



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL COBRE  
(CUPROPROTEÍNAS). ENFERMEDAD DE WILSON Y  
ENFERMEDAD DE MENKES**

**Autor: Laura Carrillo Gómez**

**Tutor: África Martínez Alonso**

**Convocatoria: Junio 2018**

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión del papel del cobre en los seres vivos, su implicación en diferentes enzimas, así como de sus características metabólicas y algunas enfermedades de origen genético relacionadas directamente con la distribución de este metal en el cuerpo humano.

El cobre es un nutriente esencial de la dieta humana y un cofactor para múltiples enzimas, denominadas por esta cualidad como *cuproenzimas*, en las cuales el metal está unido a residuos de aminoácidos específicos en el centro catalítico. El cobre, debido a sus propiedades redox, es fundamental para procesos de transferencia electrónica en el metabolismo humano, lo que hace que esté vinculado a procesos como la respiración mitocondrial, metabolismo de neurotransmisores y melaninas, homeostasis del hierro, protección antioxidante, angiogénesis, formación de tejido conectivo y amidación peptídica.

La metodología empleada es la revisión bibliográfica de las evidencias existentes en libros especializados y artículos científicos de interés.

Inicialmente se describen las propiedades químicas del cobre y una clasificación de los centros de cobre activos en las metaloproteínas, para posteriormente realizar una clasificación de las cuproproteínas más representativas dentro de los seres vivos. También se exponen los aspectos más relevantes del metabolismo del cobre dentro del cuerpo humano, así como los problemas relacionados con el mismo (excesos y defectos), para terminar con la descripción de algunas enfermedades de carácter genético relacionadas con este metal.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El cobre es un elemento esencial para la gran mayoría de seres vivos, presente a niveles traza. En los seres humanos, el cobre se encuentra en cantidades menores que otros metales como hierro o zinc.<sup>1</sup> Se trata de un componente esencial en el centro activo de muchas metaloproteínas, de manera que su presencia es necesaria para el normal funcionamiento de funciones fisiológicas como puedan ser la respiración celular, detoxificación de radicales libres, síntesis de melanina, síntesis de colágeno y metabolismo del hierro.<sup>2,1</sup>

Si nos remontamos a las formas más primitivas de vida, hace aproximadamente  $4 \cdot 10^9$  años, no encontraríamos el cobre en cantidades suficientes para ser incorporado al metabolismo de los seres vivos. Esto se debe a que la atmósfera reductora existente en el planeta antes de producirse la fotosíntesis y las elevadas concentraciones de  $H_2S$  presentes en los océanos, probablemente

produjeron el bloqueo del metal, en su forma Cu(I), al precipitarlo como CuS<sub>2</sub>. Por el contrario, el hierro, que estaba presente en su forma Fe(II), permaneció disuelto a pesar de las condiciones ambientales.

No sería hasta más de mil millones de años después, con la aparición de los procesos fotosintéticos y la consiguiente oxigenación de la atmósfera, que se transformó el Cu(I) en su forma más soluble, Cu(II), mientras que el Fe(II) se oxidó hasta Fe(III), formando en agua Fe(OH)<sub>3</sub> y FeO(OH), que son muy insolubles. Esto forzó a las especies que habían incorporado hierro a su metabolismo, a desarrollar mecanismos de transporte y almacenamiento del mismo.

Para respaldar estos acontecimientos, algunos aspectos biológicos del cobre también indican que forma parte de los seres vivos desde la aparición de oxígeno en la atmósfera. Algunos ejemplos de esto son:

- En algunos organismos muy primitivos, como pueden ser los *Archaea* anaeróbicos, no se ha encontrado presencia de proteínas de cobre
- El oxígeno actúa como sustrato o aceptor electrónico en todas las reacciones catalizadas por cuproproteínas
- Existen enzimas de cobre que participan dentro del ciclo del nitrógeno que transforman especies químicas como nitritos, óxido nítrico u óxidos de dinitrógeno, todas ellas asociadas con una atmósfera rica en O<sub>2</sub>
- El cobre resulta tóxico para ciertos organismos inferiores, entre los que encontramos algas y algunas bacterias, pero también en seres superiores entre los que se encuentra el ser humano, el margen de concentraciones admisibles es estrecho, lo cual podría deberse a una incorporación tardía al metabolismo

Sea como fuere, tras su incorporación no desplazó al hierro en sus funciones, ya que sigue ejerciendo sus funciones intracelulares, sino que pasó a cubrir sus funciones bioquímicas en el espacio extracelular, que resulta ser más oxidante, además de sustituirlo también en algunos orgánulos y vesículas. En cuanto a esta distribución espacial de ambos metales, tenemos escasas excepciones, como pueda ser el caso de la superóxido dismutasa (contiene cobre, pero está en el citoplasma), por lo que la vida evolucionó desde la “edad de hierro” a la “edad del hierro-cobre”, donde ambos metales son complementarios e incluso en algunas situaciones colaboran, como pueda ser en la ceruloplasmina, transportadora de cobre en suero que también transporta hierro a través de las membranas.<sup>3</sup>

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión del papel del cobre en los seres vivos, su implicación en distintas enzimas, así como algunas enfermedades raras relacionadas directamente con la distribución de este metal en el cuerpo humano.

## METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica de la evidencia científica disponible, incluyendo libros especializados y distintos artículos científicos de interés.

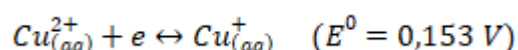
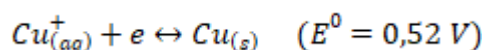
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características químicas y bioinorgánicas del cobre

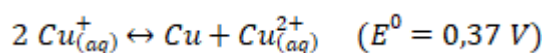
El cobre es un metal que representa 68 ppm de la corteza terrestre, principalmente en forma de sulfuro, óxido o carbonato, siendo la calcopirita, o pirita de cobre,  $\text{CuFeS}_2$ , quien constituye alrededor del 50% de los depósitos de este metal.

Se sitúa en el grupo 11 del sistema periódico, junto con otros metales de acuñar, como plata y oro, ya que tradicionalmente se han usado para la fabricación de monedas. Su configuración electrónica es  $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$ , con estados de oxidación Cu(I) y Cu(II) como los más relevantes dentro del medio de vida biológico, aunque hay complejos en los que podemos encontrarlo como Cu(III).<sup>3</sup>

En cuanto a la estabilidad de los estados de oxidación Cu(I) y Cu(II) en disolución acuosa, se define por los valores de los potenciales redox:



De esta manera, el proceso de dismutación del Cu(I) en agua será la siguiente:



Con una constante de equilibrio de aproximadamente  $10^6$ , nos indica que en medio acuoso solo encontraremos pequeñas concentraciones de  $\text{Cu}^+$ , ya que tiende a dismutarse, dando lugar a  $\text{Cu}^{2+}$  y el metal libre. En el caso de tener presencia de ligandos diferentes al agua, pueden darse complejos de Cu(I) más estables, al igual que en algunas proteínas redox de cobre que presentan potenciales más positivos, lo que indica que la cadena proteica estabiliza el Cu(I) en mayor medida que en medio acuoso. Gracias a esto, el semipar Cu(II)/Cu(I) se hace más positivo, llegando al lado oxidante dentro de la escala biológica.<sup>3</sup>

Desde el punto de vista de la química de coordinación, también encontramos diferencias en ambos estados:

- Cobre (I): Se trata de un ácido blando, que se une a bases blandas.<sup>1</sup> Consta de un sistema  $d^{10}$  que forma complejos diamagnéticos e incoloros, a menos que los ligandos posean color por su estructura. El número de coordinación más habitual es 4, con los ligandos en disposición tetraédrica, aunque se trata de una estereoquímica flexible, por lo que podemos encontrar también disposiciones de tipo cuadrado planas o distorsionadas.<sup>3</sup>
- Cobre (II): En este caso, encontramos un ácido débil, un sistema  $d^9$  que forma complejos caracterizados por la distorsión de Jahn-Teller. Esto se traduce en geometrías básicamente irregulares, como pueden ser complejos octaédricos con distorsión tetragonal o complejos plano-cuadrados, que muchas veces son difíciles de distinguir entre sí. Además, también podemos encontrar en una menor proporción complejos con estructura de pirámide trigonal e incluso tetraédricos.<sup>3,4</sup>

La mayoría de los complejos formados con Cu(II) tienen un color azul o verde, lo cual se debe a una banda ancha entre los 600 y los 900 nm.<sup>3,5</sup> Los complejos con geometría cercana a la octaédrica tienen valores de momento magnético más bajos, mientras que los que se acercan más a la estereoquímica tetraédrica tienen valores más elevados.<sup>4</sup> Finalmente, cabe destacar que estos complejos dan lugar a un tipo de espectro de resonancia paramagnética (ERP) muy característico, con un valor grande de la constante de acoplamiento hiperfino, resultante del electrón desapareado con el espín nuclear del átomo de cobre.<sup>3</sup>

### **Funciones biológicas: Cuproproteínas**

El cobre es un elemento esencial para todos los seres vivos, debido a la función que desempeña en los procesos redox y de transferencia de electrones<sup>3</sup> realizada por las cuproproteínas, un tipo de metaloproteínas en las cuales el cobre está unido a residuos de aminoácidos específicos en el centro proteico catalíticamente activo.<sup>1</sup>

Tradicionalmente, las proteínas de cobre han sido clasificadas en función de su centro activo, basándose en las características espectroscópicas de los centros de Cu(II), reflejo de su estructura electrónica y la geometría del sitio activo.<sup>3</sup> Esta clasificación contemplaba tres bloques:

- Centro de cobre tipo 1 o cobre azul:
  - ✓ Espectro electrónico con una banda de absorción a unos 600 nm, que da un intenso color azul
  - ✓ ERP con pequeñas constantes de acoplamiento hiperfino, que indican una deslocalización del electrón desapareado con una disminución de la interacción con el espín nuclear del cobre
  - ✓ Ej: Proteínas azules de cobre de transferencia electrónica<sup>1</sup>

- Centro de cobre tipo 2 o cobre normal:
  - ✓ Centro mononuclear de Cu(II) con espectros visibles y ERP típicos de Cu(II), con coordinación tetragonal
  - ✓ Espectro electrónico con débiles bandas de absorción en la zona visible
  - ✓ ERP con constantes de acoplamiento hiperfino
  - ✓ Ej: Superóxido dismutasa, galactosa oxidasa, amino oxidasa y dopamina beta hidrolasa<sup>1</sup>
- Centro de cobre tipo 3 o centro binuclear de cobre acoplado:
  - ✓ Centro binuclear de cobre (Cu(I) en su forma reducida), que normalmente une un peróxido
  - ✓ Espectro electrónico con una banda de absorción intensa a unos 330 nm
  - ✓ No se detecta ERP, debido a que el centro binuclear es diamagnético, por el fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones Cu(II)
  - ✓ Ej: Hemocianina y la tirosinasa<sup>3, 1, 5</sup>

Esta clasificación es insuficiente, ya que existen otros centros de cobre conocidos que no encajan del todo dentro de los tres tipos tradicionales. De esta manera, se han tenido que añadir a esta clasificación otros tres grupos:<sup>1, 4</sup>

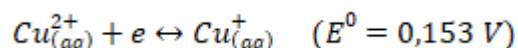
- Centro de cobre tipo (2+3) o cobre trinuclear:
  - ✓ Centro trinuclear constituido por un cobre tipo 2 y un cobre tipo 3, que interactúan entre sí
  - ✓ Espectro electrónico con banda de absorción intensa a 330 nm, debido al cobre tipo 3
  - ✓ ERP con parámetros normales de Cu(II)
  - ✓ Ej: Oxidasas de cobre<sup>1, 3</sup>
- Centro de cobre tipo Cu<sub>A</sub> o cobre púrpura:
  - ✓ Se trata de un centro binuclear de cobre de valencia mixta
  - ✓ Consta de propiedades espectroscópicas diferentes, ya que tiene absorción en el IR cercano
  - ✓ En cuanto al ERP, tiene constantes de acoplamiento hiperfinas pequeñas
  - ✓ Ej: Citocromo c oxidasa y óxido nitroso reductasa<sup>1, 3</sup>
- Centro de cobre tipo Cu<sub>Z</sub> o cobre multinuclear:
  - ✓ Centro activo formado por cuatro átomos de cobre
  - ✓ Ej: Óxido nitroso reductasa<sup>3, 4</sup>

## **Clasificación de las metaloproteínas de cobre**

Según las reacciones que catalizan, la estructura y tipo de centro de cobre, podemos agrupar las cuproproteínas en:

### ***a) Proteínas de transferencia electrónica***

Este grupo de proteínas recibe varios nombres, entre los que encontramos *pequeñas proteínas azules*, o también *cupredoxinas*, por su similitud con las ferredoxinas. El color azul se debe al centro de cobre tipo 1,<sup>5</sup> de forma que, durante el transporte del electrón, el estado de oxidación del metal oscila entre (I) y (II). Son proteínas transportadoras de un electrón, que catalizan proceso de transferencia electrónica entre un dador y una molécula de oxígeno, o bien dentro de cadenas de transferencia de la fotosíntesis.<sup>3</sup>



Estas proteínas son monómeras, con masas moleculares entre 10 y 22 kDa. Se suelen dividir en función de su relación filogénica, distinguiendo cinco grupos: Plastocianinas, azurinas, fitocianinas, auracianinas y rusticianinas.<sup>3</sup> No se encuentran en el citoplasma, aunque algunas pueden unirse débilmente a la superficie de la membrana.<sup>5</sup>

#### ***I. Plastocianinas***

Esta proteína adopta una estructura terciaria de barril- $\beta$ , en el que el cobre tiene una coordinación tetraédrica distorsionada. Esta estructura deja el centro activo cerca de la superficie de la proteína, ligeramente enterrado, con una histidina expuesta al disolvente a través de un parche hidrofóbico, lugar por el que la plastocianina interacciona con las proteínas que participan junto con ella en la cadena de transporte electrónico que tiene lugar en la fotosíntesis de plantas, algas verdes y cianobacterias.<sup>3, 1</sup>

#### ***II. Azurinas***

Se trata de una proteína que tiene estado oxidado y reducido en función del pH. El metal se encuentra fuertemente enlazado a tres ligandos y ligeramente enlazado a otros dos, los cuales le dan estructura al centro activo. Estas proteínas se caracterizan por su elevado potencial redox, que se debe a la metionina (efecto dador del átomo de azufre), que constituye uno de los dos ligandos ligeramente enlazados, que permite desestabilizar el estado oxidado Cu(II)/Cu(I). Encontramos las azurinas en la cadena de transferencia electrónica de bacterias desnitrificantes.<sup>3, 1</sup>

#### ***III. Otras proteínas de transferencia de electrones***

La familia de las proteínas de transferencia de electrones es muy amplia, incluyendo un gran número de proteínas que según sus secuencias, estructuras y cadenas de transferencia electrónica en las que se implican, se clasifican en subclases, entre las que encontramos algunas como fitocianinas, auracianinas y rusticianinas.

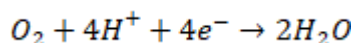
En el caso de las fitocianinas, encontramos potenciales redox bajos y elevadas velocidades de transferencia electrónica, lo cual es una excepción dentro del grupo, que se encuentra en especies vegetales.

En el lado contrario encontramos la rusticianina, presente en algunos tipos de bacteria, en los que interviene en la cadena respiratoria donde el Fe(II) se oxida a Fe(III). Una de las bacterias que contiene rusticianina es *Thiobacillus ferrooxidans*, y se utiliza para la extracción de cobre y uranio mediante lixiviación microbiana. Esta enzima tiene una serie de peculiaridades, como su elevada estabilidad en medio ácido y un potencial redox bastante más alto que el resto de proteínas de transferencia de electrones.<sup>1</sup>

Por último, encontramos otros grupos como las auracianinas, halocianinas, estelacianinas... de las que aún no se conoce su función concreta, ya que no está claramente identificada la cadena de transferencia electrónica en la que participan, ni tampoco cuales son las proteínas dadora y aceptora del electrón.<sup>1</sup>

### ***b) Oxidasas azules***

Dentro de este grupo de metaloenzimas encontramos un centro de cobre tipo (2+3), que contiene uno o más centros de cobre tipo 1, responsables del color azul, y un centro trinuclear con un cobre tipo 2 y otro tipo 3, que funciona como un único centro catalítico. Su función es la oxidación de sustratos mediante la reducción del oxígeno a agua:<sup>1</sup>



#### ***I. Lacasas***

Encontramos estas enzimas ampliamente distribuidas en plantas y hongos. Se trata de glucoproteínas monómeras que contienen un sitio de cobre tipo 1 y un centro trinuclear de cobre (2+3). La función de las lacasas es catalizar la reducción de oxígeno a agua, acoplada a la oxidación de sustratos como pueden ser para y orto difenoles, monofenoles y algunas fenilendiaminas.<sup>5, 1</sup>

#### ***II. Ceruloplasmina***

Esta enzima, también denominada “proteína azul cielo del plasma”, es una glucoproteína monómera con un PM de unos 130 kDa.<sup>1, 5</sup> Se trata de una proteína indispensable para el transporte del cobre en el plasma, y los defectos en su heptasíntesis se relacionan con la enfermedad de Wilson, que detallaremos más adelante.<sup>3</sup>

En condiciones normales, consta de seis átomos de cobre, fuertemente enlazados a la proteína. Consta también de seis dominios con un plegamiento de barril-β, típico de las pequeñas proteínas azules, aunque no se encuentre dentro de ese grupo. Tres de los dominios tienen centros



mononucleares de cobre, dos de los cuales son cobres tipo 1 (de ahí su color azul), y el otro también se considera de tipo 1 aunque no esté coordinado con metionina. Los otros tres átomos de cobre forman un centro tipo 2+3.<sup>3,5</sup>

Además de su función indispensable en el transporte del cobre, esta enzima consta de otras actividades, entre las que encontramos: Función ferroxidasa (permite movilizar hierro a través de la transferrina para su eliminación), función antioxidante y función amino oxidasa.<sup>3,5,1</sup>

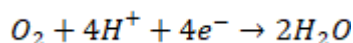
### *III. Ascorbato oxidasa*

Esta enzima es exclusiva de plantas superiores, y su función es catalizar la oxidación del ácido ascórbico,<sup>5</sup> transfiriendo los electrones al oxígeno, de manera que se forme agua.<sup>1</sup>

Estructuralmente es un homodímero de 140 kDa, en el que cada subunidad tiene tres dominios que presentan un plegamiento típico de las cupredoxinas, y cuatro centros de cobre. Estos centros son de tipo 1, tipo (2+3), tipo 3 y, por último, tipo 1. Los ligandos a los que se une adoptan una disposición espacial similar a la de la plastocianina.<sup>3</sup>

### *c) Oxidasas no azules*

Llevan a cabo la oxidación de sustratos a la vez que reducen la molécula de oxígeno a peróxido de hidrógeno:



#### *I. Galactosa oxidasa*

Se trata de una proteína con una única cadena polipeptídica de 68 kDa, con un centro mononuclear de cobre tipo 2,<sup>5</sup> localizada en los hongos. Su función es catalizar la oxidación de alcoholes primarios<sup>5</sup> a aldehídos, utilizando la molécula de oxígeno, que se reduce a peróxido de hidrógeno. Al parecer, el objetivo final de esta reacción es la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para degradar lignina.<sup>1</sup> La capacidad de esta enzima va desde alcoholes de bajo peso molecular, como la galactosa, hasta polisacáridos.

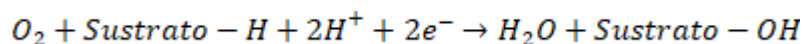
Junto al átomo de cobre que constituye el centro activo, encontramos un radical tirosilo que actúa como cofactor, de manera que se puede llevar a cabo la transferencia de dos electrones con un único átomo de cobre.<sup>5</sup>

#### *II. Amino oxidasa*

Se trata de una enzima homodímera, donde cada subunidad, de unos 80 kDa, contiene un centro de cobre tipo 2. Encontramos esta enzima en bacterias, plantas, levaduras y mamíferos. Cataliza la desaminación y oxidación de aminas primarias, formando aldehídos mediante la molécula de oxígeno, que es reducida a peróxido de hidrógeno.<sup>5,1</sup>

## d) Monooxigenasas

Llevan a cabo la oxidación de sustratos a la vez que reducen el oxígeno:



### I. *Tirosinasa*

Se trata de una proteína con un centro activo de cobre tipo 3, con actividad monooxigenasa (hidroxilasa) y oxidasa, presente en casi todos los tipos de organismos, eucariotas o procariotas.<sup>1,5</sup> Es la encargada de catalizar las primeras reacciones de la formación de melanina, así como el principio de la síntesis de catecolaminas.<sup>3</sup>

La síntesis de melanina tiene lugar en los melanocitos, células productoras de pigmentos, en los que la tirosinasa actúa en dos ocasiones: Primero transforma la L-tirosina en L-dopa, y posteriormente la transforma en dopaquinona. La ruta final lleva a dos tipos de melanina, roja y negra, que dan coloración a la piel. En los individuos albinos existe un defecto en la enzima tirosinasa, que impide la formación de los pigmentos.<sup>1,3</sup>

En la síntesis de catecolaminas, dentro del SNC y la médula suprarrenal, la L-dopa es descarboxilada, dando lugar a dopamina, que es la primera catecolamina que se sintetiza.

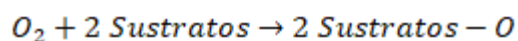
El centro activo de la enzima tiene dos átomos de cobre y 6 ligandos de histidina. Tiene similitudes con la hemocianina, que en moluscos parece tener una débil actividad tirosinasa. La diferencia reside en la accesibilidad al centro activo, ya que, en el caso de la hemocianina, la proteína solo deja acceder al oxígeno, mientras que en la tirosinasa pueden acceder sustratos más voluminosos.<sup>3,5,1</sup>

### II. *Dopamina beta hidrolasa*

Si continuamos con la anterior ruta de síntesis de catecolaminas, partiendo de la dopamina, gracias a la acción de la dopamina-beta-hidroxilasa, que también contiene cobre, se transforma en noradrenalina, que es metilada para dar lugar a adrenalina.<sup>3,5</sup>

### e) *Dioxigenasa: Quercetinasa*

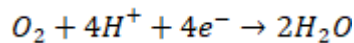
Las dioxigenasas, o 2,4-dioxigenasas, como la quercetinasa presente en hongos, catalizan la inserción de oxígeno en dos carbonos no adyacentes de compuestos heterocíclicos, como puedan ser los flavonoles, de manera que rompen dos enlaces C-C, liberando CO. Podríamos encontrar estas dioxigenasas englobadas en la superfamilia de enzimas  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, pero con una adaptación de su centro activo para llevar a cabo la ruptura mediante la molécula de oxígeno:



Se está estudiando el empleo de esta enzima en métodos de desoxigenación de alimentos que contienen ácidos grasos mono y poliinsaturados, aunque sigue en fase de desarrollo actualmente.<sup>6</sup>

### f) *Oxidasa terminal: Citocromo C oxidasa*

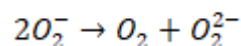
Dentro del citocromo c encontramos varios complejos enzimáticos, siendo el último de ellos el citocromo c oxidasa, encargada de transferir electrones desde el citocromo hasta el oxígeno. Dentro de este complejo, encontramos los citocromos a y a<sub>3</sub>, además del sitio de unión para el oxígeno. Cada molécula de O<sub>2</sub> acepta cuatro electrones, reduciéndose a dos moléculas de agua, gracias a los iones Cu(I), unidos en el complejo de la citocromo oxidasa, que facilitan el acoplamiento de los electrones y la reducción del O<sub>2</sub>.<sup>5</sup>



Como este complejo enzimático tiene una K<sub>m</sub> mucho menor para el oxígeno que la mioglobina, el O<sub>2</sub> es extraído desde el eritrocito hasta la mioglobina, y de ahí a la citocromo oxidasa, donde se reduce a H<sub>2</sub>O.

### g) *Superóxido dismutasas*

Son un grupo de enzimas cuya función es la eliminación del anión radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> en eritrocitos, hepatocitos, etc. La reacción que llevan a cabo es la siguiente:<sup>5</sup>



#### I. *Cu,Zn-Superóxido dismutasa*

También llamada SOD1 (para diferenciarla de otras SOD que contienen manganeso), se trata de una metaloenzima protectora, situada en el citoplasma, muy abundante en los tejidos eucariotas, y con capacidad para dismutar el anión radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>.<sup>3</sup>

Una vez formado el peróxido de hidrógeno a través de la SOD1, éste es transformado en agua y oxígeno por catalasas, o bien lo reducen a agua a la vez que oxidan un sustrato orgánico en el caso de las peroxidasas, menos abundantes.<sup>3</sup> Aunque la dismutación no catalizada del anión superóxido es bastante rápida, la enzima SOD1 ejerce una función protectora, evitando reacciones de oxidación indeseadas.<sup>1</sup> Estudios recientes relacionan una mutación sin sentido del gen *sod1*, que codifica la Cu,Zn-SOD, con algunos tipos de ELA (esclerosis lateral amiotrófica). Aunque no se conoce con exactitud el motivo de la toxicidad producida por la enzima, parece que se debe a la pérdida de afinidad con el cobre del centro activo. Esto provocaría una modificación en la actividad enzimática, aumentando los niveles del anión superóxido, que produce daño oxidativo.<sup>3, 4, 6</sup>

Cu,Zn-SOD es una metaloproteína homodímera relativamente pequeña, con un ion cobre y un ion zinc en cada subunidad. La estructura de cada uno de los monómeros es de barril-β. El centro activo, con los dos cationes metálicos, se encuentra en una cavidad o canal que se estrecha hasta alcanzar un diámetro que puede contener pequeños sustratos cilíndricos, como el anión superóxido. Este canal

que lleva al centro activo contiene restos de aminoácidos cargados, que generan un gradiente de potencial que conduce el ion superóxido hacia el cobre.<sup>3,5</sup>

Cuando el centro catalítico se oxida, contiene el ion Cu(II) con una geometría de tetraedro aplastado y, por lo tanto, una estructura de cobre tipo 2. En su forma reducida, la estructura es plana trigonal distorsionada del cobre, manteniéndose la estructura de coordinación del cinc con una geometría tetraédrica casi regular.<sup>3,5</sup>

## II. *Otras superóxido dismutasas de cobre*

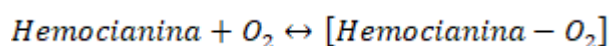
Dentro de esta familia de enzimas, y con esta misma función, encontramos subfamilias como eritrocupreína, cerebrocupreína y hepatocupreína, que son dismutasas localizadas en tejidos concretos del organismo, para así evitar los efectos tóxicos del anión radical  $O_2^-$  en el organismo completo.<sup>5</sup>

### *h) Transporte de oxígeno: Hemocianina*

Se trata de un tipo de proteínas extracelulares que contienen centros de cobre tipo 3, y que son responsables del transporte de oxígeno en moluscos y artrópodos, circulando por la hemolinfa en lugar de hacerlo dentro de células más especializadas, como en el caso de los mamíferos con la hemoglobina.<sup>3,5</sup>

Las hemocianinas de moluscos y artrópodos se parecen en función y características de los centros activos, pero se diferencian en estructura y en la secuencia de aminoácidos. En los artrópodos, las proteínas tienen seis subunidades con un centro binuclear de cobre tipo 3 por subunidad, que se unen en hexámeros que pueden asociarse llegando a formar moléculas de hasta 3.600 kDa. En el caso de los moluscos, las proteínas son cilíndricas, de entre 10 y 20 subunidades, cada una de las cuales contiene 7 u 8 centros de cobre tipo 3, llegando cada una de estas moléculas a tener hasta 160 unidades funcionales y una masa cercana a los 8 MDa.<sup>1,3,5</sup>

Este grupo de proteínas lleva a cabo una adición reversible de una molécula de oxígeno en cada una de las unidades funcionales con un centro binuclear activo de cobre. Esta adición supone un cambio de color de la hemocianina incolora a azul.<sup>1</sup> La molécula de oxígeno entra al centro activo a través de un canal que protege al cobre de sustratos diferentes. Tras el enlace del sustrato, Cu(I) se oxida a Cu(II) y la molécula de oxígeno se reduce a peróxido, siendo transportado de esta manera.<sup>3,5</sup>



A partir de diferentes estudios se vio que la hemocianina tiene formas oxiHc, metaHc y desoxiHc, con diferentes distancias entre los centros metálicos, lo que justifica la cooperatividad entre subunidades. La forma con mayor separación sería la forma T (tensa), mientras que la que tiene una

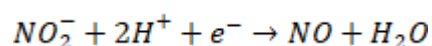
menor separación sería la forma R (relajada). Al unirse la molécula de oxígeno a la forma T, se reduce la distancia entre los centros de cobre, de manera que la metaloproteína adopta la forma R, que sería la oxiHc.<sup>3, 5</sup>

### *i) Funciones en el ciclo del nitrógeno*

El ciclo del nitrógeno implica la nitrificación y la desnitrificación. Tanto en el caso de la nitrito reductasa como en el del óxido nitroso reductasa, su papel tiene lugar en el proceso de desnitrificación, que permite la reducción de compuestos orgánicos nitrogenados presentes en el suelo, hasta llegar a nitrógeno gaseoso. Este es un proceso complejo que implica un gran número de enzimas presentes en organismos que tienen respiración anaerobia heterótrofa anóxica. Este proceso tiene un papel esencial para devolver a la atmósfera el nitrógeno fijado en los suelos.<sup>7</sup>

#### *I. Nitrito reductasa*

En esta enzima se encuentra un centro de cobre multinuclear, que contiene 4 átomos de cobre. Esta enzima ejerce su función dentro del proceso de desnitrificación (reducción del nitrato o nitrito) para obtener N<sub>2</sub>, más concretamente catalizando el proceso de reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO.

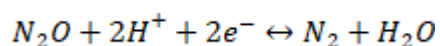


En este grupo de nitrito reductasas podemos encontrar unas que contienen grupos hemo y otras que contienen cobre. Las primeras son más abundantes en la naturaleza, aunque las de cobre están presentes en mayor cantidad de especies.

La enzima es trímera, con un centro de cobre multinuclear en cada subunidad. Dependiendo de la especie en la que se encuentre la enzima, tiene colores diferentes, entre verde y azul, lo cual se debe al centro de cobre tipo 1 que está incluido en el centro multinuclear.<sup>1</sup>

#### *II. Óxido nitroso reductasa*

Se trata de una enzima que consta de un centro de cobre binuclear, que participa en el último paso de la desnitrificación bacteriana. Esta reacción de reducción se lleva a cabo mediante la transferencia de dos electrones al óxido nitroso y la formación de nitrógeno gaseoso.



Esta enzima está localizada en el periplasma y contiene ocho átomos de cobre distribuidos en dos monómeros de unos 70 kDa cada uno.<sup>8</sup>

### **Metabolismo del cobre**

El cobre se encuentra en el ser humano en cantidades traza. Algunos alimentos en los que encontramos el cobre en cantidades importantes son los mariscos, crustáceos, hígado, carnes rojas,

lácteos, pescados, guisantes y lentejas.<sup>9</sup> Se absorbe tan solo un 25-60% de la cantidad ingerida, pudiendo ser esta absorción dificultada por algunos factores como puedan ser cadmio, fosfatos, fibra, bicarbonato cálcico o vitamina C presentes en alimentos, aunque sobre todo hay que destacar que los cereales, debido a su alto contenido en fitatos, inhiben la absorción intestinal de cobre.<sup>9</sup>

Los aportes considerados seguros y adecuados (mg), junto con los niveles de ingesta máxima tolerable (nivel máximo de ingesta de un nutriente que no genera efectos adversos) de cobre, según el *Institute of Medicine* de las Academias Nacionales de Estados Unidos y Canadá, son los indicados en la tabla que se muestra a continuación:<sup>11</sup>

Rangos de edad (años)	Niños		Varones y mujeres			Embarazo y lactancia	
	1-3	4-8	9-13	14-18	>19	<18	19-50
Aportes adecuados (mg/día)	0,7-1,0	1,0-1,5	1,5-2,5	1,5-3,0	1,5-3,0	1,5-3,0	1,5-3,0
Máximo tolerable (mg/día)	1,0	3,0	5,0	8,0	10,0	8,0	10,0

En cuanto a la exposición ambiental al cobre, las fuentes de origen industrial tienen lugar a partir de su empleo en industria electrónica y eléctrica, la fabricación de plaguicidas (sulfato de cobre) y aleaciones con otros metales. Las ostras son los mariscos que más acumulan cobre, siendo en general el pescado más sensible, aunque también encontramos mamíferos relativamente sensibles, como pueda ser la oveja. Sabiendo que las necesidades dietéticas de cobre se calculan aproximadamente en 0,05 mg/kg de peso, los niveles de ingesta máxima diaria admisible según el Comité FAO/OMS son de 0,5 mg/kg de peso corporal. En España, el límite para las aguas de consumo es de 2 mg/L, según el RD 140/2003, de 7 de febrero (BOE 21-02-2003).

### ***Homeostasis del cobre: Absorción, transporte y almacenamiento***

Como valor promedio, un adulto en buen estado de salud, de 70 kg de peso, tiene aproximadamente 110 mg de cobre (los valores oscilan entre 50 y 120 mg)<sup>9</sup>, distribuidos en el organismo de la siguiente manera (de mayor a menor cantidad): Hueso, músculos, hígado, cerebro, sangre, riñones y corazón.<sup>3</sup> También tenemos cantidades elevadas de cobre en la pigmentación del iris.<sup>5</sup>

La absorción del cobre de la dieta se produce en el estómago y el intestino delgado, entrando por difusión pasiva en la mucosa intestinal.<sup>2, 5</sup> Dentro de estas células mucosas encontramos una metalotioneína específica de cobre, a la que el metal se une una vez atraviesa las membranas. De todo el cobre aportado por la dieta, solo se absorbe una porción, entre el 25 y el 60%, dependiendo de algunos factores de la dieta, como la fibra, otros metales (zinc, molibdeno, hierro...),<sup>10, 11</sup> e

incluso la propia concentración de cobre presente en el intestino (a mayor concentración, menor fracción absorbida).<sup>2, 10</sup>

Una vez se ha absorbido el cobre en las células del intestino, aproximadamente el 90-95% se une a la ceruloplasmina para su transporte en plasma. El resto se une a otras proteínas, como son la albúmina y la transcupreína.<sup>2, 10</sup> Una pequeña parte también puede unirse a aminoácidos, como el complejo 1:2 cobre:histidina.<sup>3</sup> El cobre unido a proteínas transportadoras llega a través de la sangre hasta el hígado por la vena porta.<sup>2, 10</sup> Una vez llegado a los hepatocitos, el cobre es captado por metalotioneínas, de manera que se puede almacenar o incorporar a las cuproenzimas. Las reservas de cobre unido a metalotioneínas se almacenan en los lisosomas de los hepatocitos, para así evitar la toxicidad del metal libre ionizado. Cuando el organismo necesita acceder a estas reservas de cobre, éste es incorporado de nuevo a la ceruloplasmina, lo que le permite circular en plasma.<sup>10</sup>

El transporte de cobre durante todos estos procesos se lleva a cabo a partir de unas chaperonas cúpricas, además de las proteínas de Menkes, que son unas ATPasas cuprodependientes. El exceso de cobre es eliminado a través de la bilis y se excreta en las heces.<sup>2, 5, 10</sup>

La incorporación del cobre a las células implica la reducción a  $\text{Cu(I)}$ <sup>5</sup> mediante una reductasa de membrana, y su posterior asociación a la proteína Ctr1, que permite su transporte pasivo. La concentración de cobre que se encuentra libre en el citoplasma debe ser muy baja, de manera que no interfiera con algunos metabolitos esenciales que pueden sufrir reacciones redox. Para controlar las concentraciones de cobre libre tenemos las metalotioneínas en animales y las fitoquelatinas en plantas. Para poder incorporar el cobre libre en plasma a las apoenzimas o a los compartimentos celulares, son necesarias las chaperonas específicas, que acompañan al metal hasta su destino. Estas chaperonas facilitan la inserción del metal en la apoproteína mediante el acercamiento de las posiciones dadora y receptora de cobre, de manera que se reduce la energía necesaria para el proceso.<sup>3</sup>

## ***Desequilibrios patológicos relacionados con el metabolismo del cobre***

### ***a) Exceso***

La toxicidad por cobre suele ser accidental, tras la ingesta de soluciones de sales de cobre. Las dosis necesarias para llegar a alcanzar la toxicidad son elevadas, aunque su ingesta puede verse incrementada en caso de almacenar alimentos ácidos en recipientes de cobre, algo bastante improbable actualmente.

Los primeros síntomas de toxicidad se manifiestan con vómitos de color verde azulado, sabor metálico, dolor en la parte baja del estómago y diarrea, además de las interacciones con zinc y hierro,

dado que disminuye su absorción.<sup>9, 12</sup> Puede aparecer ictericia y hepatoesplenomegalia, debido al daño hepático y la hemólisis intravascular producida.<sup>12</sup> En casos graves puede llegar hasta insuficiencia renal, insuficiencia hepática y coma.<sup>10</sup> Una exposición más continuada puede llevar a una cirrosis, como ocurrió en la India debido al consumo de leche contaminada con cobre en niños.<sup>11</sup>

### **b) Defecto**

La carencia de cobre en la alimentación es poco frecuente, aunque se dan algunos casos en bebés prematuros alimentados con dietas lácteas, lactantes con problemas de malabsorción, lactantes alimentados desde el nacimiento exclusivamente con leche de vaca, lactantes con nutrición intravenosa no suplementada adecuadamente, uso de alimentos con alto contenido en hidratos de carbono refinados (con un alto contenido en fitatos)...<sup>1, 9, 12</sup> También podemos encontrar este déficit en el caso de algunas enfermedades con absorción deficiente y síndrome nefrótico,<sup>2</sup> así como en la enfermedad de Wilson tratada con grandes dosis de zinc, que interfiere en la absorción de cobre. En adultos podemos encontrarlo en el caso de nutrición parenteral no suplementada con micronutrientes, pérdidas abundantes de líquidos, diálisis crónica, disfunción renal y grandes quemados.<sup>9, 10, 12</sup>

El diagnóstico de la carencia de cobre suele establecerse por las bajas concentraciones séricas del metal, por debajo de los 65 µg/100 ml, y de la ceruloplasmina, por debajo de 20 mg/100 ml. Estas concentraciones pueden verse aumentadas en el embarazo o situaciones de estrés, ya que la ceruloplasmina es un reactivo de fase aguda y el 90% del cobre circulante está unido a esta proteína.<sup>10</sup>

Las primeras manifestaciones clínicas de la deficiencia de cobre son anemia refractaria al tratamiento con sales ferrosas, neutropenia y desmineralización ósea que no responde a la terapéutica con hierro.<sup>1, 9</sup> También se presentan otros signos clínicos como son palidez, disminución de la pigmentación de la piel y el pelo, venas prominentes, lesiones en la piel parecidas a la dermatitis seborreica, retraso en el crecimiento, diarrea y hepatoesplenomegalia.<sup>12</sup> Si se llega a un estado carencial que afecte al SNC, también podríamos observar hipotonía, falta de atención, retraso psicomotor, episodios de apnea y falta de respuesta visual.<sup>2, 12</sup>

### **c) Trastornos de origen genético relacionados con el metabolismo del cobre**

#### **I. Enfermedad de Wilson**

También llamada *degeneración hepato-lenticular*, la Enfermedad de Wilson (EW) es una alteración congénita autosómica recesiva, producida por una alteración del metabolismo del hepatocito, por el cual se produce una disminución de ceruloplasmina. Esto lleva a un acumulo progresivo de cobre en hígado, córnea, túbulos renales, cerebro, etc.,<sup>13</sup> ya que por el déficit de ceruloplasmina, se reduce la excreción biliar del metal.<sup>2, 15</sup>



La ceruloplasmina está codificada por el gen *ATP7B*, localizado en el cromosoma 13. De las posibles mutaciones que puede sufrir este gen, se han identificado más de 200 relacionadas con la EW.<sup>2, 14</sup> La mayor parte de los pacientes son heterocigotos compuestos, lo que implica que cada alelo contiene una mutación diferente.<sup>14</sup> De esta manera, la prevalencia de pacientes homocigotos con EW en el mundo es de 1 entre cada 30.000-100.000,<sup>13, 15</sup> siendo mayor esta cifra en zonas con mayor consanguinidad.<sup>13</sup>

En cuanto a la clínica, la presentación de la enfermedad tiene diversas variantes, pudiendo presentarse como una afección neurológica o hepática.<sup>14</sup> Lo más normal es que las primeras manifestaciones sean las hepáticas, seguidas a veces de cambios de conducta y, finalmente, la aparición de los síntomas neurológicos.<sup>13, 14</sup> El diagnóstico suele llevarse a cabo entre los 5 y los 25 años, aunque puede detectarse mucho más tarde.<sup>14</sup>

Si nos centramos más en las manifestaciones, podemos observar (en orden de mayor a menor frecuencia) que las alteraciones afectan a diferentes órganos:

- Hepáticas: Esteatosis, hepatitis, cirrosis, fallo hepático agudo
- Neurológicas: Disartria, temblor, discinesia, rigidez, ataxia
- Psiquiátricos: Irritabilidad, depresión, déficit cognitivo
- Oculares: Anillo de Kayser-Fleischer, cataratas en girasol
- Renales: Acidosis tubular renal, nefrolitiasis
- Hematológicas: Hemólisis
- Osteoarticulares: Osteomalacia, osteoporosis, artralgias<sup>14</sup>

Para el diagnóstico es necesario tener en cuenta diversos factores que puedan indicar la presencia de EW, como son el anillo de Kayser-Fleischer<sup>13</sup> (detectado mediante una lámpara de hendidura),<sup>14</sup> los niveles de ceruloplasmina bajos (<20 mg/dl),<sup>14, 15</sup> los niveles de excreción urinaria de cobre en 24 h<sup>13</sup> (>100 µg/24 h),<sup>14, 15</sup> además de este mismo dato tras la administración de D-penicilamina (niveles superiores a 1 mg/24 h)<sup>14</sup>. Una prueba más específica es la determinación de cobre en tejido hepático seco (>250 µg/g de tejido seco),<sup>13</sup> aunque puede tener un resultado falso positivo en caso de colestasis. Al ser una enfermedad genética, podríamos pensar que un estudio genético sería viable, pero el elevado número de mutaciones hacen que por el momento no sea una opción.<sup>14</sup>

El tratamiento de este trastorno se lleva a cabo mediante el empleo de diferentes sustancias, que se usan en función de la tolerancia del paciente y de las diversas situaciones clínicas:

- D-Penicilamina: Es el medicamento básico para el tratamiento de la EW.<sup>15</sup> Se toman 1-2 g/día en 4 dosis, 30 minutos antes de las comidas.<sup>13</sup> El cobre se moviliza de manera rápida, lo que permite la excreción del mismo, gracias a la formación de un compuesto de quelación excretable.<sup>2, 3, 10</sup>

- Trientina: Se utiliza en caso de intolerancia a la D-Penicilamina<sup>13</sup> (20% de los pacientes experimentan efectos secundarios). El mecanismo de acción y la dosis son iguales que la D-Penicilamina.<sup>2, 3, 10</sup>
- Zinc: Puede ser usado en monoterapia o junto con quelantes. Se administran 50-75 mg de acetato de zinc en 2 o 3 dosis, entre comidas.<sup>13</sup> Este medicamento permite mantener un balance negativo de cobre, ya que previene la absorción de cobre desde el intestino.<sup>2, 3, 10, 15</sup>

El tratamiento debe seguirse de manera vitalicia, ya que la falta de adherencia produce un empeoramiento rápido de la enfermedad hepática, que puede llevar a una hepatitis fulminante.<sup>14</sup> Además, el paciente debe llevar una dieta exenta de hígado y crustáceos, por ser los alimentos con mayor contenido en cobre.<sup>10, 14</sup> El último recurso en caso de daño hepático fulminante sería el trasplante hepático, que también se indica para pacientes con cirrosis en estado avanzado.<sup>13</sup>

## **II. Enfermedad de Menkes**

También llamada *enfermedad del cabello ensortijado*, la Enfermedad de Menkes (EM) es un trastorno del metabolismo caracterizado por anomalías en el metabolismo del cobre, producidas por una alteración en el transportador ATP7A. Presenta una herencia recesiva ligada al cromosoma X, con una incidencia de 1 entre 40.000-360.000 nacidos vivos, según la región.<sup>16</sup> Existen más de 150 mutaciones en el gen que codifica el transportador ATP7A que definen los diferentes fenotipos de la enfermedad.<sup>2, 16</sup>

En condiciones normales, la proteína ATP7A facilita la exocitosis del metal a sangre, eliminando el exceso a través de la bilis. En la EM, la mutación en el transportador hace que se acumule cobre en el citosol, mientras que en otros sitios aparece un déficit del metal.

Las manifestaciones clínicas de la EM son variadas y dependen del fenotipo de la misma, pudiendo encontrar 3 formas mayoritarias:<sup>16</sup>

- EM clásica: Los síntomas comienzan a los 2-3 meses de vida, con hipotermia, compromiso del neurodesarrollo, retardo en el crecimiento, hipopigmentación, cabello ensortijado y retardo cognoscitivo severo.<sup>16</sup> También presentan micrognatia con paladar hendido alto, síndrome convulsivo focal o generalizado, síndrome extrapiramidal, osteopatías y otros problemas asociados, como la hipercolesterolemia.<sup>2</sup> El pronóstico es malo, con una expectativa de vida hasta los 3 años sin tratamiento,<sup>15</sup> llegando a 4,6 años en el caso de un diagnóstico y tratamiento precoces.<sup>10</sup>

- EM leve, síndrome de Ehlers-Danlos tipo IX o síndrome de Cutis Laxa:<sup>2</sup> Cabello ensortijado, hiperlaxitud, habilidad intelectual límite, ataxia y disartria.<sup>16</sup>
- Síndrome del cuerno occipital: Compromiso neurológico menos severo o ausente, inteligencia normal o límite, hiperlaxitud, clavículas cortas, exostosis occipital y divertículos en la vejiga. Esta forma presenta algunas complicaciones asociadas, como pueden ser diarrea persistente, hernia inguinal, infección urinaria recurrente y aneurismas arteriales.<sup>16</sup>

El diagnóstico de la EM se basa en la sospecha clínica a partir de las manifestaciones que presenta el paciente. Para su confirmación se realizan pruebas de laboratorio, como la determinación de valores de cobre y de ceruloplasmina, ya que ambos se encontrarán disminuidos en caso de EM.<sup>16</sup> Estos análisis deben llevarse a cabo a partir de las 3 semanas de vida, ya que antes aún son detectables los niveles de cobre de la madre, que como hemos visto antes, son más elevados de lo normal.<sup>2, 16</sup> Esto no quita para que se pueda hacer un diagnóstico prenatal, ya que se puede llevar a cabo mediante un estudio de la captación de cobre en las células del líquido amniótico o en la vellosidad coriónica. Por otro lado, se pueden detectar niveles elevados de lactato en el LCR, producidos por el déficit de citocromo C oxidasa. Como en el caso de la EW, las pruebas genéticas son limitadas, debido al gran número de mutaciones posibles.<sup>16</sup>

En cuanto al tratamiento, debe tener 4 objetivos: Evitar la absorción intestinal, inicio temprano, asegurar la entrada de cobre al tejido cerebral y la disponibilidad de cobre para las funciones intracelulares.<sup>16</sup> Para ello, el tratamiento más utilizado es cobre-histidina,<sup>15</sup> de administración subcutánea en dosis de 50-150 µg/kg al día de por vida. También pueden tratarse las anomalías esqueléticas mediante el uso de pamidronato o fosfonatos,<sup>2</sup> aunque no tiene efecto sobre las anomalías nerviosas.

## CONCLUSIONES

Tras recabar toda esta información, podemos concluir que el cobre, desde su incorporación a los organismos vivos hace millones de años, ha supuesto un papel esencial en el funcionamiento de los mismos, gracias al papel que ejerce en multitud de enzimas.

También hemos podido ver que cualquier alteración en el metabolismo de este metal o en el funcionamiento de las cuproproteínas supone graves consecuencias a nivel del organismo humano, que tienen tratamiento hoy en día, pero no cura.

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Vallet M, Faus J, García-España E. *Introducción a la química bioinorgánica*. Madrid: Síntesis, D.L.; 2003. p. 207-228.
- <sup>2</sup> Mejía OR, Ruiz M, Clavijo D y cols. *Bases biológicas y patobiológicas humanas del metabolismo del cobre*. Universitas Medica [Internet]. 2006 [Consultado 28 Abr 2018]; 47(1): 55-72. Disponible en: <http://www.redalyc.org>.
- <sup>3</sup> Casas J. *Química bioinorgánica*. Madrid: Síntesis D.L.; 2002. p. 138-161.
- <sup>4</sup> Balboa S. *Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II derivados de  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Química Inorgánica, Santiago de Compostela; 2007. p. 35-38.
- <sup>5</sup> Baran E. *Química bioinorgánica*. Madrid: Mc Graw-Hill, D.L.; 1994. p. 107-120.
- <sup>6</sup> Angoa M, Rivas S. *Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?*. Arch Neurocienc (Mex) [Internet]. 2007 [Consultado 28 Abr 2018]; 12(1): 45-54. Disponible en: <http://www.medigraphic.com>.
- <sup>7</sup> Nogales J. *Caracterización molecular de la ruta de degradación de ácido gálico en Pseudomonas putida*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Madrid; 2009. p. 11.
- <sup>8</sup> Johnston EM, Dell'Acqua S, Ramos S, Pauleta SR, Moura L, Solomon E. *Determination of the Active Form of the Tetranuclear Copper Sulfur Cluster in Nitrous Oxide Reductase*. J Am Chem Soc [Internet]. 2014 [Consultado 31 Mar 2018]; 136(2): 614-617. Disponible en: <https://pubs.acs.org>.
- <sup>9</sup> Taboada N. *El zinc y el cobre: micronutrientes esenciales para la salud humana*. Acta méd centro [Internet]. 2017 [Consultado 28 Abr 2018]; 11(2): 79-89. Disponible en: <http://www.revactamedicacentro.sld.cu>.
- <sup>10</sup> De Luis DA, Bellido D, García PP. *Dietoterapia, nutrición clínica y metabolismo*. Madrid: Díaz de Santos; 2012. p. 371-380.
- <sup>11</sup> Mataix J. *Tratado de Nutrición y Alimentación*. 2ª ed. Barcelona: Océano/Ergon; 2009. p. 158, 352.
- <sup>12</sup> Hernández M, Sastre A. *Tratado de nutrición*. Madrid: Díaz de Santos; 1999. p. 237-238.
- <sup>13</sup> Duarte T. *Enfermedad de Wilson (Revisión Bibliográfica)*. Rev Med Cos Cen [Internet]. 2009 [Consultado 28 Abr 2018]; 67(590): 373-375. Disponible en: <http://www.medigraphic.com>
- <sup>14</sup> Bruguera M. *Enfermedad de Wilson*. Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2006 [Consultado 28 Abr 2018]; 29(1): 29-33. Disponible en: <http://www.elsevier.es>.
- <sup>15</sup> Baynes J, Dominiczak M. *Bioquímica médica*. 4ª ed. Madrid: Elsevier; 2015. p. 88, 405.
- <sup>16</sup> Londoño HL. *Enfermedad de Menkes*. MedUNAB [Internet]. 2011 [Consultado 28 Abr 2018]; 13(3): 169-172. Disponible en: <http://revistas.unab.edu.co>.