la interpretación y poder comparar los datos entre ambas líneas celulares los resultados fueron calculados como

porcentajes de cambio respecto al control. Los datos del panel superior (A) corresponden a la línea HepG2 y los del inferior (B) a las células A-549.

Se puede observar que se produjo un marcado incremento de TBARS (como indicador de peroxidación lipídica), CPs (marcadores de daño oxidativo a proteínas) y [NOx] (productos finales del metabolismo del óxido nítrico y del anión peroxinitrito) en ambos tipos celulares expuestos a sobrecarga por iones Cu. A concentraciones 20 μM los aumentos de TBARS, CPs y [NOx] resultaron ser significativas ($p < 0.05$), mientras que concentraciones superiores (40-160 μM) generaron aumentos muy significativos al nivel $p < 0.01$. El aumento de TBARS observado en HepG2 y A-549 concordó con los resultados obtenidos en el análisis de la composición de EMAGs, en donde se pudo constatar un acrecentamiento significativo de los ácidos grasos saturados en detrimento de los insaturados (PUFAs) luego de la suplementación con concentraciones crecientes de iones cúpricos (20-160 μM) (Fig. 11).

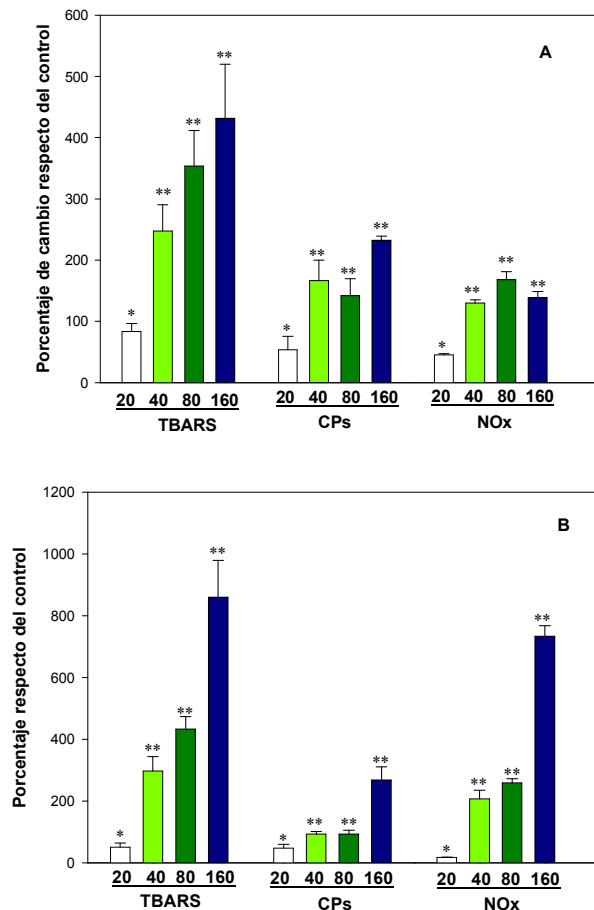


Figura 10: Porcentaje de cambio respecto al control de los parámetros de daño oxidativo TBARS, CPs y [NOx] respecto de los controles, en células HepG2 (A) y A-549 (B) expuestas a concentraciones crecientes de cobre (20-160 μM). Los resultados significativos respecto al control fueron indicados con asteriscos, * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$).

El aumento de los ácidos grasos saturados y la disminución de los PUFAs resultaron ser proporcionales a la concentración de Cu^{++} en el medio de cultivo de las células (**Fig. 11**). A su vez, estos cambios provocaron una notable disminución del índice de insaturación desde valores de 125.9 ± 6.4 y 81.4 ± 3.7 en los lotes control de HepG2 y A-549 (respectivamente) hasta 77.6 ± 5.1 y 53.3 ± 2.8 en las células tratadas con $160 \mu\text{M}$ de iones cúpricos. Como se puede apreciar en ambas líneas celulares ocurrió un descenso del índice que llegó a ser de magnitud similar (aprox. – 65 % de cambio respecto al lote sin cobre agregado) a concentración $160 \mu\text{M}$. El contenido de 20:4 resultó ser muy bajo en ambas células (una característica común en líneas eternizadas) y se lo incluyó en el contenido de PUFAs $> 20 \text{ C}$.

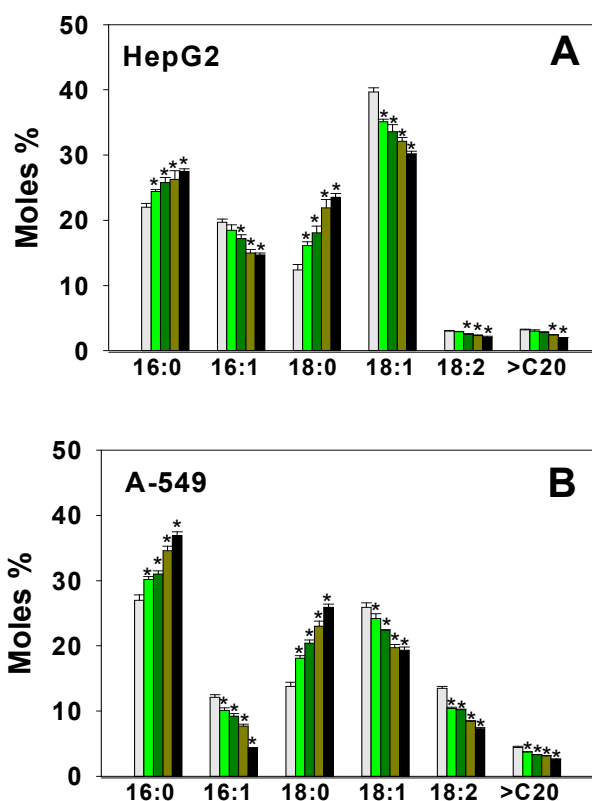


Figura 11: Composición de ácidos grasos en HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con concentraciones crecientes de iones Cu. Sin Cu o control (barra gris claro); con diferentes colores de verde Cu $20 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M}$ y en negro Cu $160 \mu\text{M}$. Los resultados se expresaron en términos de moles porcentuales \pm SD de cuatro determinaciones independientes ensayadas por duplicado. Las diferencias significativas respecto al control se indicaron con un asterisco,

* ($p < 0.05$).

En la **figura 12** se muestra un cromatograma representativo de la composición de acilos en lípidos totales celulares para la línea A-549 en donde se pueden ver claramente

las grandes variaciones producidas en las proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados bajo el efecto de la suplementación con Cu^{++} ($80 \mu\text{M}$) en comparación con el control sin agregado. Algo similar se observó para la línea HepG2.

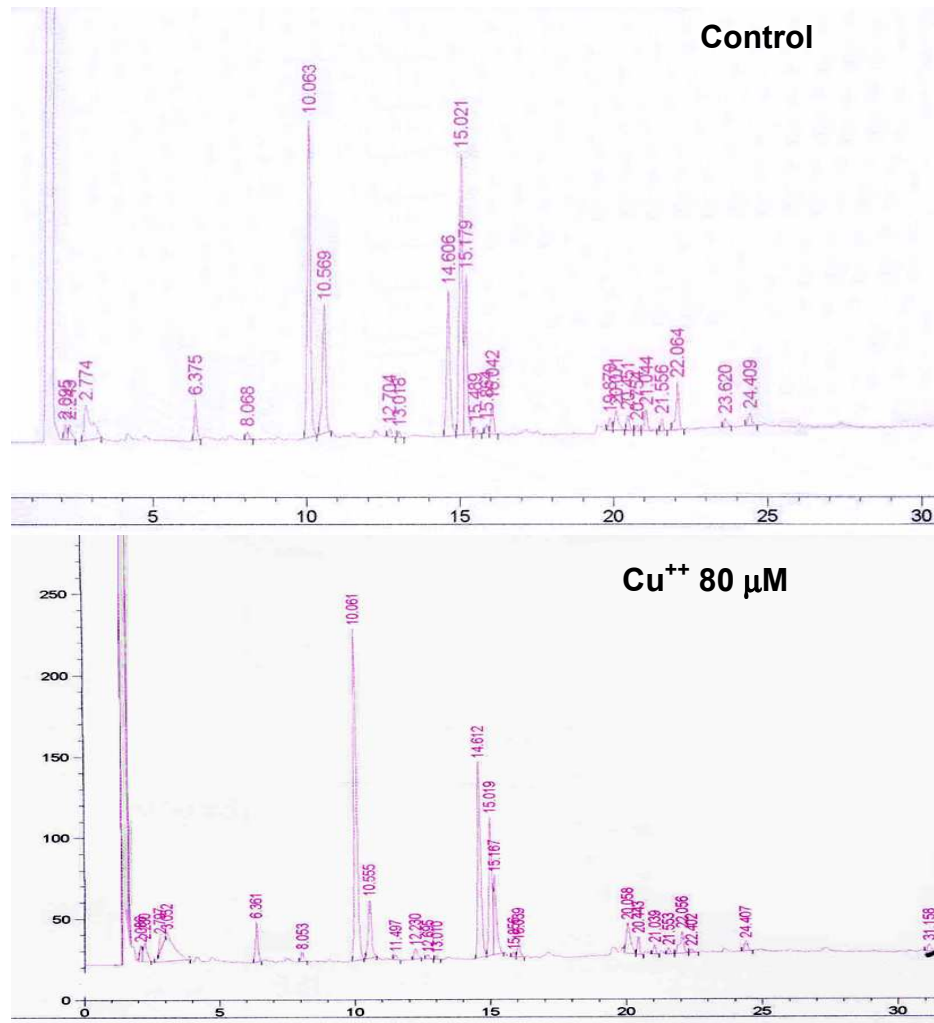


Figura 12: Perfil cromatográfico representativo para EMAGs constituyentes de A-549 tratadas con Cu $80 \mu\text{M}$ y control sin agregado de iones.

La **tabla IV** muestra el efecto producido por distintas concentraciones de Cu sobre la actividad de las enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante en cultivos de células HepG2 y A-549.

Tabla IV: Actividad de las enzimas del SDA.

Actividades enzimáticas	Concentración μM de cobre							
	20		40		80		160	
	A-549	HepG2	A-549	HepG2	A-549	HepG2	A-549	HepG2
CAT	-12	13	-11	27*	-7	91**	-9	149**
SOD	9	39*	32*	278**	80**	382**	146**	616**
GR	-45*	-19*	-48*	-66**	-61**	-68**	-72**	-81**
GT	40	118**	250**	218**	280**	288**	300**	171**
GPx	7	14	81**	30*	71**	57*	83**	66**

*Cada dato está expresado como porcentaje de cambio respecto al control (los desvíos fueron omitidos por simplicidad pero ninguno fue superior al 11 % respecto de los datos promedio). Cada punto es el promedio de 4 determinaciones independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Los valores significativamente diferentes respecto al control se encuentran resaltados.*

Todas las enzimas del sistema de defensa antioxidante acusaron modificaciones significativas en función del insulto oxidativo provocado por el cobre agregado al medio de cultivo. Sin embargo, no se observó cambio en la actividad de CAT para la línea celular derivada de pulmón. La actividad de SOD (considerada la “enzima centinela” como indicadora de estrés oxidativo) fue significativamente incrementada en ambas estirpes celulares, aunque se destacó el importante aumento observado en los homogenatos de células HepG2. En todos los casos hubo una modificación dependiente de la dosis a pesar que la glutatión transferasa en HepG2 resultó menos activada a concentración 160 μM que a 80 μM .

La **figura 13** muestra los resultados de las mediciones de concentración de antioxidantes lipo- e hidro-solubles en las muestras de HepG2 y A-549 luego de haber sido expuestas a Cu^{++} . Como antioxidante liposoluble de mayor importancia biológica se determinaron los valores de α -tocoferol, mientras que como antioxidante hidro-soluble se analizó al glutatión. Claramente se ha podido observar una disminución significativa de α -tocoferol en ambas líneas celulares después de haber sido expuestas a concentraciones 20 μM de Cu^{++} . Cuando la sobrecarga de iones en el medio fue superior a 40 μM el consumo de vitamina E resultó muy significativo, y más aún para las células de origen hepático.

En cuanto al glutatión total (GSSG + GSH) se han podido ver efectos diferentes dependiendo de la línea celular. En A-549 disminuyó significativamente, mientras que en HepG2 se produjo un incremento. Sólo se ha tenido en cuenta la concentración total de glutatión en las células, y no el contenido discriminado de GSH y GSSG. Esto es debido a que cuando las células son expuestas a agentes que generan un alto consumo de GSH (como los iones Cu^{++}), la cantidad de GSSG formado supera la capacidad de la enzima glutatión reductasa (GR) para reducirlo nuevamente a GSH. De este modo, el GSSG es transportado activamente fuera de la célula por sistemas específicos de membrana

plasmática. Por este motivo, la discriminación entre ambos podría llevar a conclusiones erróneas respecto de sus verdaderos valores dentro del citoplasma celular. Veremos luego que esta consideración no es válida para los animales enteros en donde existen otros mecanismos de compensación redox del tipo “sistémico”. Por otro lado, analizando la concentración de glutatión total se tienen en cuenta de manera indirecta la actividad de todas las enzimas que participan de su metabolismo. Resulta importante destacar que el descenso de glutatión en las células pulmonares - aunque no muy importante en cantidad - es de gran significado biológico.

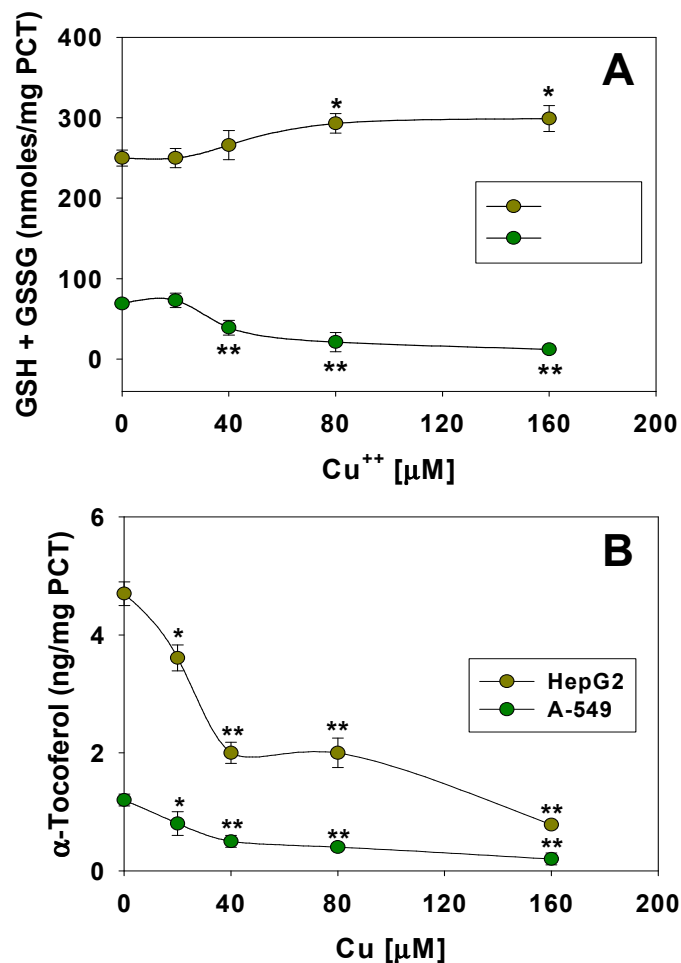


Figura 13: Concentración de antioxidantes lipo- e hidro- solubles en HepG2 y A-549 luego de la exposición a concentraciones crecientes de iones Cu⁺⁺ (20-160 μM). Los resultados fueron expresados como promedio ± SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores con diferencias significativas y muy significativas con respecto al control fueron indicados con * y ** (p<0.05 y 0.01), respectivamente.

En la **figura 14** se muestra la disminución significativa de la capacidad antioxidante total (FRAP) de los homogenatos en ambas líneas celulares en presencia de iones Cu⁺⁺. La evaluación de esta capacidad correlaciona con los datos de pérdida de α-

tocoferol que es uno de los mayores contribuyentes en el ensayo FRAP como agente reductor. Cabe aclarar que en nuestras condiciones de trabajo el ácido úrico (otro de los agentes reductores endógenos importantes) fue previamente destruido mediante tratamiento con exceso de uricasa. De modo que nuestros datos correlacionaran mejor con los vitámeros antioxidantes lipofílicos presentes en las muestras. También es importante señalar que los efectos deletéreos fueron mayores en concordancia con los aumentos de Cu^{++} en el medio.

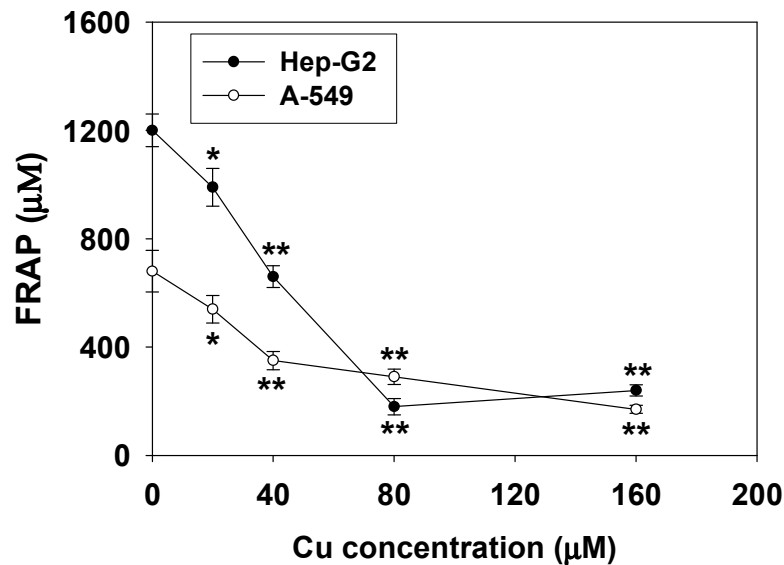


Figura 14: Capacidad antioxidante total (FRAP) de los homogenatos de células HepG2 y A-549. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado y expresados como equivalentes micromolares de Trolox® o diacetato de tocoferol (una forma hidrosoluble de la vitamina E). Los valores con diferencias significativas y muy significativas con respecto al control son indicados con * y ** ($p < 0.05$ y 0.01), respectivamente.

Habiendo comprobado el fuerte impacto de la sobrecarga de Cu^{++} sobre el sistema de defensa antioxidante en ambas líneas celulares, decidimos investigar el posible efecto de esta condición sobre las rutas de muerte celular programada redox-dependientes. La **figura 15** muestra los resultados correspondientes a la actividad de las enzimas involucradas en la muerte celular por apoptosis que dependen de la señal de Ca^{++} (mili- y μ -calpaínas). Encontramos un aumento altamente significativo de la actividad de las calpaínas a partir de concentraciones $40 \mu\text{M}$ de Cu^{++} en ambas líneas celulares. Concentraciones tan bajas como $20 \mu\text{M}$ aumentaron de manera significativa la actividad de ambas enzimas sólo en las células hepáticas.

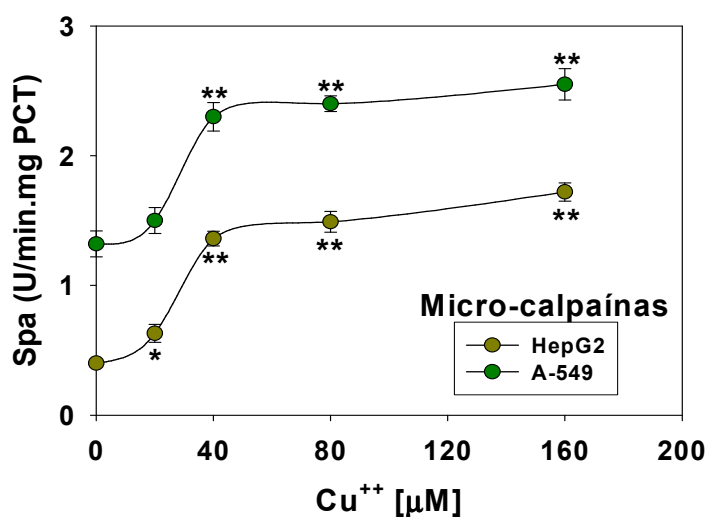
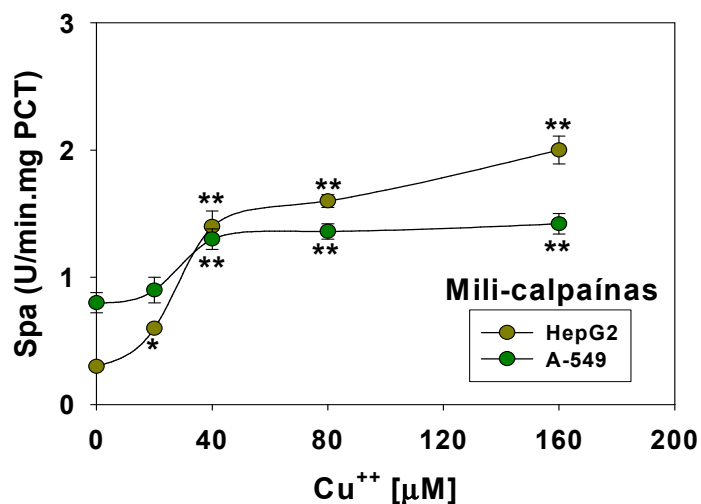


Figura 15: Actividad de calpaínas (mili- y μ -) en células A-549 y HepG2 determinadas como U/min.mg PCT. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * y ** $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Por otro lado, se determinó la actividad de la proteína efectora de apoptosis caspasa-3. Esta actividad enzimática se incrementó muy significativamente ante la presencia de concentraciones elevadas de iones Cu^{++} ($160 \mu\text{M}$) tanto en las células pulmonares como hepáticas (**Fig. 16**). La exposición de las células a Cu^{++} $80 \mu\text{M}$ sólo activó de forma muy significativa la actividad de caspasa-3 en las células A-549.

En relación con el aumento de la actividad de las enzimas anteriormente mencionadas, se decidió investigar qué proporción de células resultaba dañada por necrosis. Para esto, se eligió un clásico marcador enzimático para este tipo de muerte celular tal como la fuga de actividad lactato-deshidrogenasa (LDH) que se determinó en el

medio de cultivo centrifugado y ultrafiltrado luego de que las células fueran sometidas a distintas concentraciones de Cu^{++} (Fig. 17). Los resultados demostraron un claro y significativo aumento de la actividad de LDH en ambos tipos celulares que se observó a concentraciones 40 μM , y se tornó muy significativo a concentraciones de Cu^{++} superiores.

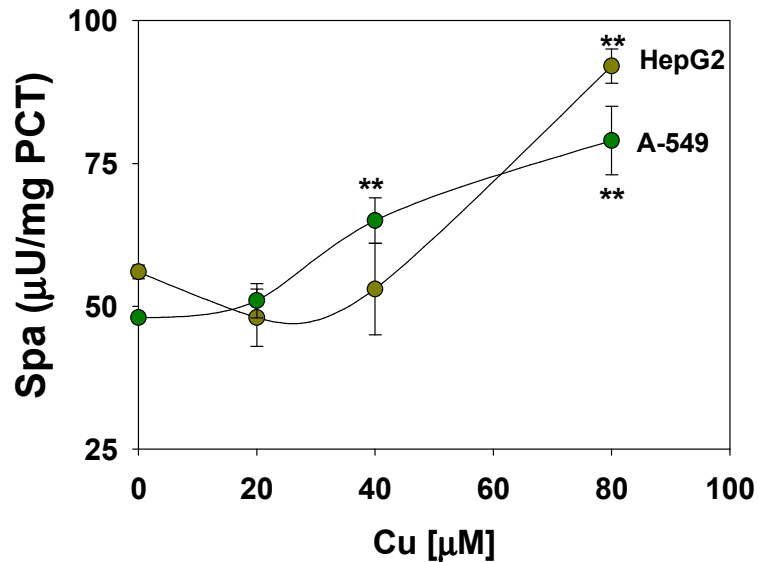


Figura 16: Actividad de caspasa-3 en células A-549 y HepG2 determinada en $\mu\text{U}/\text{mg PCT}$. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, ** ($p < 0.01$).

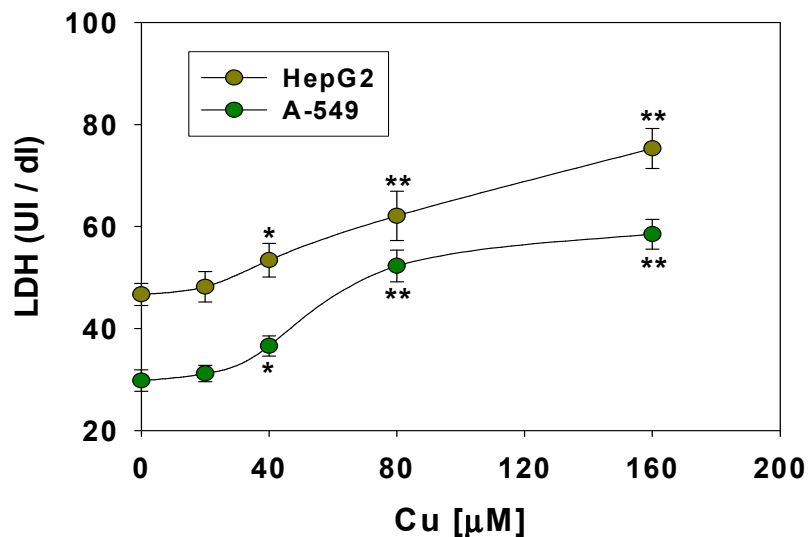


Figura 17: Actividad de láctico-deshidrogenasa (LDH) en células A-549 y HepG2 determinada como UI/dl.

Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos,

* y ** $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Por último, y teniendo en cuenta que se observó un incremento en la concentración de iones Cu dentro de las células en forma dosis-dependiente con el cobre agregado al medio de cultivo, se determinaron las concentraciones de proteínas asociadas a la homeostasis del Cu, MTs y CRP.

La **figura 18** muestra los resultados obtenidos en las determinaciones de ambas proteínas observándose un aumento de MTs que se correlacionó de manera lineal con los incrementos en los niveles de cobre tanto endocelulares como extracelulares para ambos tipos celulares. También se observó que el aumento de MTs resultó muy significativo a partir de 80 μM mientras que por debajo de este valor dependió de la línea celular, siendo significativo en A-549 y muy significativo en HepG2.

Por otro lado, se observó un incremento de la concentración de CRP que a diferencia de lo acontecido con las MTs no se correlacionó de manera lineal con la concentración de iones Cu^{++} . A pesar de ello, resultó significativo a concentraciones tan bajas como 20 μM y muy significativo a concentraciones superiores para ambas líneas celulares.

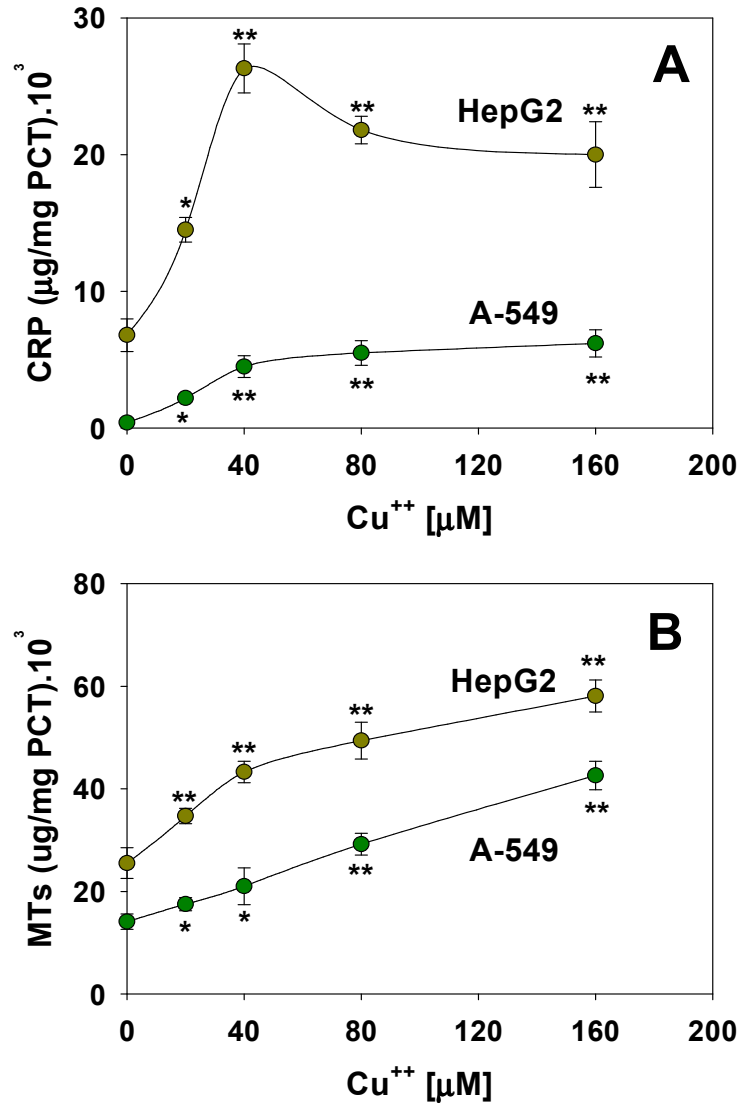


Figura 18: Concentración de proteínas involucradas en la homeostasis del Cu, CRP (A) y MTs (B), en A-549 y HepG2. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * y **, $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

12.1.2 Exposición de ambas líneas celulares a dosis crecientes de Cu⁺⁺ (0, 40 y 80 μM) durante distintos períodos de tiempo (1-5 días).

El objetivo de estos experimentos fue verificar si la exposición de las células a iones Cu⁺⁺ alteraba los parámetros de estrés oxidativo y las concentraciones de proteínas homeostáticas en forma tiempo-dependiente y con qué patrón cinético lo hacían. Asimismo, quisimos evaluar cómo esto afectaba al crecimiento de ambas estirpes celulares.

Las células respondieron a la sobrecarga de cobre con cambios paulatinos o progresivos para todos los componentes del sistema de defensa antioxidante y acusaron disminuciones de las concentraciones de antioxidantes (glutación y α-tocoferol) acordes con estos cambios. Las modificaciones de las proteínas homeostáticas también fueron concordantes con los cambios mencionados (no mostrados) y se hicieron significativas a partir de la semiconfluencia de las monocapas (día 4 post-siembra aproximadamente).

Para investigar el impacto sobre la viabilidad y el crecimiento celular se realizaron dos tipos de experimentos cuyos resultados se resumen a continuación.

En primer término se realizaron curvas de crecimiento para ambas líneas celulares a distintas concentraciones de Cu⁺⁺ (40 y 80 μM) (**Fig. 19**). En presencia de iones Cu⁺⁺ 40 μM se produjeron aumentos del período de *lag* inmediato a las siembras tanto de HepG2 como de A-549. Asimismo no se pudo diferenciar el período de crecimiento exponencial cuando las células se expusieron a concentraciones mayores a Cu⁺⁺ 80 μM. Estos cambios fueron significativos en ambas líneas celulares a partir del tercer día de exposición para las dos concentraciones de Cu ensayadas (40 y 80 μM). Además del *lag* post-siembra, el período exponencial de crecimiento (o logarítmico) también resultó modificado siendo menos pronunciado en ambas líneas expuestas Cu⁺⁺ en comparación con el control sin suplementar. De este modo, ambos tipos de cultivos llegaron a un período estacionario con menor número de células (masa vital) respecto al control que quedó evidenciado a través de la disminución significativa de la concentración de PCT.

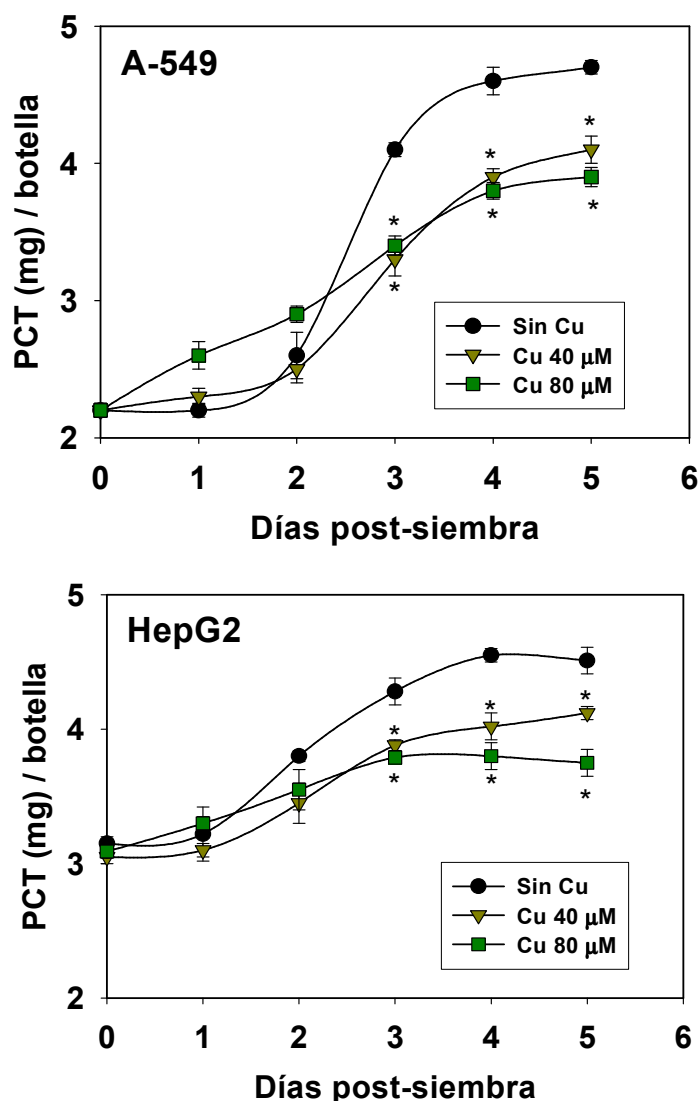


Figura 19: Curvas de crecimiento celular en A-549 y HepG2. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * y ** $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Habiendo comprobado que la condición de estrés oxidativo modificaba al sistema de defensa antioxidante y a los dos sistemas de proteasas involucradas en la apoptosis redox- y Ca-dependientes; y considerando que existían indicios de necrosis debido al incremento de la fuga de LDH al medio extracelular con inhibición del crecimiento en ambas estirpes, se decidió llevar a cabo cálculos teóricos sobre el tiempo de duplicación promedio en ambas líneas celulares empleando la siguiente fórmula:

$$1-\beta = [\log P(t + \Delta t) - \log P_t] \times 0.2857$$

Donde el parámetro $1-\beta$ es el tiempo de duplicación promedio teórico, y P_t y $P(t + \Delta t)$ son valores de proteínas punto a punto determinadas mediante la técnica de micro-Lowry.

En la **figura 20** se pueden observar los resultados de estos cálculos para ambas líneas celulares. Constatamos que la presencia de iones Cu^{++} aumentó el tiempo de duplicación promedio tanto en A-549 como en HepG2. Además pareció evidente que la concentración de iones sería crucial, ya que el tiempo de división claramente se acrecentó con el incremento de Cu en el medio (respuesta dosis-dependiente).

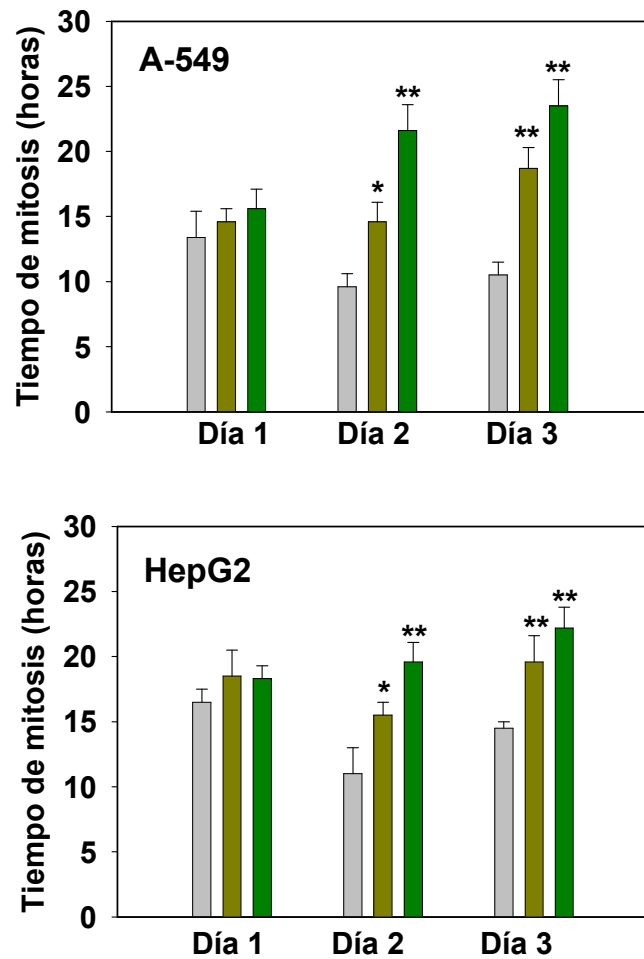


Figura 20: Tiempo de duplicación promedio en células A-549 y HepG2. Los resultados fueron expresados como promedios de $\text{PCT} \pm \text{SD}$ de 4 ensayos independientes analizados por triplicado para las dos concentraciones de Cu^{++} (barras en color). Los valores significativos respecto del control (barras grises) se indicaron con asteriscos, * y ** $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Otra conclusión interesante obtenida a partir de estos resultados es la concerniente a los cambios del tiempo de mitosis a lo largo de la curva de crecimiento. Mientras que en el control (barras grises) disminuye el tiempo de duplicación al salir del *lag* post-siembra para luego tender a recuperar el tiempo inicial (entrada al estado estacionario o salida de la

fase exponencial), las células bajo insulto pro-oxidativo por Cu^{++} continúan incrementando el parámetro $1-\beta$ hasta el final del período estudiado.

El otro tipo de experimentos que llevamos a cabo pretendió evaluar semi-cuantitativamente la viabilidad celular mediante el test de exclusión de *trypan blue* en ambos tipos celulares (A-549 y HepG2) (Fig. 21).

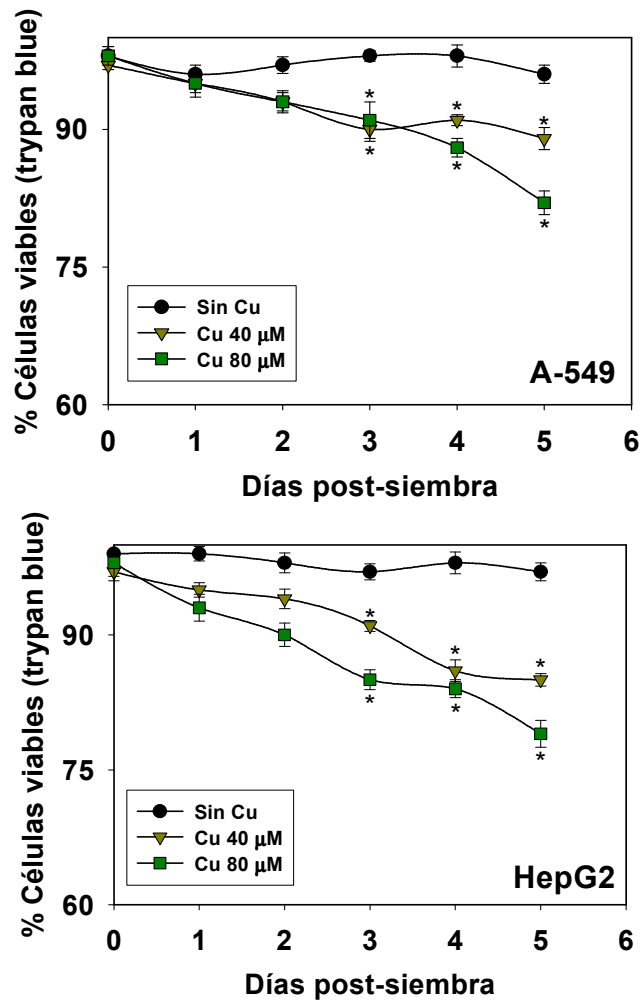


Figura 21: Viabilidad celular determinada mediante test de exclusión de *trypan blue* en células A-549 y HepG2. Los resultados fueron expresados como promedios de células viables \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado contando no menos de 200 células por campo a 40 X. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * y ** $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Se observó una marcada disminución de la viabilidad en presencia de Cu^{++} en ambas líneas celulares siendo las de origen hepático más afectadas que las A-549. El daño fue progresivo con el tiempo de exposición al suplemento de iones Cu^{++} , y en el caso de las

HepG2 la cinética del daño siguió un perfil aproximadamente lineal respecto la variable tiempo de exposición.

12.1.3 Exposición de ambas líneas celulares a concentración fija de Cu^{++} (100 μM) y a distintos antioxidantes de origen natural (100 μM de ácido cafeico, resveratrol o curcumina).

En estos experimentos se buscó investigar si los daños causados por la exposición al cobre se podían atenuar o revertir empleando antioxidantes de ocurrencia natural y probados efectos biológicos como *scavengers* de radicales libres. Para esto, se decidió realizar las incubaciones de exposición al cobre con o sin el agregado de polifenoles de estructuras químicas y propiedades biológicas diferentes, de acuerdo con los protocolos de tratamiento simultáneo o diferido descriptos en la parte metodológica.

En la **figura 22** se muestran los niveles basales de carbonilos proteicos (CPs) como marcadores de daño a proteínas para ambas líneas celulares (mayores en A-549 que en HepG2). A su vez, se puede ver que la incorporación de Cu^{++} al medio de cultivo produjo un claro aumento (muy significativo) de la formación de CPs en concordancia con los datos obtenidos en los anteriores experimentos.

La suplementación con polifenoles de origen natural en ausencia de Cu^{++} no causó modificaciones significativas de los niveles basales de producción de CPs. Sin embargo, el co-tratamiento con Cu^{++} y ácido cafeico (CA) o resveratrol (RES) aumentó de manera significativa la producción de CPs, incluso hasta valores aún más altos que los obtenidos para los lotes tratados únicamente con Cu^{++} . A diferencia del CA y RES, el co-tratamiento con el polifenol curcumina (CUR) disminuyó marcadamente la generación de CPs y restauró su concentración a los niveles del control.

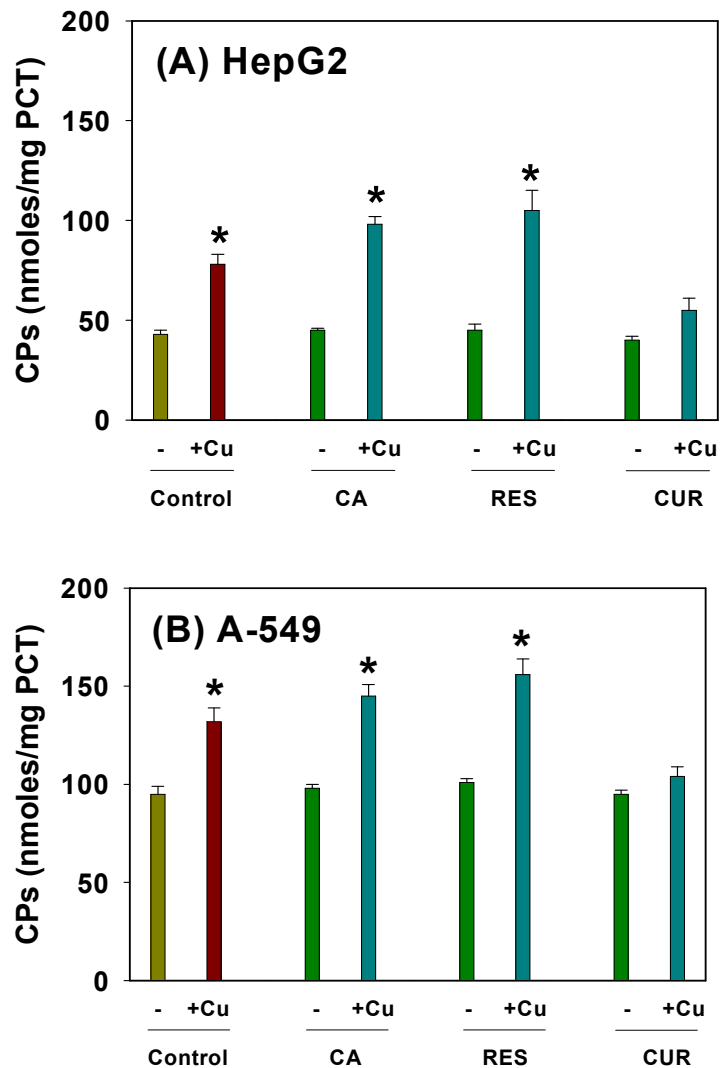


Figura 22: Concentración de carbonilos proteicos en HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con Cu^{++} (barra bordó), CA, RES y CUR (barras verdes); y la co-suplementación Cu^{++}/CA , $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ y $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$ (barras celestes). Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

En esta serie de experimentos también se decidió analizar el nivel de TBARS como marcador del daño peroxidativo a lípidos. Las determinaciones de TBARS mostraron un patrón de comportamiento similar al observado para el marcador CPs. El agregado de iones Cu^{++} aumentó de manera significativa la producción de TBARS, y la co-suplementación con CA y RES incrementaron aún más su formación (**Fig. 23**). De manera interesante, con la suplementación $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ se observó un efecto deletéreo más importante en HepG2 que en A-549. Nuevamente, el co-tratamiento con CUR redujo los niveles de TBARS equiparándolos a los del control.

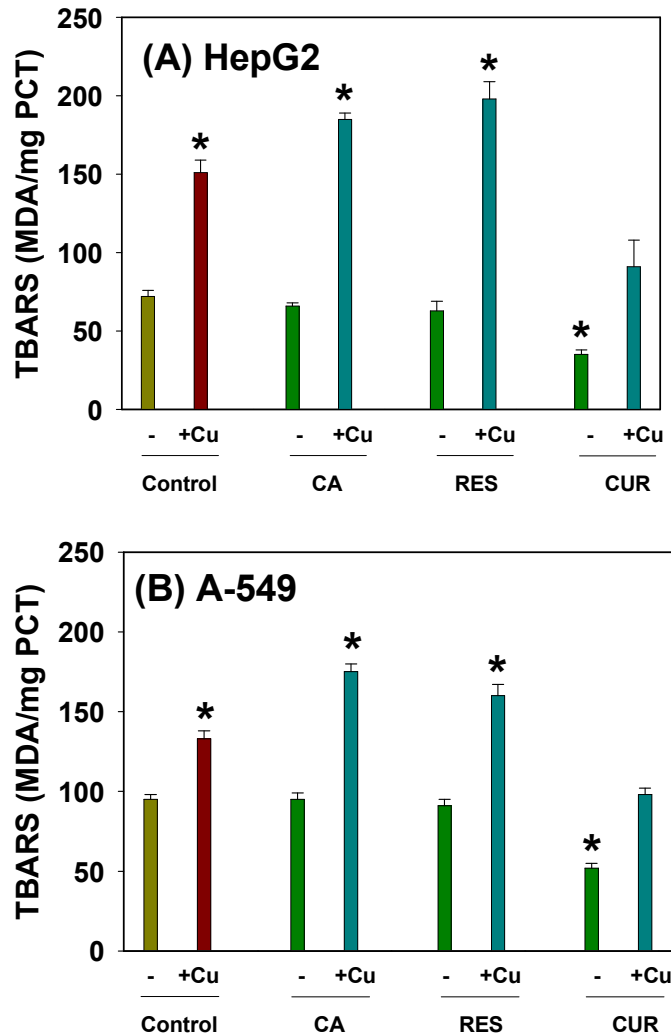


Figura 23: Concentración de TBARS en HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con Cu^{++} (barra bordó), CA, RES y CUR (barras verdes) ; y la co-suplementación Cu^{++}/CA , $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ y $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$ (barras celestes). Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

Las determinaciones de $[\text{NO}_x]$ en esta serie de incubaciones se emplearon como marcadores de la activación de iNOS y la concomitante sobreproducción de óxido nítrico y peroxinitrito (estrés nitrativo). En la **figura 24** se pueden ver los resultados de la determinación de este marcador de daño en ambas líneas celulares. Las conclusiones obtenidas resultaron similares a las anteriores. Se observó claramente que los efectos perjudiciales del tratamiento conjunto Cu^{++}/CA y $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ fueron mucho más notorios en HepG2 que en A-549. Por otro lado, es muy interesante observar que la adición de CUR a cultivos de A-549 disminuyó *per se* y de manera significativa los niveles de $[\text{NO}_x]$ por debajo de los valores obtenidos para el control. Otra respuesta diferencial se observó para

los cultivos HepG2 en donde la suplementación con Cu^{++} /CUR no logró restaurar a valores control las concentraciones de $[\text{NOx}]$.

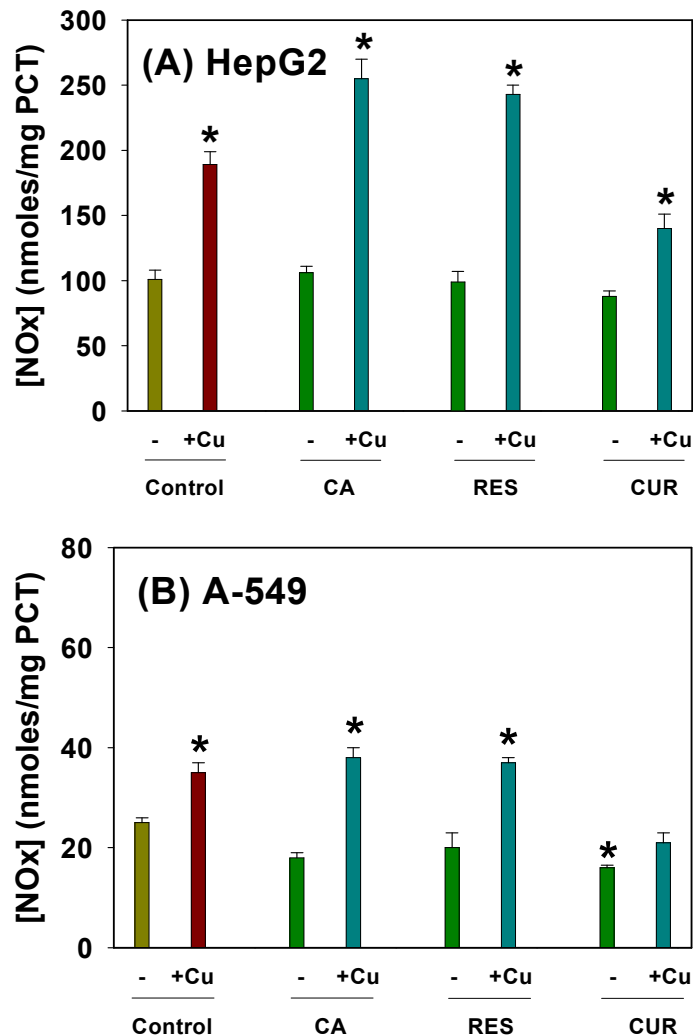


Figura 24: Concentración de $[\text{NOx}]$ en células HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con Cu^{++} (barra bordó), CA, RES y CUR (barras verdes); y la co-suplementación Cu^{++} /CA, Cu^{++} /RES y Cu^{++} /CUR (barras celestes). Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

La co-exposición a cobre y polifenoles también fue investigada en cuanto a sus efectos sobre el nivel del principal antioxidante hidrosoluble endógeno (**Fig. 25**). En las células de origen hepático se observó un aumento significativo de los niveles de glutatión luego de la exposición al Cu^{++} , e inclusive cuando se las co-suplementó con cualquiera de los tres antioxidantes estudiados (**Fig. 25-A**). A diferencia de lo acontecido con las células

HepG2, en las A-549 no se han observado variaciones de los niveles de este antioxidante (Fig 25-B).

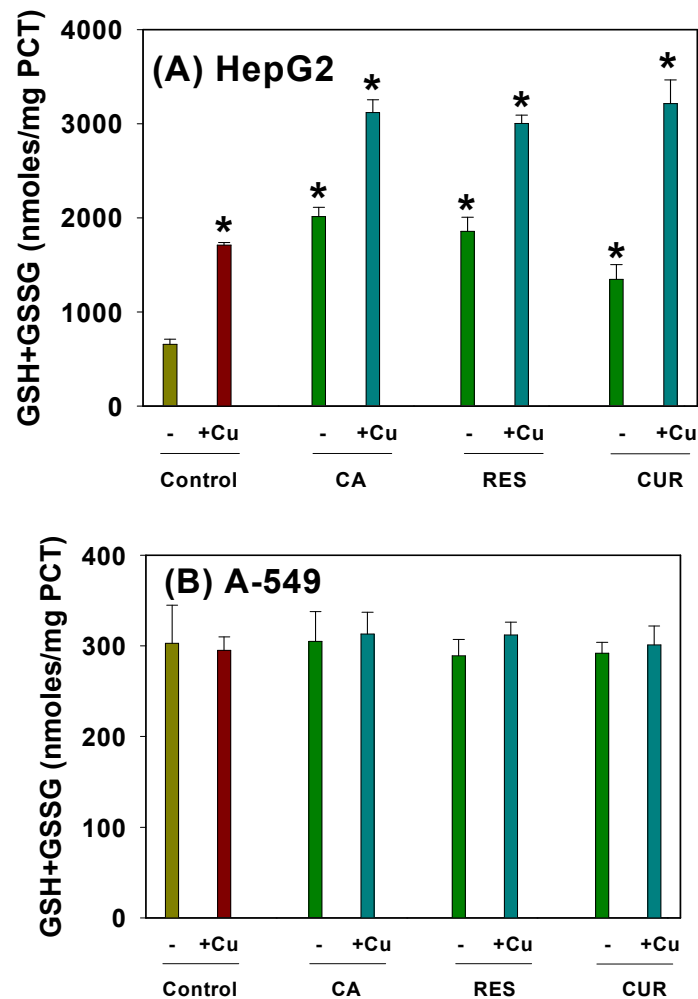


Figura 25: Concentración de glutatión total en células HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con Cu^{++} , CA, RES y CUR; y la co-suplementación Cu^{++}/CA , $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ y $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

Como se ha visto a través de los resultados de los experimentos anteriores, la viabilidad celular se encontró sumamente afectada por la presencia de iones Cu^{++} . El tratamiento de ambas líneas celulares con Cu^{++}/CA y $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$, también disminuyó la viabilidad de las mismas (Fig. 26). Sin embargo, la co-suplementación $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$ reestableció los valores de viabilidad celular a los observados en el control. En concordancia con estos resultados, se observó también un aumento de la actividad de LDH en ambas líneas celulares cuando se las suplementó con Cu^{++} o con Cu^{++}/CA y $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$, pero no con la co-incubación $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$ (Fig. 27). El agregado de antioxidantes en forma

solitaria tampoco tuvo efectos sobre la viabilidad celular ni sobre la actividad de LDH. Pero la co-suplementación de Cu^{++} con CUR reestableció los valores de LDH a los del control en ambas estirpes celulares.

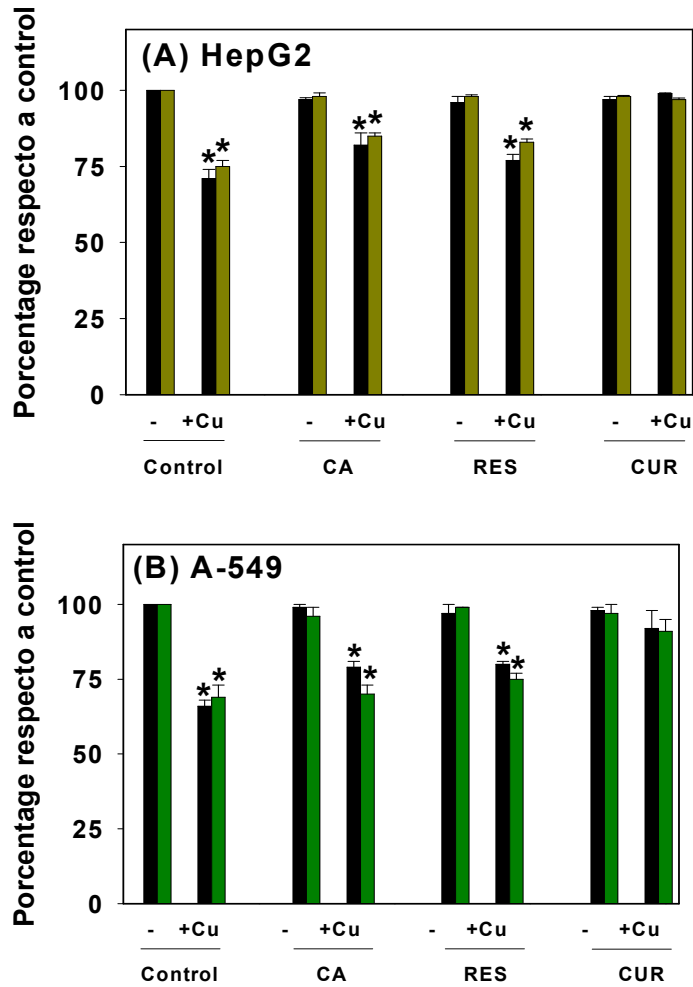


Figura 26: Viabilidad celular en HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con Cu^{++} , CA, RES, CUR; y la co-suplementación Cu^{++}/CA , $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ y $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$. Los resultados fueron expresados como promedios \pm SD de cuatro determinaciones independientes contándose no menos de 200 células por campo a 40 X. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

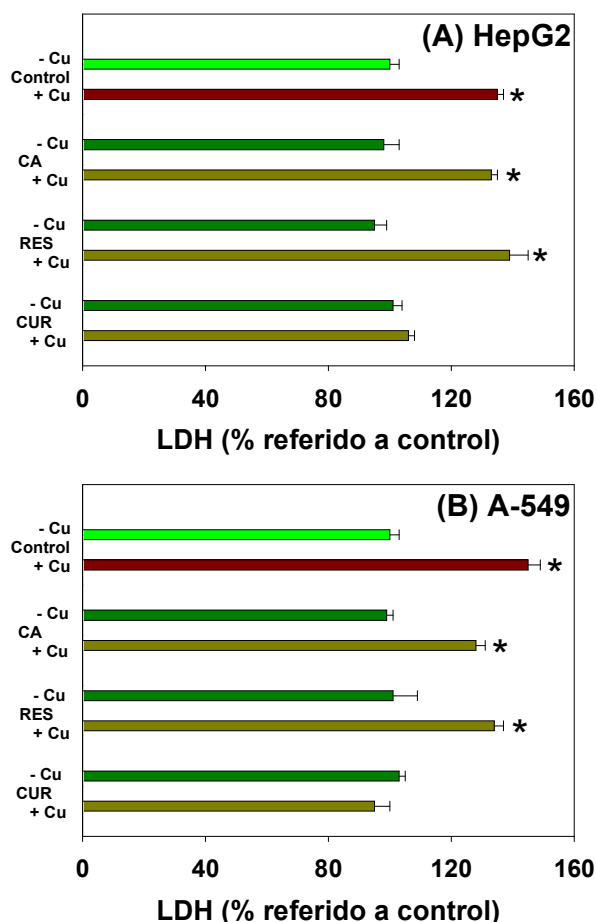


Figura 27: Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de HepG2 (A) y A-549 (B) luego del tratamiento con Cu^{++} , CA, RES, CUR; y la co-suplementación Cu^{++}/CA , $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ y $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$. Los resultados fueron expresados como promedios \pm SD de cuatro determinaciones independientes ensayadas por triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

12.1.4 Exposición de ambas líneas celulares a una concentración fija de Cu^{++} (100 μM) y simultáneamente a agentes quelantes selectivos para Cu^+ (neocuproína 100 μM) o Cu^{++} (carnosina 100 μM).

En esta serie de experimentos empleamos la determinación de CPs, TBARS y [NOx] como biomarcadores de daño, buscando discriminar si los efectos perjudiciales de la exposición a Cu^{++} eran provocados por ese catión o por su conversión a cuproso (o quizás por una acción combinada de ambos).

Pudimos determinar que el tratamiento con Cu^{++} produjo un aumento muy significativo ($p < 0.01$) de la formación de CPs como marcador de daño pro-oxidativo de las proteínas celulares (**Fig. 28**) al igual que en lo observado en experimentos anteriores. A su vez,

parece ser que los efectos negativos del Cu^{++} fueron más prominentes en HepG2 que en A-549. Sin embargo, en ambas líneas celulares la suplementación con neocuproína (NCP) disminuyó los valores basales de CPs (**Fig. 28-I**). A diferencia de la suplementación con NCP, el agregado de CR si bien no produjo incrementos en la producción de CPs, tampoco demostró ser capaz de disminuirlos por debajo de los valores control (**Fig. 28-II**). Por otro lado, cuando los quelantes fueron agregados concomitantemente con el Cu la producción de CPs disminuyó fuertemente en ambas líneas celulares siendo restaurativa para A-549 y atenuadora del efecto para HepG2.

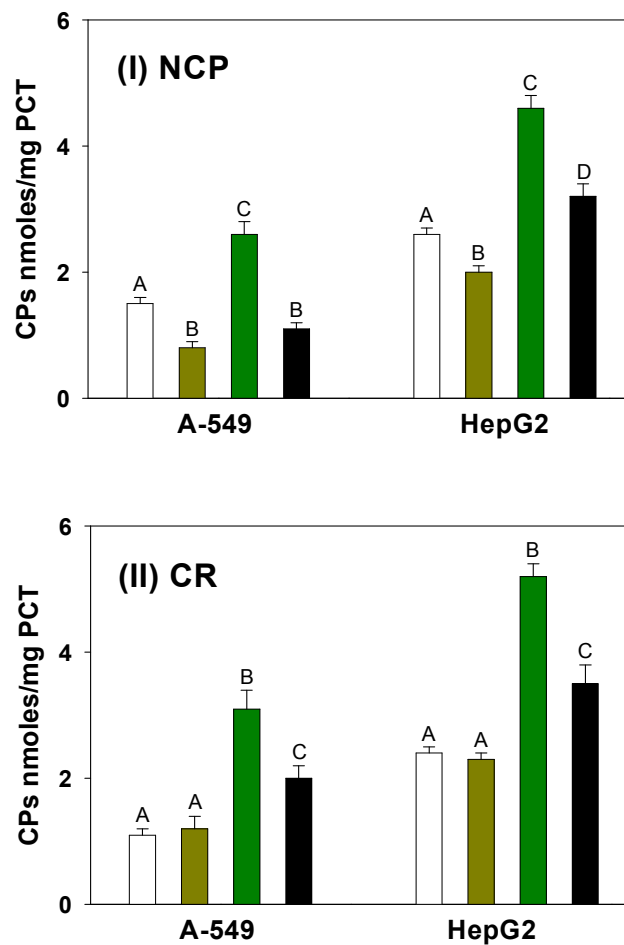


Figura 28: Efecto del agregado de neocuproína (NCP) y carnosina (CR) sobre la formación de CPs inducida por el Cu^{++} en células HepG2 y A-549. Las monocapas en fase logarítmica fueron tratadas durante 24 hs con 100 μM NCP o CR (barras verdes claras), 100 μM Cu^{++} (barras verdes oscuras), solas o en combinaciones de Cu^{++} /NCP o Cu^{++} /CR (barras negras). Las barras blancas representan los controles sin tratar. Los valores significativamente diferentes entre ellos fueron indicados con distintas letras ($p < 0.01$).

La **figura 29** muestra los resultados obtenidos para los productos de peroxidación lipídica (determinados como TBARS) luego del tratamiento con NCP o CR agregados al medio de cultivo de ambas líneas celulares. Se observó que el daño lipídico provocado por

la incorporación de Cu^{++} fue superior en HepG2 que en A-549, tal como se había observado en experimentos anteriores. Las conclusiones obtenidas luego del tratamiento con complejantes selectivos fueron similares a las derivadas del análisis del marcador CPs. Se produjo un importante aumento de la formación de TBARS bajo el tratamiento con iones Cu , con una reducción sustancial del daño producido por el Cu suplementado con NCP o CR. La carnosina tuvo un efecto más protector que el de la neocuproína. Es interesante destacar que la adición de CR redujo los valores de TBARS por debajo de los niveles del control.

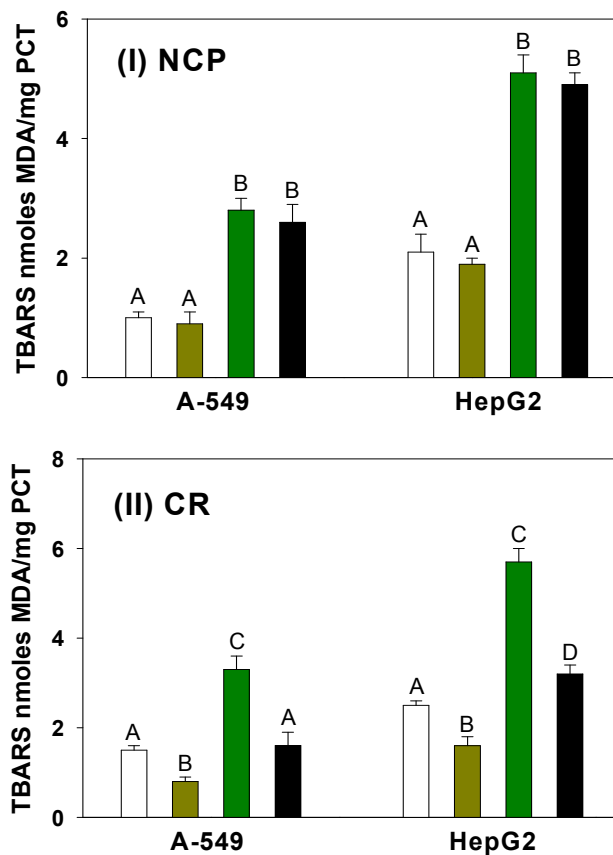


Figura 29: Efecto del agregado de neocuproína (NCP) (I) y carnosina (CR) (II) sobre la formación de TBARS inducida por el Cu^{++} en células HepG2 y A-549. Las monocapas en fase logarítmica fueron tratadas durante 24 hs con 100 μM NCP o CR (barras verdes claras), 100 μM Cu^{++} (barras verdes oscuras), solas o en combinaciones de Cu^{++} /NCP o Cu^{++} /CR (barras negras). Las barras blancas representan los controles sin tratar. Los valores significativamente diferentes entre ellos fueron indicados con distintas letras ($p < 0.01$).

La **figura 30** muestra los resultados obtenidos para la producción de $[\text{NO}_x]$ en A-549 y en HepG2. Observamos que la suplementación con NCP o CR no modificaron significativamente los valores basales. Por otro lado, el agregado de iones Cu^{++} indujo fuertemente la producción de $[\text{NO}_x]$ en A-549, y en menor medida en HepG2. La incubación simultánea de los quelantes con los iones Cu^{++} no fue capaz de neutralizar

completamente los efectos deletéreos causados por el metal en ninguna de las líneas celulares (especialmente en el caso de la neocuproína). A pesar de ello, la formación de [NOx] disminuyó significativamente y tendió a normalizarse con el co-tratamiento con carnosina.

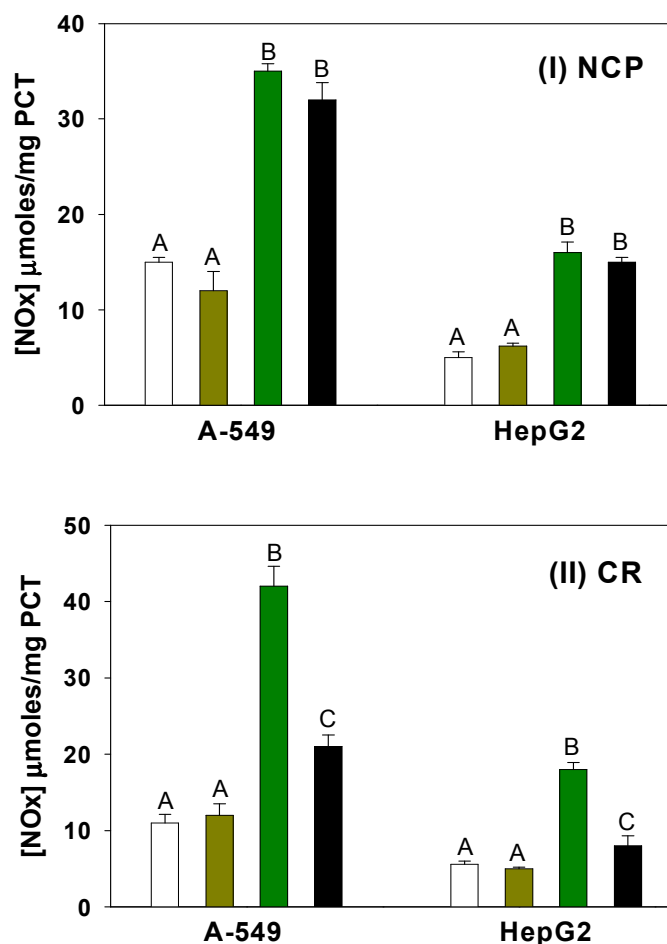


Figura 30: Efecto del agregado de neocuproína (NCP) (I) y carnosina (CR) (II) sobre la formación de [NOx] inducida por el Cu⁺⁺ en células HepG2 y A-549. Las monocapas en fase logarítmica fueron tratadas durante 24 hs con 100 μM NCP o CR (barras verdes claras), 100 μM Cu⁺⁺ (barras verdes oscuras), solas o en combinaciones de Cu⁺⁺/NCP o Cu⁺⁺/CR (barras negras). Las barras blancas representan los controles sin tratar. Los valores significativamente diferentes entre ellos fueron indicados con distintas letras (p < 0.01).

En estos experimentos exploramos también los efectos sobre la viabilidad celular utilizando la técnica de exclusión de *trypan blue*.

Se observó que la integridad de las células resultó profundamente afectada con el agregado de Cu⁺⁺ a juzgar por el aumento de la fuga de LDH al medio de cultivo (**Fig. 31**). Esto concuerda con datos presentados previamente. Los valores de fuga de LDH en condiciones basales para ambas líneas celulares (4.1 ± 0.2 y 6.9 ± 0.4 U LDH/L en el

medio de cultivo para A-549 y HepG2, respectivamente), se incrementaron por el agregado de Cu^{++} mucho más significativamente en A-549 que en HepG2.

La suplementación con NCP o CR no redujo los niveles basales de fuga de LDH en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas; sin embargo observamos que ambos complejantes demostraron diferentes capacidades protectoras en relación al parámetro viabilidad. NCP fue capaz de disminuir el daño producido por el Cu en ambas líneas celulares (efecto paliativo) (**Fig. 31-I**).

En contraste, el co-tratamiento Cu^{++}/CR normalizó completamente la liberación de LDH al medio llevándola hasta los valores del lote control o sin agregados (**Fig. 31-II**).

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en el ensayo de exclusión de *trypan blue* (**Fig. 32**), en donde se pudo ver que el tratamiento con CR fue más efectivo que el de NCP en la restauración de la viabilidad celular hacia valores cercanos a los del control (tanto en A-549 como en HepG2).

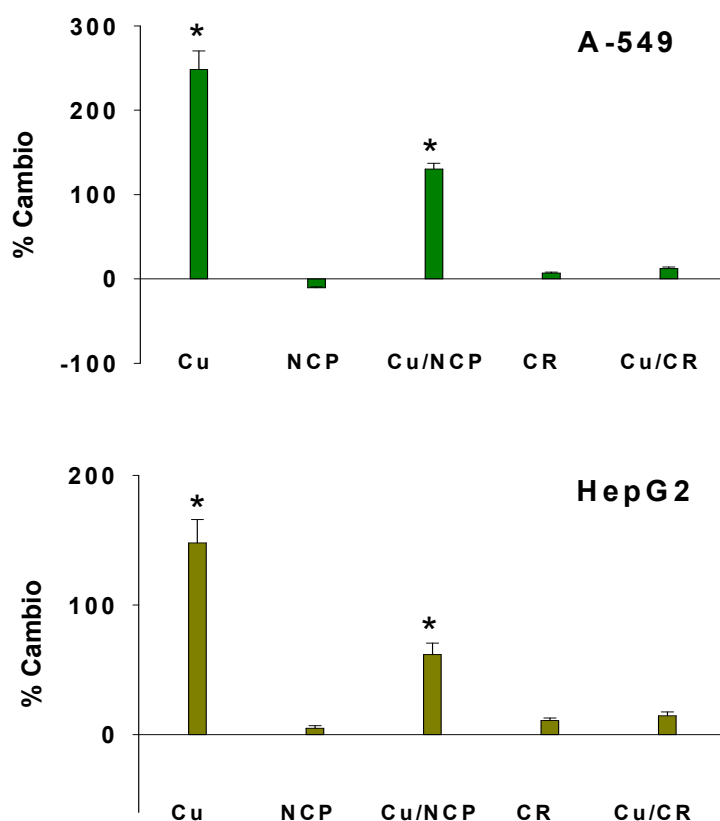


Figura 31: Actividad de LDH en el medio de cultivo obtenido a partir de A-549 y HepG2 luego del tratamiento con Cu^{++} , NCP, CR y la co-suplementación $\text{Cu}^{++}/\text{NCP}$ y Cu^{++}/CR . Los resultados fueron expresados como promedios \pm SD de 4 ensayos independientes analizados por duplicado o triplicado. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

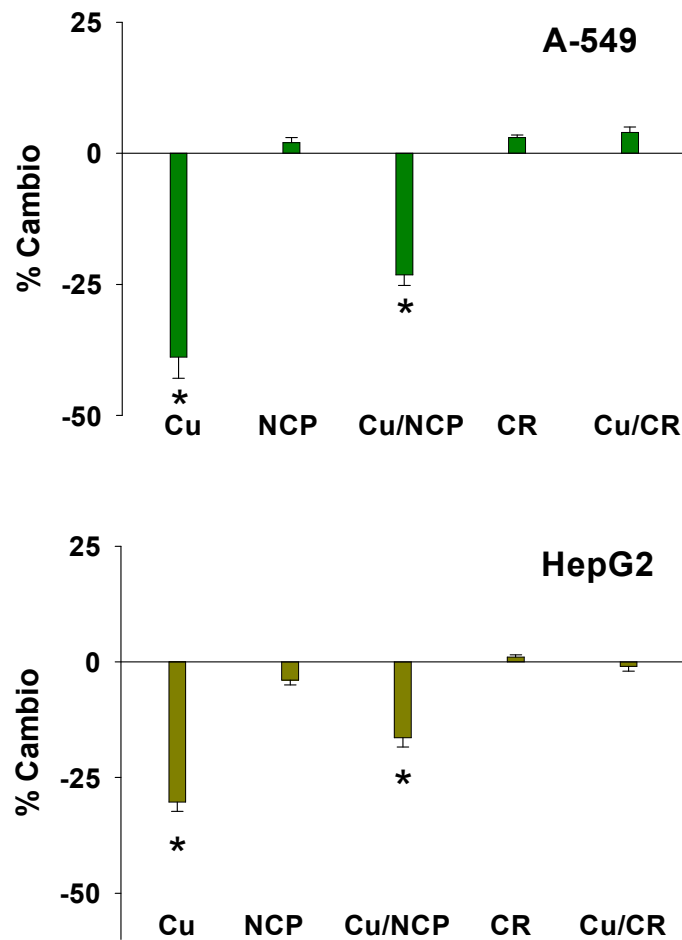


Figura 32: Viabilidad celular en A-549 y HepG2 determinado mediante el test de exclusión de *trypan blue* luego del tratamiento con Cu^{++} , NCP, CR y la co-suplementación $\text{Cu}^{++}/\text{NCP}$ y Cu^{++}/CR . Los resultados fueron expresados como promedios \pm SD de 4 ensayos independientes contándose no menos de 200 células por campo a 40 X. Los valores significativos respecto del control se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$).

12.2 Experimentos en ratas (efecto *in vivo*)

Tal como se indicó en la parte experimental, las ratas que se utilizaron en estos experimentos fueron de la cepa Wistar (machos) tratadas a partir del destete durante 30 días consecutivos con dietas semi-sintéticas elaboradas en nuestro laboratorio, y pertenecientes a dos tipos básicos:

S: dieta completa

D: dieta deficiente en cobre

Ambos tipos de dietas se emplearon en combinación con diferentes suplementos de cobre bajo la forma de carbonato de cúprico que se administró por vía oral o por vía

intraperitoneal (i.p.) según el esquema que se mostró en la sección de materiales y métodos. Los animales se controlaron durante todo el período experimental para observar su conducta, determinar el consumo de agua y alimento, medir la evolución de su peso corporal, y tomarles muestras de sangre, orina y heces hasta el día de su sacrificio.

No se constataron cambios significativos en las curvas de crecimiento para ninguno de los lotes experimentales (ver gráfico representativo en la sección materiales y métodos).

12.2.1 Contenido de cobre en los lotes de alimentos

Cada lote se analizó por triplicado (media \pm SD). Las tres rectas de regresión obtenidas a partir de estos datos indicaron un contenido promedio de 37.6; 7.8 y 0.12 mg de Cu^{++} por kg (ppm) de alimento para las dietas SCuO, S y D, respectivamente tal como se muestra en la siguiente figura (Fig. 33).

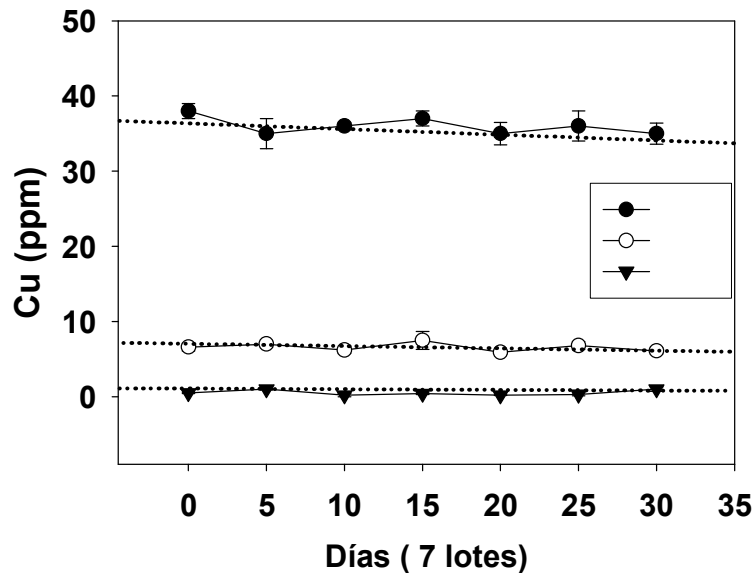


Figura 33: Contenido promedio de Cu^{++} (mg/Kg) en el alimento para las dietas SCuO, S y D. Cada dato es el promedio de 5 determinaciones \pm SD.

12.2.2 Contenido de cobre en agua

Para ponderar la importancia del suministro no controlado de cobre en agua de bebida se analizaron muestras durante todo el período experimental. La regresión efectuada sobre los datos experimentales señala que es del orden de 0.62 ppm (Fig. 34). De modo que la contribución de este aporte resultó despreciable a los fines del experimento. Los animales que empleamos consumen en promedio 15 mL de agua por día, de modo que a partir del agua de bebida ingirieron no más de 10 microgramos de cobre por día/rata.

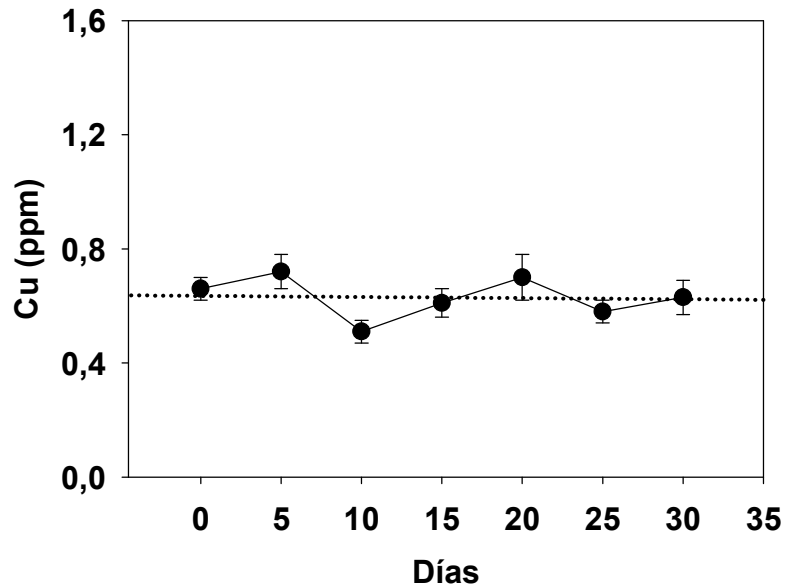


Figura 34: Curva de regresión realizada para el Cu^{++} incorporado a través de agua durante el tiempo experimental. Cada dato es el promedio de 5 determinaciones \pm SD.

En la **figura 35** se muestran los resultados obtenidos para el contenido de Cu^{++} en las heces de los animales alimentados con diferentes dietas. Cada dato es el promedio de 6 determinaciones independientes \pm SD y se expresaron en microgramos por gramo de peso seco (peso constante a 110°C). Los asteriscos junto a cada símbolo indican diferencias significativas al nivel $p < 0.01$ comparadas contra los valores de la dieta S. Se observó un claro y progresivo aumento del contenido de cobre a lo largo del tratamiento para todos los lotes bajo sobrecarga. Por otra parte se constató una disminución casi lineal para los animales alimentados con dieta deficiente de Cu^{++} , la cual parece estabilizarse sobre el final del período experimental (días 25 a 30).

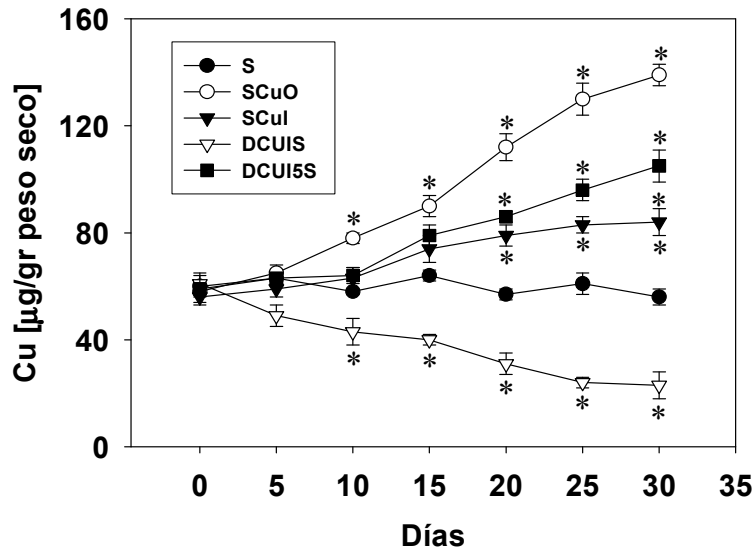


Figura 35: Concentración de Cu^{++} en las heces de los animales alimentados con diferentes dietas. Cada dato es el promedio de 6 determinaciones independientes \pm SD, expresados en $\mu\text{g/gr}$ de peso seco (peso constante a 110°C). Las diferencias significativas en relación con los valores de la dieta S se indicaron con asteriscos * ($p < 0.01$).

12.2.3 Contenido efectivo de cobre en plasma, niveles de proteínas homeostáticas y sistema de defensa antioxidante

El contenido *efectivo* (resultante de la ingesta/inyección y la interacción con los sistemas homeostáticos *in vivo*) de cobre en plasma y tejidos de interés se analizó mediante espectrometría de absorción atómica tal como se describió en la parte de metodologías. Los gráficos muestran los promedios de 8 datos \pm SD expresándose los resultados en ng/mg de proteína tisular (**Fig. 36**). Los datos son todos diferentes entre sí al nivel $p < 0.01$ (indicados con letras distintas).

En primer término se observó claramente una muy significativa diferencia en los contenidos de cobre entre los tejidos analizados que no siempre correlacionó con los de sus proteínas homeostáticas (CRP y MTs) (las cuales se expresaron en las mismas unidades de concentración para facilitar las comparaciones entre tejidos). Las concentraciones de cobre en hígado y plasma son similares entre sí, y muy diferentes a las de intestino y pulmones. Mientras que el plasma presentó los niveles más altos de cobre y de CRP, fue al mismo tiempo el material con menor concentración de MTs. Por el contrario, el cobre hepático, pulmonar e intestinal, estarían más vinculados a MTs que a CRP. El tejido intestinal

presentó las cantidades más elevadas de MTs de entre los cuatro tipos de muestras estudiadas (11 veces el contenido plasmático).

En la **figura 37** se observa como se modificaron los niveles de Cu, MTs y CRP en la sangre periférica de los animales sometidos a diferentes tiempos de administración de las dietas experimentales. Los resultados son promedios \pm SD de cuatro datos obtenidos con muestras de sangre de la cola. Los asteriscos indican significación ($p < 0.01$) respecto a lote S.

Como era de esperar, los niveles de cobre aumentaron significativamente en la sangre de los animales tratados con dietas suplementadas por vía oral con carbonato cúprico o inyectados por vía i.p aunque estos aumentos fueron de cinéticas y magnitudes significativamente disímiles. El incremento fue proporcionalmente más importante cuando el metal se inyectó por vía i.p. evitando el sistema de regulación de la absorción a nivel intestinal. Por otra parte, resulta importante notar que luego de 20 días de tratamiento se produjo una disminución del nivel de cobre en sangre en el lote suplementado oralmente (pero no en los otros), y también se observó una compensación de la disminución de cobre en sangre en el lote deficiente del metal. Estos cambios parecen estar más vinculados al incremento de MTs que al de CRP.

Considerados en conjunto, los resultados demuestran que la vía oral es mucho más efectiva que la intraperitoneal para la inducción de la biosíntesis de MTs, en cambio todas las dietas, excepto la deficiente en cobre, estimularon significativa y tempranamente la síntesis de CRP. Es más, en la dieta libre de cobre, la CRP se hizo significativamente menor que en el lote control al final del período de tratamiento (aunque no sucedió lo mismo con las MTs).

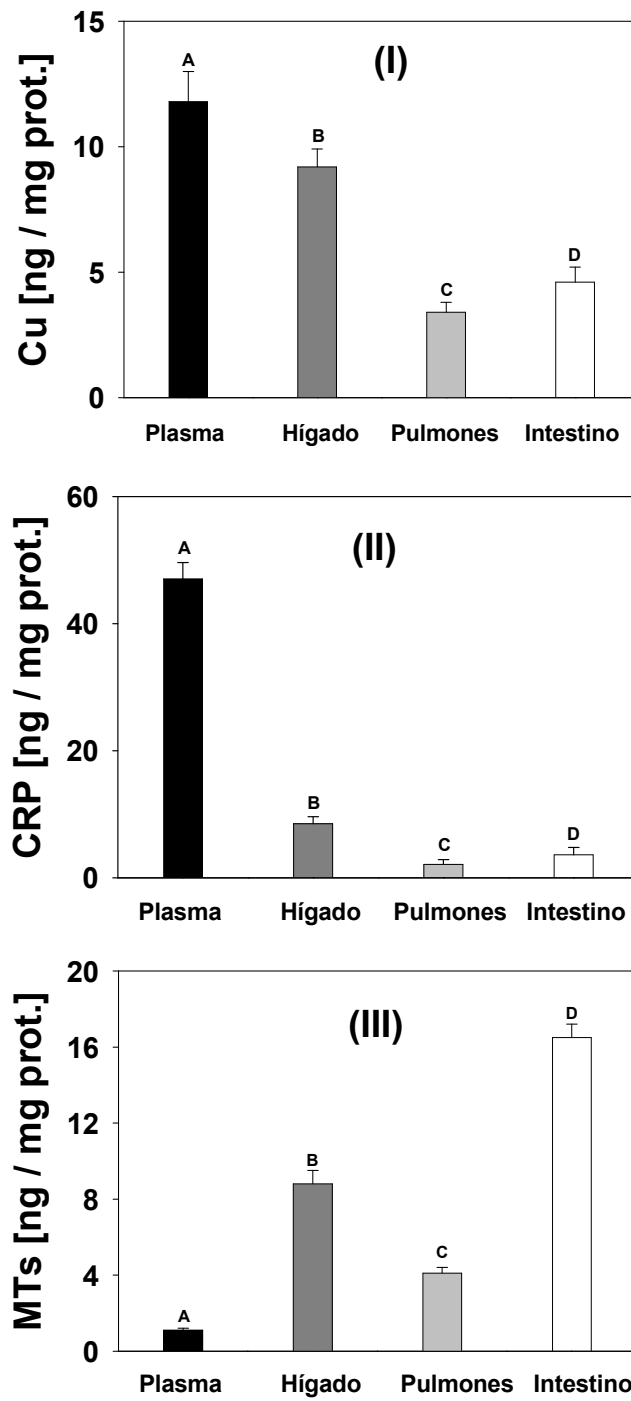


Figura 36: Contenidos de cobre, MTs y CRP en plasma, hígado, intestino y pulmón de ratas controles en condiciones basales (dieta S). Los resultados son promedios de 8 datos \pm SD (ng/mg de proteína tisular). Los datos significativamente diferentes entre si ($p < 0.01$) fueron indicados con letras distintas.

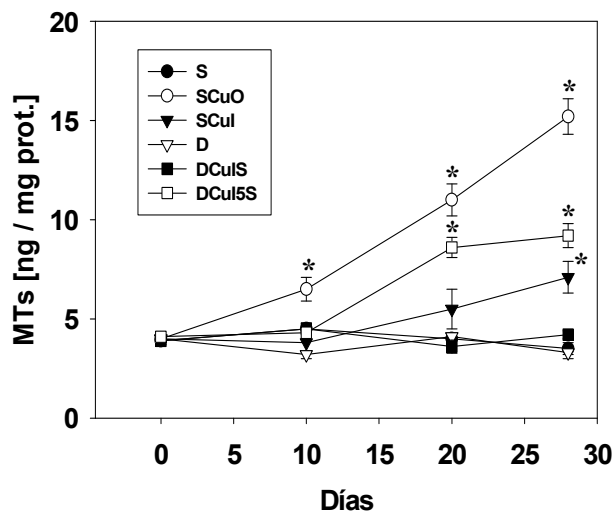
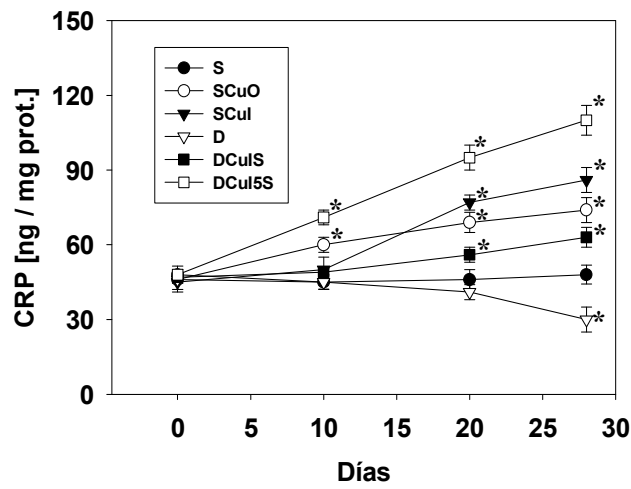
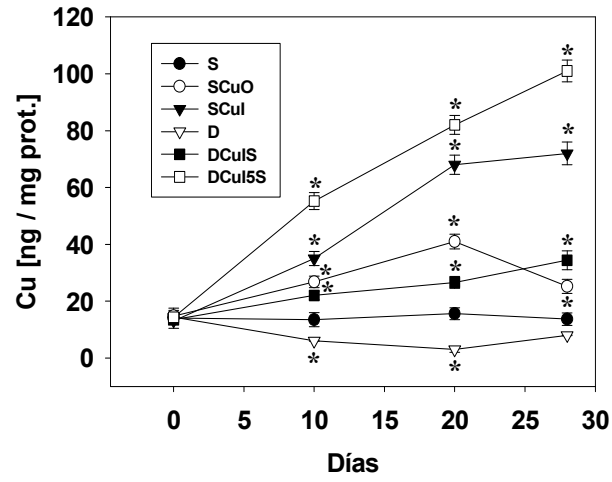


Figura 37: Evolución de la concentración de cobre, MTs y CRP en la sangre de las ratas durante diferentes tiempos de implementación de las dietas. Los resultados son promedios \pm SD de cuatro datos. Las diferencias significativas respecto al lote S fueron indicadas con asteriscos, * ($p < 0.01$).

Luego del sacrificio de los animales, se determinaron varios biomarcadores de estrés oxidativo y de daño, conjuntamente con los niveles de proteínas involucradas en la homeostasis del cobre y la concentración tisular del metal. Los resultados aparecen en la **tabla V**.

Tabla V: Biomarcadores de estrés y de daño oxidativo en ratas alimentadas con dietas que modifican la homeostasis del cobre.

Dieta	S			D		
	S	SCuO	SCuI	D	DCuIS	DCuIS5
Plasma						
Cu (ng/mg prot.)	13.7 ± 2.1 ^a	25.2 ± 2.4 ^b	71.9 ± 4.0 ^c	8.0 ± 0.1 ^d	34.4 ± 3.3 ^e	101.2 ± 3.9 ^f
[NOx] (nmoles/mg prot.)	0.6 ± 0.05 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.1 ^b	0.6 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^c
TBARs (nmoles/mg prot.)	3.5 ± 0.1 ^a	6.2 ± 0.2 ^b	7.7 ± 0.4 ^b	2.8 ± 0.1 ^c	4.1 ± 0.2 ^d	9.2 ± 0.2 ^e
PCs (nmoles/mg prot.)	4.8 ± 0.2 ^a	6.9 ± 0.2 ^b	7.4 ± 0.3 ^b	3.1 ± 0.03 ^c	5.6 ± 0.1 ^d	8.3 ± 0.1 ^e
α-Toc (μM)	20.9 ± 0.6 ^a	11.7 ± 0.5 ^b	10.5 ± 0.3 ^b	19.8 ± 0.4 ^a	18.5 ± 0.3 ^a	12.4 ± 0.4 ^c
FRAP (μM)	883 ± 21 ^a	702 ± 15 ^b	719 ± 11 ^b	861 ± 38 ^a	655 ± 12 ^c	626 ± 22 ^c
MTs (ng/mg prot.)	3.5 ± 0.3 ^a	15.2 ± 0.9 ^b	7.1 ± 0.7 ^c	3.3 ± 0.3 ^a	4.2 ± 0.1 ^d	9.3 ± 0.5 ^e
CRP (ng/mg prot.)	48.0 ± 3.7 ^a	74.1 ± 5.0 ^b	86.0 ± 4.8 ^c	31.1 ± 4.4 ^d	63.4 ± 4.0 ^e	111.3 ± 5.5 ^f
Hígado						
Cu (ng/mg prot.)	9.2 ± 0.3 ^a	18.3 ± 0.8 ^b	23.1 ± 0.7 ^c	5.5 ± 0.1 ^d	17.9 ± 0.3 ^b	44.1 ± 3.2 ^f
[NOx] (nmoles/mg prot.)	4.8 ± 0.2 ^a	6.7 ± 0.1 ^b	8.0 ± 0.2 ^c	4.5 ± 0.3 ^a	5.0 ± 0.2 ^a	7.8 ± 0.2 ^c
TBARs (nmoles/mg prot.)	1.5 ± 0.1 ^a	3.6 ± 0.2 ^b	4.8 ± 0.1 ^c	1.3 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.2 ^d
PCs (nmoles/mg prot.)	4.3 ± 0.1 ^a	8.4 ± 0.1 ^b	10.9 ± 0.3 ^c	3.5 ± 0.2 ^d	5.5 ± 0.1 ^e	11.0 ± 0.2 ^c
α-Toc (pmoles/mg prot.)	965 ± 35 ^a	502 ± 21 ^b	483 ± 29 ^b	971 ± 28 ^a	524 ± 18 ^b	466 ± 11 ^c
FRAP (μM)	476 ± 15 ^a	425 ± 11 ^b	389 ± 20 ^c	468 ± 17 ^a	433 ± 12 ^b	351 ± 14 ^d
MTs (ng/mg prot.)	8.5 ± 0.2 ^a	14.3 ± 0.3 ^b	16.1 ± 0.4 ^b	8.1 ± 0.3 ^a	9.0 ± 0.2 ^a	22.2 ± 0.5 ^c
CRP (ng/mg prot.)	7.8 ± 0.2 ^a	9.9 ± 0.1 ^b	10.2 ± 0.2 ^b	6.5 ± 0.3 ^a	11.1 ± 0.3 ^b	15.4 ± 0.4 ^c
Pulmón						
Cu (μg/g peso seco)	4.1 ± 0.1 ^a	6.7 ± 0.1 ^b	10.2 ± 0.3 ^b	3.8 ± 0.1 ^a	6.5 ± 0.2 ^b	12.9 ± 0.3 ^c
[NOx] (nmoles/mg prot.)	0.7 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.05 ^b	2.7 ± 0.2 ^c	0.8 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^c
TBARs (nmoles/mg prot.)	2.2 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.3 ^b	5.8 ± 0.2 ^c	1.3 ± 0.1 ^d	3.0 ± 0.1 ^e	7.7 ± 0.2 ^f
PCs (nmoles/mg prot.)	3.1 ± 0.1 ^a	5.4 ± 0.2 ^b	6.8 ± 0.1 ^c	2.5 ± 0.2 ^d	4.1 ± 0.04 ^e	8.1 ± 0.1 ^f
α-Toc (pmoles/mg prot.)	488 ± 9 ^a	355 ± 12 ^b	331 ± 14 ^c	490 ± 14 ^a	361 ± 15 ^b	299 ± 10 ^d
FRAP (μM)	334 ± 14 ^a	302 ± 11 ^b	273 ± 15 ^c	327 ± 9 ^a	299 ± 14 ^b	255 ± 12 ^d
MTs (ng/mg prot.)	4.1 ± 0.1 ^a	4.5 ± 0.2 ^a	4.5 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	6.6 ± 0.2 ^b
CRP (ng/mg prot.)	2.2 ± 0.1 ^a	3.4 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.1 ^b	5.3 ± 0.2 ^c
Intestino						
Cu (μg/g peso seco)	5.8 ± 0.2 ^a	26.8 ± 1.1 ^b	14.6 ± 0.5 ^c	4.0 ± 0.1 ^d	6.3 ± 0.2 ^a	35.5 ± 2.3 ^e
[NOx] (nmoles/mg prot.)	0.8 ± 0.02 ^a	1.7 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.1 ^c	1.0 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.1 ^c
TBARs (nmoles/mg prot.)	0.9 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.03 ^b	2.0 ± 0.1 ^c	0.7 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.03 ^a	1.9 ± 0.1 ^c
PCs (nmoles/mg prot.)	2.1 ± 0.2 ^a	3.0 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.04 ^c	1.1 ± 0.04 ^d	2.0 ± 0.1 ^a	3.8 ± 0.2 ^c
α-Toc (pmoles/mg prot.)	288 ± 11 ^a	262 ± 9 ^b	235 ± 7 ^c	294 ± 10 ^a	270 ± 11 ^b	229 ± 8 ^c
FRAP (μM)	341 ± 16 ^a	322 ± 8 ^b	303 ± 9 ^c	346 ± 18 ^a	317 ± 10 ^b	275 ± 16 ^d
MTs (ng/mg prot.)	16.3 ± 0.4 ^a	39.5 ± 2.1 ^b	17.6 ± 0.3 ^a	14.5 ± 0.4 ^a	17.2 ± 0.4 ^a	48.7 ± 1.8 ^c
CRP (ng/mg prot.)	4.3 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.3 ^a	4.6 ± 0.2 ^a	4.1 ± 0.1 ^a	4.7 ± 0.2 ^a	11.1 ± 0.5 ^b

Los resultados se obtuvieron entre el día del sacrificio y no más de 2 semanas posteriores; y son el promedio ± SD de al menos cuatro determinaciones independientes ensayadas por duplicado (entre 4 y 8). Las unidades para cada magnitud se indican entre paréntesis. Las diferencias significativas ($p < 0.01$; ANOVA + Tukey) están señaladas con distintas letras como superíndices.

Se puede ver que en el plasma resultó notable el incremento diferencial que provocaron las distintas estrategias de sobrecarga. Por otro lado y como era de esperar, los animales deficientes mostraron una significativa disminución de la cupremia.

Los cambios observados en el nivel de cobre correlacionaron con aumentos en los biomarcadores de estrés oxidativo/nitrativo y con los marcadores de daño subsecuente. Es interesante notar que la disminución de cobre no produjo ni estrés ni daño en las condiciones de nuestros experimentos, a pesar de que otros investigadores han publicado que también se provocan daños oxidativos cuando falta este metal (adjudicables a la falta de actividad SOD que es dependiente de cobre).

En relación a los modelos de sobrecarga investigados, vemos que todos generaron estrés y daño en magnitudes diferentes y proporcionales a la cupremia. Cuando la sobrecarga fue por vía mixta (oral e i.p) se obtuvieron los valores más significativos para todos los parámetros determinados. Por otro lado, quedó claro que los daños inducidos por la vía i.p son proporcionalmente más serios que los provocados por vía oral demostrando el rol fundamental del intestino en la homeostasis del cobre.

Los cambios en el nivel de cobre y en los parámetros de daño oxidativo se trasladaron hacia los tejidos examinados con un patrón similar. Sin embargo, resultó evidente que algunos tejidos mostraron particularidades especiales. Por ejemplo, la producción de [NOx] frente a la sobrecarga de cobre fue muy importante en el hígado al igual que el daño por carbonilación a las proteínas. El daño por peroxidación a lípidos fue más importante en pulmón e hígado que en intestino, mientras que los niveles de MTs se incrementaron especialmente en el intestino, en forma menos marcada en el hígado, y la menor respuesta se obtuvo para el tejido pulmonar. La CRP se incrementó en forma similar en todos los tejidos estudiados.

El daño generado por la sobrecarga de cobre afectó significativamente el cociente entre GSH y GSSG (**Tabla VI**). Por un lado se observó un aumento del total de glutatión en respuesta a la sobrecarga (pero no a la deficiencia) que mayoritariamente se produjo a expensas del GSSG dando como resultado significativos descensos del cociente GSH/GSSG. Los cambios que se observaron para pulmón e hígado fueron de similar magnitud aunque el pulmón (que de por sí presentó valores más bajos en el contenido total de glutatión) pareció ser más sensible al daño en los lotes suplementados por vía i.p. El intestino tuvo un comportamiento similar a los otros tejidos y su contenido total de glutatión fue similar al del hígado.

Tabla VI: Glutación reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación R (GSH/GSSG) en plasmas y homogenatos tisulares de ratas alimentadas con dietas que modifican la homeostasis del cobre.

Dieta	S			D		
	S	SCuO	SCuI	D	DCuIS	DCuIS5
<i>Plasma</i>						
GSH + GSSG (µmoles/mg prot.)	13.0 ± 0.5 ^a	18.6 ± 0.5 ^b	22.5 ± 0.5 ^c	15.6 ± 0.4	17.2 ± 0.5 ^b	23.7 ± 0.6
GSH (µmoles/mg. prot.)	12.2 ± 0.5 ^a	15.3 ± 0.4 ^b	15.0 ± 0.5 ^b	14.9 ± 0.3 ^b	10.6 ± 0.4 ^a	12.7 ± 0.5 ^a
GSSG (µmoles/mg. prot.)	0.8 ± 0.1 ^a	3.3 ± 0.1 ^b	10.7 ± 0.4 ^c	0.7 ± 0.2 ^a	6.6 ± 0.2 ^d	11.0 ± 0.2 ^c
R : GSH/GSSG	15.3 ± 0.4 ^a	4.6 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.2 ^c	21.3 ± 0.6 ^d	1.6 ± 0.1 ^c	1.2 ± 0.1 ^c
% CRC (R)	--	-69.9 ± 2.2^a	-90.8 ± 2.5^b	39.2 ± 1.5^c	-89.5 ± 2.2^b	-92.2 ± 3.0^b
Veces	--	1.3 ± 0.1^a	1.2 ± 0.1^a	1.2 ± 0.1^a	0.8 ± 0.1^b	1.0 ± 0.1^a
<i>Hígado</i>						
GSH + GSSG (µmoles/mg prot.)	8.2 ± 0.4 ^a	12.9 ± 0.5 ^b	15.6 ± 0.4 ^c	10.8 ± 0.5 ^b	13.2 ± 0.3 ^b	18.6 ± 0.4 ^d
GSH (µmoles/mg. prot.)	7.6 ± 0.4 ^a	11.5 ± 0.4 ^b	12.6 ± 0.3 ^b	10.2 ± 0.5 ^b	11.9 ± 0.5 ^b	16.1 ± 0.4 ^c
GSSG (µmoles/mg. prot.)	0.6 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.1 ^c	0.6 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.2 ^c
R : GSH/GSSG	12.7 ± 0.4 ^a	8.2 ± 0.3 ^b	4.2 ± 0.1 ^c	17.0 ± 0.6 ^d	9.2 ± 0.1 ^b	6.4 ± 0.2 ^e
% CRC (R)	--	-35.4 ± 1.1^a	-66.9 ± 2.0^b	33.9 ± 1.7^a	-27.6 ± 2.0^a	-49.6 ± 1.8^c
Veces	--	1.5 ± 0.1^a	1.7 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^a	1.6 ± 0.1^a	0.5 ± 0.1^b
<i>Pulmón</i>						
GSH + GSSG (µmoles/mg prot.)	5.8 ± 0.2 ^a	5.1 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.2 ^a	6.1 ± 0.3 ^a	6.1 ± 0.4 ^a	5.6 ± 0.2 ^a
GSH (µmoles/mg. prot.)	5.1 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.1 ^b	3.8 ± 0.1 ^b	5.5 ± 0.3 ^a	4.0 ± 0.2 ^b	3.5 ± 0.1 ^b
GSSG (µmoles/mg. prot.)	0.7 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	2.2 ± 0.2 ^c	0.6 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.1 ^c	2.1 ± 0.1 ^c
R : GSH/GSSG	7.2 ± 0.1 ^a	3.6 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.1 ^c	9.2 ± 0.2 ^d	1.9 ± 0.1 ^c	2.1 ± 0.1 ^e
% CRC (R)	--	-50.0 ± 3.2^a	-76.4 ± 2.2^b	27.8 ± 1.0^c	-73.6 ± 2.8^d	-70.8 ± 3.4^b
Veces	--	0.6 ± 0.04^a	0.7 ± 0.03^a	1.0 ± 0.1^b	0.8 ± 0.02^a	0.7 ± 0.02^a
<i>Intestino</i>						
GSH + GSSG (µmoles/mg prot.)	9.0 ± 0.3 ^a	9.2 ± 0.1 ^a	9.3 ± 0.2 ^a	9.5 ± 0.4 ^a	9.0 ± 0.4 ^a	8.9 ± 0.2 ^a
GSH (µmoles/mg. prot.)	8.2 ± 0.3 ^a	6.9 ± 0.1 ^b	5.1 ± 0.1 ^c	8.5 ± 0.4 ^a	5.5 ± 0.1 ^c	7.0 ± 0.1 ^b
GSSG (µmoles/mg. prot.)	0.8 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.2 ^b	4.2 ± 0.1 ^c	1.0 ± 0.2 ^a	3.5 ± 0.2 ^c	1.9 ± 0.1 ^b
R : GSH/GSSG	10.3 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.02 ^b	1.2 ± 0.1 ^c	8.5 ± 0.1 ^d	1.6 ± 0.1 ^c	3.7 ± 0.1 ^e
% CRC (R)	--	-95.1 ± 3.4^a	-88.3 ± 2.2^b	-21.2 ± 0.8^c	-84.5 ± 2.2^b	-64.1 ± 2.0^e
Veces	--	0.8 ± 0.03^a	0.6 ± 0.03^a	1.0 ± 0.2^a	0.7 ± 0.04^b	0.9 ± 0.1^a

Todos los datos se obtuvieron en los cinco días subsiguientes al día del sacrificio y son promedios ± SD de al menos 4 datos independientes (entre 4 y 8). Los valores con diferentes letras indicadas como super-índices son estadísticamente significativos entre sí al nivel $p < 0.01$. % CRC (R): porcentaje de cambio de la relación GSH/GSSG con respecto al correspondiente control. "Veces" indica el cociente entre el dato de R de cada tejido/tratamiento respecto a su correspondiente valor control.

Las actividades enzimáticas del sistema de defensa antioxidante también fueron severamente afectadas por la sobrecarga de cobre (y por la deficiencia) en una forma dependiente de la vía de administración del metal (**tabla VII**).

En todos los tejidos estudiados la GR se activó en respuesta a la oxidación inducida por la sobrecarga de cobre sobre el glutatión reducido. La CAT y la GPx también se activaron por la sobrecarga, siendo más importante el efecto de la vía i.p (similar al causado por la administración mixta) que el de la vía oral. Los tres tejidos presentaron respuestas similares entre sí en cuanto al tipo de cambio y a la magnitud de los mismos. La deficiencia disminuyó significativamente la actividad de GPx y, como era de esperar, la de SOD en los tres tejidos (especialmente en el pulmón e intestino) aunque esto no resultó suficiente para causar incremento en los marcadores de daño.

Tabla VII: Actividades de las principales enzimas del sistema de defensa antioxidante en tejidos de ratas alimentadas con dietas que modifican la homeostasis del cobre.

Dieta	S			D		
	S	SCuO	SCuI	D	DCuIS	DCuIS5
Hígado						
GPx (μmoles NADPH/mg prot. min)	1.8 ± 0.2 ^a	3.2 ± 0.2^b	4.6 ± 0.3^c	0.8 ± 0.1^d	2.0 ± 0.2 ^a	4.4 ± 0.2^c
GR (nmol/mg prot. Min.)	111.5 ± 3.9 ^a	126.4 ± 4.1^b	154.3 ± 3.2^c	108.5 ± 4.4 ^a	112.0 ± 3.6 ^a	165.8 ± 4.0^d
GT (μmoles/mg prot. min)	2.3 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.3 ^a	2.0 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.3 ^a	1.1 ± 0.2^b
SOD (U/mg prot.)	3.6 ± 0.3 ^a	4.7 ± 0.2^b	5.5 ± 0.1^c	2.5 ± 0.1^d	3.7 ± 0.2 ^a	6.1 ± 0.3^e
CAT (k(min ⁻¹)/mg prot.)	14.6 ± 1.1 ^a	17.7 ± 0.6^b	19.9 ± 0.6^c	14.1 ± 1.3 ^a	13.8 ± 0.9 ^a	20.2 ± 0.8^c
Pulmón						
GPx (μmoles NADPH/mg prot. min)	2.7 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.2^b	4.8 ± 0.3^c	1.1 ± 0.05^d	2.6 ± 0.1 ^a	4.5 ± 0.2^c
GR (nmol/mg prot. Min.)	142.8 ± 5.0 ^a	151.0 ± 4.3 ^a	173.1 ± 3.4^b	139.6 ± 5.2 ^a	144.4 ± 4.1 ^a	182.5 ± 4.9^c
GT (μmoles/mg prot. min)	1.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.03 ^a	0.8 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.2 ^a
SOD (U/mg prot.)	4.8 ± 0.3 ^a	6.3 ± 0.1^b	7.5 ± 0.2^c	2.2 ± 0.1^d	3.0 ± 0.05^e	4.3 ± 0.2 ^a
CAT (k(min ⁻¹)/mg prot.)	28.8 ± 1.5 ^a	36.3 ± 2.0^b	44.7 ± 1.7^c	25.9 ± 2.2 ^a	33.6 ± 1.9 ^a	41.1 ± 1.7^c
Intestino						
GPx (μmoles NADPH/mg prot. min)	0.8 ± 0.04 ^a	1.5 ± 0.1^b	2.2 ± 0.2^c	0.5 ± 0.02^d	0.7 ± 0.1 ^a	2.6 ± 0.2^e
GR (nmol/mg prot. Min.)	166.7 ± 4.3 ^a	163.2 ± 5.1 ^a	182.0 ± 4.4^b	168.5 ± 4.0 ^a	172.3 ± 3.8 ^a	190.2 ± 4.1^c
GT (μmoles/mg prot. min)	0.8 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.05 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.1 ^a
SOD (U/mg prot.)	1.3 ± 0.1 ^a	3.3 ± 0.2^b	5.2 ± 0.1^c	0.7 ± 0.04^d	0.8 ± 0.1^a	1.2 ± 0.2 ^a
CAT (k(min ⁻¹)/mg prot.)	6.2 ± 0.2 ^a	7.8 ± 0.1^b	8.5 ± 0.2^c	6.4 ± 0.2 ^a	6.7 ± 0.3 ^a	11.2 ± 0.4^c

Los resultados son el promedio ± SD de al menos cuatro determinaciones independientes ensayadas por duplicado (entre 4 y 8). Las unidades para cada magnitud se indican entre paréntesis. Las diferencias significativas ($p < 0.01$) están señaladas con distintas letras como superíndices.

12.2.4 Efectos sobre la composición de ácidos grasos

En la **tabla VIII** que se mostrará más adelante se pueden ver los resultados de los análisis de EMAGs practicados sobre plasma y homogenatos de pulmón e hígado (no se muestran los de otros tejidos a los fines de simplificar la presentación de los datos, pero las conclusiones obtenidas son muy similares). Para estos resultados se llevó a cabo una cuantificación de los EMAGs empleando ácido 20:1 (eicosa-monoenoico) como estándar

interno y los datos se expresaron en términos de nanomoles de cada ácido graso por mg de proteína tisular. También a los fines de simplificar la reseña de resultados, solamente se indican los análisis practicados sobre muestras de ratas alimentadas con sobrecarga oral de cobre (lote SCuO).

A su vez, en los animales sometidos a diferentes tipos de sobrecarga de cobre se observaron cambios analíticos muy similares a los descritos para las células HepG2 y A-549. En el hígado y el pulmón de todas las ratas que ingirieron cobre en exceso, o que fueron inyectadas con solución de carbonato cúprico, se observó un descenso de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), en especial los de larga cadena, y un incremento concomitante de los saturados (palmítico o 16:0 y estearico o 18:0). Los cocientes 16:1/16:0 y 18:1/18:0 descendieron y disminuyó significativamente el índice de no saturación. El contenido de ácido araquidónico también disminuyó en concordancia con lo que se observó para los otros PUFAs; sin embargo, el cociente 18:2 n-6/20:4 n-6 no sufrió en todos los casos una disminución acorde (o proporcional), pues si bien resultó siempre significativa fue compensada en parte por el descenso concomitante del ácido linoleico.

A modo de ejemplo se muestran dos cromatogramas representativos de muestras provenientes del tejido pulmonar de un lote de animales con sobrecarga oral de cobre.

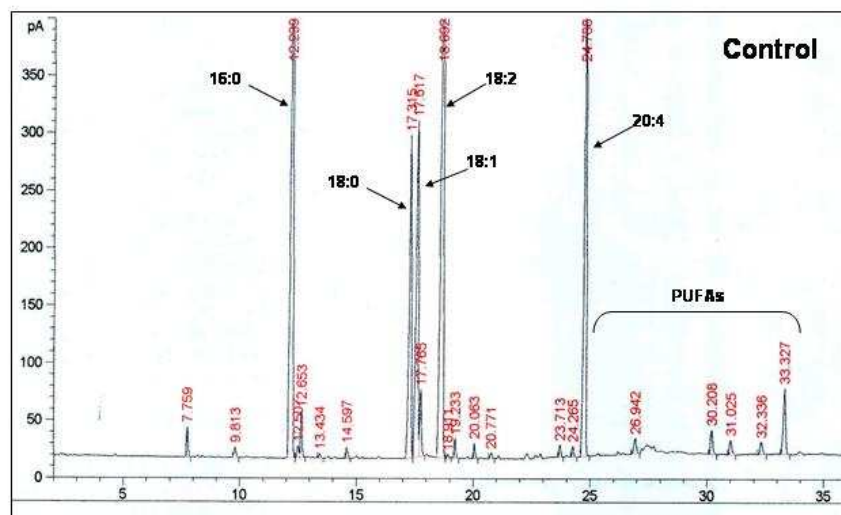


Figura 38: Perfil típico de EMAGs en un análisis practicado sobre lípidos totales de homogentao de pulmón obtenido de animales con dieta control conteniendo 7 ppm de cobre.

La sobrecarga con cobre provocó un claro descenso del índice de no saturación perceptible a simple vista a través de los cambios en las señales de EMAGs del cromatograma.

En los tres materiales estudiados (hígado, pulmones e intestino) la sobrecarga con cobre provocó un patrón de cambio similar. Otros tejidos no informados en el presente trabajo (riñones, corazón, cerebro y testículos) sufrieron modificaciones muy similares. Cabe mencionar que en los otros grupos tratados con otros esquemas de sobrecarga los cambios observados fueron de características parecidas aunque de diferentes magnitudes. La sobrecarga por vía i.p produjo cambios similares en magnitud y sentido, mientras que la sobrecarga mixta causó daños aún mayores que las anteriores manteniendo el patrón de alteraciones. La deficiencia de cobre no indujo cambios significativos con excepción de una disminución del contenido de araquidonato y de los C22 de serie n-6, con un aumento concomitante de los C22 n-3.

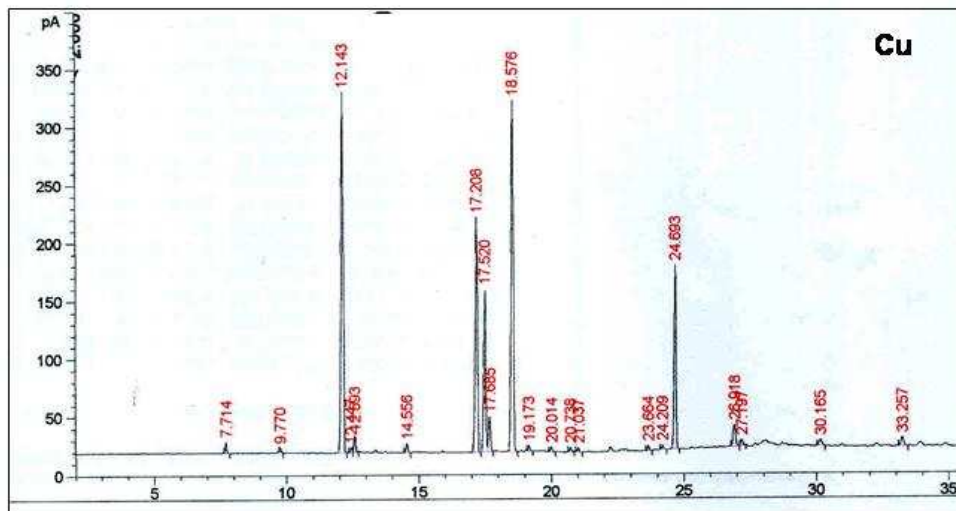


Figura 39: Perfil típico de EMAGs en un análisis practicado sobre lípidos totales de homogentao de pulmón obtenido de animales con dieta control conteniendo sobrecarga oral (35 ppm) ppm de cobre correspondiente a la dieta ScuO.

En la **tabla IX** se muestra un ejemplo representativo de análisis composicional correspondiente a los EMAGs de tejidos hepático, pulmonar e intestinal de ratas con sobrecarga oral de cobre (35 ppm).

Tabla IX: Contenido de EMAGs de lípidos totales en homogenatos de hígado, pulmón y plasma de ratas alimentadas con dieta normal o suplementada con Cu por vía oral (35 ppm).

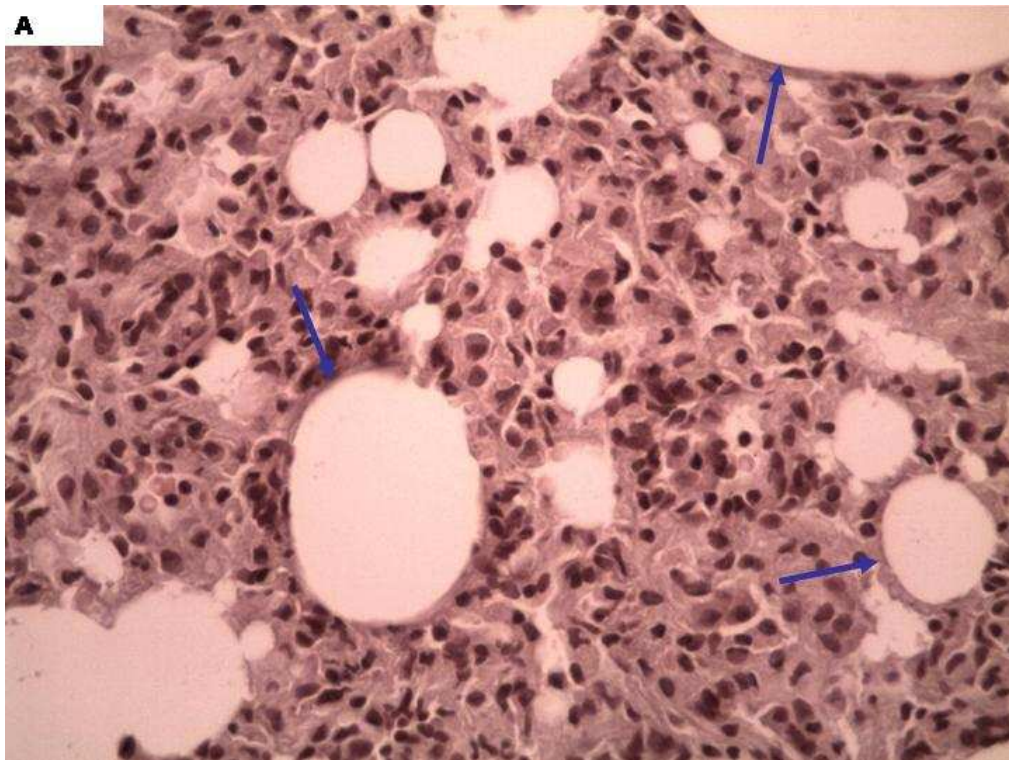
ÁCIDOS GRASOS	HIGADO		PULMÓN		PLASMA	
	C	+ Cu	C	+ Cu	C	+ Cu
14:0	0,38 ± 0.01	0,31 ± 0.02	0,20 ± 0.03	0*	0,08 ± 0.001	0,22 ± 0.03*
15:0	0,09 ± 0.001	0	0	0	0	0
16:0	28,53 ± 1.55	34,07 ± 1.24*	43,17 ± 2.33	47,12 ± 2.22*	26,63 ± 1.82	38,63 ± 2.12*
16:1 n-7	2,72 ± 0.10	2,10 ± 0.12	4,51 ± 0.21	3,30 ± 0.09*	1,92 ± 0.12	1,65 ± 0.11
18:0	13,44 ± 1.02	17,82 ± 0.97*	10,35 ± 0.82	16,41 ± 0.80*	17,20 ± 1.15	25,60 ± 1.84*
18:1 n-9	10,52 ± 0.8	7,91 ± 0.22*	14,56 ± 0.53	10,66 ± 1.01*	7,68 ± 0.69	6,07 ± 0.45
18:1 n-7	0	0	0	0	0	0
18:2 n-6	16,46 ± 0.82	16,24 ± 0.79	15,69 ± 0.54	12,89 ± 0.66*	13,62 ± 0.81	14,56 ± 0.78
18:3 n-6	0,09 ± 0.002	0,10 ± 0.04	0	0	0,08 ± 0.003	0
18:3 n-3	0,09 ± 0.001	0	0	0	0,08 ± 0.01	0
20:0	0,19 ± 0.02	0*	0	0	0,11 ± 0.02	0,22 ± 0.03*
20:1	0	0	0	0	0	0
20:2 n-6	0,29 ± 0.01	0,29 ± 0.003	0	0	0,26 ± 0.01	0,33 ± 0.02*
20:3 n-6	1,46 ± 0.12	1,37 ± 0.06	0,51 ± 0.04	0,31 ± 0.03*	1,13 ± 0.10	1,10 ± 0.13
20:4 n-6	16,46 ± 0.73	12,86 ± 0.45*	8,71 ± 0.14	8,20 ± 0.24	10,92 ± 0.34	9,38 ± 0.47
20:5 n-3	0,48 ± 0.02	0,31 ± 0.03	0	0	0	0
22:4 n-3	1,43 ± 0.13	1,05 ± 0.04	0	0	0,08 ± 0.01	0
22:4 n-6	1,16 ± 0.09	0,84 ± 0.06*	0	0	0,17 ± 0.004	0*
22:5 n-3	0,29 ± 0.02	0,10 ± 0.03*	0	0	0	0
22:5 n-6	0,48 ± 0.10	0,21 ± 0.01*	1,33 ± 0.02	0,53 ± 0.03*	0,26 ± 0.02	0,11 ± 0.02*
22:6 n-3	5,35 ± 0.05	4,43 ± 0.12	0,92 ± 0.11	0,53 ± 0.10*	1,39 ± 0.15	0,99 ± 0.07*
Parámetros Analíticos						
16:0/16:1	10,46 ± 0.94	16,15 ± 0.71*	9,56 ± 0.88	14,25 ± 0.91*	13,86 ± 1.12	23,33 ± 1.16*
18:0/18:1	1,27 ± 0.06	2,25 ± 0.05*	0,71 ± 0.04	1,54 ± 0.06*	2,23 ± 0.09	4,21 ± 0.33*
18:2/20:4	1,00 ± 0.03	1,26 ± 0.01*	1,81 ± 0.11	1,57 ± 0.12	1,24 ± 0.11	1,65 ± 0.24
SUMA MONOET.	13,24 ± 0.55	10,02 ± 0.44*	19,07 ± 1.12	13,96 ± 0.95*	27,94 ± 1.22	7,83 ± 0.52*
SUMA DIET.	16,46 ± 1.11	16,24 ± 0.76	15,69 ± 1.33	12,89 ± 1.14*	13,62 ± 0.92	14,56 ± 0.75
SUMA TRIET.	2,89 ± 0.15	2,42 ± 0.11	0,51 ± 0.04	0,31 ± 0.07	1,22 ± 0.15	1,10 ± 0.11
SUMA TETRAET.	16,46 ± 1.20	12,86 ± 0.61*	8,71 ± 0.52	8,20 ± 0.73	10,91 ± 0.84	9,38 ± 0.36
SUMA PENTAET.	1,94 ± 0.05	1,26 ± 0.02*	0	0	0,17 ± 0.01	0*
SUMA HEXAET.	0,48 ± 0.02	0,21 ± 0.01*	1,33 ± 0.03	0,53 ± 0.01*	0,26 ± 0.05	0,11 ± 0.02*
INDICE INSAT.	133,36 ± 4.44	108,86 ± 5.56*	94,87 ± 4.41	76,75 ± 3.04*	104,98 ± 5.55	80,46 ± 2.61*

Los datos son promedios ± SD de 8 análisis independientes. Están expresados en nanomoles de cada ácido graso/mg de proteína. El ácido eicosamonoenoico (20:1) se empleó como standard interno. Los resultados estadísticamente significativos (* p < 0.01) aparecen resaltados en otro color.

12.2.5 Estudios histopatológicos

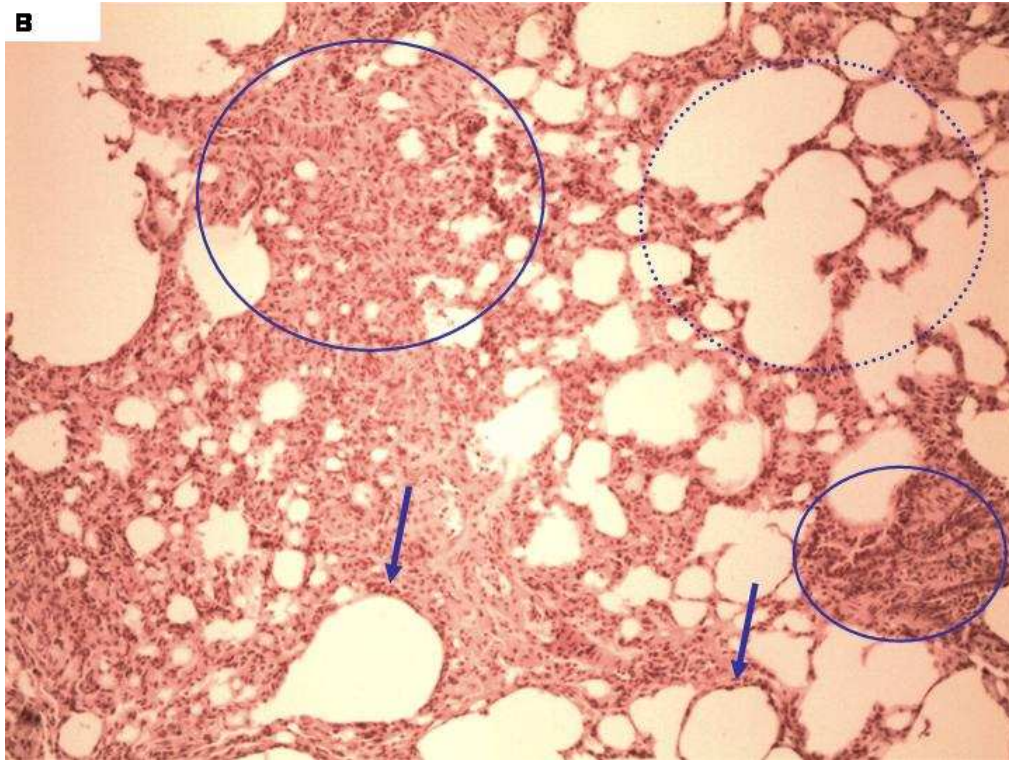
Finalmente comentaremos que todos los tejidos extraídos de los animales sometidos a los diferentes esquemas de sobrecarga con cobre fueron fijados en PBS/formol, incluidos en parafina y procesados para su estudio mediante la técnica de tinción con hematoxilina/eosina. A continuación se muestran imágenes representativas.

En la siguiente microfotografía (“A”, 40 X) se observa una panorámica del tejido pulmonar obtenido de ratas con sobrecarga oral de cobre en donde se percibe dilatación alveolar profusa y engrosamiento de tabiques (flechas).

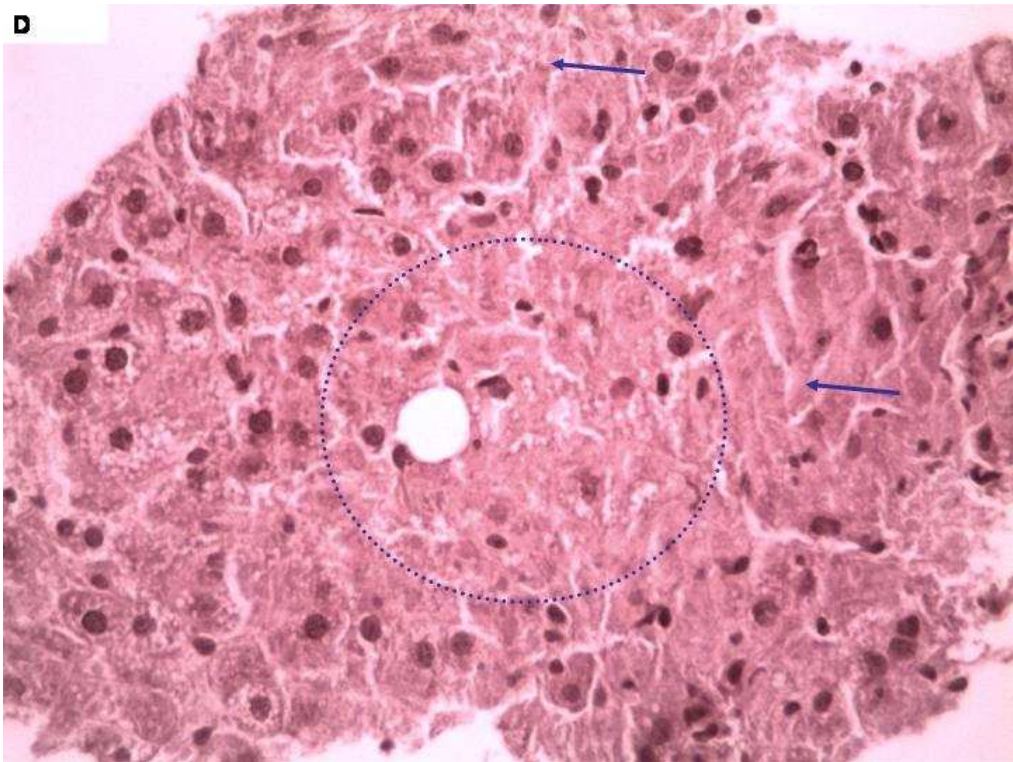
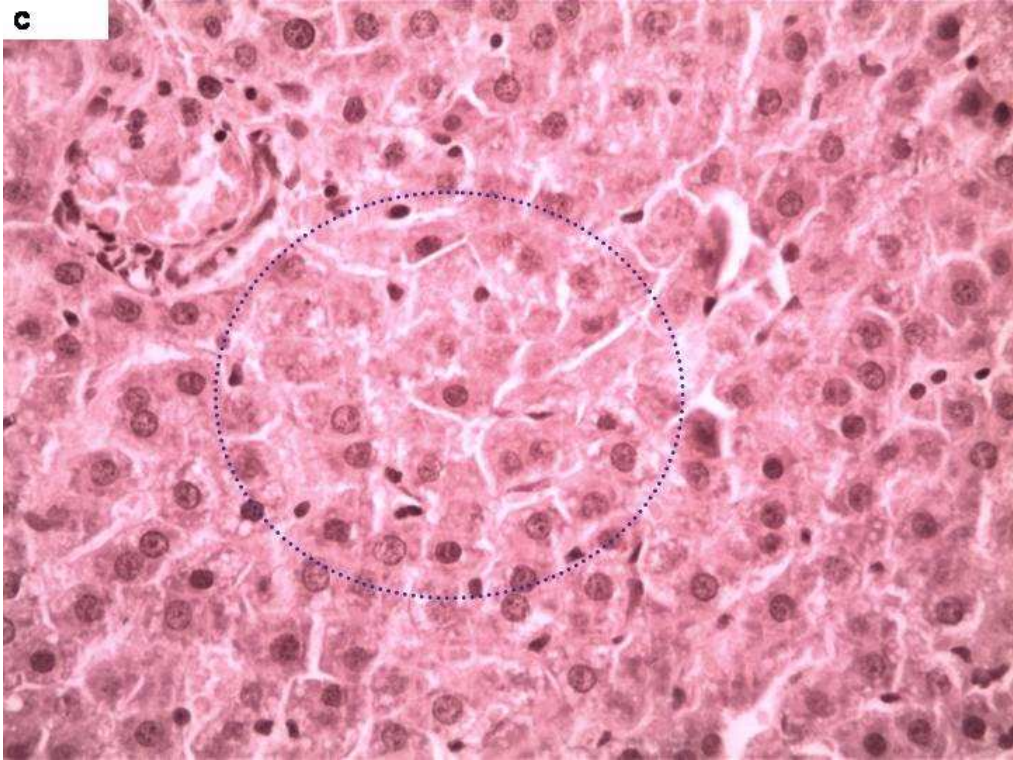


En otro corte panorámico (“B”), también obtenido de un animal sometido a sobrecarga de Cu por vía oral con dieta SCuO, se observó engrosamiento de tabiques (flechas), dilatación alveolar (círculo punteado) y ausencia de alvéolos por destrucción con reemplazo de tejido cicatrizal (círculos llenos). Estos cambios son compatibles con lesiones de reparación tisular subsecuentes a muerte por necrosis y apoptosis.

En los otros tratamientos de sobrecarga se pudieron constatar lesiones similares aunque de diferente intensidad, siendo las más importantes las que presentaron los animales con sobrecarga mixta (oral e i.p.).



El tejido hepático de los mismos animales mostrados en las microfotografías anteriores también mostró serias alteraciones de la histoarquitectura caracterizadas por la pérdida de organización centrolobulillar (“C” y “D”, círculos punteados), núcleos hiperpicnóticos y focos cicatrizales post-necróticos (microfotografía “D”, círculo punteado y flechas).



12.3 Resultados en humanos

12.3.1 Mujeres usuarias de dispositivos intrauterinos a base de cobre (Cu-DIUs)

Con el objeto de investigar si el empleo de dispositivos intrauterinos a base de Cu es capaz de provocar estrés oxidativo que se pueda asociar al tiempo de uso del DIU, emprendimos un estudio en mujeres usuarias del mismo tipo de dispositivo durante diferentes períodos de tiempo. En la **tabla X** se muestran las características de los grupos estudiados (control o C y experimental o DIU). El número de mujeres que formaron parte de cada grupo de investigación fue similar, todas siguieron una dieta semejante, y pertenecieron al mismo grupo étnico con similares promedios de edad. A su vez, el porcentaje de fumadoras fue similar.

Tabla X: Características principales de los grupos experimentales

Parámetros	Grupos	
	C	DIU
<i>N</i>	39	35
Promedio de edad (años ± SD)	28.8 ± 5.0	27,6 ± 4,47
Dieta	Balanceada/omnívora	Balanceada/omnívora
Índice de masa corporal (Kg/cm ²)	25.4 ± 3.3	24.3 ± 2.6 (n.s.)
Étnia (%)		
Caucásica	7.7	11.4
Hispanica/Latina	84.7	80.1
Afro-Americana	5.1	5.7
Asiática	2.5	2.8
Historial de contracepción oral (%)	33.3	28.6*
% Nulípara	43.5	34.3
% Fumadoras	49.8	48.6

*SD, desviación estándar; (n.s.), no significativo; *, Antes de la colocación del Cu-DIU.*

La **figura 40** muestra los resultados obtenidos para distintos biomarcadores de estrés oxidativo a partir de las muestras de plasmas de las mujeres analizadas, incluyendo glutatión (GSH), peróxidos lipídicos evaluados como sustancias reactivas al tiobarbiturato (TBARS), concentración de nitritos y nitratos ([NOx]) y niveles de carbonilos proteicos (CPs). Todos los biomarcadores estudiados presentaron diferencias significativas ($p < 0.01$). Los CPs (**Fig. 41-A**) y TBARS (**Fig. 41-B**) mostraron correlaciones positivas ($r^2 = 0.74$ y 0.75 , respectivamente) con el tiempo de uso del Cu-DIU. Por el contrario, no se han encontrado correlaciones significativas (lineales o no lineales) para GSH y [NOx] (datos no mostrados).

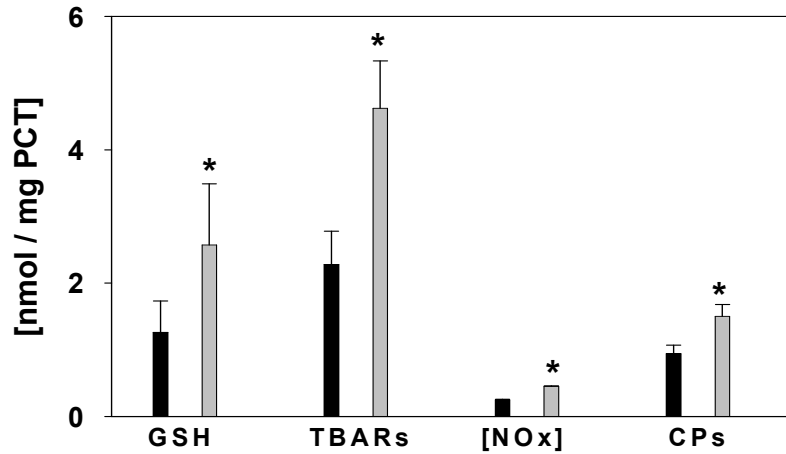


Figura 40: Biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de plasma de mujeres con Cu-DIU (barras grises) y controles (barras negras). Los resultados para glutatión (GSH), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitritos y nitratos ([NOx]) y carbonilos proteicos (CPs) fueron expresadas como el promedio \pm SD del n indicado en la tabla X, y fueron obtenidas tal como se describe en materiales y métodos. * Diferencia significativa respecto del control, $p < 0.01$.

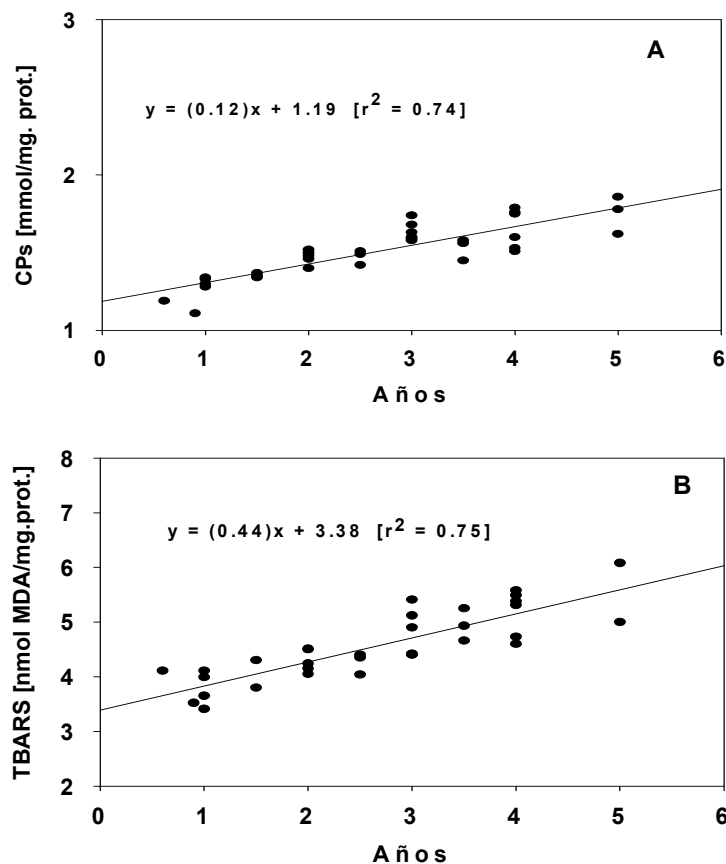


Figura 41: Correlación entre concentración de CPs (panel A) y TBARS (panel B) y tiempo de uso del Cu-DIU. Los análisis fueron realizados empleando el software descrito en la sección de materiales y métodos.

Las ecuaciones de los coeficientes de correlación (r^2) y regresión lineal fueron incluidas en el párrafo correspondiente.

En la **figura 42** se representó el análisis de concentración de Cu en las muestras de plasma de los grupos experimentales. Luego de 1.5 a 2 años de uso permanente los niveles aumentaron significativamente mostrando un incremento que siguió un ajuste con el tiempo de implantación, el cual correlacionó mejor con una curva sigmoïdal ($r^2 = 0.97$) que con una lineal ($r^2 = 0.84$). Luego de un período superior a los 3 años se observó una disminución del incremento del nivel de Cu alcanzándose una meseta asintótica hasta los 5 años de uso (período máximo de estudio del dispositivo en nuestra muestra poblacional).

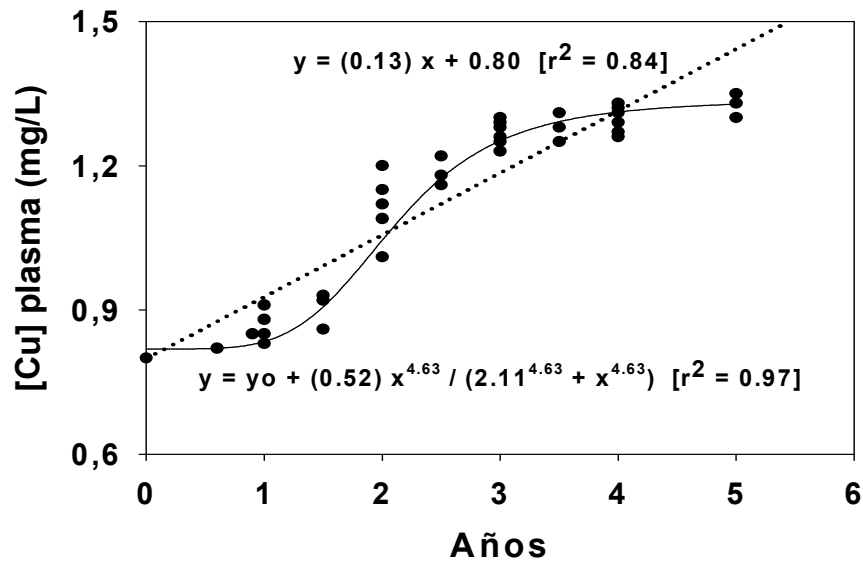


Figura 42: Correlaciones lineales y no lineales entre concentración de iones cobre (Cu) y tiempo de uso del dispositivo intrauterino. Los análisis fueron realizados empleando el software descrito en la sección de materiales y métodos. Las ecuaciones de los coeficientes de correlación (r^2) y de las curvas fueron incluidas en el gráfico.

En respuesta a estos cambios, los niveles de metalotioneínas (MTs) y ceruloplasmina (CRP) variaron de diferentes modos (**Fig. 43** y **44**, respectivamente). La concentración de MTs comenzó a elevarse luego de la implantación del Cu-DIU, aumentando de forma hiperbólica (**Fig. 43**). Este incremento se inició aproximadamente a los 3 años de uso y permaneció activo hasta el final del período estudiado aunque disminuyó su velocidad de aumento en función de la estabilización de los niveles de cobre en el plasma. Es interesante notar que los valores de CRP se mantuvieron casi estables durante el primer año de uso, pero luego aumentaron significativamente (siguiendo un comportamiento polinómico de tercer grado) luego de los 2 años de uso continuo y hasta el final del período de observación.

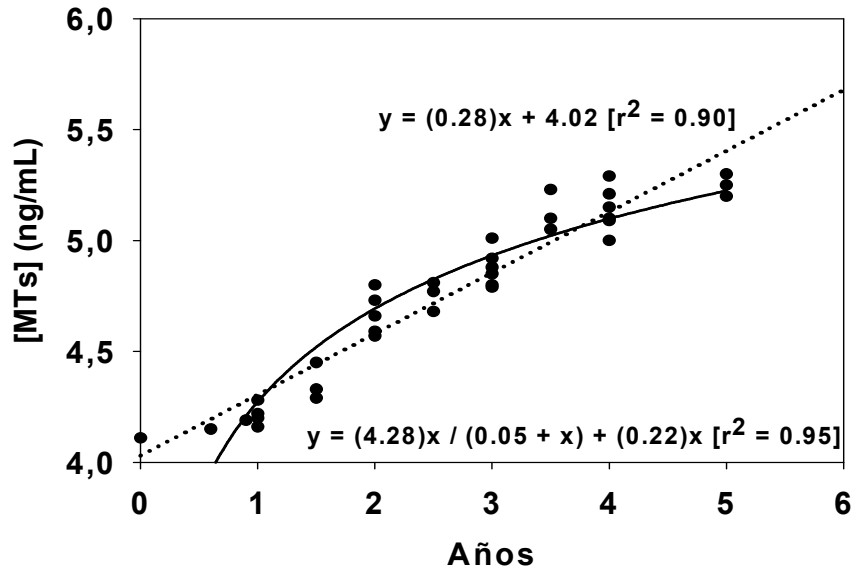


Figura 43: Correlaciones lineales y no lineales entre concentración de metalotioneínas (MTs) y tiempo de uso del DIU. Los análisis fueron realizados empleando el software descrito en la sección de materiales y métodos. Las ecuaciones de los coeficientes de correlación (r^2) y de las curvas correspondientes fueron incluidas en el gráfico.

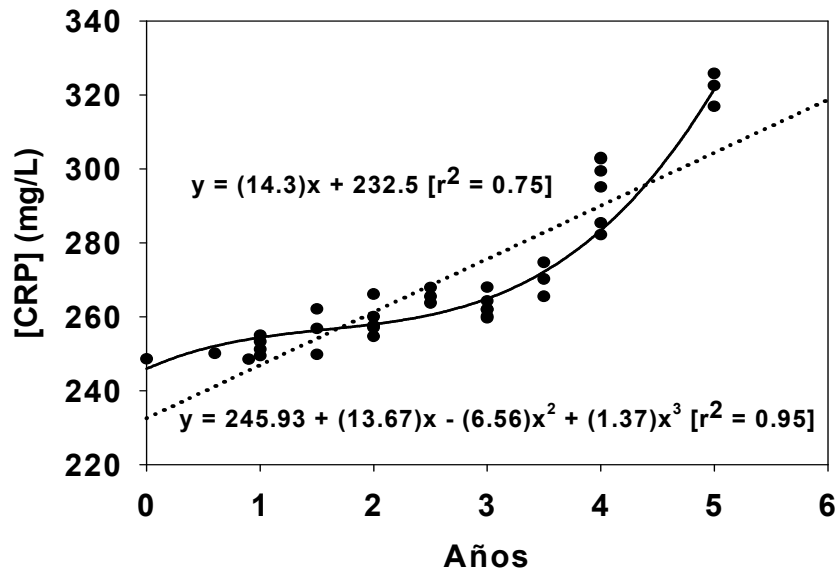


Figura 44: Correlaciones lineales y no lineales entre concentración de ceruloplasmina (CRP) y tiempo de uso del DIU. Los análisis fueron realizados empleando el software descrito en la sección de materiales y métodos. Las ecuaciones de los coeficientes de correlación (r^2) y de los polinomios de tercer grado fueron incluidas en el gráfico.

La **figura 45** muestra los resultados obtenidos para las actividades de enzimas marcadoras del funcionamiento hepático. Si bien los valores de las actividades de las transaminasas (ALT y AST) -expresadas en UI/L- se encontraron dentro de los rangos normales en ambos grupos experimentales, los valores en el grupo de usuarias del Cu-DIU

fueron significativamente mayores que para el grupo control. De manera similar, la actividad de la láctico-deshidrogenasa (LDH) fue mayor en mujeres con el dispositivo que en las controles. No se observaron diferencias significativas en la actividad de las enzimas γ -glutamyl-transpeptidasa y fosfatasa alcalina entre ambos grupos.

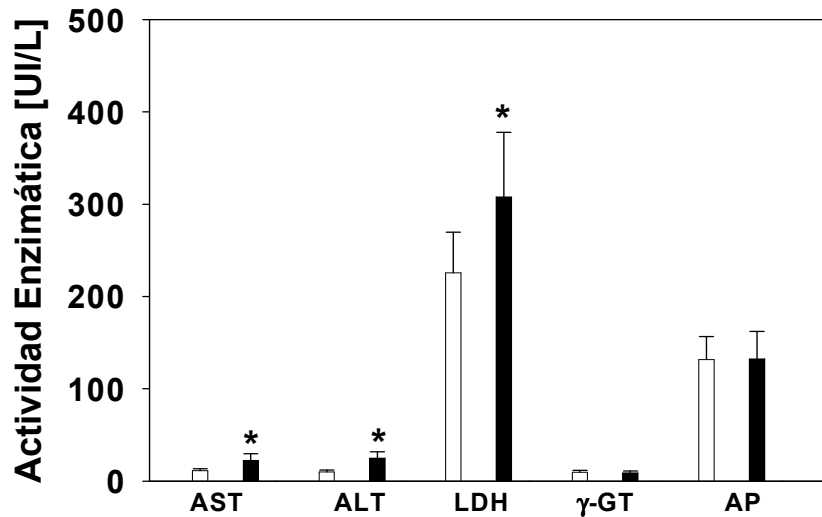


Figura 45: Actividad enzimática en plasma de mujeres con DIU (barras blancas) y sin el dispositivo (barras negras). Los resultados de alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), lactato-deshidrogenasa (LDH), γ -glutamyl-transpeptidasa (γ -GT) y fosfatasa alcalina (AP) fueron expresados como el promedio \pm SD del n indicado en la tabla X. * Diferencia significativa respecto del control $p < 0.01$.

12.3.2 Profesionales dedicados a la fumigación de agroquímicos

Las personas que manipulan compuestos derivados del cobre, minerales enriquecidos en este metal, u otros insumos industriales aplicables a múltiples actividades productivas que incluyen diversas formas químicas y físicas del cobre, constituyen una población de riesgo que merece ser investigada. Por esta razón también investigamos a un grupo de fumigadores profesionales que emplean compuestos orgánicos del cobre como agroquímicos.

En la **tabla XI** se muestran las características demográficas de la población de fumigadores estudiados y del grupo control. No hubo diferencias significativas en relación al promedio de edad entre las personas que conformaban ambos grupos y tampoco en cuanto a la proporción de hombres y mujeres. Sin embargo, el número de fumadores varió resultando significativamente diferente. Es sabido que el tabaco es una fuente generadora de estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2009); por ese motivo, se decidió analizar la

diferencia estadística de los resultados teniendo en cuenta este distractor. Aún considerando este factor, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los individuos fumadores y no fumadores pertenecientes a un mismo grupo. Es más, de haberse producido alguna diferencia, esta hubiera hecho aún más significativas las conclusiones obtenibles siendo que el porcentaje de fumadores resultó ser más elevado en el grupo control que en el experimental.

Tabla XI: Principales características demográficas de los grupos estudiados

Parámetros	Grupos	
	Control	Fumigadores
N	32	31
Promedio de edad (años ± SD)	25 ± 5	26 ± 4.6 (n.s)
Dieta	Balanceada/omnivora	Balanceada/omnivora
% Fumadores	69	48
% Hombres	57	60
% Mujeres	43	40

SD, desviación estándar; (n.s.) diferencia no significativa.

El análisis de la concentración de Cu plasmático mostró que los fumigadores (F) presentaron concentraciones elevadas de este metal en relación con el grupo control (C) (casi un 50 % más elevado) (**Fig. 46**).

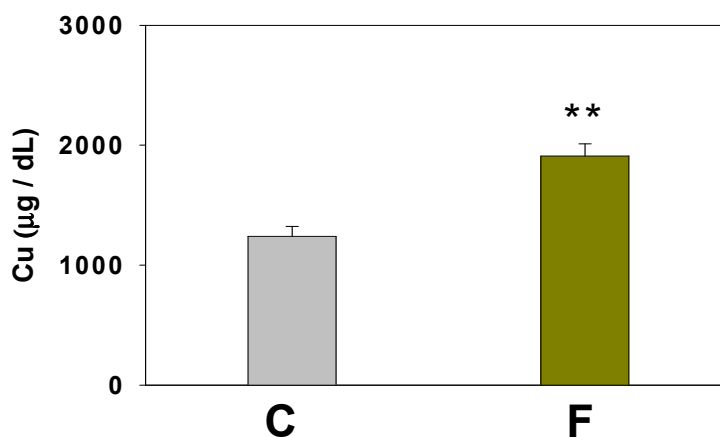


Figura 46: Concentración plasmática de Cu (µg/dL) en muestras de fumigadores (F) y control (C). Los resultados fueron expresados como el promedio ± SD.

** Diferencia significativa respecto del control $p < 0.01$.

En la **tabla XII** se pueden observar los resultados obtenidos para la concentración de antioxidantes lipo- e hidro-solubles, y proteínas asociadas con la homeostasis del Cu.

Tabla XII: Concentración plasmática de antioxidantes y proteínas involucradas en la homeostasis del Cu.

Determinaciones	Grupos	
	Controles	Fumigadores
α -Tocoferol (μ M)	24.8 \pm 2.8	14.3 \pm 2.9 **
Glutación (GSH+GSSG) (mM)	0.12 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02

Los resultados se expresaron como el promedio \pm SD.

*Las diferencias significativas respecto el control fueron indicadas con ** ($p < 0.01$).*

Los valores de α -tocoferol se hallaron disminuidos de manera muy significativa en los fumigadores. Sin embargo, no se observaron diferencias con respecto al glutación total. Las concentraciones de CRP y MTs se encontraron incrementadas en los fumigadores, presentando valores 70 % y 60 % -respectivamente- superiores a las encontradas en el grupo control.

La **tabla XIII** muestra los resultados correspondientes a la actividad de las enzimas hepáticas utilizadas como biomarcadores de daño/funcionalismo. Los resultados obtenidos para los fumigadores fueron comparados con los del control, y a su vez con los valores de referencia establecidos para nuestra población general e informados por el fabricante del *kit* comercial empleado en su determinación. Se observó un marcado aumento de la actividad de todas las enzimas analizadas en las muestras correspondientes al plasma de los fumigadores cuando se las comparó con el grupo control del experimento; sin embargo, no hubo diferencias significativas al efectuar las comparaciones con los rangos de referencia informados para la población general.

Tabla XIII: Resultados de biomarcadores hepáticos en muestras de plasma de controles (C) y fumadores (F).

Determinaciones	Grupos		V. R.
	Controles	Fumigadores	
AST (UI/ml)	7.78 ± 1.6	13.06 ± 2.5 **	< 12
ALT (UI/ml)	9.13 ± 1.6	12.87 ± 3.8 **	<12
GGT (U/l)	16.50 ± 6.3	32.00 ± 5.7 **	5-38
AP (UI/l)	112.1 ± 34.0	182.8 ± 46.6 **	68-240
LDH (UI/l)	182.5 ± 36.0	267.5 ± 54.3 **	160-320

AST: aspartato amino transferasa, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: γ glutamyl-transpeptidasa, AP: fosfatasa alcalina, LDH: láctico deshidrogenasa. Los resultados fueron expresados como promedios \pm SD. * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$). V.R.: valores de referencia para la población general.

Las **figuras 47 y 48** muestran los resultados obtenidos en las determinaciones de biomarcadores de estrés oxidativo/nitrativo de las muestras de plasma de fumadores y controles. Se puede observar que los niveles de [NOx] aumentaron significativamente (30 %) respecto a los controles (**Fig. 47**). De la misma forma los TBARS y CPs fueron significativamente superiores en los fumadores alcanzando valores 50 y 40 % mayores, respectivamente (**Fig. 48**).

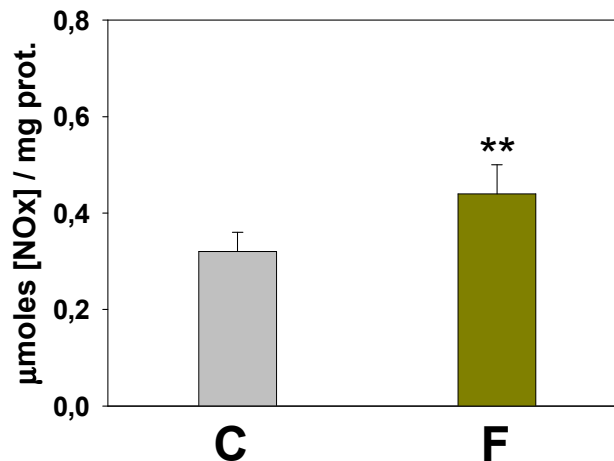


Figura 47: Niveles de [NOx] (nitritos y nitratos) en muestras de plasmas de controles (C) y fumadores (F). Los resultados fueron expresados en μ M/mg de proteína como promedios \pm SD. ** ($p < 0.01$).

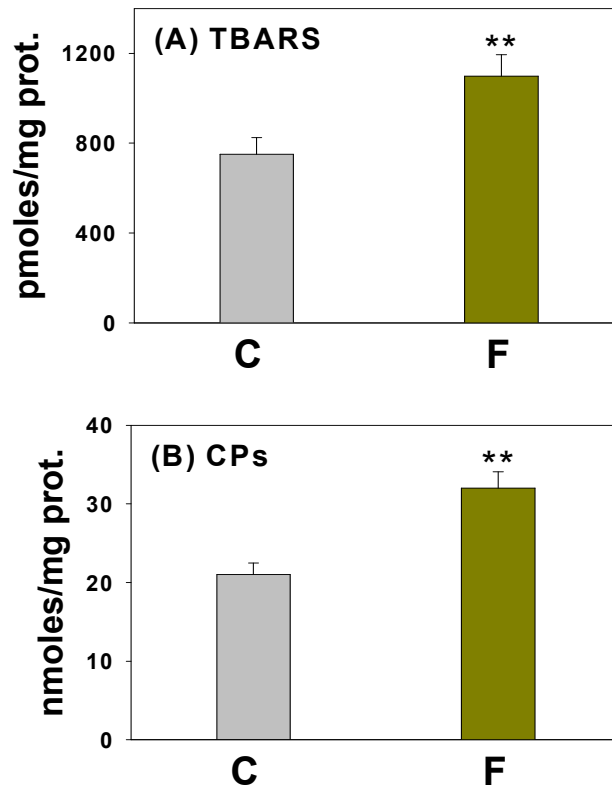


Figura 48: Biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de plasmas de controles (C) y fumigadores (F) expresados como promedios \pm SD. (A) TBARS (pmoles MDA/mg de prot.); (B) Carbonilos proteicos (CPs; nmoles/mg de prot.). Los valores significativamente diferentes respecto al control fueron indicados con ** ($p < 0.01$).

Por otro lado, la capacidad antioxidante del plasma (determinada como equivalentes reductores en el ensayo FRAP) resultó inferior en las muestras de fumigadores comparadas con el grupo control (**Fig. 49**). Tal como se describiera en las determinaciones realizadas en homogenatos celulares o provenientes de tejidos de rata, las muestras de plasma de ambos grupos fueron tratadas previamente con uricasa para eliminar la contribución antioxidante del ácido úrico. De este modo, la disminución en la capacidad antioxidante en los fumigadores se pudo atribuir directamente a una disminución en los antioxidantes lipo- e hidro-solubles presentes en el plasma.

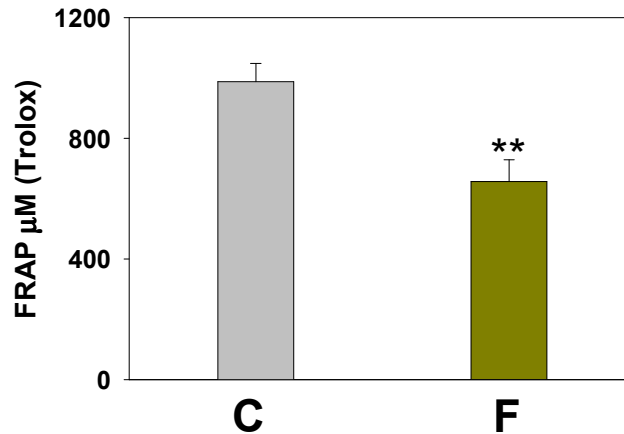


Figura 49: Valores del ensayo FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) en muestras de controles (C) y fumigadores (F). Los resultados fueron expresados en concentración micromolar de equivalentes reductores considerados como Trolox® (diacetato de tocoferol) en forma de promedios \pm SD. Los valores significativamente diferentes comparados con el control fueron indicados con ** ($p < 0.01$).

12.2.3 Pacientes con enfermedades neurodegenerativas

El cobre se halla indiscutiblemente ligado a enfermedades humanas degenerativas, especialmente neurodegenerativas, y a la aterosclerosis.

Como se muestra en la **tabla XIV** decidimos estudiar grupos de pacientes que fueron pareados en relación al sexo y edades, y se decidió incluir dos grupos controles: uno compuesto por sujetos jóvenes (GCJ) y otro por personas de mayor edad (GCA).

Dentro del grupo de los pacientes neurodegenerativos hubo, tal como era de esperar, un aumento significativo de la duración de la enfermedad en relación con el estadio clínico o evolutivo. También en concordancia con la progresión del cuadro neurodegenerativo los resultados del test MMSE (*Mini-Mental State Examination*) disminuyeron desde una condición intermedia hacia una severa. Cabe aclarar aquí que de acuerdo con evidencias previas, este test cognitivo correlaciona casi linealmente con los resultados obtenidos mediante la utilización de otros test neurológicos aislados o en batería (Godglas y Kaplan, 1986; Juby, 1999; Larner, 2007) cuestión que fue corroborada en nuestro estudio por comparación con los resultados de las pruebas de fluencia fonética, fluencia semántica, *Addenbrook Test*, *Clock Test*, y escala *ACE* (datos no mostrados). Por este motivo, decidimos tomar solamente los *scores* del MMSE a los fines de las comparaciones estadísticas y como índices representativo de las condiciones cognitivas de cada paciente.

A pesar de que los grupos controles tuvieron diferencias significativas en cuanto al promedio de edad (algo que fue buscado deliberadamente para legitimizar los ensayos bioestadísticos), ambos fueron indistinguibles entre sí en relación a sus *performances* cognitivas (*pair-wise comparison*, test de Tukey's, $p < 0.01$; **tabla XIV**). Por otro lado, otras condiciones demográficas, nutricionales o socio-culturales no mostraron diferencias significativas entre grupos. Se observó que la proporción de fumadores fue mayor en los controles que en cualquier otro grupo ($p < 0.05$) y esta condición fue considerada en el estudio estadístico de los resultados aunque no resultó ser determinante de la significación.

Tabla XIV: Principales características de los grupos estudiados

Grupos	MMSE (X ± SD)	Años de enfermedad (X ± SD)	Σ n (F+ M)	n F	n M	Promedio de edad (X edad ± SD)		
						M	H	Σ (M+H)
Enfermedad de Alzheimer (AD)								
Moderado (ADM)	22.2 ± 3.1	3.1 ± 1.1	39	22	17	69.6 ± 5.4	70.3 ± 6.3	70.0 ± 5.6
Intermedio (ADI)	15.9 ± 1.5	5.1 ± 2.4	36	21	15	75.2 ± 6.0	77.5 ± 4.8	76.4 ± 5.4
Severo (ADS)	11.6 ± 2.2	7.8 ± 3.5	35	21	14	76.8 ± 4.4	78.4 ± 5.0	77.6 ± 4.6
Total AD			110	64	46	74.4 ± 5.1	76.1 ± 5.2	74.7 ± 4.1
Parientes de AD (PAD)			76	41	35	54.0 ± 6.1	51.2 ± 5.3	53.1 ± 5.7
Enfermedad de Parkinson (PD)								
Moderado (PDM)	24.6 ± 2.9	4.5 ± 3.3	33	19	14	66.1 ± 3.8	68.5 ± 5.4	66.9 ± 4.4
Intermedio (PDI)	22.1 ± 1.5	6.5 ± 2.7	29	16	13	69.6 ± 6.1	68.0 ± 4.7	69.1 ± 5.6
Severo (PDS)	17.4 ± 3.3	9.0 ± 2.7	25	15	10	75.2 ± 4.7	73.6 ± 3.3	74.5 ± 4.1
Total PD			87	50	37	70.1 ± 4.8	70.2 ± 4.5	70.0 ± 4.6
Parientes PD (PPD)			46	29	17	45.8 ± 4.4	41.9 ± 5.0	43.9 ± 4.6
Demencia vascular (VD)								
Moderado (VDM)	22.2 ± 3.4	5.2 ± 3.0	48	25	23	74.3 ± 6.1	72.8 ± 7.0	73.7 ± 6.4
Intermedio (VDI)	17.4 ± 2.5	7.1 ± 2.9	32	20	12	77.5 ± 4.3	75.4 ± 5.1	76.6 ± 4.6
Severo (VDS)	9.9 ± 1.8	8.7 ± 2.1	30	18	12	79.8 ± 3.2	80.1 ± 2.5	80.0 ± 2.8
Total VD			110	42	32	77.4 ± 4.4	76.4 ± 4.7	77.0 ± 4.5
Parientes VD (PVD)			56	29	27	38.5 ± 6.6	41.3 ± 5.0	39.9 ± 5.8
Grupos control (GP)								
Grupo control joven (GCJ)	29.5 ± 0.8		55	29	26	42.2 ± 4.3	41.6 ± 3.9	42.0 ± 4.1
Grupo control adulto (GCA)	27.8 ± 1.1		79	38	41	78.5 ± 3.0	77.1 ± 4.4	77.8 ± 3.7
Total de controles			134	67	67			
Total de parientes			178	99	79			
Total pacientes			307	177	130			
Total sujetos analizados (#)			619	343	276			

“Σ” indica la suma de las variables involucradas. MMSE: Mini-Mental State Examination test; M, mujer; H, hombre. (#), Ninguno de los pacientes fue institucionalizado. Los años de enfermedad se computaron desde el día del diagnóstico. No presentaron diferencias significativas entre grupos en cuanto a nivel educacional, años de instrucción, ni consumo de alcohol. La proporción de fumadores fue superior en ambos controles en comparación con el resto de los grupos estudiados.

La **tabla XV** muestra los resultados obtenidos en el análisis de la concentración de Cu, CRP y MTs en pacientes y controles.

Los pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadio clínico severo (ADS) mostraron un aumento de la concentración plasmática de Cu significativamente mayor comparada con los otros estadios de la misma enfermedad o con los grupos controles. Sin embargo, la concentración de CRP fue inferior en ADS en comparación con ADM y ADI, e incluso fue menor comparada con el valor observado en el grupo de controles de alto promedio de edad (GCA).

Los pacientes con Parkinson presentaron altas concentraciones de iones Cu sólo en los casos severos (PDS). Sin embargo, en los PDI la concentración de Cu fue más elevada que en el subgrupo de evolución moderada (PDM). Un comportamiento similar se observó para los datos de concentración de ceruloplasmina (CRP) en los pacientes Parkinsonianos. Por otro lado, en los pacientes con demencias vasculares (VD) la concentración de Cu y CRP aumentó progresivamente desde el estado moderado (VDM) hacia el severo (VDS), siendo los valores significativamente diferentes respecto de los obtenidos para los correspondientes controles. Además se pudieron observar incrementos discretos en los niveles de metalotioneínas (MTs), los cuales fueron más pronunciados en los VDS que en los dos estadios anteriores de la enfermedad (VDM y VDI). Ninguno de los parámetros analizados mostró cambios significativos en el grupo de parientes directos, con excepción de la concentración de Cu que se encontró aumentada en los parientes de dementes vasculares (PVD).

También estimamos los valores de Cu no asociado a CRP y MTs a través de los cálculos descritos en la parte experimental y las relaciones entre el metal y sus proteínas homeostáticas mayoritarias.

Los pacientes de los tres grupos presentaron elevadas proporciones de Cu/CRP y de Cu/MTs en contraste con el correspondiente control, en especial en los estadios severos de las enfermedades (**Fig. 50-A** y **50-B**). Es interesante notar, que los pacientes con AD tuvieron un claro incremento de ambas relaciones en concordancia con la evolución de la enfermedad.

Tabla XV: Contenido de Cu, CRP y MTs grupos experimentales y controles

Grupos	Determinaciones		
	Cu [mg/L]	CRP [mg/L]	MTs [ng/mL]
Controles (C)			
G CJ	0.79 ± 0.04	253 ± 12	4.11 ± 0.10
G CA	0.81 ± 0.06	265 ± 7	4.23 ± 0.08
Enfermedad de Alzheimer (AD)			
ADM	0.84 ± 0.04 ^a	264 ± 11 ^a	4.08 ± 0.05
ADI	0.90 ± 0.06 ^a	248 ± 9 ^a	3.91 ± 0.10
ADS	1.26 ± 0.05 ^{b**}	245 ± 12 ^{a*}	3.95 ± 0.12
Enfermedad de Parkinson (PD)			
PDM	0.87 ± 0.02 ^a	255 ± 8 ^a	4.38 ± 0.21
PDI	0.93 ± 0.03 ^b	262 ± 14 ^a	4.57 ± 0.16
PDS	1.02 ± 0.04 ^{b*}	279 ± 11 ^{b*}	4.81 ± 0.09
Demencia vascular (VD)			
VDM	0.98 ± 0.04 ^{a*}	249 ± 7 ^a	4.10 ± 0.04 ^a
VDI	1.14 ± 0.02 ^{b*}	291 ± 11 ^{b*}	4.72 ± 0.18 ^b
VDS	1.34 ± 0.07 ^{c**}	326 ± 14 ^{c**}	5.47 ± 0.26 ^{b*}
Parientes directos (P)			
PAD	0.83 ± 0.02	266 ± 11	4.05 ± 0.12
PPD	0.86 ± 0.03	259 ± 16	4.01 ± 0.23
PVD	1.01 ± 0.05 [*]	262 ± 9	4.24 ± 0.15

Los resultados fueron expresados como promedios ± SD (el n para cada categoría se especifica en la **tabla XIV**). Las diferencias significativas dentro de cada grupo se indicaron con distintas letras como superíndices ($p < 0.01$) (ANOVA más test de Tukey).

Las diferencias estadísticas entre los pacientes y sus correspondientes controles se indicaron con asteriscos, * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$).

Dentro del grupo de los parientes, sólo los PVD mostraron aumentos en las relaciones Cu/CRP y Cu/MTs en comparación con GCJ (**Fig. 51-A** y **51-B**). Estos resultados concuerdan con los cambios calculados para la fracción de Cu no unida a CRP (NCBC) (**Fig. 52**) para los pacientes y/o parientes. Los cálculos fueron realizados como porcentaje de cambio respecto al control (los valores de referencia fueron 23.3 ± 3.5 y -19.7 ± 2.8 para GCA y GCJ, respectivamente). En aquellos casos en donde la relación Cu/CRP aumentó (**Fig. 50-A** y **Fig. 51-A**), también se ha visto incrementada la concentración de NCBC (**Fig. 52**). Es más, los valores de NCBC aumentaron concomitantemente con los niveles de afección de las enfermedades, especialmente en PD y AD, lo cual puede tener una notable importancia clínica.

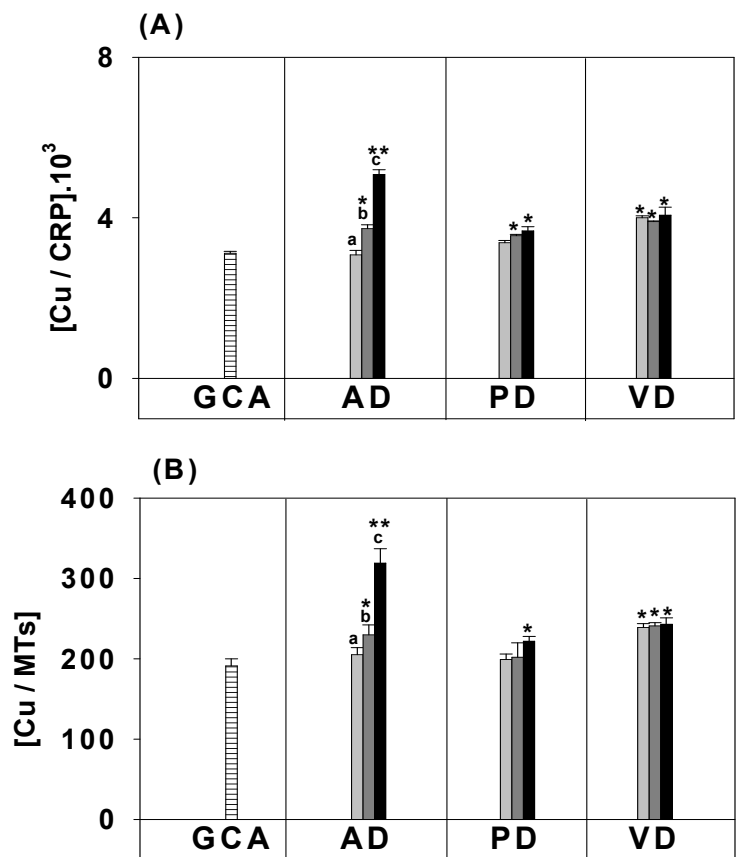


Figura 50: Proporciones [Cu/CRP].10³ (A) y [Cu/MTs] (B) (promedios \pm SD) en grupo control adulto de alto promedio de edad (GCA, barra rayada) y pacientes con Alzheimer (AD), Parkinson (PD) o demencias vasculares (VD) en los tres estadios clínicos (leve, (barras grises); intermedio, (barras grises oscuras); severo, (barras negras)). Las diferencias estadísticas entre los estadios de cada patología fueron indicados con letras, mientras que las diferencias respecto al control se indicaron con asteriscos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Los números de casos aparecen en la **tabla XIV**.

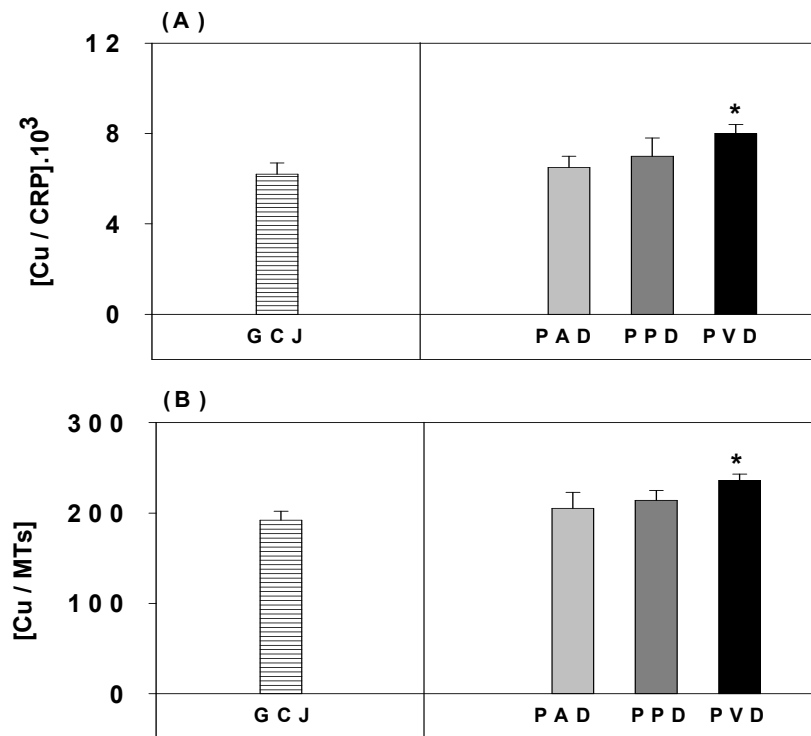


Figura 51: Proporciones [Cu/CRP].10³ (A) y [Cu/MTs] (B) (promedio \pm SD) en el grupo control de bajo promedio de edad (GCJ, barra rayada) y parientes de los pacientes con Alzheimer (PAD, barras grises), Parkinson (PPD, barras grises oscuras) o demencias vasculares (PVD, barras negras). Las diferencias estadísticas respecto al grupo GCJ fueron indicadas con asteriscos* ($p < 0.05$). Los números de casos aparecen en la **tabla XIV**.

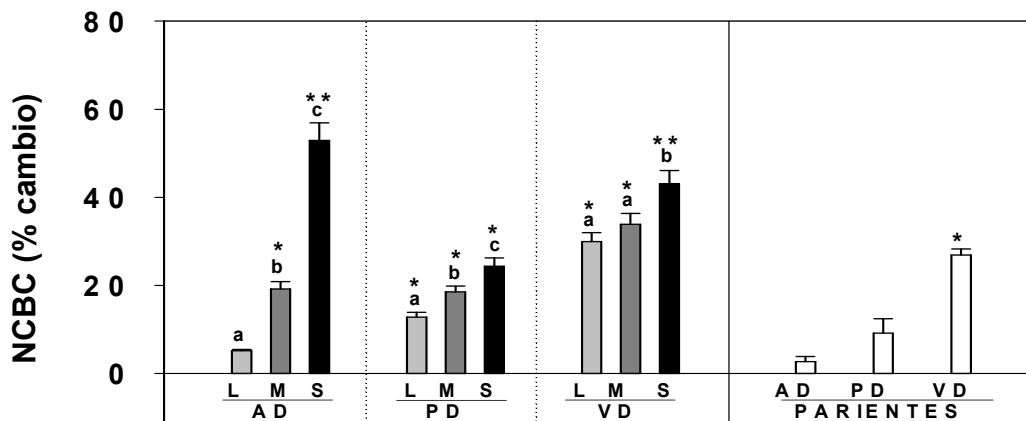


Figura 52: Fracción de cobre *libre* o no complejoado a CRP (NCBC) en pacientes con Alzheimer (AD), Parkinson (PD) o demencias vasculares (VD) en los tres estadios clínicos: leve (L, barras grises), intermedio (I, barras grises oscuras) y severo (S, barras negras), y sus respectivos parientes directos (barras blancas). Los datos se expresaron como promedio \pm SD del porcentaje de cambio respecto al grupo control correspondiente (GCA y GCJ para pacientes y parientes directos, respectivamente). Las diferencias estadísticamente diferentes entre estadios de una patología se indicaron con letras, mientras que las diferencias significativas respecto el control se indicaron con asteriscos* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$). Los valores basales fueron -23.3 ± 3.5 y -19.7 ± 2.8 para GCA y GCJ, respectivamente. Los números de casos aparecen en la **tabla XIV**.

También se llevaron a cabo estudios de regresión y correlación entre variables con la idea de investigar posibles herramientas de caracterización clínica o de valor pronóstico (o predictivo) a partir de los datos experimentales. Como variables de contraste se emplearon los datos de Cu, CRP y MTs y los resultados del test cognitivo MMSE para los tres grupos de pacientes y parientes (**Fig. 53**). Algunos de esos resultados se mostrarán a continuación.

Los valores de MMSE presentaron una relación lineal inversa con la concentración de Cu plasmática para los tres grupos estudiados. Las mejores linealidades se obtuvieron para AD y PD ($r^2 = 0.91$ y 0.90 , respectivamente), mientras que en VD se presentó un r^2 de 0.75 (datos no mostrados). Además, se observó una muy buena regresión lineal inversa para MMSE y el contenido de NCBC para AD y PD (0.90 y 0.94 , respectivamente) (**Fig. 53**). Sin embargo, en el caso de los VD se obtuvo una mejor regresión ($r^2 = 0.97$) utilizando la ecuación polinómica de tercer orden $y = y^0 + a/x + b/x^2 + c/x^3$, donde y^0 , 75.0 ; a , -6.0 (10^3); b , 1.72 (10^5); c , -1.43 (10^6) (*Durbin-Watson Statistics* 0.2665 ; con un nivel de significancia de $p < 0.001$). Este ajuste no lineal podría indicar la existencia de una mayor proporción de NCBC en los estadios iniciales de las demencias vasculares que en las etapas finales de la enfermedad.

De manera interesante observamos la existencia de una relación lineal muy fuerte entre las variables CRP y MMSE en todos los grupos de pacientes analizados. Sin embargo, mientras que para los AD esta correlación fue positiva ($r^2 = 0.91$), para los PD y VD resultó negativa ($r^2 = 0.92$ y 0.91 , respectivamente). Estos resultados podrían sugerir una incapacidad de los pacientes con enfermedad de Alzheimer para producir niveles adecuados de CRP hasta los valores requeridos para mantener los niveles de Cu dentro de los parámetros fisiológicos.

Cuando se realizaron cálculos similares con los datos de MTs vs. MMSE no se encontraron correlaciones lineales estadísticamente significativas entre las variables, con excepción de los datos correspondientes a pacientes dementes vasculares para los cuales se obtuvo un coeficiente $r^2 = 0.88$.

También fueron calculadas correlaciones a través del test paramétrico de Pearson (r) en donde se analizaron las variables MMSE vs Cu, Cu/CRP y NCBC. MMSE correlacionó de forma lineal y muy significativa con Cu ($r = -0.833$), Cu/CRP ($r = -0.874$) y NCBC ($r = -0.756$). Cuando las concentraciones de CRP se correlacionaron con MMSE se encontraron vínculos significativos para los pacientes dementes vasculares y Parkinsonianos pero no para los que padecían mal de Alzheimer.

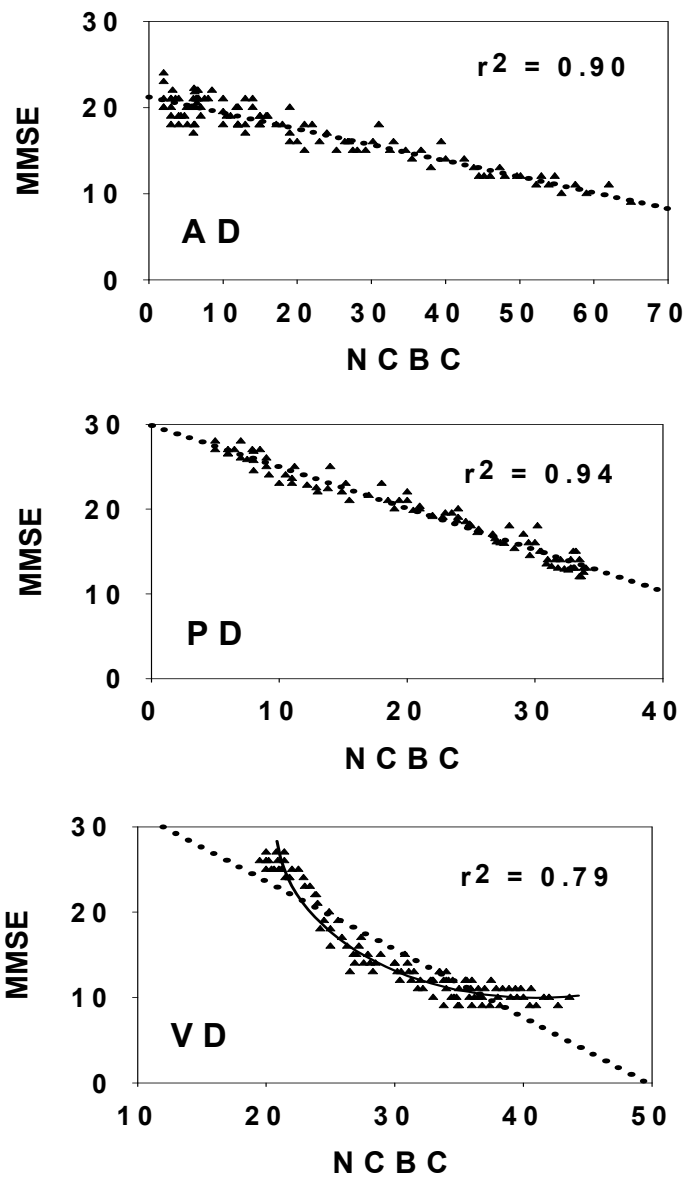


Figura 53: Regresiones lineales entre porcentaje de cambio entre cobre libre (NCBC) y los resultados del test MMSE. Para cada determinación se indican los coeficientes (r^2). Los números de casos aparecen en la **tabla XIV**. Los datos de DV fueron sometidos a regresiones no-lineales (polinomio inverso de tercer orden).

Las curvas resultantes fueron indicadas mediante líneas sólidas, mientras que las regresiones lineales aparecen como líneas punteadas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

13.1 EXPERIMENTOS EN SISTEMAS NO HUMANOS

13.1.1 Cultivos celulares HepG2 y A-549

Nuestros resultados demuestran que la exposición de las células pulmonares (A-549) y hepáticas (HepG2) a sulfato de cobre produce un aumento de la concentración intracelular de estos iones hasta ciertos niveles después de los cuales la incorporación de Cu^{++} comienza a disminuir. Este hecho probablemente se deba a que estos iones poseen un sistema homeostático específico que regula su metabolismo en las células eucariotas (Southon *et al.*, 2004; Balamurugan y Schaffner, 2006). En todas ellas existe una familia de proteínas denominadas Ctr (*copper transporter*) encargadas de incorporar cobre, bajo la forma de iones cuprosos desde el medio extracelular (Zhou y Gitschier, 1997; Lee *et al.*, 2002). Los iones cuprosos captados serían luego re-oxidados a cúpricos en el citoplasma celular. La cantidad de estas proteínas presentes en la superficie de las células depende de las concentraciones de Cu^{++} en el entorno. Cuando las concentraciones de este metal en el exterior celular son bajas aumentan los niveles de Ctr1 en la periferia celular, incrementando de este modo el influjo de cobre que es activamente captado (Bertinato y L'Abbé, 2004). Sin embargo, cuando las concentraciones de Cu son muy elevadas se produce el fenómeno opuesto mediado por la internalización de estos receptores a través de vesículas rodeadas por clatrina (Petris *et al.*, 2003) lo cual restringe su incorporación.

Claramente las células eucariotas han adoptado un sistema que regula las concentraciones de Cu, ya que este metal forma parte de una gran cantidad de enzimas y en general cuproproteínas muy importantes para una normal fisiología. A pesar de esto, el cobre en forma libre resulta muy perjudicial. Tal como se ha mencionado en la parte introductoria, el Cu es un metal de transición con gran actividad redox, que puede participar en reacciones de tipo Fenton o Haber-Weiss produciendo radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1999) los cuales a su vez pueden oxidar activamente biomoléculas cruciales en la fisiología celular. Pourahmad y O'Brien (2000) demostraron que existe un rápido aumento de la formación de ROS luego de la exposición a una concentración 50 μM de iones Cu^{++} , produciéndose elevados niveles de TBARS como marcadores del daño a lípidos. En concordancia con estos resultados nosotros observamos que la exposición de las dos líneas celulares estudiadas (HepG2 y A-549) a concentraciones crecientes de Cu^{++} aumenta significativa- o muy significativamente- la formación de los marcadores de daño oxidativo TBARS, CPs y $[\text{NO}_x]$.

Como ya se ha mencionado, los TBARS son productos de peroxidación lipídica y sus principales componentes son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) utilizados ampliamente como biomarcadores de daño lipídico (Davydov *et al.*, 2004). Letelier *et al.* (2005) propusieron que ciertos lípidos son más vulnerables al ataque inducido por ROS, inclusive a bajas concentraciones de cobre. Nuestros resultados demuestran que tanto en A-549 como en HepG2 hubo una producción de TBARS ampliamente superior respecto de la de otros biomarcadores de daño estudiados luego de la exposición aún a bajas concentraciones de estos iones. Los productos de peroxidación se generarían a expensas de la destrucción principalmente de PUFAs acilados a lípidos celulares complejos tal como quedó demostrado por los análisis de EMAGs. En este sentido nuestros resultados concuerdan con los publicados por el grupo de Letelier (2005). En suma, hemos observado tanto en HepG2 como A-549 un aumento de los ácidos grasos saturados en detrimento de los insaturados como una consecuencia esperable del establecimiento de un ambiente pro-oxidativo debido a la inducción de ROS cobre-dependiente.

Por otro lado, es sabido que los TBARS pueden oxidar a las proteínas contribuyendo con la formación de carbonilos proteicos (CPs) (Davydov *et al.*, 2004; Suji y Sivakami, 2008). Es más, Suji y Sivakami (2008) han demostrado que existe una correlación positiva entre la concentración de MDA y la formación de CPs. Esto sugiere que los aumentos de CPs observados podrían derivar por un lado de los ROS formados por la sobrecarga de iones Cu^{++} *per se*, y por otro, por las altas concentraciones de TBARS.

Otro biomarcador analizado fue la concentración de nitratos y nitritos ($[\text{NOx}]$), quienes de igual modo que los TBARS y CPs, sufrieron aumentos muy marcados luego de la exposición a Cu^{++} . Los aumentos observados podrían ser consecuencia de un incremento de la actividad de iNOS cuya expresión está regulada por ROS. Se sabe que los radicales libres desencadenan la activación de la iNOS mediante las vías JNK-AP1 y Jak2-IRF1 pues ambas señales son necesarias para la inducción de la expresión de la enzima (Wu *et al.*, 2008).

Si bien podemos ver que por un lado el aumento de iones Cu^{++} intracelular oxidó a las moléculas orgánicas que se encuentran en las células, por otro indujo un aumento de la actividad de la mayoría de las enzimas del SDA las cuales están destinadas a la neutralización del daño. Una excepción fue la glutatión reductasa (GR), cuya actividad disminuyó frente a la exposición a este metal de transición. La explicación para esto podría radicar en la particular estructura de su sitio activo muy rico en grupos tioles (-SH)

derivados de cisteínas, los cuales son sensibles a un ambiente pro-oxidativo y fácilmente destruibles cuando la condición de estrés oxidativo/nitratito es importante.

A pesar de que en ambas líneas celulares la actividad de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión transferasa (GT) y glutatión peroxidasa (GPx) aumentaron significativamente, pudimos notar que en HepG2 existió mayor respuesta de estas enzimas en comparación con la observada en las células A-549 de origen pulmonar. Estos resultados coinciden con los del grupo de Yang *et al* (2006). Ellos demostraron que las células HepG2 son menos sensibles a la exposición a cadmio (Cd) que las células del glioma C6 debido a que tienen mayor actividad de GPx y GR. No obstante, sería prudente no generalizar estos comportamientos defensivos ya que la actividad de las enzimas del SDA va a depender críticamente no sólo de la estirpe celular en estudio sino también del metal de transición al que se las expone (García-Fernández *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006).

Por otro lado, Andela *et al* (2005) demostraron aumentos de la expresión de CAT y SOD en células alveolares tipo II (estirpe WT; línea 1 de carcinoma alveolar) a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) en respuesta al aumento de ROS. De la misma manera, Tsan *et al* (1990) publicaron que se induce la actividad de SOD, CAT y GPx en condiciones de hiperoxia y que la activación de NF- κ B es la vía de respuesta más potente que se conoce al estímulo pro-oxidativo. Más aún, Shea *et al* (1996) observaron un aumento de la activación de NF- κ B luego de someter durante 24 hs a los linfocitos pulmonares de rata a condiciones hiperóxicas.

Se sabe que la oxidación de grupos sulfidrilos conduce a la disociación del factor de transcripción Nrf2 (*nuclear-erythroid related factor 2*) de la proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) ubicada en el citoplasma para su posterior traslocación al núcleo y unión a secuencias ARE (*antioxidante response element*). Esta señal incrementa así la expresión de genes involucrados en la fase II de detoxificación entre los que se encuentra por ejemplo el que codifica para la GT (Lu *et al.*, 2008).

En ambos tipos celulares se pudieron demostrar pérdidas de moléculas antioxidantes (especialmente α -tocoferol y otras involucradas en el ensayo FRAP) directamente comprometidas en la neutralización de los ROS/RNS formados por efecto de la sobrecarga con Cu^{++} . Además, en las células HepG2 se produjeron incrementos de glutatión total luego de la exposición a 100 μM de Cu^{++} lo cual constituyó una respuesta diferencial con las células A-549 en donde hubo una disminución del mismo. Si bien estas diferencias son claras entre ambas líneas celulares, no significa que no exista consumo de GSH en HepG2. Se debe aquí tener en cuenta que las células de origen hepático conservan

a pleno su capacidad para sintetizar y regenerar a este antioxidante, condición que les está fuertemente restringida a las A-549. Existe bibliografía que demuestra el activo consumo de GSH en células hepáticas ante un aumento de ROS de cualquier origen (Pourahmad y O'Brien, 2000). Sin embargo, si bien todas las células del cuerpo son capaces de sintetizar GSH (con la excepción de las neuronas que lo reciben de la glia adyacente), el mismo se sintetiza en mayor proporción en las células hepáticas ya que el hígado es el órgano detoxificador por excelencia del organismo y el exportador de GSH a la sangre con destino al resto de los tejidos (Pastore *et al.*, 2003). Por este motivo, y porque hemos observado una disminución en la actividad de GR, suponemos que los elevados niveles de glutatión total resultantes en HepG2 serían consecuencia del aumento (o inducción) de la biosíntesis de GSH. La inducción de la biosíntesis de glutatión se debe a la mayor expresión de la enzima clave de la ruta, la γ -glutamyl-cisteinyl-sintetasa, hecho que ha sido extensamente probado en otros sistemas experimentales sometidos a estrés pro-oxidativo. Concentraciones bajas de Cu^{++} (0.1-10 μM) no serían capaces de producir modificaciones en los niveles de GSH en las células HepG2, cuestión que concuerda con resultados previos de otro grupo (Hultberg *et al.*, 1998). A su vez, otros investigadores que utilizaron células no-hepáticas (tales como las HeLa derivadas de adenocarcinoma de cuello uterino) expuestas a concentraciones elevadas de iones Cu^{++} (100-500 μM) obtuvieron resultados similares al nuestro (disminución de la concentración de glutatión total) en los experimentos con A-549 (Hultberg *et al.*, 1997a). Esta disminución de glutatión total se debería entonces a un mayor consumo de GSH sin posibilidades efectivas de re-síntesis o, en el caso de los cultivos, de captación desde el medio (Hultberg *et al.*, 1997b,c).

También observamos que la vitamina E (α -tocoferol) disminuyó tanto en HepG2 como en A-549. Este vitámero es considerado una molécula esencial para los humanos pues carecemos de capacidad para biosintetizarlo. Usualmente se intercala entre los lípidos de las bicapas de las biomembranas protegiéndolos frente al ataque de ROS/RNS. De modo que la marcada disminución de vitamina E que encontramos concuerda con los elevados valores de TBARS obtenidos en ambas líneas celulares luego de la exposición a Cu^{++} y es otro fiel indicador del daño infringido a las estructuras del compartimento lipofílico celular.

En conjunto, el consumo de GSH y el de vitamina E se vieron reflejados en una disminución significativa de la capacidad antioxidante total de las células (FRAP). La reducción del FRAP es un parámetro importante a la hora de indicar que las células

expuestas a Cu^{++} pierden la capacidad de defenderse frente a los ataques pro-oxidativos a pesar de los esfuerzos realizados al aumentar la actividad de las enzimas del SDA.

El fallo generalizado del intento realizado por el SDA enzimático por neutralizar el daño es probablemente la causa que justifique la activación de la vía de muerte celular programada (apoptótica) que conduce a la pérdida progresiva (dosis-dependiente) de ambos tipos de células. Esta hipótesis se basa en los resultados obtenidos para las actividades de calpaínas (μ - y mili-) y caspasa-3, las cuales se encuentran incrementadas tanto en A-549 como en HepG2. Es ampliamente conocido que las calpaínas son activadas en respuesta a estímulos pro-apoptóticos y que el aumento de ROS es uno de ellos (Chandra *et al.*, 2000). También se sabe fehacientemente que en forma independiente de la ruta apoptótica activada (intrínseca o extrínseca), la caspasa-3 es la proteína efectora común a ambas vías, por lo que un aumento de su actividad indica sin ninguna duda que las células entrarán en apoptosis.

Por otro lado, las calpaínas también fueron relacionadas con muerte celular por necrosis. Se trata de un tema controversial pues existen muchos trabajos que demuestran que las calpaínas también se activan tanto en la vía apoptótica como en la necrótica (Mc Ginnis *et al.*, 1998; van Raam *et al.*, 2008; Guha *et al.*, 2010). En concordancia con estos antecedentes pudimos observar que luego de la exposición de HepG2 a concentraciones 20 μM de iones Cu^{++} se produjo un aumento significativo de la actividad de las μ - y m-calpaínas, el cual fue aún mayor a concentraciones elevadas de Cu^{++} (40- 160 μM). Sin embargo sólo se evidenciaron incrementos de la actividad de caspasa-3 a concentraciones 160 μM . Esto nos hace pensar que en las células hepáticas se activan en primer lugar las calpaínas, quienes luego serían “relevadas” por activación de la caspasa-3. Esta suposición se basa por un lado en el trabajo de Nawaz *et al* (2006) quienes demostraron que como consecuencia de la exposición de cultivos primarios de hepatocitos de ratas a Cu^{++} se produce un aumento de la concentración de iones Ca^{++} en el interior de la célula (Ca_i^{++}). A su vez el aumento de Ca_i^{++} induce la *auto-catálisis* de las m- y μ -calpaínas, proceso mediante el cual se activan ambas isoformas (Wang *et al.*, 2000; Manz *et al.*, 2004). Por otro lado, van Raam *et al* (2008) publicaron que la inactivación de las calpaínas en granulocitos impediría la activación de caspasa-3 por medio de la estabilización de XIAP (blanco de las calpaínas) y PKC- δ . Esta última enzima sería clivada por las calpaínas liberando la sub-unidad catalítica PKM, la cual fosforila a la fosfatidilserina de la membrana plasmática para su traslocación a la cara externa de la misma. Además PKC- δ sería responsable de estabilizar a Bad, el cual también juega un rol crucial en la apoptosis.

Choi *et al* (2006) obtuvieron resultados similares en la línea estable de células β pancreáticas de ratón (MIN6N8a), mientras que Ding *et al* (2002) demostraron que las calpaínas son las principales proteasas involucradas en la muerte celular programada inducida por microcistina-LR en cultivos primarios de hepatocitos.

A diferencia de las células hepáticas, en A-549 observamos aumentos significativos de la actividad de calpaínas y caspasa-3 a partir de una misma concentración de Cu^{++} ($80\mu\text{M}$). Por ese motivo no podemos suponer que las calpaínas activen (al menos en esta línea celular) a la caspasa-3. Probablemente, en las células pulmonares ocurra el procedimiento opuesto, es decir que sea la caspasa-3 activa la que a su vez active a las calpaínas. Esta suposición se basa en evidencia previa, como la de Wang *et al* (2000) quienes han demostrado que la caspasa-3 activa es capaz de degradar a la proteína calpastatina (también conocida como calpastina), la cual en condiciones normales está unida a la calpaína inhibiéndola. Por este mecanismo se facilitaría entonces el proceso de activación de estas proteasas.

Existe a su vez un nexo que vincula las rutas de muerte celular programada y la composición de acilos en lípidos complejos. En concordancia con nuestros resultados sobre composición de ácidos grasos en HepG2 y A-549, Singh *et al* (1996) demostraron que cuando las células neuronales (HN2-5) entran en la ruta de apoptosis aumentan los valores de ácidos grasos saturados 16:0 (palmítico) y 18:0 (esteárico) en detrimento de los insaturados o PUFAs.

Otro indicador de muerte por necrosis y/o apoptosis fueron los resultados obtenidos para la actividad de LDH en el medio de cultivo de HepG2 y A-549 luego del tratamiento con Cu^{++} . Claramente pudimos ver un aumento significativo de LDH en los medios de cultivo de células expuestas a los iones Cu^{++} . Si bien los incrementos de esta enzima fueron tradicionalmente considerados indicadores de muerte por necrosis, existen diversos trabajos que demuestran aumentos de la liberación de LDH en células en apoptosis (Chong *et al.*, 2000; Botha *et al.*, 2004). De modo que estos marcadores deberían ser considerados con precaución a la hora de adjudicarles un único (exclusivo) rol en el proceso de muerte celular. Alternativamente, cabe la interpretación de que la sobrecarga por cobre medie la muerte celular por ambos tipos de mecanismos (necrótico y apoptótico) en proporciones variables y dependientes de la intensidad de la noxa o del daño infringido.

Por otro lado, hemos visto que como parte de los mecanismos defensivos se produjeron aumentos en la concentración de las proteínas homeostáticas ceruloplasmina (CRP) y metalotioneínas (MTs), ambas directamente involucradas en la neutralización de

la sobrecarga por Cu^{++} . Claramente pudimos observar que las células hepáticas produjeron niveles basales de CRP superiores a los de A-549, atribuible casi con certeza a que el hígado es el órgano primordial en la biosíntesis de esta proteína. La CRP pertenece a la fracción α_2 -globulina del plasma humano y es considerada un reactante de fase aguda o sub-aguda. Los aumentos observados en ambas líneas celulares se pueden atribuir al estado de estrés oxidativo instalado en A-549 y HepG2 luego de la exposición a iones Cu^{++} , el cual desencadenaría la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias responsables de la activación de la transcripción del gen de la CRP (Fox *et al.*, 2000; Vassiliev *et al.*, 2005).

También hemos demostrado incrementos en la concentración de las MTs en respuesta al aumento de Cu^{++} en concordancia con los resultados obtenidos Blalock *et al* (1988). A su vez, otros investigadores demostraron que se producen aumentos de MTs en células hepáticas y pulmonares luego de la administración de agentes productores de ROS (Bauman *et al.*, 1992; Dalton *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 2009). Nuevamente observamos que en HepG2 existieron niveles basales de MTs superiores a los encontrados en A-549 por ser el hígado el principal órgano que sintetiza a esta super-familia de proteínas. Al igual que la CRP, la síntesis de MTs es inducida por citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6 e IF- γ (Inoue *et al.*, 2009) y por factores de transcripción de respuesta a metales (MRF-1) entre los cuales se encuentra el cobre (Tapiero *et al.*, 2003).

En relación con la exposición a distintos períodos de tiempo y a distintas concentraciones de Cu^{++} pudimos observar que se producen cambios muy significativos en las curvas de crecimiento de A-549 y HepG2, y sobre ese aspecto centramos nuestra atención. A concentraciones de Cu^{++} 40 μM aparentemente la fase de crecimiento afectada sería la exponencial a expensas de un alargamiento sustancial de la salida del *lag* post-siembr. A mayores concentraciones de iones Cu^{++} (80 μM) no se pudieron diferenciar las fases *lag* y exponencial de crecimiento celular en una suerte de *fusión* entre ambas. Además, para las dos concentraciones de Cu^{++} estudiadas (40 y 80 μM) el resultado final fue que ambas estirpes llegan a la fase estacionaria con un menor número de células respecto a los controles. Estos resultados serían consecuencia del aumento significativo del tiempo de duplicación y de una disminución concomitante de la viabilidad celular demostrada en ambas líneas celulares por las pruebas de exclusión de trypan blue y fuga de LDH y con una evidente respuesta a la dosis de la noxa externa. En este sentido otros autores tales como Costa *et al* (1982) han publicado que la exposición a Cu^{++} de otros tipos celulares como el derivado de ovario de hamster, produce un retardo en el progreso de la fase S (síntesis). A su vez, y en concordancia con nuestros resultados, Aston *et al* (2000)

demonstraron que las células HepG2 expuestas a 64 μM de Cu^{++} perdían la capacidad replicativa a la vez que disminuía la viabilidad celular y aumentaba la fuga de actividad LDH tal cual nosotros hemos observado.

Está ampliamente demostrado que niveles elevados de ROS se relacionan con la etiopatogenia de distintas enfermedades tales como asma, cirrosis, enfermedades neurodegenerativas y problemas cardiocirculatorios (entre otras), sobre todo como consecuencia del daño producido a importantes biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN (Banerjee *et al.*, 1999; Green-Ruiz y Páez-Osuna, 2001; Prakasam *et al.*, 2001; Ranjbar *et al.*, 2002; Gaetke y Chow, 2003; Ranjbar *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006; Jia y Misra, 2007; López *et al.*, 2007; Lukaszewicz-Hussain, 2008; Muniz *et al.*, 2008; Astiz *et al.*, 2009; Arnal *et al.*, 2010). Además, y tal como hemos descrito en la introducción, hay personas que poseen mayor contacto con los iones Cu^{++} presentando aumentos en la concentración plasmática de este metal. Tal es el caso de los fumigadores profesionales de agroquímicos a base de cobre y mujeres usuarias de TCu-DIU (ver discusión-parte 2). Muchas de estas personas no tienen la posibilidad de evitar la exposición para cuidar su salud o utilizar métodos anticonceptivos alternativos. Es más, en muchos de los hospitales públicos de nuestra ciudad se les implanta el TCu-DIU a las mujeres que buscan evitar la concepción como el primer método de elección. Por estos motivos, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos de exposición de células HepG2 y A-549 a distintas concentraciones de Cu^{++} o a diferentes tiempo de tratamiento, hemos decidido investigar la posibilidad de utilizar distintos antioxidantes de ocurrencia natural como agentes protectivos frente al daño provocado por el aumento de ROS en las células hepáticas y pulmonares.

Hemos demostrado que la suplementación de las células con polifenoles de origen natural provoca respuestas muy diferentes en función de cambios relativamente pequeños en la estructura de los compuestos bioactivos. Así, el resveratrol (RES) o el ácido cafeico (CA) no produjeron modificaciones de los niveles basales de los marcadores de estrés/daño pro-oxidativo (TBARS, CPs y $[\text{NOx}]$). Estos resultados son interesantes y de hecho no concuerdan completamente con los publicados por otros investigadores donde se informa que concentraciones crecientes de CA aumentarían la producción de TBARS en linfocitos aislados (Bath *et al.*, 2007), y otros en los que se propone que el RES generaría una movilización del Cu^{++} endógeno produciendo mayor daño a lípidos y aumentando los niveles de $[\text{NOx}]$ en linfocitos periféricos humanos (Azmi *et al.*, 2006). Suponemos que las diferencias observadas con nuestros resultados (ausencia de efectos) serían producto del

tipo celular empleado en las investigaciones y también a la falta de resultados en otras condiciones de incubación (diferentes tiempos y concentraciones finales en el medio de incubación). En este sentido, es sabido que al menos en el caso del RES los efectos producidos dependen críticamente del tipo celular y de las condiciones del experimento (Saiko *et al.*, 2008).

Sin embargo, encontramos que la curcumina (CUR) disminuyó los valores de TBARS por debajo de los del control tanto en A-549 como en HepG2, en concordancia con los resultados obtenidos por Naik *et al* (2004). A su vez, el agregado solitario de CUR también fue capaz de disminuir los valores de [NOx] en A-549 por debajo de los del control sin producir cambios significativos en HepG2. Algunos investigadores sostienen que la CUR reduce la activación de iNOS en cultivos primarios de macrófagos de rata, de modo que podemos especular que la disminución de [NOx] que encontramos en A-549 podría deberse a un mecanismo similar (Goel *et al.*, 2008).

Luego de la co-suplementación de ambas líneas celulares con Cu^{++} /RES y Cu^{++} /CA, observamos aumentos en la formación de TBARS, CPs y [NOx] inclusive hasta concentraciones superiores a las encontradas en los tratamientos con Cu^{++} solo. Wang *et al* (2008) han publicado que el CA en presencia de iones Cu^{++} conduciría al aumento de ROS, en especial del radical hidroxilo y de los iones superóxido. Al mismo tiempo propusieron que el CA sería un gran agente reductor de Cu^{++} lo cual podría agravar sus efectos pro-oxidantes. En relación al efecto del RES, si bien nosotros no observamos aumentos en la formación de los biomarcadores de daño oxidativo (resultados coincidentes con los de Azmi *et al.*, 2006), la co-suplementación con Cu^{++} no permitiría la metabolización del metal agregado induciendo aumentos zonales y subsecuente hiperproducción de TBARS, CPs y [NOx] (aun superiores a los obtenidos con la sola suplementación con Cu^{++}).

Por el contrario, la adición de CUR conjuntamente con Cu^{++} previno la formación de CPs y TBARS tanto en A-549 como en HepG2. Por otro lado, demostramos aumentos de [NOx] en HepG2 suplementadas con Cu^{++} /CUR, los cuales no llegaron a alcanzar los valores de los tratamientos con iones Cu^{++} y no fueron observados en A-549. Al respecto, es posible que en estos casos existan suficientes diferencias en los mecanismos de activación/desactivación de la iNOS como para que se justifiquen las respuestas particulares de cada estirpe celular. Es bien sabido que el óxido nítrico juega en el pulmón un papel mucho más central que en el hígado y su biosíntesis está regulada de manera muy diferente.

Daniel *et al* (2004) sugirieron que las propiedades antioxidantes de la CUR frente a los efectos tóxicos del Cd se deben a la unión entre ambos, disminuyendo así la concentración efectiva de metal libre. Debido a este antecedente consideramos que es probable que la CUR posea efectos similares en relación con otros metales como el Cu^{++} , ejerciendo los efectos protectores (al menos en parte) mediante su secuestro y la disminución zonal de su concentración efectiva.

Si bien no observamos cambios en la concentración de los biomarcadores de daño oxidativo analizados luego del tratamiento con los polifenoles en forma solitaria, pudimos constatar que en las células HepG2 aumentó la concentración de glutatión total. Además este aumento también ocurrió tras la co-suplementación Cu^{++} /polifenoles inclusive a niveles superiores a los observados por la adición solitaria de Cu^{++} . Estos resultados probablemente fueron consecuencia del insulto pro-oxidativo conjuntamente con la inducción de la biosíntesis de GSH en las células hepáticas, quienes como ya habíamos discutido anteriormente, son las principales responsables de la síntesis de este antioxidante y tienen un activo mecanismo de sobre-expresión de la enzima controladora de la ruta.

En concordancia con los resultados obtenidos en A-549 y en HepG2 en relación a la producción de TBARS, CPs y $[\text{NO}_x]$, pudimos constatar que no se produjeron modificaciones significativas en cuanto a la viabilidad celular en presencia de los polifenoles adicionados solos. Por el contrario, y como era de esperar, el porcentaje de células viables disminuyó frente al tratamiento con Cu^{++} , o con la asociación de Cu^{++} /RES y Cu^{++} /CA. Estos resultados concuerdan con datos publicados por Wang *et al* (2008) quienes demostraron que el CA en presencia de Cu^{++} es capaz de romper la doble hélice de ADN a la vez que produce incrementos importantes en la formación de ROS. Del mismo modo, Zheng *et al* (2006) publicaron que el RES puede actuar *cooperativamente* con el Cu^{++} para provocar daño estructural a la doble hélice del ADN.

Resultados publicados por otros investigadores señalan que el resveratrol inhibe la entrada a la fase S del ciclo celular impidiendo el inicio de la G_2/M (Notas *et al.*, 2006; Colin *et al.*, 2008). Por esta razón se hubiera podido esperar una menor cantidad de células (o tasa de mitosis) bajo los efectos de este polifenol, aunque no necesariamente una menor viabilidad de las ya divididas (coincidente con lo observado en nuestros experimentos).

Nuestros resultados respecto a la viabilidad celular son también coincidentes con los obtenidos para la actividad de LDH en el medio de cultivo de las células luego de los correspondientes tratamientos (solitarios y combinados). Pudimos observar que ante la administración de los polifenoles no se produjeron cambios en la fuga de LDH respecto a

los controles sin tratar, y que la co-suplementación de $\text{Cu}^{++}/\text{RES}$ y Cu^{++}/CA aumentó de manera significativa los valores de LDH en el medio de cultivo. De manera interesante, el tratamiento $\text{Cu}^{++}/\text{CUR}$ mostró efectos protectores en ambas líneas celulares. Este último resultado concuerda con datos publicados por Naik *et al* (2004) en donde se demuestra que los cultivos primarios de hepatocitos de ratas tratados simultáneamente con un agente productor de ROS y CUR liberan menos LDH al medio extracelular que los hepatocitos tratados sólo con el inductor de ROS. En sistemas de animal entero, recientes investigaciones realizadas en ratones demostraron que la curcumina restaura los niveles de glutatión y la actividad de enzimas del sistema defensa antioxidante aliviando la condición de estrés oxidativo que acompaña a la endotoxemia no letal inducida por lipopolisacárido (Sompamit *et al.*, 2009).

Por todo lo mencionado anteriormente concluimos que dentro de la suplementación con polifenoles la curcumina sería mucho más eficiente que RES y CA en la protección de los hepatocitos transformados HepG2 y células pulmonares A-549 frente a los efectos adversos de los iones Cu^{++} .

Restaba investigar la cuestión mecanística referente al rol de las especies iónicas del cobre (Cu^+ y Cu^{++}) en cuanto a su responsabilidad para generar daño pro-oxidativo. Analizando los resultados obtenidos con la suplementación con agentes quelantes de $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ (carnosina o CR como quelante del Cu^{++} y neocuproína o NCP como quelante del Cu^+), observamos que la CR resultó ser mucho más eficiente que la NCP en la protección de ambas líneas celulares frente a los daños generados por el agregado de iones cúpricos. Aparentemente la CR tendría efectos restauradores del daño a las biomoléculas y de la viabilidad celular que no se observan para el caso de la NCP.

Estudios previos sugieren que el responsable del daño a lípidos es el cobre en su forma Cu^{++} (Perugini *et al.*, 1997, 1998), y además sería también el responsable del daño a proteínas y ADN (Vöhringer *et al.*, 1998; Miersh y Mutus, 2005). El objetivo central en este tipo de experimentos fue entonces dilucidar cuál de los estados de oxidación del cobre, cúprico (Cu^{++}) o cuproso (Cu^+), sería el principal efector de los daños observados y, en consecuencia, cuál de los dos complejantes estudiados sería más efectivo en la protección de las células ante los daños ocasionados. Más aún, los daños observados podrían ser generados por Cu^{++} sobre ciertas moléculas y por Cu^+ sobre otras.

Evidencias experimentales previas indican que el daño generado por Cu^{++} sería producto de su conversión a Cu^+ durante el procesamiento metabólico (Hadi *et al.*, 2007; Hanif *et al.*, 2008). Sin embargo, nosotros creemos que las interpretaciones de nuestros

resultados exceden el simple concepto de formación de complejos entre Cu^{++} o Cu^+ con los correspondientes quelantes (CR y NCP, respectivamente). Esta observación se basa en el hecho de que CR no sólo actúa como complejante de Cu^{++} , sino que también se comporta como antioxidante siendo capaz de dismutar radicales superóxido, secuestrar radicales hidroxilos y neutralizar los productos de peroxidación lipídica (TBARS) (Hipkiss, 1997; Velez *et al.*, 2008). En concordancia, Hipkiss *et al* (2001) han demostrado que el agregado de CR a ovoalbúmina oxidada (carbonilada) acelera sustancialmente su reconversión hacia la estructura nativa (renaturalización).

Como hemos mencionado antes en el análisis de los resultados concernientes a la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, existe evidencia que demuestra que los productos finales de la peroxidación lipídica (MDA y 4-HNE) son capaces de oxidar proteínas con la subsecuente formación de CPs (Hipkiss *et al.*, 1997; Suji and Sivakami, 2007). En consecuencia, suponemos que los elevados niveles de CPs presentes en A-549 y HepG2 fueron producidos en parte por el aumento de ROS y en parte por los TBARS acumulados en ambas líneas celulares luego de la exposición a Cu^{++} . A su vez, hemos observado que solamente el tratamiento con CR disminuyó de manera significativa la producción basal de TBARS en comparación con el control sin tratar. De acuerdo con esto, Davydov *et al* (2004) demostraron que los productos proteicos producidos por la modificación covalente de grupos aldehídicos son más resistentes a la degradación proteolítica o proteosomal. Desde ese punto de vista, los CPs pueden ser considerados biomarcadores más estables y confiables que los TBARS. Sin embargo, y de manera curiosa, los TBARS están teniendo más auge como biomarcadores de probable empleo en la clínica que los CPs, a pesar de que ambas metodologías son accesibles y validables para un laboratorio de baja complejidad.

Resulta interesante discutir otro aspecto concerniente a estos resultados. En nuestros experimentos observamos que los CPs disminuyeron sus niveles basales luego de la suplementación con NCP. Si bien no resulta claro este comportamiento, y se necesitarían realizar más estudios para poder dilucidarlo, suponemos que se debería a que el Cu^+ probablemente desempeñe un rol activo (independiente de ROS) en la formación de CPs. Por ese motivo, la adición de CR, que no forma complejo con el Cu^+ , no presentaría los mismos efectos que NCP. Por el contrario, NCP sí forma complejos de alta afinidad con Cu^+ pudiendo disminuir así la formación de CPs hasta niveles que se hallan por debajo de los del control.

Otra observación interesante se basa en las elevadas concentraciones basales de [NOx] en A-549 y los incrementos observados por el tratamiento con Cu⁺⁺ que resultaron ser claramente superiores a los encontrados en HepG2. Suponemos que estos resultados fueron consecuencia de la inducción de la actividad de iNOS en respuesta al metabolismo pro-oxidativo que es característico de las células alveolares (Barchowsky y O'Hara, 2003; Rahman *et al.*, 2006) y como resultado del aumento de ROS inducido por Cu⁺⁺ (Miersh y Mutus, 2005). Otra explicación posible para los elevados valores basales de [NOx] en A-549 residiría en la antes demostrada descomposición de los S-nitrosotioles por efecto del cobre (Miersh y Mutus, 2005), o en última instancia, en la ausencia de una ruta alternativa para catabolizar NO y ONOO⁻ hecho que sí puede ocurrir en HepG2 como consecuencia de la entrada de los mismos al ciclo de la urea (Kelm, 1999).

Pudimos observar que la co-suplementación Cu⁺⁺/NCP sólo disminuyó los valores de CPs en comparación con los obtenidos para el tratamiento solitario con Cu⁺⁺. En relación a esto, otros investigadores han demostrado que esta droga (la NCP) potencia los efectos tóxicos del Cu⁺⁺ en presencia de fenoles policlorinados utilizados en la manufactura de herbicidas y fungicidas (Zhu y Chevion, 2000). A su vez, Chen *et al* (2008) publicaron que la neocuproína aumenta los efectos tóxicos del Cu⁺⁺ en astrocitos. Una posible explicación a estas observaciones sería que la NCP unida al Cu⁺ forma complejos que estabilizan al ión cuproso haciéndolo incapaz de *ciclar* entre los estados Cu⁺ y Cu⁺⁺. Sin embargo, este complejo es muy lipofílico por lo que puede atravesar fácilmente la membrana plasmática e ingresar a las células (Zhu y Chevion, 2000). Una vez dentro de la célula, el complejo Cu⁺/NCP se puede disociar y así el Cu⁺ establecería nuevas interacciones con ligandos celulares. Si bien la célula posee un sistema proteico involucrado en la homeostasis del Cu⁺, al no entrar el metal siguiendo la ruta "normal" no se puede regular su concentración de manera efectiva (Zhu y Chevion, 2000).

También es importante discutir los efectos ejercidos por la NCP y CR en cuanto a la supervivencia celular. La complejación Cu⁺/NCP no fue efectiva en la restauración de la pérdida de la integridad celular demostrada por los resultados obtenidos tanto en la actividad de LDH en el medio de cultivo como en el test de exclusión de *trypan blue*. Los roles protectivos demostrados para la carnosina podrían tener implicancia en la prevención de la pérdida de células bajo estrés oxidativo inducido no sólo por la presencia de concentraciones elevadas de Cu⁺⁺, sino también como consecuencia de cualquier otro agente con actividad pro-oxidante.

Concluimos que las evidencias mostradas hasta ahora son de particular importancia debido al posible uso de CUR (como polifenol con actividad protectora) y CR (como complejante y antioxidante) al menos *in vitro* como suplementos frente a la noxa pro-oxidativa debida a sobre-exposición por Cu^{++} , o en situaciones que se caractericen por un desbalance de la homeostasis de este metal de transición.

13.1.2 Experimentos en animales

Tal como se ha comentado en la parte metodológica, también hemos estudiado los efectos de la sobrecarga por Cu^{++} utilizando ratas Wistar como modelo de animal entero con el fin de experimentar su posible acción deletérea a nivel sistémico.

Como era de suponer, el hígado y el plasma fueron los sitios de mayor acumulación de cobre. Por otro lado, el intestino también fue capaz de albergar grandes concentraciones de cobre en concordancia con resultados previos obtenidos por Irato y Albergoni (2005). Los resultados obtenidos resultan en parte predecibles si consideramos que en un primer momento el Cu^{++} toma contacto con los enterocitos para ser absorbido y entra al organismo mediante los mecanismos fisiológicos naturalmente previstos. Como es sabido, el hígado es capaz de almacenar cierta cantidad de iones Cu^{++} , aunque la mayoría son liberados al plasma para ser transportados hacia los tejidos periféricos. Luego, y probablemente en respuesta al exceso de Cu^{++} , observamos un incremento rápido y substancial de los niveles de las principales proteínas que regulan su concentración en forma *libre*. El hígado tiene la capacidad de sintetizar activamente tanto MTs como CRP. Las CRP se sintetizan en la vía de excreción de los hepatocitos, explicando así los altos valores encontrados en el plasma (Waggoner *et al.*, 1999). Sin embargo, los tejidos extra-hepáticos (intestino y pulmones) tienen tendencia a inducir la expresión de las MTs sólo en presencia de considerable exceso de Cu^{++} (Balamurugan y Schaffner, 2006; González *et al.*, 2008). De modo que estas observaciones justificarían las elevadas concentraciones de MTs encontradas en el intestino en comparación con el hígado, coincidiendo asimismo con datos similares publicados por el grupo de Blalock *et al* (1988).

Con el agregado de iones Cu^{++} a la dieta de las ratas pudimos ver que se producen aumentos de los niveles plasmáticos proporcionales a las dosis administradas y a las vías de ingreso (menos regulada la i.p que la oral). A pesar de ello, en la suplementación de Cu^{++} por vía oral hemos notado un decaimiento del metal liberado a la sangre luego de varios días de tratamiento. Este resultado probablemente sea debido a la adaptación que

sufrirían las células del intestino y/o del parénquima hepático frente a los niveles de la sobrecarga.

Como hemos descrito en detalle en la introducción de este trabajo, todas las células tienen un sistema altamente eficiente de proteínas responsables del metabolismo específico del cobre (Andrews, 2002; Puig y Thiele, 2002; Balamurugan y Schaffner, 2006). Cuando están expuestas a concentraciones elevadas, las proteínas encargadas de incorporarlo a las células son endocitadas reduciendo así la entrada de este metal de transición (Lee *et al.*, 2002; Petris *et al.*, 2003). En concordancia con los resultados anteriores pudimos demostrar que ante la sobrecarga de Cu^{++} se producen grandes cantidades de CRP y MTs. Es importante tratar de dilucidar el origen de estas proteínas involucradas en la homeostasis del metal. Observando los resultados de la **tabla V** pudimos ver que luego de la suplementación oral (el ejemplo típico fue el del lote SCuO) el tejido con más cobre fue el intestino, mientras que la suplementación i.p. produjo una mayor concentración de metal en el hígado. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la **figura 37** claramente surge que los mayores aumentos de CRP se relacionan con un exceso de iones Cu^{++} a partir de la administración i.p. (menos regulada como ya dijimos), a la vez que los mayores valores de MTs concuerdan con la suplementación de Cu^{++} vía oral. De este modo podríamos especular que las CRP provendrían de su biosíntesis en el hígado, mientras que las MTs serían en su mayoría provenientes del intestino.

También pudimos ver que los aumentos de iones Cu^{++} produjeron incrementos significativos en los niveles de los biomarcadores de estrés/daño oxidativo TBARS, CPs y [NOx], y que estos cambios se hallan de acuerdo con las disminuciones observadas en el ensayo FRAP y con el nivel de α -tocoferol disponible. Es más, los cambios se encontraron acentuados en la administración de Cu^{++} por vía i.p. coincidiendo con la suposición de una falla homeostática por ausencia del filtro intestinal. En la vía i.p. los iones alcanzan al hígado y luego al sistema periférico vía plexo mesentérico/porta/suprahepáticas y también por liberación a los capilares sanguíneos y linfáticos desde los sinusoides y complejos canaliculares.

El pulmón sería el órgano más afectado por la sobrecarga de iones Cu^{++} a juzgar por la concentración de TBARS y CPs alcanzada en cualquiera de los tratamientos. Es probable que si bien los pulmones poseen un sistema enzimático capaz de responder a grandes concentraciones de ROS (por su ubicación anatómica y su particular fisiología), no serían capaces de amortiguar eficientemente sobrecargas de cobre ni inclusive las

generadas por vía intestinal con cantidades moderadas del metal. Esta observación queda claramente justificada si tenemos en cuenta los bajos niveles de CRP y MTs sintetizados frente a la noxa. A su vez, si analizamos en detalle los resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo en el intestino podemos observar claramente que a pesar de haberse acumulado concentraciones superiores de cobre a partir de su suplementación por vía oral en comparación con la vía i.p, es a través de esta segunda vía donde se vieron mayormente incrementados los TBARS, CPs y [NOx], y en donde se hallaron más disminuidos los valores de FRAP y de la concentración disponible de α -tocoferol. Esta observación probablemente sea justificada por el hecho que en la administración de iones Cu^{++} por vía i.p los cationes entran a las células por una vía distinta a la mediada por Ctr. De esta forma, las células no podrían *amortiguar* la entrada de los mismos tal como han sugerido Zhu y Chevion (2000). Sin embargo, cuando el Cu es administrado por vía oral, y en consecuencia sí es incorporado a las células a través de Ctr, el metal puede ser eficientemente captado por las correspondientes proteínas homeostáticas y así regularse su ingreso y distribución de manera más fisiológica. Más aún, en este caso estaría justificada la sobreproducción de MTs observada en el intestino.

Si analizamos las concentraciones de GSH y GSSG en los tejidos de ratas que hemos estudiado, podemos ver que en todos ellos la concentración de glutatión total no varió significativamente con excepción del hígado y del plasma en donde se produjeron incrementos. En el animal entero, y debido a que existe un sistema de intercambio efectivo de especies reducidas y oxidadas de glutatión entre todos los tejidos y siendo el hepático el mayor productor y exportador de GSH, se suele emplear el cociente GSH/GSSG como indicador de daño pro-oxidativo. Los resultados obtenidos para este antioxidante concuerdan con los observados en las líneas celulares. Como hemos explicado anteriormente, el hígado es el órgano principal en la biosíntesis de GSH no sólo para su propio consumo (que es muy significativo) sino también para el suministro a la periferia en condiciones específicas de demanda aumentada. Debido a eso, los incrementos observados en los niveles de glutatión total no significan que no se produzca consumo de GSH, sino más bien que existe un efectivo sistema de reducción de GSSG y/o de nueva síntesis y suministro de GSH.

Esto último quedó reflejado en los resultados que muestran crecientes niveles de GSSG en el hígado y aumentos de GSH. De modo que en los otros tejidos que no son activos sintetizadores de GSH o efectivos reductores de GSSG (al menos no tan efectivos como el hígado) encontramos incrementados los valores de GSSG, indicando un consumo

de GSH y/o una disminución de los niveles de GSH probablemente por falla sistémica en la efectiva reducción de GSSG.

El establecimiento de la condición de estrés oxidativo, claramente evidenciada en las ratas luego de la suplementación con Cu^{++} por cualquiera de las vías empleadas (en especial la i.p), está en relación con los aumentos encontrados en la actividad de las enzimas del SDA con la sola excepción de la GT donde no se produjeron variaciones. Nuestros resultados coinciden con otros publicados anteriormente en ratas (Ammouche *et al.*, 2002; Galhardi *et al.*, 2004) y demuestran el intento desarrollado por el sistema de defensa antioxidante por compensar (al menos en parte) los daños provocados por la sobrecarga del metal.

Resulta también de suma importancia el haber constatado daños histopatológicos en tejidos pulmonar y hepático consistentes con la pérdida de células por necrosis y/o apoptosis y subsecuente actividad reparadora. El diseño del experimento nos llama a reflexionar sobre las implicancias de estos resultados debido a que, si bien las extrapolaciones a humanos deben ser sumamente cautelosas, podríamos asumir que no sería posible confiar en la efectividad de las enzimas antioxidantes como un mecanismo seguro para evitar el daño pro-oxidativo causado por sobrecargas de cobre que no necesariamente se hallan alejadas de las observables en ciertos entornos o poblaciones humanas (Buchanan *et al.*, 1999; Turnlund *et al.*, 2004). Esto reviste aún mayor importancia cuando se tienen en cuenta los daños ocasionados con características de lesiones permanentes (o cicatrizales) en órganos como el hígado y los pulmones, o la intensa actividad regenerativa que pone en riesgo la diferenciación de estirpes celulares. Estos daños a estructuras tisulares altamente diferenciadas como las que se observan en pulmón e hígado son de indudable importancia en la etiopatogénesis de la cirrosis, de la enfermedad pulmonar difusa y de la fibrosis que se han descrito como íntimamente asociadas al estrés oxidativo provocado por sobrecarga de cobre (Hoffmann, 2009; Bargagli *et al.*, 2009; Kliment y Oury, 2010).

Finalmente mencionaremos los estudios realizados sobre la composición de ácidos grasos en lípidos complejos como un punto de especial interés.

Hemos investigado la composición de EMAGs en plasma, hígado e intestino y encontramos que el aumento de ROS inducido por cobre generó un patrón de daño (que podríamos catalogar de “sistémico”) muy similar al observado en células en cultivo; es decir, aumentos de los ácidos grasos saturados en detrimento de los insaturados (PUFAs), aumento de los cocientes 16:0/16:1 y 18:0/18:1, y disminución significativa del índice de

no saturación. En este sentido, nos atrevemos a especular que la sobrecarga de cobre sería responsable de un patrón de daño muy difundido sobre los acilos de lípidos complejos, y aparentemente independiente del tejido afectado. Por otra parte, y tal como se mencionó antes, este patrón particular de alteraciones está íntimamente asociado a muerte celular programada (Singh *et al.*, 1996) y a daño progresivo sobre varias rutas metabólicas fundamentales que, en su conjunto, podrían conducir a síndrome metabólico e incompetencia endotelial según recientes investigaciones sobre el tema (Da Young *et al.*, 2010).

13.2 Experimentos en sistemas humanos

13.2.1 Mujeres usuarias de dispositivos intrauterinos

En primera instancia nuestros resultados demostraron que el uso del TCu-DIU incrementó los niveles plasmáticos de iones cobre, hallazgo que se halla en concordancia con estudios previos de otros investigadores (Hefnawi *et al.*, 1974; Fahmy *et al.*, 1993; De la Cruz *et al.*, 2005; Pincemail *et al.*, 2007). Dentro de un período de uso continuo de 1.5 a 2 años, la concentración de este metal aumentó significativamente para luego permanecer aparentemente constante por hasta 5 años (máximo tiempo estudiado en nuestro experimento). Estos resultados indican claramente que la concentración de cobre aumenta por el uso del TCu-DIU, y que este incremento está también asociado con el tiempo de uso (desde semanas hasta 5 años). Sin embargo, como el diseño experimental no fue específicamente longitudinal, la asociación tiempo-dependiente entre el uso del dispositivo y el aumento del cobre en plasma debería ser considerado como un hecho fenomenológico y ratificable o rectificable mediante estudios de diseño *ad-hoc* en los cuales se siga la evolución de cada una de las usuarias en forma independiente y a lo largo de un período prolongado.

Aquí también parece lógico asumir que el aumento de la concentración de cobre podría provocar cambios en proteínas relacionadas con la homeostasis de este metal. Durante el primer período de uso (menor a 2 años) vimos que las MTs aumentaron rápidamente. Este hecho se relaciona con resultados de otros laboratorios que demostraron un aumento en la expresión de los genes para las MTs en respuesta a un incremento en el nivel de metales de transición (Blalock *et al.*, 1988; Coyle *et al.*, 2002; Selvaraj *et al.*, 2005; Egli *et al.*, 2006). Superados los dos años de uso del DIU, los niveles de CRP

también comenzaron a elevarse. Como la CRP además de ser una proteína transportadora de cobre es indicadora de procesos inflamatorios (Broadley y Hoover, 1989; Thomas *et al.*, 1995), su aumento puede atribuirse a uno de los mecanismos por medio de los cuales los DIUs ejercen su efecto anticonceptivo el cual es la inflamación del endometrio (Kjaer *et al.*, 1993; Pradhan *et al.*, 1997; Beltran-García *et al.*, 2000). La demora en la respuesta de las CRP puede explicarse como un mecanismo compensatorio que es rápidamente ejecutado una vez que las MTs disminuyen su concentración.

En relación con el efecto inflamatorio de los Cu-DIUs, observamos que el TCu380A produce un estado de estrés oxidativo como respuesta a la liberación de iones Cu^{++} . Es muy factible que aquí también el incremento en la concentración de cobre sea la causa de la elevación de los niveles de TBARS, [NOx], CPs y GSH observados en mujeres implantadas con el dispositivo. Pradhan *et al* (1997) no encontraron diferencias significativas en los niveles de óxido nítrico luego de 12 semanas de uso del Cu-DIU. De todos modos, los resultados de este trabajo previo, poco pueden ser comparados con los nuestros debido sobre todo a las diferencias en el tiempo de uso estudiado en ambos casos. Sin embargo, los mismos autores sugieren que el uso de Cu-DIU incrementa la formación de radicales superóxido, los cuales disminuyen marcadamente la vida media del óxido nítrico a costa de producir peroxinitrito que como es sabido se dismuta a [NOx]. A su vez, estudios de Amla *et al* (1993) indicaron que el aumento de ROS se produce en tan sólo una semana post-inserción, y en este sentido, es factible que nuestros resultados sean mucho más representativos de un estado avanzado (sub-crónico o crónico) del daño por sobrecarga involuntaria de Cu^{++} .

Los datos que hemos obtenido también demuestran una correlación positiva entre el tiempo de uso del dispositivo y la generación de TBARS y CPs. Dalle-Donne *et al* (2003a,b) publicaron en trabajos previos que los CPs son mejores biomarcadores de estrés oxidativo en comparación con los productos finales de la peroxidación lipídica. De hecho, los CPs son más estables que los TBARS y pueden ser producidos por oxidación de residuos de aminoácidos en proteínas o por reacciones secundarias entre MDA y otros productos generados durante las peroxidaciones lipídicas. Por este motivo, la correlación tiempo-dependiente para los CPs puede ser considerada como el verdadero biomarcador de estrés oxidativo en usuarias de TCu-DIUs. A pesar de ello, consideramos que es más confiable analizar una gran variedad de biomarcadores de estrés oxidativo en lugar de centralizar nuestra atención en sólo uno de ellos. Este punto de vista concuerda con el de otros autores que recomiendan la determinación simultánea de al menos un marcador para

daño lipídico, otro proteico y uno de estrés nitrativo para evaluar de manera fehaciente las condiciones pro-oxidantes en sistemas biológicos complejos (Abuja y Albertini, 2001; Emerit *et al.*, 2004; Facheris *et al.*, 2004).

Es interesante notar que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la capacidad antioxidante total del plasma (FRAP) entre ambos grupos de mujeres. Esta observación probablemente se deba a que el cobre estaría induciendo cambios en los niveles de los antioxidantes plasmáticos circulantes que estarían enmascarados por el elevado contenido de ácido úrico periférico. Previamente se ha demostrado que los uratos son responsables de más del 60 % de la actividad FRAP del plasma (Benzie y Strain, 1996) y en estas muestras no se efectuó (por razones inherentes al muestreo) el tratamiento previo de los plasmas con uricasa como en los experimentos anteriores. Además, el contenido de GSH fue mayor en las mujeres con Cu-DIU que en las mujeres controles, de modo que esto contribuyó en forma adicional a la capacidad reductora plasmática y compensó la probable pérdida de agentes antioxidantes producida por el aumento de cobre. Ya hemos comentado que incrementar la concentración de GSH es una estrategia frecuentemente observada en muchos tejidos como respuesta al daño oxidativo por agentes tóxicos de efecto pro-oxidante, de modo que ese fenómeno largamente observado en sistemas animales parecería también desarrollarse en humanos (Hultberg *et al.*, 1997).

Las actividades de las transaminasas hepáticas y de la LDH fueron mayores en las mujeres con Cu-DIU respecto a los controles. Suponemos que el aumento en la concentración de iones Cu^{++} podría producir un estado sub-clínico de hepatotoxicidad. Inclusive siendo un daño sub-clínico (sub-sintomático aunque no sub-signológico), este daño debe ser lo suficientemente importante como para verse reflejado en las actividades de estas enzimas, por lo que consideramos no debería ser subestimado. Mucho menos aún considerando la evidencia experimental directa que hemos reunido sobre el extenso daño histológico en pulmón y en hígado de ratas tratadas con sobrecarga por cobre.

Considerando los resultados obtenidos, parece ser relevante cuestionarse cuál sería la concentración de iones Cu^{++} que pueda ingresar al torrente circulatorio a partir de su liberación en el endometrio. Kjaer *et al* (1993) establecieron que la liberación de cobre a partir del alambre de los dispositivos intrauterinos disminuye de manera progresiva con el tiempo de implantación hasta ser de alrededor de un 20 % en un período de 8 años. Esto conlleva a una liberación significativa de este metal a la circulación sanguínea ($43\text{-}83 \mu\text{gCu}^{++}/\text{día}$), y esta cantidad podría ser aún mayor dependiendo del tipo de dispositivo de cobre usado. Motivo por el cual creemos que esta cuestión debería ser tomada en cuenta de

manera mucho más cautelosa y al menos controlar los signos asociados al uso del DIU o recomendar la interrupción del uso del dispositivo antes de los 5 años continuos. Otra investigación de Tokokuni y Sagripanti (1994) demuestra que los materiales a base de cobre (en especial amalgamas y dispositivos intrauterinos) implantados en el cuerpo humano se corroen con el tiempo liberando potenciales iones tóxicos que pueden dañar al ADN. Este daño conduce a la formación de guanidinas oxidadas (8-OHdG) y está asociado con mutagénesis y carcinogénesis (Tokokuni y Sagripanti, 1994).

En síntesis, nuestros resultados demostraron que el uso de Cu-DIUs eleva la concentración plasmática de cobre con modificaciones concomitantes en los niveles de CRP y MTs. Algunos de los biomarcadores de daño oxidativo se vieron modificados (en particular TBARS y CPs) y este cambio fue evidentemente dependiente del tiempo de uso del dispositivo aun sin haber hecho un seguimiento longitudinal de las usuarias. Observamos incrementos (sub-clínicos) de la actividad de las transaminasas y de la actividad de LDH que podrían correlacionarse con daño hepático sub-sintomatológico. Nuestros resultados sugieren que el uso de Cu-DIU induce daño pro-oxidativo y cambios en la homeostasis del cobre al menos durante una implantación mayor a 3 años consecutivos.

Otros autores demostraron hace tiempo que el aumento en la concentración de iones cobre se relaciona directamente con aumento del riesgo aterogénico (Karten *et al.*, 1997). Por esa causa parece prudente proponer un análisis meticuloso del estado redox sistémico y del nivel de cobre plasmático en mujeres que usen Cu-DIUs con el fin de establecer posibles efectos tóxicos sub-clínicos y pro-aterogénicos asociados al uso del dispositivo.

13.2.2 Fumigadores profesionales de agroquímicos formulados a base de Cu

Como ya se dijera, otra población estudiada con el fin de establecer el riesgo de exposición involuntaria al cobre fue la de los fumigadores profesionales empleados en la manipulación de agroquímicos formulados en base a este metal de transición. Estos compuestos (pesticidas y micomicidas de muy difundido empleo en todo el mundo) suelen estar también presentes en agua de bebida y como residuos en frutas y verduras para consumo humano.

De acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que las personas involuntariamente expuestas a agroquímicos a base de Cu presentan niveles plasmáticos de

Cu 50 % superiores a los del grupo control. Esta observación es coincidente con los incrementos observados en las proteínas involucradas en la homeostasis del metal, tal como también constatamos en las mujeres usuarias de Cu-DIUs. Los aumentos de MTs serían consecuencia de la inducción de la expresión de los genes que codifican para las mismas (Blalock *et al.*, 1988; Selvaraj *et al.*, 2005; Egli *et al.*, 2006). Los elevados niveles de CRP concuerdan con los resultados publicados por otros investigadores señalando que las concentraciones séricas de cobre correlacionan positivamente con el aumento de los niveles de CRP y con la incidencia y prevalencia de enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado que elevados niveles de CRP sérica constituyen un factor de riesgo para este tipo de enfermedades (Reunanen *et al.*, 1992; Mänttari *et al.*, 1994). Los aumentos de CRP se encuentran estrechamente vinculados con procesos inflamatorios diversos ya que esta proteína posee propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes pero al mismo tiempo es marcadora de estrés oxidativo y degeneración celular crónica (Broadley y Hoover, 1989). Por otro lado, Broadley y Hoover (1989) han demostrado que cuando las células endoteliales están expuestas a CRP se produce un incremento de la adhesión leucocitaria, lo que sería un factor de importancia en la génesis de la placa ateromatosa.

Los valores significativamente disminuidos de α -tocoferol y glutatión total en las muestras de plasma de los fumadores podrían ser explicados por el aumento de peroxidación lipídica, CPs y [NOx] presentes en las células como consecuencia del ataque por ROS. Esta hipótesis es coincidente con la de muchos investigadores que trabajan en sistemas experimentales similares (Flessel *et al.*, 1993; Bagchi *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 1999; Delescluse *et al.*, 2001; Prakasam *et al.*, 2001; Halliwell, 2002; Di Monte, 2003; Paolini *et al.*, 2004; Kanthasamy *et al.*, 2005; Testa *et al.*, 2005; Beard, 2006; Nielsen *et al.*, 2006; López *et al.*, 2007; Hatcher *et al.*, 2008; Migliore y Coppedè, 2009). Con el mismo argumento se podrían justificar los niveles reducidos de FRAP.

Por otro lado, y tal como ya hemos en parte mencionado, no existen dudas acerca del vínculo directo entre el estrés oxidativo producido por xenobióticos y el desarrollo de distintas enfermedades humanas (Gorman *et al.*, 1996; Jenner y Olanow, 1996; Gu *et al.*, 1998; Heales *et al.*, 1999; Honig y Rosenberg, 2000; Zhou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Pope *et al.*, 2008). Nuestros resultados demuestran que la exposición a pesticidas formulados a base de cobre produce daño hepático. Dentro de las enzimas que usualmente se analizan en los laboratorios clínicos convencionales como parámetro de daño hepático, la GGT (γ -glutamyl-transpeptidasa o γ -glutamyl-transferasa) es considerada por muchos autores como un indicador líder confiable de hepatotoxicidad. Esta enzima posee un rol

central en la síntesis de GSH y, según Lim *et al* (2004), correlaciona negativamente con la concentración o actividad biológica de muchos antioxidantes. Más aún, hemos observado que GGT resultó ser mucho más sensible que las otras enzimas estudiadas (AST, ALT y AP) presentando valores de hasta casi un 90 % superiores en comparación con el grupo control, en concordancia con los resultados obtenidos por Parron *et al* (1996).

Es interesante notar, que cuando los resultados encontrados en los fumigadores son comparados con los valores de referencia, todos se encuentran dentro del rango considerado “normal” para la población general (rango de valores de referencia indicado por el fabricante del equipo comercial). Sin embargo, si comparamos con los resultados del grupo control, todas las determinaciones de los fumigadores son significativamente superiores. Por ese motivo, consideramos que los análisis de rutina realizados a personas expuestas a agroquímicos, en especial aquellos que contienen Cu, deben ser analizados con suma cautela. Como hemos demostrado, estas determinaciones no son eficaces en la identificación de daño sub-clínico (asintomático) producido por la exposición a este tipo de agrotóxicos. De modo que sugerimos la determinación de la cupremia y de las proteínas involucradas en la homeostasis del Cu (CRP y MTs) como parámetros más confiables específicamente en aquellas poblaciones expuestas involuntariamente a sobrecarga por cobre tales como asentamientos urbanos cercanos a minas, fábricas que elaboran minerales de cobre, artículos electrónicos, pinturas y esmaltes, zonas rurales dedicadas al cultivo intensivo con agroquímicos, o en profesionales del agro que realicen tareas como fumigadores profesionales. Cabe remarcar aquí que los efectos negativos producidos por el aumento de la concentración de cobre en la sangre de las personas resulta ser independiente del origen de esos incrementos.

La cupremia tiene también un rol trascendental en la incidencia de enfermedades cardiovasculares tal como lo vienen demostrando numerosos estudios de corte epidemiológico. Como hemos descrito detalladamente en la introducción, los iones Cu^{++} se pueden unir a un número finito de sitios en las lipoproteínas de alta densidad y de baja densidad (HDL y LDL) que corresponden a residuos histidina de algunas de sus apolipoproteínas (como la B-100) (Perugini *et al.*, 1998; Gaetke y Chow, 2003). Además los aumentos de ROS producidos por la presencia de iones Cu^{++} , y evidenciados a través de los niveles significativamente superiores de los parámetros de estrés oxidativo analizados (TBARS, CPs y $[\text{NO}_x]$), pueden en conjunto desencadenar estímulos pro-inflamatorios produciendo cambios en el fenotipo de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Estos cambios permiten el paso de partículas de LDL y leucocitos a través de

la barrera endotelial atrapándolos en el denominado *espacio sub-endotelial*. Estos depósitos sub-endoteliales estimulan la entrada de macrófagos, linfocitos y la liberación y activación de enzimas como la mieloperoxidasa conjuntamente con la sobre-expresión de la iNOS induciendo así la formación de ulteriores cantidades de ROS/RNS que alcanzan concentraciones zonales verdaderamente elevadas. De este modo se forman LDL oxidadas (LDLox) las cuales pierden su capacidad de unirse a los receptores *naturales* de LDL en la superficie celular (Silverstein, 2009). A su vez, las LDLox adquieren afinidad por una familia de receptores alternativos presentes sobre todo en los macrófagos, llamados *receptores scavenger* que reconocen e internalizan a estas lipoproteínas peroxidadas. De este modo, los macrófagos alteran su metabolismo acumulando grandes cantidades de moléculas de colesterol y de otros lípidos, siendo propensos a transformarse en las denominadas *células espumosas* con un rol crucial en la génesis de las placas aterogénicas. A este escenario se le agrega la formación de productos de oxidación del propio colesterol que funcionan como agentes hiperplásicos y alteran el equilibrio de citoquinas/linfocinas favoreciendo la inflamación y los procesos locales infiltrativos. La acumulación de ROS genera concomitantemente un desbalance de la homeostasis del calcio que por un lado provoca necrosis de ciertos tipos celulares y por otro lado calcifica la placa aterogénica que se torna mucho más obstructiva y pierde maleabilidad. Numerosos factores proteicos concurren al sitio empeorando la respuesta inflamatoria y la evolución de la lesión, que incluye también a las plaquetas.

Por otro lado, los aumentos de CRP observados como consecuencia de los incrementos de iones Cu^{++} pueden llegar a tener actividad pro-oxidante (cuando originariamente cumplirían el rol opuesto) y, según Fox *et al* (2000) podrían oxidar específicamente a las LDL. La peroxidación de LDL *in vitro* por cantidades traza de cobre es un hecho largamente demostrado, pero a esto se agregan evidencias de otros investigadores que han probado que las LDLox son capaces de inducir la activación de NF- κ B y conducir a la apoptosis de las células endoteliales (sobre todo en experimentos realizados con arterias coronarias) y a su reemplazo por tejido cicatrizal de tipo fibroblástico (Saldeen y Saldeen, 2005). Por lo tanto, hacemos hincapié en la importancia de la búsqueda de alternativas de prevención a la exposición al cobre, en el monitoreo apropiado de las poblaciones sospechosas de exposición al metal, y en redoblar los esfuerzos para investigar estrategias que no sólo prevengan los efectos adversos generados por los iones del cobre sino que los atenúen una vez instalados.

13.2.3 Pacientes con enfermedades neurodegenerativas

Existe amplia y aceptada evidencia experimental que vincula al cobre con la etiopatogénesis de enfermedades neurodegenerativas humanas. A través del tiempo, se ha venido observando que durante el proceso de envejecimiento se produce un constante aumento de los eventos pro-oxidativos e inflamatorios en el cerebro de los humanos, demostrable por métodos directos de estudio en el *post-mórtem* inmediato. Este hecho está íntimamente asociado con lesiones histopatológicas características de las enfermedades neurodegenerativas (Mansoor *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Sasson y Brown, 2003; Brown y Kozlowski, 2004). La patofisiología de muchas enfermedades neurodegenerativas es muy compleja y muy probablemente multifactorial, involucrando mecanismos algunas veces independientes y otros solapados que conducen al daño neuronal. El cobre ha sido asociado cada vez más con gliosis o activación reaccional de la microglia y con procesos inflamatorios inducidos por estrés oxidativo, quienes están siempre presentes en mayor o menor medida en todas estas patologías (Lowell *et al.*, 1998; Praticó y Delanty, 2000; Becaria *et al.*, 2006).

Nosotros hemos determinado algunos biomarcadores de producción de ROS/RNS en grupos experimentales de pacientes con diversos tipos de patologías neurodegenerativas, seleccionando las de mayor prevalencia e incidencia. Además de los pacientes clasificados por estadio clínico, incluimos (por razones bioestadísticas) a dos grupos de control conformados por voluntarios de alto y de bajo promedio de edades (GGA y GCJ, respectivamente). Realizamos un monitoreo no invasivo de biomarcadores de estrés oxidativo/nitrativo de acuerdo con los lineamientos definidos por Mangialasche *et al* (2009) que se llevó a cabo en muestras de sangre periférica.

Los valores obtenidos para TBARS, CPs, [NOx] y FRAP son claros indicadores del establecimiento de la condición de estrés oxidativo en las tres patologías estudiadas: mal de Parkinson, Alzheimer y demencias de origen vascular. Además, los resultados demuestran que el grupo control de personas adultas experimentó un deterioro de su condición redox sistémica (estrés por fallo antioxidante) en comparación con el grupo control integrado por personas jóvenes, lo cual sugiere revisar las estrategias de prevención en relación a este aspecto de la salud a medida que los humanos envejecemos.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que demuestran el rol de ROS/RNS como factores directamente involucrados en la neurodegeneración y en la evaluación del daño o en la caracterización del estadio clínico de estas enfermedades

(Bains y Shaw, 1997; De Leo *et al.*, 1998; Serra *et al.*, 2000; Desport y Couratier, 2002; Rossi *et al.*, 2002; Emerit *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2004; Mangialasche *et al.*, 2009; Tórsdóttir *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009; Migliore y Coppedè, 2009). Estos hallazgos resultaron más novedosos en relación a los incrementos en la concentración de cobre y proteínas involucradas en la homeostasis, y cobran trascendencia por el demostrado papel que juegan ambos factores en la deposición de péptidos amiloides (Cerpa *et al.*, 2005).

El análisis de los resultados en ambos grupos controles (GCA y GCJ) muestra que no hay diferencias significativas en cuanto a la concentración de Cu, CRP y MTs. Los valores obtenidos resultaron muy similares a los reportados previamente por otros laboratorios en otros contextos poblaciones como Europa, Norteamérica y Asia (Mulder *et al.*, 1991; Berkovitch *et al.*, 2003; Prakasam *et al.*, 2001; Squitti *et al.*, 2005). Investigaciones recientes sugieren que el cobre en el SNC tiende a aumentar desde la niñez a expensas de los depósitos de este metal en el resto de los tejidos (Zatta *et al.*, 2008a,b). Nosotros no observamos una tendencia a la disminución al menos en las determinaciones del cobre plasmático (**tabla XV**).

Los aumentos de Cu plasmáticos como una *consecuencia* (Spitalny *et al.*, 1984; Buchanan *et al.*, 1999; Bárány *et al.*, 2002), más que una *causa* del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas es un tema de enorme debate internacional hoy en día. Nosotros adherimos a la teoría que propone a los desórdenes neurodegenerativos estudiados (AD, PD y VD) como *síndromes de origen multifactorial*. El cobre (y otros metales de transición) (Hatter y Barnea, 1988; Johnson *et al.*, 1992; Thomas y Oates, 2003), contaminantes ambientales, endo- y exo-toxinas y muchos xenobióticos de naturaleza diversa (pesticidas, aditivos alimenticios, etc.) se encuentran en conjunto con la carga genética de cada persona y también interactúan con ciertos condicionamientos sociales (educacionales, económicos, etc.), todos ellos involucrados en mayor o menor medida en la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas. Nuestro punto de vista concuerda con el de muchos otros investigadores (Blennow *et al.*, 2006; Mangialasche *et al.*, 2009; Migliore y Coppedè, 2009).

Rescatamos la evidencia acerca del valor clínico de la concentración de iones cobre en plasma periférico y de dos de las principales proteínas transportadoras del metal como herramientas que podrían ser útiles en la caracterización de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentemente diagnosticadas, y en el establecimiento del estadio clínico de las mismas o del riesgo de padecerlas. La ventaja de las determinaciones de cobre, CRP y MTs radica en que son métodos no invasivos y de alta factibilidad con

parámetros analíticos muy confiables (alta sensibilidad, especificidad y bajos coeficientes de variación intra- e inter-muestras) que podrían llegar a convertirse en biomarcadores útiles desde el punto de vista clínico. Justamente, nos referiremos a continuación al posible uso clínico (validación) de estos parámetros en cada una de las enfermedades analizadas por separado.

Enfermedad de Alzheimer

Se ha demostrado que existen grandes acumulaciones de cobre en las placas seniles y en los entramados neurofibrilares características de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Smith *et al.*, 1997; Lowell *et al.*, 1998; Sayre *et al.*, 2000). Como hemos detallado a lo largo de la tesis, y en concordancia con otros investigadores, es sabido que el cobre es extremadamente eficiente en la formación de radicales libres y por añadidura también lo es en la agregación de péptidos β -amiloides (A β) en asociación con las proteínas precursoras amiloides (APP) (Lowell *et al.*, 1998; Atwood *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Sparks y Schereurs, 2003; Becaria *et al.*, 2006). A su vez, el cobre se une a A β y APP para iniciar una cascada de eventos tendientes a remover el exceso de iones del cerebro (Prohaska y Gybina, 2004) demostrando así que la homeostasis del metal es un factor clave en la patogénesis del AD.

Existe amplia bibliografía demostrando el rol de la perturbación de la homeostasis del cobre en el desarrollo del AD (Cuajungco *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2002). La CRP aumenta en relación con los incrementos de Cu, aunque lamentablemente no es un indicador confiable que refleje el grado de avance de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que en estos pacientes los eventos pro-inflamatorios (o la gliosis reaccional) asociados con el progreso de la enfermedad se encuentran confinados al sistema nervioso central, y su intensidad no resulta ser suficiente para que sea evidente a nivel periférico. Muchos investigadores han demostrado que los procesos inflamatorios en los pacientes con AD ocurren principalmente a nivel de la glía (Bains y Shaw, 1997; Desport y Couratier, 2002; Emerit *et al.*, 2004). Si bien algunos biomarcadores de inflamación se encuentran en altas concentraciones en el plasma (Song *et al.*, 2009), la muerte neuronal por apoptosis es silente y muchas veces no es reflejada en la periferia (De Luigi *et al.*, 2001; Blennow *et al.*, 2006; Mangialasche *et al.*, 2009).

Squitti *et al.* (2005) también demostraron que hay aumentos de cobre en el suero de pacientes con AD en total concordancia con nuestros resultados. Además, también encontramos resultados coincidentes en relación con el aumento de los niveles plasmáticos

de cobre libre no asociados a CRP (NCBC) (Squitti *et al.*, 2005). Y lo que es mucho más interesante, nuestros resultados indican que la relación Cu/CRP aumenta progresivamente con la severidad de la enfermedad. Un comportamiento similar se encontró calculando el NCBC en cada estadio de la enfermedad. Estos resultados refuerzan la idea de utilizar Cu, Cu/CRP y NCBC como posibles marcadores periféricos de *progresión* de AD. El mismo comportamiento hallado para Cu/CRP fue encontrado estudiando la relación Cu/MTs, obteniendo conclusiones similares en cuanto a su uso como marcador de *evolución* de AD.

Resulta pertinente aquí discutir la importancia de la cupremia en la evolución del AD en términos cuantitativos. Algunos investigadores han propuesto que incrementos de Cu en el suero de 1 $\mu\text{mol/L}$ correlacionan con un 80 % de aumento de riesgo para contraer la enfermedad y correlacionan con una significativa disminución de las funciones neurofisiológicas centinelas (Squitti *et al.*, 2002, 2004; Babiloni *et al.*, 2007). En relación con las anteriores observaciones, nuestros resultados demuestran una correlación positiva entre el test cognitivo MMSE y NCBC en pacientes con AD lo que implica una fuerte correlación negativa entre el NCBC y el deterioro cognitivo. Las consideraciones del impacto del cobre en sangre adquieren mucha importancia desde que obtuvimos en nuestros pacientes aumentos de 0.63; 1.43 y 6.67 $\mu\text{mol/L}$ en los casos leves, intermedios y severos, respectivamente.

Por el contrario, no pudimos demostrar valores predictivos de predisposición a AD dentro del grupo de los parientes directos. Nuestra hipótesis es que el Cu influye en la *evolución* de AD antes que en su *desarrollo*, y este punto de vista concuerda con el de Smorgon *et al* (2004).

Está ampliamente aceptado que el contenido de cobre en sangre se halla muy influenciado por la concentración de Cu (y otros metales) en la dieta. Si embargo, el cobre que resultaría *clínicamente importante* es el libre o no ligado, y este se encuentra fuertemente condicionado por los niveles de CRP y MTs.

La tendencia a sobre-expresar MTs en las enfermedades neurodegenerativas en respuesta a los aumentos de metales para proteger a las neuronas de los efectos deletéreos de los mismos (Mocchegiani *et al.*, 2005; Zatta *et al.*, 2008) no resultó evidente a nivel periférico (quizás lo sea a nivel local en el SNC). No obstante, con el agravamiento de la enfermedad el cobre libre (sin unir a CRP o MTs) resultó ser cada vez más elevado, coincidiendo con los aumentos observados en las relaciones Cu/CRP y Cu/MTs y demostrando así su relevancia desde el punto de vista clínico.

Enfermedad de Parkinson

La homeostasis del cobre también se encuentra alterada en la enfermedad de Parkinson (PD). Sin embargo, en esta patología se producen acumulaciones o depleciones de este metal según sea la región del cerebro que se estudie (Rojas *et al.*, 2009).

Existe una gran controversia respecto al rol del cobre en la etiopatogenia de PD. Algunos autores han publicado que ciertos agentes quelantes del Cu ejercen efectos protectores (Armstrong *et al.*, 2001; Gaetke y Chow, 2003), mientras que otros llegan a conclusiones opuestas (Rojas *et al.*, 2009). Sato *et al.* (1994) han propuesto un rol central del cobre en la captación o liberación de dopamina como consecuencia de su ubicación en las terminales sinápticas. Más aún, Paris *et al.* (2001, 2009) han demostrado que la neurotoxicidad del metal depende de la incorporación de dopamina mediada por Cu y la reducción del aminocromo en la *sustancia nigra* de la rata, sugiriendo que probablemente el Cu produzca estrés oxidativo a través de la formación de complejos [Cu-dopamina]. Dentro de este contexto, todas las proteínas involucradas en la homeostasis del cobre parecen ser relevantes en la neurodegeneración del PD, a la vez que las MTs parecen cumplir también un rol protector (Ebadi *et al.*, 2005a,b).

Nuestros resultados demuestran elevados niveles de Cu y CRP en las muestras de plasma de pacientes con PD, mientras que las MTs no sufrieron cambios significativos. Se produjeron aumentos en la relación Cu/CRP en los estadios intermedios y severos, siendo aparentemente este parámetro más sensible que la relación Cu/MTs. Algunos investigadores han demostrado que la inducción de la transcripción de los genes de las MTs es una respuesta general al aumento de estrés oxidativo por metales (Hart *et al.*, 1996; Kondoh *et al.*, 2001) en especial debido al exceso de Cu (Mulder *et al.*, 1992; Aoyama *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2003; Prohaska y Gybina, 2004; Zatta *et al.*, 2008). Sin embargo, si existe una inducción genética (transcripcional) de las MTs en el cerebro de los pacientes con PD, esta no se vió reflejada a nivel periférico.

Los aumentos de CRP plasmáticos encontrados en los pacientes con PD probablemente sean consecuencia de los procesos inflamatorios asociados a la enfermedad (Orr *et al.*, 2002). A pesar de que la muerte por apoptosis es el evento predominante en relación con la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Ebadi *et al.*, 2005; Singh y Dikshit, 2007), los procesos inflamatorios como la activación de la microglia o gliosis reaccional también ocurren en alguna medida aún no determinada fehacientemente (Campbell *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2003). Este hecho justifica los cambios observados en los niveles circulantes de CRP, y podría ser considerado como un marcador no específico periférico de

neurodegeneración para esta patología. Sin embargo, la relación de MTs y CRP con la evolución de la enfermedad resulta controversial. Estudios previos de Jiménez-Jiménez *et al* (1992) postulan que la relación Cu/CRP no correlaciona ni con el inicio ni con la duración de la enfermedad. Además, los autores no encuentran cambios significativos en la concentración de Cu en líquido cefalorraquídeo en los pacientes con PD (Jiménez-Jiménez *et al.*, 1992). Sin embargo, nosotros creemos que los niveles de Cu y las alteraciones de la relación Cu/CRP deberían ser considerados como hallazgos fenomenológicos íntimamente asociados con la enfermedad mediante un mecanismo aún no bien comprendido.

El análisis de los biomarcadores antes mencionados en los enfermos de PD otra vez nos lleva a la pregunta central de si estas determinaciones se relacionan de manera *casual* con la enfermedad o si son *consecuencia* del progreso debido a algún factor etiológico aún no identificado. Lamentablemente este interrogante permanece como una incógnita a la que adhieren muchos otros grupos de investigadores en todo el mundo (Tórsdóttir *et al.*, 2006).

Como se observa en los parientes de los enfermos de PD, ninguno de los biomarcadores estudiados posee valor *predictivo* para la enfermedad. Si bien no hemos encontrado un marcador clínico para los parientes de PD, encontramos una correlación significativa entre NCBC y los estadios clínicos del PD, y entre NCBC y los resultados del test MMSE. Llamativamente la dependencia lineal respecto de los impedimentos cognitivos resultó ser aún más pronunciada que la encontrada para los pacientes con AD. Por ese motivo, consideramos que esta conclusión en particular podría ser utilizada en la evaluación de la evolución de esta enfermedad neurodegenerativa en particular.

Demencias vasculares

Existe amplia evidencia epidemiológica y experimental que demuestra una relación directa entre el cobre adquirido por la dieta y la incidencia de enfermedades aterogénicas (Ferns *et al.*, 1997; Adam *et al.*, 2001). A su vez, algunos estudios caso-control han sugerido un rol central en los aumentos de los niveles de CRP como marcador del componente inflamatorio en los pacientes con VD. Probablemente, la mayoría de los efectos deletéreos observados serían consecuencia del aumento de Cu como inductor de un estado pro-oxidativo generador del daño (Swain *et al.*, 1994).

Nuestros resultados demuestran un claro aumento de los niveles de Cu plasmático en los enfermos de VD. De hecho, estas concentraciones son las más elevadas de entre todas las que hemos medido para cualquiera de las tres enfermedades estudiadas. A su vez,

también observamos que la concentración de Cu se incrementa en forma paralela con el deterioro o estadio clínico de la enfermedad (21 %, 41 % y 65 % respecto de GCA en los estadios leve, intermedio y severo, respectivamente).

Aún más interesante resulta ser el descubrimiento de los elevados valores de Cu en las muestras de los parientes directos de pacientes con VD. Estos resultados sugieren que la determinación de cobre en sangre podría ser un método no invasivo que permita evaluar distintas poblaciones con riesgo aterogénico y anticiparse previniendo su ingreso al cuadro clínico. En concordancia con esto, Squitti *et al* (2003) han observado aumentos significativos de Cu plasmático en pacientes con VD. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con estos autores en cuanto a que ellos sugieren que la concentración de Cu plasmático es un biomarcador que puede diferenciar pacientes con VD de los que padecen AD. Nuestros datos no soportan ese análisis discriminativo. Probablemente estas discrepancias sean producto de la selección o de las características de las poblaciones analizadas, o inclusive, pueden deberse a causas de orden metodológico en las determinaciones de Cu y/o proteínas homeostáticas.

Tal como ya hemos comentado, las MTs están directamente involucradas en el complejo sistema homeostático del cobre (Kuppusamy y Schaffner, 2006), y pueden actuar como *buffer* del exceso de iones Cu^{++} y de otros metales de transición (Carrasco *et al.*, 2003; Levenson, 2005; Vassiliev *et al.*, 2005). Pensamos que la inducción de las MTs ocurre sólo en pacientes con VD porque en estos casos las concentraciones de Cu son muy superiores a las encontradas en AD y PD. (Dicho de otro modo, quizás las concentraciones de Cu en AD y PD no sean suficientemente elevadas como para promover la expresión de los genes de MTs). Podríamos arribar a conclusiones similares en relación a los parientes de los enfermos con VD. Por lo tanto, dentro de este grupo, no somos capaces de encontrar incrementos confiables de MTs que funcionen como marcadores de riesgo.

Las relaciones Cu/CRP y Cu/MTs se encontraron incrementadas en los pacientes con VD, sin mostrar una correlación clara con la evolución de la enfermedad. Este comportamiento es similar al encontrado en los enfermos con PD, pero claramente diferente al de AD. Un hallazgo muy interesante es el hecho de que sólo en los parientes de VD se observan incrementadas estas relaciones en comparación con el correspondiente grupo control (GCJ).

Otro descubrimiento distintivo en el grupo VD fue la ausencia de diferencias significativas de NCBC en los estadios intermedios y severos en comparación con el grupo control, y la dependencia no lineal entre NCBC y los resultados del test MMSE.

Aparentemente, en los estadios iniciales de la enfermedad existe una pequeña contribución del Cu libre (sin unir a proteínas) en la pérdida de los aspectos cognitivos que resulta ser más importante en los niveles más avanzados de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con datos previos que sugieren una influencia del Cu en la *evolución*, más que en la *iniciación* de los impedimentos cognitivos (Smorgon *et al.*, 2004).

Vinculando nuestros resultados con investigaciones previas de otros grupos (De Luigi *et al.*, 2001; Pashkow *et al.*, 2008), suponemos que en los pacientes con VD se produce una respuesta inflamatoria intensa con fuertes aumentos de los biomarcadores de fase aguda tales como la CRP. A su vez, hemos demostrado que el grupo VD fue el único que exhibió diferencias en los niveles de CRP en relación con la evolución de la enfermedad.

Una vez más, y habiendo visto que existe una asociación importante entre los niveles plasmáticos de cobre y las enfermedades neurodegenerativas, proponemos la idea de incentivar este tipo de estudios en grandes poblaciones y mediante diseños longitudinales con el fin de esclarecer el rol del cobre en el proceso etiopatogénico, llevar adelante estrategias de prevención, y desarrollar mecanismos para mitigar los efectos perjudiciales una vez establecido el cuadro clínico.

CONCLUSIÓN GENERAL

A través de los experimentos desarrollados en este trabajo de tesis creemos haber probado el rol central de la sobrecarga de cobre en el establecimiento de una condición de estrés oxidativo/nitratito con significativo impacto tanto local como sistémico.

Mediante un viaje de complejidad creciente a través de células en cultivo, animales de experimentación y muestras de origen humano, hemos comprobado que la sobrecarga de cobre genera daños a lípidos y a proteínas, disminuyendo el nivel de antioxidantes endógenos, incrementando la producción de radicales nitrogenados, modificando la expresión de enzimas, desatando señales de muerte celular y provocando daños evidenciables a nivel histológico.

Comprobamos asimismo que la importante respuesta defensiva que esta condición desencadena no resultaría suficiente para compensar los daños que parecen ser progresivos con la intensidad y la duración de la sobrecarga, y de características similares con independencia del tejido involucrado.

Los modelos experimentales indicarían que los daños se desarrollan bajo sobrecargas discretas que son factibles de observar en poblaciones humanas involuntariamente expuestas al metal. Demuestran también que la homeostasis del cobre es un factor directamente involucrado en patologías humanas neurodegenerativas puras o de base cardiovascular.

Al mismo tiempo, creemos que el estudio del efecto de antioxidantes de origen natural cuidadosamente seleccionados y asimismo el de complejantes específicos para los iones del cobre, abre un interesante panorama de investigación sobre su posible empleo como agentes paliativos o incluso terapéuticos, al tiempo que los biomarcadores de estrés y de daño que hemos investigado emergen como herramientas que aguardan ser validadas para una promisorio utilidad en la clínica.

Esperamos haber contribuído a incentivar el trabajo de investigación en esta área del conocimiento, que sin duda, depara interesantes avances en un futuro inmediato.

BIBLIOGRAFÍA

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abuja PM y Albertini R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*, 306:1-17.
- Adam B, Aslan S, Bedir A y Alvur M. 2001. The interaction between copper and coronary risk indicators. *Jpn Heart J*, 42: 281-286.
- Adler V, Yin Z, Tew KD y Ronai Z. 1999. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 18: 6104-6111.
- Aebi H. 1984. Oxygen radicals in biological systems. *Methods in enzymol*, 105: 121-126. *Nutr Res*, 22: 1265-1273.
- Ahn HS, Jeon TI, Lee JY, Hwang SG, Lim Y y Park DK. 2002. Antioxidant activity of persimon and grape seed extract: in vitro and in vivo.
- Allen RT, Hunter WJ III y Agrawal DK. 1997. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 37: 215-228.
- Amla S, Gupta I, Kausalva S y Ganguly NK. 1993. Active oxygen species in copper intrauterine device users. *Contraception*, 48: 150-156.
- Ammouche A, Rouaki F, Bitam A y Bellal MM. 2002. Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development. *Ann Nutr Metab*, 46: 268-275.
- Andela VB, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Puzas EJ, Rosenblatt JD y Rosier RN. 2005. A genome-wide expression profile and system-level integration of nuclear factor kappa B regulated genes reveals fundamental metabolic adaptations during cell growth and survival. *FEBS Lett*, 579: 6814-6820.
- Anderson ME y Meister A. 1984. Enzymic assay of GSSG plus GSH. *Methods Enzymol*, 105: 448-450
- Andersson K, Olofsson A, Nielsen EH, Svehag SE y Lundgren E. 2002. Only amyloidogenic intermediates of transthyretin induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 294: 309-314.
- Andrews NC. 2002. Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol*, 6: 181-186.
- Andueza S, Manzocco L, de Peña MP, Cid C y Nicoli C. 2009. Caffeic acid decomposition products: Antioxidant or pro – oxidants?. *Food Res Int*, 42: 51-55.
- Aoyama Y, Kato C y Sakakibara S. 2001. Expression of metallothionein in the liver and kidney of rats is influenced by excess dietary histidine. *Comp Biochem Physiol*, 128: 339-347.

- Armstrong JS, Leong W y Lees GJ. 2001. Comparative effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity induced by copper (Cu^{2+}), iron (Fe^{3+}) and zinc in the hippocampus. *Brain Res*, 8992: 51-62.
- Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz MJ y Marra CA. 2010. Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res*, 1319: 118-130.
- Arnal N, Tacconi de Alaniz MJ y Marra CA. 2010. Alterations in copper homeostasis and oxidative stress biomarkers in women using the intrauterine device Tcu380A. *Toxicol Lett*, 192: 373-378.
- Arredondo M y Núñez MT. 2005. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med*, 26: 313-327.
- Arteel GE y Sies H. 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Phar*, 10: 153-158.
- Asikainen TM y White CW. 2005. Antioxidant defenses in the preterm lung: role of hypoxia – inducible factors in BPD?. *Toxicol Appl Pharmacol*; 203: 177-188.
- Astiz M, de Alaniz MJ y Marra CA. 2009. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ Toxicol Phar*, 28: 465-473.
- Aston NS, Watt N, Morton IE, Tanner MS y Evans GS. 2000. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Hum Exp Toxicol*, 19: 367-376.
- Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP, Tanzi RE y Bush AI. 2000. Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta-42. *J. Neurochem*, 75: 1219-1233.
- Azmi AS, Bath SH, Hanif S y Hadi SM. 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett*, 580: 533-538.

B

- Babiloni C, Squitti R, Del Percio C, Caseta E, Ventriglia MC, Ferreri F, Tombini M, Frisoni G, Binetti G, gurzi M, Salinari S, Zappasodi F y Rossini PM. 2007. Free copper and resting temporal EEG rhythms correlate across healthy, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Clin Neurophys*, 118: 1244-1260.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA y Stohs SJ. 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104:129-140.

- Bagnati M, Bordone R, Perugini C, Cau C, Albano E y Bellomo G. 1998. Cu(I) availability paradoxically antagonizes antioxidant consumption and lipid peroxidation during the initiation phase of copper-induced LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 253: 235-240.
- Bains JS y Shaw CA. 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev*, 25: 335-358.
- Balamurugan K y Schaffner W. 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*, 1763: 737-746.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST y Chakraborty AK. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett*, 107: 33-47.
- Bárány E, Bergdahl IA, Bratteby LE, Lundh T, Samuelson G, Schütz A, Skerfving S y Oskarsson A. 2002. Relationships between trace element concentrations in human blood and serum. *Toxicol Lett*, 134: 177-184.
- Barceloux DG. 1999. Copper. *J Toxicol Clin Toxicol*, 37: 217-230.
- Barchowsky A y O'Hara KA. 2003. Metal-induced cell signalling and gene activation in lung diseases. *Free Rad Biol Med*, 34: 1130-1135.
- Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J y Rottoli P. 2009. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung disease: a review. *Resp. Med.* 103: 1245-1256.
- Bath SH, Azmi AS y Hadi SM. 2007. Prooxidant DNA breakage induce by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol Appl Pharmacol*, 218: 249-255.
- Bauman JW, Madhu C, McKim JM Jr, Liu Y y Klaassen CD. 1992. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 117: 233-241.
- Beard J. 2006. Australian Rural Health Research Collaboration. *Sci. Total Environ*, 355: 78-89.
- Becaria A, Lahiri DK, Bondy SC, Chen DM, Hamadeh A, Li H, Taylor R y Campbell A. 2006. Aluminium and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain. *J Neuroimm*, 176: 16-23.
- Beevi SS, Rasheed MH y Geetha A. 2007. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*, 375: 119-123.
- Beltran-Garcia MJ, Espinosa A, Herrera N, Perez-Zapata AJ, Beltran-Garcia C y Ogura T. 2000. Formation of copper oxychloride and reactive oxygen species as causes of uterine injury during copper oxidation of Cu-IUD. *Contraception*, 61: 99-103.
- Benov L. 2001. How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma*, 217: 33-36.
- Benzie I y Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.

- Berkovitch M, Heyman E, Afriat R, Matz-Khromchenko I, Avgil M, Greenberg R, Zimmerman DR, Berman S y Weissgarten J. 2003. Copper and zinc blood levels among children with nonorganic failure to thrive. *Clin Nutr*, 22: 183-186.
- Bertinato J y L'Abbé MR. 2004. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper – trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *J Nutr Biochem*, 15: 316-322.
- Beshgetoor D y Hambidge M. 1998. Clinical conditions altering copper metabolism in humans. *Am J Clin Nutr*, 67: 1017S-1021S.
- Bienengraber M, Fordekunz S, Klein D y Summer KH. 1995. Determination of Cu-containing metallothionein: comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem*, 228: 69-73.
- Blalock TL, Dunn MA y Cousins RJ. 1988. Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J Nutr*, 118: 222-228.
- Blennow K, de Leon MJ y Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet*, 368: 387-403.
- Boonstra J y Post JA. 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337:1-13.
- Botha N, Gehringer MM, Downing TG, van de Venter M y Shephard EG. 2004. The role of microcystin – LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicol*, 43: 85-92.
- Bove PF y van der Vliet A. 2006. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radic Biol Med*, 41: 515-527.
- Broadley C y Hoover RL. 1989. Ceruloplasmin Reduces the Adhesion and Scavenges Superoxide during the Interaction of Activated Polymorphonuclear Leukocytes with Endothelial Cells. *Am J Pathol*, 135: 647-655.
- Brown DR y Kozlowski H. 2004. Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases. *Dalton Trans*, 13: 1907-1917.
- Buchanan SD, Disker RA 3rd, Sinks T, Olson DR, Daniel J y Flodman T. 1999. Copper in drinking water, Nebraska, 1994. *Int J Occup Environ Health*, 5: 256-261.
- Buhl R, Meyer A y Vogelmeier C. 1996. Oxidant-protease interaction in the lung. *Chest*, 110: 267S-272S.
- Bumgardner JD, Lucas LC, Alverson MW Jr y Tilden AB. 1993. Effects of copper-based dental casting alloys on two lymphocyte cell lines and the secretion of interleukin 2 and IgG. *Dent Mater*, 9: 85-90.
- Burkitt MJ. 2001. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys*, 394: 117-135.
- Burrell R. 1993. Human immune toxicity. *Mol Aspects Med*, 14: 1-81.

- Burstein E, Ganesh L, Dick RD, van De Sluis B, Wilkinson JC, Klomp LWJ, Wijmenga C, Brewer GJ, Nabel GJ y Duckett CS. 2004. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J*, 23: 244-254.
- Bush A. 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 26: 207-214.
- Bush AI, Masters CL y Tanzi RE. 2003. Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 11193-11194.
- Butterfield DA, Reed T, Newman SF y Sultana R. 2007. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*, 43: 658-677.
- Buttriss JL y Diplock AT. 1984. High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods Enzymol*, 105: 131- 138.

C

- Cai YL, Ma LP, Hou LF, Zhou B, Yang L y Liu ZL. 2002. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chem Phys Lipids*, 120: 109-117.
- Calderón J, Ortiz-Pérez D, Yáñez L, y Díaz-Barriga F. 2003. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotoxicol Environ Saf*, 56: 93-103.
- Camakaris J, Petris MJ, Bailey L, Shen P, Lockhart P, Glover TW, Barcroft CL, Patton J y Mercer JFB. 1995. Gene amplification of the Menkes (MNK; ATP7A) P – type ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux. *Hum Mol Genet*, 4: 2117-2123.
- Campbell JD. 2001. Lifestyle, minerals and health. *Med Hypotheses*, 57: 521-531.
- Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, 113: 484-490.
- Carrasco J, Penkowa M, Giralt M, Camats J, Molinero A, Campbell IL, Palmiter RD y Hidalgo J. 2003. Role of metallothionein-III following central nervous system damage. *Neurobiol Dis*, 13: 22-36.
- Caruano-Yzermans AL, Bartnikas TB y Gitlin JD. 2006. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 281: 13581-13587.
- Cerón JJ y Martínez-Subiela S. 2004. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res*, 35: 671–679.
- Cerpa W, Varela – Nallar L, Reyes AE, Minniti AN e Inestrosa NC. 2005. Is there a role for copper in neurodegenerative disease?. *Mol Aspects Med*, 26: 405-420.
- Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Dataa P, Alnemri ES y Shi Y. 2001. Structural basis of caspase – 7 inhibition by XIAP. *Cell*, 104: 769-780.
- Chandra J, Samali A y Orrenius S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 29: 323-333.

- Chen SH, Lin JK, Liang YC, Pan MH, Liu SH y Lin-Shiau SY. 2008. Involvement of activating transcription factors JNK, NF-kappaB, and AP-1 in apoptosis induced by pyrrolidine dithiocarbamate/Cu complex. *Eur J Pharmacol*, 59: 9-17.
- Chen SH, Lin JK, Liu SH, Liang YC y Lin-Shiau SY. 2008. Apoptosis of cultured astrocytes induced by the copper and neocuproine complex through oxidative stress and JNK activation. *Toxicol Sci*, 102: 138-149.
- Choi SE, Min SH, Shin HC, Kim HE, Jung MW y Kang Y. 2006. Involvement of calcium-mediated apoptotic signals in H₂O₂-induced MIN6N8a cell death. *Eur J Pharmacol*, 547: 1-9.
- Chong MW, Gu KD, Lam PK, Yang M y Fong WF. 2000. Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. *Chemosphere*, 41: 143-147.
- Ciuffo GM, Santillán MB, Morales ME y Jáuregui EA. 2007. Nitric oxide: modeling of síntesis and inhibition. *Advances in chemistry and biology of nitric oxide*, 1-18.
- Clifford MN. 1999. Chlorogenic acid and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Scie Food Agric*, 79: 362-372.
- Cobbold C, Ponnambalam S, Francis MJ y Monaco AP. 2002. Novel membrane traffic steps regulate the exocytosis of the Menkes disease ATPase. *Hum Mol Genet*, 11: 2855-2866.
- Cobine PA, Pierrel F y Winge DR. 2006. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1763: 759-772.
- Cockell KA, Bertinato J y LÁbbé MR. 2008. Regulatory frameworks for copper considering chronic exposures of the population. *Am J Clin Nutr*, 88: 863S-866S.
- Cockell KA, Wotherspoon AT, Belonje B, Fritz ME, Madère R, Hidiroglou N, Plouffe LJ, Ratnayake WM y Kubow S. 2005. Limited effects of combined dietary copper deficiency/iron overload on oxidative stress parameters in rat liver and plasma. *J Nutr Biochem*, 16: 750-756.
- Colin D, Lancon A, Delmas D, Lizard G, Abrossinow J, Kahn E, Jannin B y Latruffe N. 2008. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie*, 90:1674-1684.
- Costa M, Cantoni O, de Mars M y Swartzendruber DE. 1982. Toxic metals produce an S-phase-specific cell cycle block. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 38: 405-419.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC y Rofe AM. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59: 627-647.
- Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, Cortes M, Lal V, Filiz G, Perez KA, Nurjono M, Caragounis A, Du T, Laughton K, Volitakis I, Bush AI, Li QX, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR y Barnham KJ. 2009. Increasing Cu bioavailability

inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 381-386.

- Crystal RG. 1991. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med*, 91: 39S-44S.
- Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS, Huang X, Farrag YW, Perry G y Bush AI. 2000. Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *J Biol Chem*, 275: 19439-19442.

D

- Da Young O, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WQ, Li P, Lu WJ, Watkins SM y Olefsky JM. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142: 687-698.
- Dalle – Donne I, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Rossi R y Milzani A. 2003a. Protein carbonylation in human diseases. *Trends mol med*, 9: 169-176.
- Dalle – Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A y Colombo R. 2003b. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 329: 23-38.
- Dalton T, Palmiter RD y Andrews GK. 1994. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res*, 22: 5016-5023.
- Daniel S, Limson JL, Dairam A, Watkins GM y Daya S. 2004. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *J Inorg Biochem*, 98: 266-275.
- Davis CD y Newman S. 2000. Inadequate dietary copper increases tumorigenesis in the Min mouse. *Cancer Lett*, 159: 57-62.
- Davydov VV, Dobaeva NM y Bozhkov AI. 2004. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Exp Gerontol*, 39: 11-16.
- De la Cruz D, Cruz A, Arteaga M, Castillo L y Tovalin H. 2005. Blood copper levels in Mexican users of the T380A IUD. *Contraception*, 72: 122-125.
- De Leo ME, Borrello S, Passantino M, Palazzotti B, Mordente A, Daniele A, Filippini V, Galeotti T y Masullo C. 1998. Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 250: 173-176.
- De Luigi A, Fragiaco C, Lucca U, Quadri P, Tettamanti M y Grazia de Simoni M. 2001. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Mech Aging Dev*, 122: 1985-1995.

- Delescluse C, Ledirac N, Li R, Piechocki MP, Hines RN, Gidrol X y Rahmani R. 2001. Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochem Pharmacol*, 61: 399-407.
- Desport JC y Couratier P. 2002. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nutr Clin Metabolism*, 16: 253-259.
- Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN y Reddy PP. 2000. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemia. *Clin Chim Acta*, 293: 53-62.
- Di Monte DA. 2003. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?. *Lancet Neurol*, 2: 531-538.
- Ding WX, Shen HM y Ong CN. 2002. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 291: 321-331.
- Du T, Ciccotosto GD, Cranston GA, Kocak G, Masters CL, Crouch PJ, Cappai R y White AR. 2007. Neurotoxicity from glutathione depletion is mediated by Cu-dependent p53 activation. *Free Radic Biol Med*, 44: 44-55.

E

- Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaey H, Singh BB, Garrett S, Shavali S y Sharma SK. 2005a. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Mol Brain res*, 134: 67-75.
- Ebadi M, Sharma SK, Ghafourifar P, Brown-Borg H y El Refaev H. 2005b. Peroxynitrite in the pathogenesis of Parkinson's disease and the neuroprotective role of metallothioneins. *Methods Enzymol*, 396: 276-298.
- Eddleston M y Bateman DN. 2007. Pesticides. *Medicine*, 35: 646-648.
- Egli D, Yepiskoposyan H, Selvaraj A, Balamurugan K, Rajaram R, Simons A, Multhaup G, Mettler S, Vardanyan A, Georgiev O y Schaffner W. 2006. A family knockout of all four *Drosophila* metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. *Mol Cell Biol*, 26: 2286-2296.
- Elsabbagh HS y El-Tawil OS. 2000. Immunotoxicity of cupravit and previcur fungicides in mice. *Pharmacol Res*, 43: 71-76.
- Emerit J, Edeas M y Bricaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58: 39-46.
- Eybl V, Kotyzova D y Koutensky J. 2006. Comparative study of natural antioxidants – curcumin, resveratrol and melatonin – in cadmium induced oxidative damage in mice. *Toxicology*, 225:150-156.

F

- Facchetti F, Vermi W, Fiorentini S, Chilosi M, Caruso A, Duse M, Notarangelo LD y Badolato R. 1998. Expression of inducible oxide nitric synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am J Pathol*, 154: 145-152.
- Facheris M, Beretta S y Ferrarese C. 2004. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy? *J Alzheimers Dis*, 6: 177–184.
- Fahmy K, Ghoneim M, Eisa I, El-Gazar A y Afifi A. 1993. Serum and endometrial copper, zinc, iron and cobalt with inert and copper-containing IUDs. *Contraception*, 47: 483-490.
- Fatur T, Musek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT y Filipie M. 2002. DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (hepG2) exposed to cadmium. *Food Chem. Toxicol*, 40: 1069-1076.
- Ferns GA, Lamb DJ y Taylor A. 1997. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis*, 133: 139-152.
- Ferrer I. 2009. Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's diseaseconvergence of multiple metabolic defects. *Prog Neurobiol*, 88: 89-103.
- Flessel P, Quintana PJ y Hooper K. 1993. Genetic toxicity of malathion: a review. *Environ Mol Mutagen*, 22:7-17.
- Fleury C, Petit A, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Tabrizian M y Huk OL. 2006. Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials*, 27: 3351-3360.
- Flohé L y Gunzler WA. 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods enzymol*, 105: 115-121.
- Flora SJ. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol*, 53: 1-2.
- Folch J, Lees M y Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226: 497-509.
- Fotakis G y Timbrell JA. 2006. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol. Lett*, 164: 97-103.
- Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E y Mukhopadhyay CK. 2000. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 28: 1735-1744.
- Fraga CG. 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med*, 26: 235-244.

G

- Gaetke LM y Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189: 147-163.
- Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko RC, Ribas BO y Novelli EL. 2004. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem Toxicol*, 42: 2053-2060.
- García-Fernández AJ, Bayoumi AE, Pérez-Pertejo Y, Motas M, Reguera RM, Ordóñez C, Balaña-Fouce R y Ordóñez D. 2002. Alterations of the glutathione-redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 132: 365-373.
- Ghayour-Mobarhan M, Taylor A, Kazemi-Bajestani SM, Lanham-New S, Lamb DJ, Vaidya N, Livingstone C, Wang T y Ferns GA. 2008. Serum zinc and copper status in dyslipidaemic patients with and without established coronary artery disease. *Clin Lab*, 54: 321-329.
- Gladine C, Morand C, Rock E, Gruffat D, Bauchart D y Durand D. 2007. The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed *n* – 3 PUFA rich diets. *Anim Feed Sci Tech*, 139: 257-272.
- Goel A, Kunnumakkara AB y Aggarwal BB. 2008. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*, 75: 787-809.
- Goldman D, Cho Y, Zhao ML, Casadewall A y Lee SC. 1996. Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. *Am J Pathol*, 148: 1275-1282.
- González M, Reyes-Jara A, Suazo M, Jo WJ y Vulpe C. 2008. Expression of copper-related genes in response to copper load. *Am. J. Clin. Nutr*, 88: 830S-834S.
- Gorell JM, Peterson EL, Rybicki BA y Johnson CC. 2004. Multiple risk factors for Parkinson’s disease. *J Neurol Sci*, 217: 169-174.
- Gorman AM, McGowan A, O’Neill C y Cotter T. 1996. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J Neurol Sci*, 139: 45-52.
- Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS y Hibbs JB Jr. 1996. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*, 268: 142-151.
- Green-Ruiz C y Páez-Osuna F. 2001. Heavy metal anomalies in lagoon sediments related to intensive agriculture in Altata-Ensenada del Pabellón coastal system (SE Gulf of California). *Environ Int*, 26: 265-273.
- Greger JL. 1999. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *J Nutr*, 129: 1434S-1435S.
- Gu M, Owen AD, Toffa SE, Cooper JM, Dexter DT, Jenner P, Marsden CD y Schapira AH. 1998. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci*, 158: 24-29.

- Guha P, Dey A, Dhyani MV, Sen R, Chatterjee M, Chattopadhyay S y Bandyopadhyay SK. 2010. Calpain and caspase orchestrated death signal to accomplish apoptosis induced by resveratrol and its novel analog hydroxystilbene-1 in cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 334: 381-394.
- Gunay N, Yildirim C, Karcioğlu O, Gunay NE, Yılmaz M, Usalan C, Kose A y Togun I. 2006. A series of patients in the emergency department diagnosed with copper poisoning: recognition equals treatment. *Tohoku J Exp Med*, 209: 243-248.
- Gupte A y Mumper RJ. 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 35: 32-46.

H

- Habig WH, Pabst MJ y Jakoby WB. 1974. Glutathione S – transferases, the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol Chem*, 249: 7130-7139.
- Hadi SM, Showket, H, Bhat AS, Azmi SH y Uzma Shamim MF. 2007. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Sem Cancer Biol*, 17: 370-376.
- Halliwell B y Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219:1-14.
- Halliwell B y Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*, Third Edition. Oxford Science Publications, 1999.
- Halliwell B. 2002. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biol Med*, 32: 968 - 974.
- Halliwell B. 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med*, 46: 531-542.
- Hanif S, Uzma S, Ullah MF, Azmi AS, Showket H y Hadi SM. 2008. The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. *Toxicology*, 49: 19-25.
- Hart BA, Gong Q y Eneman JD. 1996. Pulmonary metallothionein in rats following single and repeated exposure to cadmium aerosols. *Toxicology*, 112: 205-218.
- Hassett R y Kosman DJ. 1995. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 270: 128-134.
- Hatcher JM, Pennell KD y Miller GW. 2008. Parkinson's disease and pesticides: toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci*, 29: 322-329.
- Hatter DE y Barnea A. 1988. Brain tissue accumulates copper by two ligand-dependent saturable processes. A high affinity, low capacity and low affinity, high capacity process. *J Biol Chem*, 263: 799-805.

- Hayashi T, Shishido N, Nakayama K, Nunomura A, Smith MA, Perry G y Nakamura M. 2007. Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide. *Free Radic Biol Med*, 43: 1552-1559.
- Heales SJR, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM y Clark JB. 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*, 1410: 215-228.
- Hefnawi F, Kandil O, Askalani H, Zaki K, Nasr F y Mousa M. 1974. Copper levels in women using intrauterine devices or oral contraceptives. *Fertil Steril*, 25: 556-561.
- Hernández AF, Amparo Gómez M, Pérez V, García-Lario JV, Pena G, Gil F, López O, Rodrigo L, Pino G y Pla A. 2006. Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environ Res*, 102: 70-76.
- Hipkiss AR, Preston JE, Himswoth DT, Worthington VC y Abbot NJ. 1997. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett*, 238: 135-138.
- Hipkiss AR, Brownson C y Carrier MJ. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev*, 122: 1431-1445.
- Hipkiss AR. 2005. Glycation, ageing and carnosine: Are carnivorous diets beneficial?. *Mech Ageing Dev*, 126: 1034-1039.
- Hirabayashi T, Murayama T y Shimizu T. 2004. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull*, 8: 1168-1173.
- Ho H, Chan-Yeung M, Ho SP, Mak JC, Ip MS, Ooi MS et al. 2007. Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur Resp J*, 22: 273-278.
- Hoffman G. 2009. Copper-associated liver diseases. *Vet Clin North Am*, 39: 489-511.
- Hoehn MM, Yahr MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 17: 427-442.
- Honig LS y Rosenberg RN. 2000. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med*, 108: 317-330.
- Hooijmans CR y Kiliaan AJ. 2008. Fatty acids, lípido metabolismo and Alzheimer pathology. *Eur J Pharmacol*, 585: 176-196.
- Hostynek JJ y Maibach HI. 2003. Copper hypersensitivity: dermatologic aspects-an overview. *Rev Environ Health*, 18: 153-183.
- Huang Y y Wang KKW. 2001. The calpain family and human disease. *TRENDS in Mol Med*, 7: 355-362.
- Hubacher D, Chen PL y Park S. 2009. Side effects from the copper IUD: do they decrease over time?. *Contraception*, 79: 356-362.
- Hultberg B, Andersson A y Isaksson A. 1997a. The effects of homocysteine and copper ions on the concentration and redox status of thiols in cell line cultures. *Clin Chim Acta*, 262: 39-51.

- Hultberg B, Andersson A y Isaksson A. 1997b. Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures. *Toxicology*, 117: 89-97.
- Hultberg B, Andersson A y Isaksson A. 1997c. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology*, 123: 33-40.
- Hultberg B, Andersson A y Isaksson A. 1998. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology*, 126: 203-212.
- Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD y Gitlin JD. 1997. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 272: 21461- 21466.
- Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofseth LJ, Shields PG, Billiar TR, Trautwein C, Hohler T, Galle PR, Phillips DH, Markin R, Marrogi AJ y Harris CC. 2000. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 12770-12775.
- Huster D, Kühn HJ, Mössner J y Caca K. 2005. Wilson disease. *Internist*, 46: 731-732.

I

- Inoue K, Takano H, Shimada A y Satoh M. 2009. Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators Inflamm*: ID del artículo: 101659.
- Irato P y Albergoni V. 2005. Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rats with particular reference to the synthesis of induced-metallothionein. *Chem Biol Interact*, 155: 155-164.
- Irons RD, Stillman WS, Pyatt DW, Yang Y, Le A, Gustafson DL y Hua Zheng J. 2001. Comparative toxicity of dithiocarbamates and butadiene metabolites in human lymphoid and bone marrow cells. *Chem Biol Interact*, 135-136: 615-625.

J

- Jacobi H, Eicke B y Witte I. 1998. DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper (II). *Free radic Biol Med*, 24: 972-978.
- Jacobi H, Hinrichsen ML, Weiß D y Witte I. 1999. Induction of lipid peroxidation in human fibroblast by the antioxidant propyl gallate in combination with copper (II). *Toxicol Lett*, 110: 183-190.

- Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH y Galletti PM. 1981. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes-freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro*, 17: 1100-1110.
- Jenner P y Olanow CW. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 47 (suppl. 3): 161-170.
- Jia Z y Misra HP. 2007. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFkappaB and caspase-3. *Free Radic Biol Med*, 42:288-298.
- Jiménez-jiménez FJ, Fernández-calle P, Martínez-Vanaclocha M, Herrero E, Molina JA, Vázquez A y Codoceo R. 1992. FERUM levels of zinc and copper in pateints with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 112: 30-33.
- Johnson PE, Milne DB y Ikken GI. 1992. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am J Clin Nutr*, 56: 917-925.

K

- Kaler SG, Gallo LK, Proud VK, Percy AK, Mark Y, Segal NA, Goldstein DS, Holmes DS y Ghal WA. 1994. Occipital horn syndrome and a mild Menkes phenotype associated with splice site mutations at the MNK locus. *Nat Genet*, 8: 195-202.
- Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN y Hensley K. 2008. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis*, 15: 473-493.
- Kannan R, Mittur A, Bao Y, Tsuruo T y Kaplowitz N. 1999. GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium – dependent GSH transporter. *J Neurochem*, 73: 390-399.
- Kanthasamy AG, Kitazawa M, Kanthasamy A y Anantharam V. 2005. Dieldrin-induced neurotoxicity: Relevance in Parkinson's disease pathogenesis. *Neurotoxicology*, 26: 701-719.
- Karten B, Beisiegel U, Gercken G y Kontush A. 1997. Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. *Chem and Phys Lipids*, 88: 83–96.
- Kelimbaum DG y Kupper LL. 1997. In: *Applied regression analysis and other multivariable methods*. 3rd ed. Pacific Grove, CA, Duxbury Press, London, UK.
- Kelm M. 1999. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 273-289.
- Kim SG y Lee SJ. 2007. PI3K, RSK and Mtor signal Networks for the GST gene regulation. *Toxicol Sci*, 96: 206-213.
- Kinnula VL, Pääkkö P y Soini Y. 2004. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Letters*, 569: 1-6.

- Kjaer A, Laursen K, Thormann L, Borggaard O y Lebech PE. 1993. Copper release from copper intrauterine devices removed after up to 8 years of use. *Contraception*, 47: 349-358.
- Kliment CR y Oury TD. 2010. Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Rad Biol Med*. 49: 707-717.
- Kondoh M, Inoue S, Atagi S, Futakawa N, Higashimoto M y Sato M. 2001. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci*, 69: 2137-2146.
- Kong GK, Miles LA, Crespi GA, Morton CJ, Ng HL, Barnham KJ, McKinstry WJ, Cappai R y Parker MW. 2008. Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Eur Biophys J*, 37: 269-279.
- Kozłowski H, Janicka-Kłos A, Brasun J, Gaggelli E, Valesnsin D y Valensin G. 2009. Copper, iron, and zinc homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coord Chem Rev*, 253: 2665-2685.
- Kuppusamy B y Schaffer W. 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*, 1763: 737-746.

L

- Labieniec M y Gabryelak T. 2006. Study of interactions between phenolic compounds and H₂O₂ or Cu(II) ions in B14 Chinese hamster cells. *Cell Biol Int*, 30: 761-768.
- Lagos GE, Maggi LC, Peters D y Revecco F. 1999. Model for estimation of human exposure to copper in drinking water. *Sci. Total Environ*, 239: 49-70.
- Leary SC, Cobine PA, Kaufman BA, Guercin GH, Mattman A, Palaty J, Lockitch G, Winge DR, Rustin P, Horvath R y Shoubridge EA. 2007. The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis. *Cell Metab*, 5: 9-20.
- Lee J, Peña MMO, Nose Y y Thiele DJ. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem*, 277: 4380-4387.
- Leonard SS, Harris GK y Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 37: 1921-1942.
- Leone N, Courbon D, Ducimetiere P y Zureik M. 2006. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology*, 17: 308-314.
- Letelier ME, Lepe AM, Faúndez M, Salazar J, Marín R, Aracena P y Speisky H. 2005. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact*, 151: 71-82.
- Levenson CW. 2005. Trace metal regulation of neuronal apoptosis: from genes to behavior. *Physiol Behav*, 86: 399-406.

- Lim J-S, Yang J-H, Chun B-Y, Kam S, Jacobs DR y Lee D-H. 2004. Is serum γ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress?. *Free Radic Biol Med*, 37: 1018-1023.
- Linder MC. 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutat Res*, 475: 141-152.
- Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, Tanzi RE, Rogers JT y Huang X. 2006. Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol*, 155: 45-51.
- Liu H, Li XZ, Leng YJ y Wang C. 2007. Kinetic modeling of electro-Fenton reaction in aqueous solution. *Water Res*, 41: 1161-1167.
- López O, Hernández AF, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parrón T, Villanueva E y Pla A. 2007. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicol Lett*, 171: 146-153.
- Lowell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL y Parkesbery WR. 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci*, 158: 47-52.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Lu Y, Gong P y Cederbaum AI. 2008. Pyrazole induced oxidative liver injury independent of CYP2E1/2A5 induction due to Nrf2 deficiency. *Toxicology*, 252: 9-16.
- Lukaszewicz-Hussain A. 2008. Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food Chem Toxicol*, 46:82-86.
- Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY y Dmitriev OY. 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev*, 87: 1011-1046.

M

- Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R y Mecocci P. 2009. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev*, 8: 285-305.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ y Stamler JS. 1999. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284: 651-654.
- Mansoor MA, Bergmark C, Haswell SJ, Savage IF, Evans PH, Berge RK, Svardal AM y Kristensen O. 2000. Correlation between plasma total homocysteine and copper in patients with peripheral vascular disease. *Clin Chem*, 46: 385-391.
- Mänttari M, Manninen V, Huttunen JK, Palosuo T, Ehnholm C, Heinonen OP y Frick MH. 1994. Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors. *Eur Heart J*, 15:1599-1603.

- Manzl C, Enrich J, Ebner H, Dallinger R y Krumschnabel G. 2004. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology*, 196: 57-64.
- Markesbery WR. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 23: 134-47.
- Marra CA y de Alaniz MJ. 1989. Influence of testosterone administration on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in male and female rats. *Lipids*, 24: 1014-1019.
- Massie HR, Ofosu-Appiah W y Aiello VR. 1993. Elevated serum copper is associated with reduced immune response in aging mice. *Gerontology*, 39: 136-145.
- Mattie MD, McElwee MK y Freedman JH. 2008. Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *J Mol Biol*, 383: 1008-1018.
- Mazière C, Djavaheri-Mergny M, Frey-Fressart V, Delattre J y Mazière JC. 1997. Copper and cell-oxidized low-density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 409: 351-356.
- McGinnis KM, Whitton MM, Gnegy ME y Wang KK. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is cleaved by caspase-3 and calpain in SH-SY5Y human neuroblastoma cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem*, 273: 19993-20000.
- Mc Kahn G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D y Stadlan M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force of Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944.
- Medici V, Rossaro L y Sturniolo GC. 2007. Wilson disease a practical approach to diagnosis, treatment and follow-up. *Dig Liver Dis*, 39: 601-609.
- Mehta R, Templeton DM y O' Brien PJ. 2006. Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity II. Copper toxicity. *Chem Biol interact*, 163: 77-85.
- Mercer JF. 2001. The molecular basis of copper - transport diseases. *Trends Mol Med*, 7:64-69.
- Meyer A, Buhl R, Kampf S y Magnussen H. 1995. Intravenous *N*-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 1055-1060.
- Miersch S y Mutus B. 2005. Protein S – nitrosation: Biochemistry and characterization of protein thiol – NO interactions as cellular signals. *Clin Biochem*, 38: 777-791.
- Migliore L y Coppedè F. 2009. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res*, 674: 73-84.
- Miranda KM, Espey MG y Wink DA. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5: 62-71.

- Misra HP y Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247: 3170-3175.
- Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F y Malavolta M. 2005. Brain, aging, and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol*, 75: 367-390.
- Mondal MK, Das TK, Biswas P, Samanta CC y Bairagi B. 2007. Influence of dietary inorganic copper salt and level of soybean oil on plasma lipids, metabolites and mineral balance of broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech*, 139: 212-233.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CM, Pinho GL, Chaves IS, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J y Bianchini A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146: 221-234.
- Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, Smith MA y Perry G. 2008. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 44: 1493-1505.
- Morrison WR y Smith LM. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *J Lipid Res*, 5: 600-608.
- Mufti AR, Burstein E y Duckett CS. 2007. XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys*, 463: 168-174.
- Mufti AR, Burstein E, Csomos RA, Graf PCF, Wilkinson JC, Dick RD, Challa M, Son JK, Bratton SB, Su GL, Brewer GJ, Jakob U y Duckett CS. 2006. XIAP is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Mol cell*, 21: 775-785.
- Mulder TP, Janssens AR, Verspaget HW y Lamers CB. 1991. Plasma metallothionein concentration in patients with liver disorders: special emphasis on the relation with pulmonary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 14: 1008-1012.
- Mulder TPJ, Janssens AR, Verspage HW, Van Hattum J y Lamers CBHW. 1992. Metallothionein concentration in liver of patients with Wilson's disease, primary biliary cirrhosis, and liver metastasis of colorectal cancer. *J Hepatol*, 16: 346-350.
- Muller PAJ y Klomp LWJ. 2009. ATOX1: A novel copper – responsive transcription factor in mammals?. *Int J Biochem Cell B*, 41: 1233-1236.
- Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, Nazar-Stewart V y Kisby GE. 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*, 227: 97-107.

N

- Naik RS, Mujumdar AM y Ghaskadbi S. 2004. Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro. *J Ethnopharmacol*, 95: 31-37.

- Nawaz M, Manzl C, Lacher V y Krumschnabel G. 2006. Copper-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinase in trout hepatocytes: the role of reactive oxygen species, Ca²⁺, and cell energetics and the impact of extracellular signal-regulated kinase signaling on apoptosis and necrosis. *Toxicol Sci*, 92: 464-475.
- Nelson AL. 2007. Contraindications to IUD and IUS use. *Contraception*, 75: S76-S81.
- Nemery B. 1990. Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur Respir J*, 3: 202-219.
- Newhook R, Hirtle H, Byrne K y Meek ME. 2003. Releases from copper smelters and refineries and zinc plants in Canada: human health exposure and risk characterization. *Sci. Total Environ*, 301: 23-41.
- Nielsen BS, Larsen EH, Ladefoged O y Lam HR. 2006. Neurotoxic effect of Maneb in the rats as studied by neurochemical and immunohistochemical parameters. *Environ Toxicol Pharm*, 21: 268-275.
- Nishikawa M, Hashida M y Takakura Y. 2009. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 319-326.
- Notas G, Nifli AP, Kampa M, Vercauteren J, Kouroumalis E y Castanas E. 2006. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 1657-1666.

O

- Odin AP. 1997. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanism of antimutagenic action. *Mutat Res*, 386: 39-67.
- Orr CF, Rowe DB y Halliday GM. 2002. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 68: 325-340.
- Ostrakhovitch EA, Lordnejad MR, Schliess F, Sies H y Klotz LO. 2002. Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, 397: 232-239.

P

- Packer L, Tritschler HJ y Wessel K. 1997. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, 22: 359-378.
- Paez J y Sellers WR. 2003. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res*, 115: 145-167.
- Pandit A y Bhave S. 1996. Present interpretation of the role of copper in Indian childhood cirrhosis. *Am J Clin Nutr*, 63: 830S-835S.
- Paolini M, Sapone A y Gonzalez FJ. 2004. Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 124-129.

- Paris I, Dagnino-Subiabre A, Marcelain K, Bennett LB, Caviedes P, Caviedes R, Azar CO y Segura-Aguilar J. 2001. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J Neurochem*, 77: 519-529.
- Paris I, Pérez-Pastene C, Couve E, Caviedes P, Ledoux S y Segura-Aguilar J. 2009. Copper-dopamine complex induces mitochondrial autophagy preceding caspase-independent apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 284: 13306-13315.
- Parrón T, Hernández AF, Pla A y Villanueva E. 1996. Clinical and biochemical changes in greenhouse sprayers chronically exposed to pesticides. *Hum Exp Toxicol*, 15: 957-963.
- Pase L, Voskoboinik I, Greenough M y Camakaris J. 2004. Copper stimulates trafficking of a distinct pool of the Menkes copper ATPase (ATP7A) to the plasma membrane and diverts it into a rapid recycling pool. *Biochem J*, 378: 1031-1037.
- Pashkow FJ, Watumull DG y Campbell CL. 2008. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 101: 58D-68D.
- Pastore A, Federici G, Bertini E y Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333: 19-39.
- Perugini C, Seccia M, Albano E y Bellomo G. 1997. The dynamic reduction of Cu(II) to Cu(I) and not Cu(I) availability is a sufficient trigger for low density lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1347: 191-198.
- Perugini C, Seccia M, Bagnati M, Cau C, Albano E y Bellomo G. 1998. Different mechanisms are progressively recruited to promote Cu(II) reduction by isolated human low-density lipoprotein undergoing oxidation. *Free Radic Biol Med*, 25: 519-528.
- Petris MJ y Mercer JBF. 1999. The Menkes proteína (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C – terminal di – leucine endocytic signal. *Hum Mol Gen*, 11: 2107-2115.
- Petris MJ, Smith K, Lee J y Thiele DJ. 2003. Copper – stimulates endocytosis and degradation of the human copper transporter, $hCtr1$. *J Biol Chem*, 278: 9639-9646.
- Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, Collette G, Haleng J, Cheramy-Bien JP, Charlier C, Chapelle JP, Giet D, Albert A, Limet R y Defraigne JO. 2007. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Lie`ge, Belgium. *Hum Reprod*, 8: 2335-2343.
- Pocino M, Baute L y Malavé I. 1991. Influence of the oral administration of excess copper on the immune response. *Fundam Appl Toxicol*, 16: 249-256.
- Poli G y Parola M. 1997. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*, 22: 287-305.

- Pope S, Land JM y Heales SJR. 2008. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target?. *Biochim Biophys Acta*, 1777: 794-799.
- Pourahmad J y O'Brien PJ. 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology*, 143: 263-273.
- Pradhan M, Gupta I y Ganguli NK. 1997. Nitrites and L-citrulline levels in copper intrauterine device users. *Contraception*, 55: 315-318.
- Prakasam A, Sethupathy S y Lalitha S. 2001. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta*, 310: 107-112.
- Praticó D y Delanty N. 2000. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med*, 109: 577-585.
- Predki PF y Sarkar B. 1992. Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem*, 267: 5842-5846.
- Prohaska JR y Gynina AA. 2004. Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr*, 134: 1003-1006.
- Puig S y Thiele DJ. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*, 6: 171-180.

R

- Rahman I y McNee W. 1996. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*, 21: 669-681.
- Rahman I, Biswas SK y Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*, 533: 222-239.
- Ranjbar A, Pasalar P, Sedighi A y Abdollahi M. 2002. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. *Toxicol Lett*, 131: 191-194.
- Ranjbar A, Solhi H, Mashayekhi FJ, Susanabdi A, Rezaie A y Abdollahi M. 2005. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environ Toxicol Phar*, 20: 88-91
- Ray SK y Banik NL. 2003. Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration. *Current drug targets – CNS Neurol disord*, 2: 173-189.
- Rech Franke SI, Prá D, Giulian R, Ferraz Dias J, Yoneama ML, Da Silva J, Erdtmann B y Pêgas-Henriques JA. 2006. Influence of orange juice in the levels and in the genotoxicity of iron and copper. *Food Chem Toxicol*, 44: 425-435.
- Reeves MS y Hoffmann PR. 2009. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 66: 2457-2478.

- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey y GC Jr. 1993. AIN - 93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN - 76A Rodent Diet, *J Nutr*, 123: 1939 - 1951
- Reunanen A, Knekt P y Aaran RK. 1992. Serum ceruloplasmin level and the risk of myocardial infarction and stroke. *Am J Epidemiol*, 136:1082-1090.
- Reznick AZ y Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233: 357-363.
- Riedel GF. 2008. Copper. *Ecotoxicol*, 778-783.
- Rojas PR, Montes S, Serrano-García N y Rojas-Castañeda J. 2009. Effect of EGb761 supplementation on the content of copper in mouse brain in an animal model of Parkinson's disease. *Nutrition*, 25: 482-485.
- Rossi L, Squitti R, Pasqualetti P, Marchese E, Cassetta E, Forastiere E, Rotilio G, Rossini PM y Finazzi-Agró A. 2002. Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett*, 329: 137-140.
- Rotilio G, Carri MT, Rossi L y Ciriolo MR. 2000. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life*, 50: 309-314.

S

- Saiko P, Szakmary A, Jaeger W y Szekeres T. 2008. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?. *Mutat Res*, 658: 68-94.
- Saldeen H y Saldeen T. 2005. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nut Res*, 25: 877-889
- Saleh D, Barnes PJ y Giaid A. 1997. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 155: 1763-1769.
- Sasoon J y Brown D. Copper and prion disease. Metal ions and neurodegenerative disorders. *World Sci., Singapore London 2003*: 279:306.
- Sato M, Ohtomo K, Daimon T, Sugiyama T y Iijima K. 1994. Localization of copper to afferent terminals in rat locus coeruleus, in contrast to mitochondrial copper in cerebellum. *J Histochem Cytochem*, 42: 1585-1591.
- Sayre IM, Perry G, Harris PL, Lyu Y, Schubert KA y Smith MA. 2000. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem*, 74: 270-279.
- Schopfer FJ, Baker PRS y Freeman BA. 2003. NO – dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?. *Trends Biochem Sci*, 28: 646-654.

- Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U y Conrad M. 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 8: 237-248.
- Selvaraj A, Balamurugan K, Yepiskoposyan H, Zhou H, Egli D, Georgiev O, Thiele DJ y Schaffner W. 2005. Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev*, 19: 891-896.
- Senthil K, Aranganathan S y Nalini N. 2004. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin Chim Acta*, 339: 27-32.
- Serra JA, Marschoff ER, Domínguez RO, de Lustig ES, Famulari AL, Bartolomé EL y Guareschi EM. 2000. Comparison of the determination of superoxide dismutase and antioxidant capacity in neurological patients using two different procedures. *Clin Chim Acta*, 301: 87-102.
- Serra JA, Marschoff ER, Domínguez RO, Guareschi EM, Famulari AL, Pagano MA y de Lustig ES. 2004. Oxidative stress in Alzheimer's and vascular dementias: masking of the antioxidant profiles by a concomitant Type II diabetes mellitus condition. *J Neurol Sci*, 218: 17-24.
- Setty SRG, Tenza D, Sviderskaya EV, Bennett DC, Raposo G y Marks MS. 2008. Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature*, 454: 1142-1146.
- Shea LM, Beehler C, Schwartz M, Shenkar R, Tuder R y Abraham E. 1996. Hyperoxia activates NF-kappaB and increases TNF-alpha and IFN-gamma gene expression in mouse pulmonary lymphocytes. *J Immunol*, 157: 3902-3908.
- Shim H y Harris ZL. 2003. Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr*, 133: 1527S-1531S.
- Silverstein RL. 2009. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: Role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med*, 76: S27-S30.
- Singh JK, Dasgupta A, Adayev T, Shahmehdi SA, Hammond D y Banerjee P. 1997. Apoptosis is associated with an increase in saturated fatty acid containing phospholipids in the neuronal cell line, HN2-5. *Biochim Biophys Acta*, 1304: 171-178.
- Singh S y Dikshit M. 2007. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev*, 54: 233-250.
- Sivin I. 2007. Utility and drawbacks of continuous use of a copper T IUD for 20 years. *Contraception*, 75: S70-S75
- Smith DG, Cappai R y Barnham KJ. 2007. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta*, 1768: 1976-1990.
- Smith GJ, Ohl VS y Litwack G. 1977. Ligandin, the glutathione S-transferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis: a review. *Cancer Res*, 37: 8-14.

- Smith MA, Harris PI, Sayre LM y Perry G. 1997. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 9866-9868.
- Smorgon C, Mari E, Atti AR, Dalla Nora E, Zamboni PF, Calzoni F, Passaro A y Fellin R. 2004. Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. *Arch. Gerontol. Geriatr Suppl*, 9: 393-402.
- Snyder RD y Friedman MB. 1998. Enhancement of cytotoxicity and clastogenicity of l-DOPA and dopamine by manganese and copper. *Mutat Res*, 405: 1-8.
- Sompamit K, Kukongviriyapan U, Nakmareon S, Pannangpetch P y Kukongviriyapan V. 2009. Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice. *Eur J Pharmacol*, 616: 192-199.
- Song F, Poljak A, Smythe GA y Sachdev P. 2009. Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*, 61: 69-80.
- Southon A, Burke R, Norgate M, Batterham P y Camakaris J. 2004. Copper homeostasis in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biochem J*, 383: 303-309.
- Sparks DL y Schereurs BG. 2003. Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 11065-11069.
- Spitalny KC, Brondum J, Vogt RL, Sargent HE y Kappel S. 1984. Drinking-water-induced copper intoxication in a Vermont family. *Pediatrics*, 74: 1103-1106.
- Squitti R, Cassetta E, Dal Forno G, Lupoi D, Lippolis G, Pauri F, Vernieri F, Cappa A y Rossini PM. 2004. Copper perturbation in 2 monozygotic twins discordant for degree of cognitive impairment. *Arch Neurol*, 61: 738-743.
- Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chioyenda P, Rossi L, Cortesi M, Cassetta E y Rossini PM. 2002. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology*, 59: 1153-1161.
- Squitti R, Pasqualetti P, Cassetta E, Dal Forno G, Cesaretti S, Pedace F, Finazzi-Agrò A y Rossini PM. 2003. Elevation of serum copper levels discriminates Alzheimer's disease from vascular dementia. *Neurology*, 60: 2013-2014.
- Squitti R, Pasqualetti P, Dal Forno G, Moffa F, Cassetta E, Lupoi D, Vernieri F, Rossi L, Baldassini M y Rossini PM. 2005. Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology*, 64: 1040-1046.
- Squitti R, Quattrocchi CC, Salustri C y Rossini PM. 2008. Ceruloplasmin fragmentation is implicated in 'free' copper deregulation of Alzheimer's disease. *Prion*, 2: 23-27.
- Steinberg D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, 272: 20963-10966.
- Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W y Multhaup G. 2001. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull*, 55: 175-185.

- Suji G y Sivakami S. 2008. Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. *Toxicol In Vitro*, 22: 618-624.
- Sul D, Kim HS, Lee D, Joo SS, Hwang KW y Park SY. 2009. Protective effect of caffeic acid against beta – amyloid – induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sci*, 84: 257-262.
- Suzuki T, Nojiri H, Isono H y Ochi T. 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. *Toxicology*, 204: 97-107.
- Swain JA, Darley-Usmar V y Gutteridge JM. 1994. Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis. *Febs Lett*, 342: 49-52.

T

- Tanner MS. 1998. Role of copper in Indian childhood cirrhosis. *Am J Clin Nutr*. 67: 1074S-1081S.
- Tapiero H, Townsend DM y Tew KD. 2003. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 57: 386-398.
- Terrés- Martos C, Navarro-Alarcón M, Martín-Lagos F, López G de la Serrana H y López-Martínez MC. 1997. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ*, 198: 97-103.
- Testa CM, Sherer TB y Greenmyre JT. 2005. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol*, 134: 109-118.
- Thomas C y Oates PS. 2003. Copper deficiency increases iron absorption in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285: G789-795.
- Thomas T, Macpherson A y Rogers P. 1995. Ceruloplasmin gene expression in the rat uterus. *Biochim Biophys Acta*, 1261: 77-82.
- Tokokuni S y Sagripanti JL. 1994. Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in kidney and liver of rats continuously exposed to copper. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 126: 91-97.
- Tórsdóttir G, Sveinbjörnsdóttir S, Kristinsson J, Snaedal J y Jóhannesson T. 2006. Ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in Parkinson's disease: a follow-up study. *J Neurol Sci*, 241: 53-58.
- Townsend DM y Tew KD. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22: 7369-7375.
- Tsan MF, White JE, Santana TA y Lee CY. 1990. Tracheal insufflation of tumor necrosis factor protects rats against oxygen toxicity. *J Appl Physiol*, 68: 1211-1219.

- Tsuji M, Dimov VB y Yoshida T. 1995. In vivo expression of monokine and inducible nitric oxide synthase in experimentally induced pulmonary granulomatous inflammation. *Am J Pathol*, 147: 1001-1015.
- Turnlund JR, Jacob RA, Keen CL, Strain JJ, Kelley DS, Domek JM, Keyes WR, Ensunsa JL, Lykkesfeldt J y Coulter J. 2004. Long-term high copper intake: effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men. *Am J Clin Nutr*, 79: 1037-1044.
- Twomey PJ, Wierzbicki AS, House IM, Viljoen A y Reynolds TM. 2007. Percentage non-ceruloplasmin bound copper. *Clin Biochem*, 40: 749-750.

U

- Uriu-Adams JY y Keen CL. 2005. Copper, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med*, 26: 268-298.
- Uversky VN. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem*, 103: 17-37.

V

- Valavanidis A, Vlachogianni T y Fiotakis K. 2009. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6: 445-462.
- van Raam BJ, Drewniak A, Groenewold V, van den Berg TK y Kuijpers TW. 2008. Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3. *Blood*, 112: 2046-2054.
- Vassiliev V, Harris ZL y Zatta P. 2005. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 49: 633-640.
- Velez S, Nair NG y Reddy P. 2008. Transition metal ion binding studies of carnosine and histidine: Biologically relevant antioxidants. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 66: 291-294.
- Vöhringer ML, Becker TW, Krieger G, Jacobi H y Witte I. 1998. Synergistic DNA damaging effects of malondialdehyde/Cu(II) in PM2 DNA and in human fibroblasts. *Toxicol Lett*, 94: 159-166.
- Valko M, Izakovik M, Mazur M, Rhodes CJ y Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266: 37-56.
- Vasák M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*, 19: 13-7.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovik M y Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress – induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160: 1-40.
- Vicent A, Armengol J y García – Jiménez J. 2009. Protectant activity of reduced concentration of copper sprays against *Alternaria brown spot* on “Fortune” mandarin in Spain. *Crop Prot.*, 28: 1-6.

W

- Waggoner DJ, Bartnikas TB y Gitlin JD. 1999. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis*, 6: 221-230.
- Wallaert B, Lasalle P, Fortin F, Aerts C, Bart F, Fournier E y Voisin C. 1990. Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of nonsmoking coal workers. *Am Rev Respir Dis*, 141:129-133.
- Wang KKW. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference?. *Trends Neurosci*, 23: 20-26.
- Wang T, Chen LX, Long Y, W WM y Wang R. 2008. DNA damage induced by caffeic acid phenyl ester in the presence of Cu(II) ions: Potential mechanism of its anticancer properties. *Cancer Lett*, 263: 77-88.
- Wang X-F, Li S, Chou AP y Bronstein JM. 2006. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: Implication in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis*, 23: 198-205.
- Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A, Noda M y Bouillaguet S. 2002. Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. *J Oral Rehabil*, 29: 133-139.
- Wei QY, Chen WF, Zhou B, Yang L y Liu ZL. 2006. Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 70-77.
- West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED y Aschner M. 2008. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology*, 29:489-503.
- WHO. Farley TMM, Meirik O, Rowe PJ. 1999. Mecanismos de acción, seguridad y eficacia de los dispositivos intrauterinos. WHO, *Reprod Health Res Ann Technical Report*
- Winge DR y Mehra RK. 1990. Host defenses against copper toxicity. *Int Rev Exp Pathol*, 31: 47-83.
- Wu W, Graves LM, Jaspers I, Devlin RB, Reed W y Samet JM. 1999. Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol*, 277: L924-L931.
- Wu F, Tyml K y Wilson JX. 2008. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, 217: 207-214.

Y

- Yagi K. 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxides in blood plasma. *Biochem Med*, 15: 212-216.
- Yang MS, Chan HW y Yu LC. 2006. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*, 226: 126-130.

- Yang DP, Kong DX y Zhang HY. 2007. Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*, 104: 1269-1271.
- Yin XM. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, 369: 7-19.
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Htay HH, Tsubouchi R, Qiao SL, Li WH, Murakami K y Yokochi T. 2004. Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death. *Toxicol In Vitro*, 18: 783-739.
- Young JF, Dragsted LO, Daneshvar B, Lauridsen ST, Hansen M y Sandström. 2000. The effect of grape – skin extract on oxidative status. *Br J Nutr*, 84: 505-513.

Z

- Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková D y Stetina R. 2009. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res*, 58: S13-17.
- Zatta P, Drago D, Zambenedetti P, Bolognin S, Nogara E, Peruffo A y Cozzi B. 2008a. Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging. *J Chem Neuroanat*, 36: 1-5.
- Zatta P, Drago D, Zambenedetti P, Bolognin S, Nogara E, Peruffo A y Cozzi B. 2008b. *J Chem Neuroanatomy*, 36: 1-5.
- Zeng LF, Wei QY, Cai YJ, Fang JG, Zhou B, Yang L y Liu ZL. 2006. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure – activity relationship. *Free Radic Biol Med*, 41: 1807-1816.
- Zerounian NR y Linder MC. 2002. Effects of copper and ceruloplasmin on iron transport in the Caco 2 cell intestinal model. *J Nutr Biochem*, 13: 138-148.
- Zhou B y Gitschier J. 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 7481-7486.
- Zhou Y, Shie FS, Piccardo P, Montine TJ y Zhang J. 2004. Proteosomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: Relevance to Parkinson's disease. *Neurosci*, 128: 281-291.
- Zhu BZ y Chevion M. 2000. Copper-mediated toxicity of 2,4,5-trichlorophenol: biphasic effect of the copper(I)-specific chelator neocuproine. *Arch Biochem Biophys*, 380: 267-273.
- Ziyatdinova GK, Voloshin AV, Gilmutdinov AKh, Budnikov HC y Ganeev TS. 2006. Application of constant-current coulometry for estimation of plasma total antioxidant capacity and its relationship with transition metal contents. *J Pharm Biomed Anal*, 40: 958-963.