

LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PEROXIDASAS ES IMITADA POR COMPUESTOS OXIDADOS DERIVADOS DEL HEMO

Abstract:

Catalytic functions of preoxidase, such as their participation in redox processes, is mimicked by the iron(III) complex of deuteroporphyring IX, deuterioferriheme (dfh) oxidized with compounds like hypochlorite or peroxyacids. The products of the reactions and the «intermediate states» of the dfh and the oxygen donor compound can be identified via spectrophotometric studies. The whole process involves the production of two «intermediate states;» the compounds that are present as intermediate forms in the reaction are able, not only to participate in the redox process, but to regenerate part of the dfh used up. The oxidized complex of dfh catalyses the demethylation and dealkylation of different substituted anilines. The identification of the main and by-products of these reactions are also presented in this study.

JUAN CARLOS CARMONA HERNÁNDEZ *

Además de servir como transportadores de oxígeno y electrones, las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan reacciones donde un átomo de oxígeno se ve transferido al sustrato y uno más al agua. La aplicabilidad de lo anterior se ve directamente reflejada en el cuerpo humano al ser protegido de los peróxidos nocivos por las hidroperoxidasas; «en los eritrocitos y otros tejidos, la enzima glutatión peroxidasa cataliza la destrucción del H_2O_2 y los hidroperoxidos lipídicos por el glutatión reducido, protegiendo a los lípidos de membrana y a la hemoglobina contra la oxidación y los peróxidos» (1). La acumulación de estos compuestos (peróxidos) ocasiona un desequilibrio orgánico que se relaciona con la generación de radicales libres; esto conlleva a

la destrucción de membranas y a posibles causas de cáncer y aterosclerosis. El beneficio del proceso enzimático de las peroxidasas, en este caso, es el de participar como aceptor de electrones en la reducción de los peróxidos.

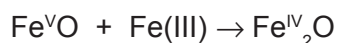
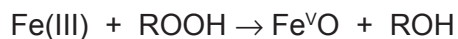
Otra aporte de las peroxidasas, con respecto a agentes externos al organismo, en el caso de medicamentos como aminopirina, anilina, morfina y contaminantes ambientales y carcinógenos químicos como los xenobióticos, es el de metabolizarlos por medio de enzimas como las del sistema de citocromo P450. este sistema enzimático al igual que la peroxidasa Horseradish cataliza procesos de oxidorreducción.

El complejo de hierro(III) de deuterioferrihemo IX, deuterioferrihemo (dfh) oxidado con el ión hipoclorito imita el proceso catabólico de las peroxidasas. La identificación de los productos e intermediarios de estas reacciones pueden ser identificados por medio de espectrofotometría; este es un proceso en el cual se forman y pueden ser detectados dos diferentes «estados intermedios» en la reac-

* Químico, Texas Wesleyan University. Fort Worth, Tx. 76105 U.S.A.
Docente Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Manizales.

ción; donde el primero participa directamente en la oxidorreducción y el segundo colabora con el proceso regenerativo del dfh. La capacidad redox de los mencionados compuestos es aplicada en la desmetilación y desalquilación de N-metil y N-alquilanilinas. Los productos principales y secundarios de estos procedimientos son presentados en este documento.

El dfh se oxida con el ión de hipoclorito para producir un «estado intermediario» reactivo que es funcionalmente análogo en cuanto a la actividad catalítica de los intermediarios obtenidos en la oxidación con las enzimas del tipo peroxidasas. Este estado intermediario exhibe el mismo espectro óptico que se obtiene en la oxidación de dfh con otros oxidantes como ácidos peroxibenzoicos substituidos, iones clorito y yodosobenzeno y sus derivados diacéticos. Con estos oxidantes se da el caso de equivalencia estequiométrica de 2 moles de hemo hierro(III)/mol del oxidante de 2 electrones, observándose en titulaciones espectrofotométricas experimentales de flujo controlado. A baja concentración de OCl⁻ la formación del estado intermediario es de primer orden en ambos hipoclorito y dfh monomérico. El anterior proceso ha sido interpretado como una oxidación de 2 electrones que incluye la transferencia del átomo de oxígeno desde el compuesto oxidante hasta el grupo hemo para producir una especie que puede ser representada como un análogo I del compuesto de peroxidasa, seguido por una rápida segunda reacción que se muestra en el siguiente esquema:



Estas ecuaciones representan los estados de oxidación del hierro y el proceso general de oxidorreducción. La cinética de saturación se muestra en altas concentraciones del oxidante. La velocidad de reacción es independiente del

pH en un rango de 6.9 – 8.5 pero aumenta marcadamente en buffers de carbonato de pH de 8.5 – 10.6; este es un efecto atribuido tentativamente a la contribución del dímero dfh motivado por el ion bicarbonato, el cual puede estar funcionando como una base general. Gráficas reciprocas sugieren aceleración en la velocidad de reacción en las regiones de una relativa alta basicidad que se refleja principalmente en la constante de Michaelis, K_m , y que esta determinada más por la unión del dfh al oxidante que por la conversión del complejo hemo-oxidante al estado intermediario.

La oxidación a altas concentraciones de hipoclorito está acompañada de una degradación menos extensiva del anillo de porfirina de la que se observa en condiciones de concentración similar usando H₂O₂ o ácido m-cloroperoxibenzoico y bajo estas condiciones, se aprecia la formación del producto en relación 1/1 hemo hierro(III)-OCl⁻. Se propone que esta situación es análoga al producto en relación 1/1 enzima-oxidante obtenida en la oxidación de peroxidasas seleccionadas y para el intermediario propuesto obtenido con la oxidación con peroxiácido del coproferrihemo monomérico (2).

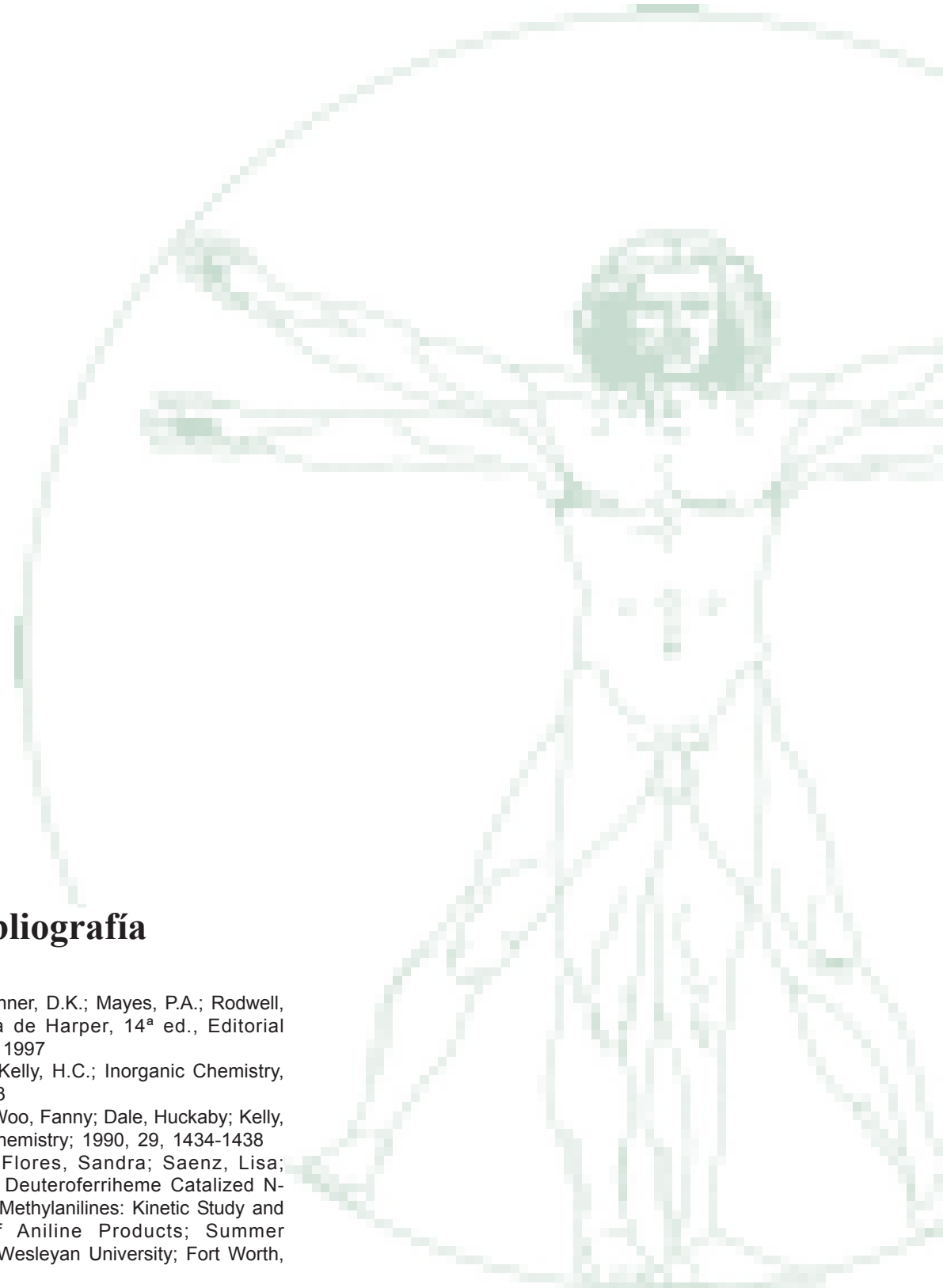
El dfh es regenerado espontáneamente desde una forma oxidada del hemo que se presenta por conducto de una reacción de dfh con una variedad de átomos donantes de oxígeno, tales como OCl⁻, ClO₂⁻ y los peroxiácidos. Este proceso regenerativo se monitorea con medios espectrofotométricos observando la recuperación de la densidad óptica, la cual viene después del descenso en la absorbancia acompañada de la oxidación del dfh en la región Soret (384nm) del espectro del hemo. Los correspondientes cambios en absorbancia son bifásicos y un manejo gráfico de la información conduce a la determinación de dos constantes de un pseudo-primer orden de la reacción (en dfh). La información es compatible con dos modelos mecanísticos: uno que incluye dos reacciones paralelas en las cuales dos formas de la espe-

cie hemo oxidada son reducidas simultáneamente y el otro compromete dos reacciones (en serie) consecutivas en las cuales una sola forma del hemo oxidado es reducida en una reacción intermediaria que subsecuentemente es reducida al hemo libre. El análisis cinético no permite la confirmación o eliminación de cualquiera de los mecanismos, sin embargo, el modelo en serie se verifica por medio de estudios de temperatura. De esta forma se considera que el espectro del producto de oxidación del dfh es independiente de la temperatura, mientras que el promedio y velocidad de la reacción de la oxidación del hemo muestra que depende directamente de la temperatura, indicando así que solo se produce un compuesto (una especie) en la oxidación del dfh. La identificación de los agentes reductores es desconocida; sin embargo, la reproducibilidad de las constantes de pseudo-primer orden de las reacciones sugieren la participación de agua como solvente en el ataque determinante sobre estas especies que pasan a ser reducidas en las reacciones secuenciales que conllevan a la regeneración del dfh. Un descenso en el grado de regeneración va acompañado de un aumento en la velocidad de regeneración a altas concentraciones del oxidante del hemo. Esto se debe muy probablemente a una degradación del sistema en anillo de la porfirina inducida por el oxidante, en la cual especies reductoras son producidas, ofreciendo de esta forma una ruta adicional para la regeneración de dfh (3).

Los compuestos intermediarios se ha comprobado catalizan el proceso de N-dealquilación de n-metil anilinas. Se han hecho estudios cinéticos para monitorear parámetros como pH, concentración del agente oxidante y aspectos

estéricos del proceso de desmetilización de estas anilinas. Los resultados de estos experimentos indican que la reacción es independiente del pH pero no, de la concentración del grupo oxidante (OCl^-), amina y dfh. Un análisis más profundo demostró que entre más grande sea el sustituyente alquílico en el nitrógeno, mas lento era el desarrollo de la reacción. El progreso de la reacción fue seguido midiendo la cantidad de formaldehído producido. Otros estudios se realizaron para identificar los productos de la desmetilización y la posible desalquilación de las N-metil-N-etilanilinas usando técnicas de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Estos estudios indican que el producto adicional de la N-desmetilación de la N-metilanilina fue anilina. Otro aspecto interesante es que al usar N-etilanilina como sustrato se produjo también la anilina. Lo anterior indica que el dfh no solo cataliza la desmetilación oxidativa sino también la desalquilación (4).

El estudio del dfh como análogo de enzimas hemoproteínicas, particularmente las peroxidasas, permite demostrar la importancia de los procesos de oxidorreducción en los cuales éstas enzimas participan. La capacidad de reproducir, hasta cierto grado, la acción catalizadora de las peroxidasas en el laboratorio utilizando el dfh y los sustratos oxidantes, como el ión hipoclorito, es una muestra de que muchos procesos biológicos pueden ser comprendidos por medio de la revisión y análisis de diferentes trabajos investigativos. En este estudio no solo se observan las formas en que los sustratos reaccionan para imitar un proceso orgánico, sino que se identifican y demuestran los productos de las reacciones.



Bibliografía

- (1) Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W.; Bioquímica de Harper, 14^a ed., Editorial Manual Moderno, 1997
- (2) Rodríguez, R.E.; Kelly, H.C.; Inorganic Chemistry, 1989, 28, 589-593
- (3) Rodríguez, R.E.; Woo, Fanny; Dale, Huckaby; Kelly, H.C.; Inorganic Chemistry; 1990, 29, 1434-1438
- (4) Carmona, J.C.; Flores, Sandra; Saenz, Lisa; Rodríguez, R.E.; Deuterioferriheme Catalized N-Dealkylation of N-Methylanilines: Kinetic Study and Identification of Aniline Products; Summer Research; Texas Wesleyan University; Fort Worth, Tx, 76105