



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

ESTUDIOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE ENZIMAS NATURALES Y SINTÉTICAS

TESIS

Presentada al Posgrado en Ciencia de Materiales como requisito parcial
para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS DE MATERIALES

por:

ROCÍO SUGICH MIRANDA

Hermosillo, Sonora

Enero de 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vii
ABSTRACT	viii
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivo específicos	8
1 RECONOCIMIENTO MOLECULAR ENZIMÁTICO. Rol del residuo invariante de lisina en la unión de folatos a la timidilato sintasa (TS): Estudio de la interacción de antifolatos con la TS mutante K48Q por calorimetría de titulación isotérmica (ITC)...	10
1.1 Antecedentes.....	11
1.1.1 Propiedades de las enzimas.....	11
1.1.2 Estructura y función de la timidilato sintasa (TS).....	14
1.1.3 Mecanismo de reacción de la TS.....	16
1.1.4 Desarrollo de fármacos contra el cáncer: antifolatos como análogos del cofactor metiléntetrahydrofolato.....	20
1.1.5 Calorimetría de titulación isotérmica aplicada al estudio de los mecanismos de unión de ligantes y fármacos a enzimas.....	24
1.2 Experimental.....	29
1.2.1 Diseño Experimental.....	29
1.2.2 Materiales.....	35
1.2.3 Métodos.....	36
1.2.3.1 Determinaciones calorimétricas.....	36
1.3 Resultados y Discusión.....	37
1.3.1 Reconocimiento molecular de TS hacia PDDF y U89.....	37
1.3.1.1 Efecto de la mutación K48Q sobre la afinidad.....	41
1.3.2 Estequiometría de los complejos.....	42

1.3.3	Parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y $T\Delta S$ de la formación de los complejos enzima-dUMP-antifolato.....	43
1.4	Conclusiones.....	47
2	RECONOCIMIENTO MOLECULAR QUÍMICO. Propiedades biomiméticas de los complejos de cobre(II) de los ciclofanos PO y PC.....	49
2.1	Antecedentes.....	50
2.1.1	Sistemas modelo.....	50
2.1.2	Metaloenzimas.....	52
2.1.2.1	SOD como defensa celular antioxidante.....	56
2.1.3	Aspectos termodinámicos del funcionamiento del complejo enzima-metal... ..	58
2.1.3.1	Concepto de ácido-base duro-blando.....	58
2.1.3.2	Efecto quelato y serie de Irving-Williams.....	62
2.1.3.3	Valores de pK_a de ligantes coordinados.....	64
2.1.3.4	Variación de potenciales redox.....	66
2.1.3.5	Efectos biomacromoleculares.....	70
2.1.4	Complejos de cobre de macrociclos como modelos enzimáticos.....	71
2.1.4.1	Análogos de SOD.....	71
2.1.4.1.1	Mecanismo de la SOD.....	72
2.1.4.1.2	Propiedades químicas y físicas de los agentes miméticos de la SOD.....	74
2.1.4.2	Actividad antioxidante.....	79
2.1.4.2.1	Agentes antioxidantes naturales: ácido ascórbico.....	80
2.1.5	Técnicas experimentales empleadas comúnmente para medir actividad antioxidante.....	83
2.1.5.1	Técnica para medir actividad de SOD.....	84
2.1.5.2	Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC).....	85
2.2	Experimental.....	89
2.2.1	Diseño Experimental.....	89
2.2.2	Materiales.....	93
2.2.3	Métodos.....	94
2.2.3.1	Síntesis de los ciclofanos y sus complejos con Cu(II).....	94
2.2.3.2	Actividad mimética SOD.....	96
2.2.3.3	Actividad antioxidante: método TEAC.....	96

2.2.3.4	Ensayos de toxicidad celular.....	97
2.3	Resultados y discusión.....	98
2.3.1	Características estructurales de los complejos metálicos Cu ₂ PO y Cu ₂ PC..	98
2.3.2	Actividad mimética SOD.....	99
2.3.3	Capacidad antioxidante.....	102
2.3.4	Toxicidad celular.....	104
2.4	Conclusiones.....	106
	CONCLUSIONES GENERALES.....	108
	BIBLIOGRAFÍA.....	110
	ARTÍCULOS ANEXOS.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	6-sulfonato de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina
CH ₂ THF	Metilentetrahidrofolato
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Cu ₂ PO	Complejo de cobre del ciclofano PO
Cu ₂ PC	Complejo de cobre del ciclofano PC
DHFR	Dihidrofolato reductasa
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
IC ₅₀	Concentración requerida para inhibir en 50% la formación de nitroazul de formazán
ITC	Calorimetría de Titulación Isotérmica
K48Q	Enzima TS mutante
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PDDF	Propargyldideazafolato
PO	2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1]paraciclofano
PC	2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza[10.1.10.1]paraciclofano
SOD	Superóxido dismutasa
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes trolox
TS WT	Timidilato sintasa silvestre
U89	BW 1843 U89
5-FU	5-fluorouracilo
5NO ₂ dUMP	Nitrodeoxiuridina monofosfato

LISTA DE FIGURAS

1	Estructura de los ciclofanos PO y PC.....	7
1.1	Diagrama de energía libre de una reacción química.....	12
1.2	Representación de la estructura de un monómero de la TS.....	15
1.3	Esquema del modo de interacción entre el cofactor CH ₂ THF y TS silvestre en la estructura cristalina del complejo ternario con FdUMP.	17
1.4	Mecanismo de reacción de la TS.....	19
1.5	Estructuras de fármacos anticáncer: (a) Análogos al ácido fólico (antifolatos). (b) Análogos de las bases pirimidínicas.....	22
1.6	Titulación microcalorimétrica de Ca ²⁺ a celulosa a 33°C.....	26
1.7	Perfil de la energía de Gibbs ΔG , entalpía ΔH , entropía $T\Delta S$ y la constante de afinidad K_a con respecto al cambio de temperatura para un complejo macromolécula/sustrato.....	28
1.8	Estructura química del cofactor (CH ₂ THF), sustrato (dUMP) y producto (dTMP) de la reacción catalizada por TS	30
1.9	Análogos del cofactor CH ₂ THF.....	32
1.10	Estructura de algunos aminoácidos presentes en la vecindad del sitio activo de TS.....	34
1.11	Gráficas ITC de la unión de los antifolatos PDDF y U89 a la enzima timidilato sintasa silvestre (WT) en presencia de dUMP.....	39
1.12	Gráficas ITC de la unión de los antifolatos PDDF y U89 a la enzima timidilato sintasa mutante (K48Q) en presencia de dUMP.....	40
1.13	Representación de esferas y barras de la estructura cristalográfica de TS de <i>E. coli</i> en complejo ternario con dUMP y PDDF (CB3717) y TS-dUMP-U89 (1843U89).....	45
2.1	Ligantes orgánicos selectos y cofactores.....	61
2.2	Estructura del ácido etilendiaminotetraacético (H ₄ EDTA), un agente quelante y del complejo de EDTA con Co ³⁺	63
2.3	Balance del proceso oxidación-reducción en el cuerpo humano.....	81
2.4	Estructura de nitroazul de tetrazolio (NBT) y nitroazul de formazán.....	86
2.5	Proceso de oxidación del 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ABTS..	88
2.6	Esquema del sitio activo de la CuZnSOD.....	90

2.7	Estructuras de los complejos de cobre de los ciclofanos PO y PC probados en este trabajo como miméticos de SOD y como antioxidantes no enzimáticos....	92
2.8	Actividad mimética de SOD de Cu ₂ PO y Cu ₂ PC, como inhibidores de la formación de nitroazul de formazán.....	101
2.9	Capacidad antioxidante de los complejos de cobre Cu ₂ PO y Cu ₂ PC por el método TEAC.....	103
2.10	Toxicidad celular en células mononucleares en diferentes tiempos de post-tratamiento con cuatro concentraciones de Cu ₂ PO.	105

LISTA DE TABLAS

1.1	Datos termodinámicos de la unión de antifolatos a TS WT y K48Q de <i>E. coli</i> determinados por ITC. Los valores de ΔH , $T\Delta S$ y ΔG se dan en kJ mol^{-1}	38
2.1	Funciones biológicas de metales selectos.....	53
2.2	Funciones de algunas metaloenzimas.....	55
2.3	Clasificación ácido-base, duro-blando de iones metálicos y ligantes de importancia en química bioinorgánica.....	60
2.4	Valores de pK_a para algunos ligantes con y sin iones metálicos.....	65
2.5	Reacciones de hidrólisis de Fe(III), 25°C.....	67
2.6	Efecto del ligante sobre el potencial de reducción Cu(I)/Cu(II) en solución de DMF.....	68

ABSTRACT

Molecular recognition implies complementary lock-and-key type fit between molecules. The lock is the molecular receptor and the key is the substrate that is selectively recognized to give a defined receptor-substrate complex, a coordination compound or a supermolecule. Hence, molecular recognition along with fixation and coordination is one of the three tenets, that lay the foundation of the biological phenomena like enzymatic catalysis and supramolecular chemistry.

A good model to understand the molecular recognition mechanism in biological systems is the enzyme thymidylate synthase (TS). TS catalyzes the reductive methylation of deoxyuridine monophosphate (dUMP) using methylene tetrahydrofolate (CH_2THF) as cofactor. The cofactor glutamate tail forms a water-mediated hydrogen bond with an invariant lysine residue of this enzyme. To understand the role of this interaction, we determine the association constant of the K48Q mutant of *Escherichia coli* TS and folates by isothermal titration calorimetry which showed that binding was reduced by one order of magnitude for folate-like TS-inhibitors, such as propargylidiazafolate (PDDF) or BW 1843 U89 (U89). Thermodynamic binding studies indicated PDDF binding was dominated by enthalpic effects while U89 had an important entropic component. In conclusion, K48 is critical for catalysis since it leads to a productive CH_2THF binding.

Beside to help in understanding of the biological system, the study of molecular recognition at synthetic level contributes to development of new drugs.

From the supramolecular chemistry approach, we evaluated the bioactive properties of two well-studied cyclophanes 2,9, 25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1]paracyclophane and 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10, 24,27,30,33-octaaza[10.1.10.1]paracyclophane binuclear copper complexes (Cu_2PO and Cu_2PC , respectively). We evaluated using the TEAC assay, the antioxidant capacity and cytotoxicity on cultured cells, as well as the superoxide dismutase (SOD)-like activity of the copper complexes. Cu_2PO had an antioxidant capacity ($0.1 \text{ g eq TROLOX mol}^{-1}$) within the order of magnitude of ascorbic acid, and both Cu_2PO and Cu_2PC were inert to cultured peripheral blood mononuclear cells. The SOD-like activity of the compounds was evaluated using the nitroblue tetrazolium assay, Cu_2PO was an excellent activity with $\text{IC}_{50}=34 \text{ nM}$ vs. $\text{CuZn SOD IC}_{50} 17 \text{ nM}$ (Fernandes *et al.* 2007). The IC_{50} for Cu_2PC result higher than Cu_2PO ($\text{IC}_{50}=420 \text{ nM}$). These results suggest that application of synthetic binuclear macrocycles have a potential as synthetic bioactive molecules with applications in biomedicine.

RESUMEN

El reconocimiento molecular implica complementariedad y ajuste de tipo “llave y cerradura” entre moléculas. La cerradura es el receptor molecular y la llave es el sustrato que es reconocido y seleccionado para producir un receptor complejo-sustrato, un compuesto de coordinación o una supermolécula. De aquí que el reconocimiento molecular es uno de los tres pilares principales (la fijación, la coordinación y el reconocimiento) que constituyen la base de los fenómenos biológicos como la catálisis enzimática así como de lo que se conoce como química supramolecular.

Un buen modelo para el estudio de los mecanismos de reconocimiento molecular en los sistemas biológicos es la enzima timidilato sintasa (TS), esta cataliza la metilación reductiva de deoxiuridina monofosfato (dUMP) utilizando metileno tetrahidrofolato (CH_2THF) como cofactor en el que el grupo glutamato forma un puente de hidrógeno mediado por agua con el residuo invariante de lisina (K48) de esta enzima. Para entender el papel de esta interacción, hemos determinado la constante de asociación de la TS mutante K48Q de *Escherichia coli* con folatos por calorimetría de titulación isotérmica. Los resultados mostraron que la constante de asociación se reduce en un orden de magnitud en la unión de folatos, como los inhibidores de TS, tal como propargylidideazafolato (PDDF) o compuestos que distorsionan el sitio activo de TS como BW 1843 U89 (U89). Las determinaciones termodinámicas indican que la unión de PDDF es dominada por efectos entálpicos, mientras que U89 presenta una importante contribución

entrópica. En conclusión, lisina es fundamental para la catálisis, ya que conduce a una asociación productiva con CH₂THF.

Además de ayudar al entendimiento de los sistemas biológicos, el reconocimiento molecular a nivel sintético contribuye en el desarrollo de nuevos fármacos. En este trabajo se estudiaron dos complejos binucleares de Cu²⁺ de los ciclofanos 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1]paracyclophane y 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza[10.1.10.1]paracyclophane (Cu₂PO y Cu₂PC, respectivamente) evaluando su capacidad antioxidante, su citotoxicidad hacia células, así como la actividad imitadora de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Cu₂PO presentó una capacidad antioxidante (0,1 g eq Trolox mol⁻¹) en el orden de magnitud del ácido ascórbico y resultó inerte en cultivos de células mononucleares de sangre periférica. Se evaluó la actividad biomimética de SOD de los complejos con una excelente actividad para el caso de Cu₂PO, IC₅₀=34 nM vs CuZnSOD IC₅₀= 17 nM (Fernandes *et al.*, 2007). El valor de IC₅₀ obtenido para el complejo Cu₂PC fue más alto que para Cu₂PO (IC₅₀ = 420 nM). Estos resultados sugieren que la aplicación de macrociclos sintéticos binucleares tiene un gran potencial como moléculas bioactivas, con aplicaciones en biomedicina.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son los catalizadores de los sistemas biológicos y se caracterizan por tres importantes propiedades: incrementan grandemente las velocidades de reacción, tienen una elevada especificidad y pueden ser reguladas por diferentes metabolitos, los cuales aumentan o disminuyen su actividad de acuerdo a las necesidades del proceso (Dugas, 1996; Labádi, 2009).

En buena medida, estas propiedades se basan en el fenómeno de reconocimiento molecular, el cual se define como un proceso que implica la unión selectiva de un sustrato por un receptor con la finalidad de llevar a cabo una función específica (Lehn, 1985; Steed *et al.*, 2007).

El desarrollo de la teoría moderna de la catálisis enzimática y su relación con el concepto de reconocimiento molecular, sentó sus bases hace ya más de 100 años desde que Emil Fischer postuló su principio de la “llave y cerradura”. Posteriormente y basados en dicho principio, el concepto de reconocimiento molecular se convirtió en uno de los pilares fundamentales de la bioquímica y más recientemente de la química supramolecular (Dugas, 1996).

La propagación de todas las formas de vida depende del fenómeno de reconocimiento molecular. Además de su importancia en catálisis enzimática, este fenómeno juega un papel central en los sistemas biológicos, ya que es la base de la especificidad observada en los neurotransmisores, los receptores hormonales y las interacciones antígeno-anticuerpo (Breckenridge, 1991).

En ese sentido, una de las áreas de mayor desarrollo en la última parte del siglo XX fue el estudio de los mecanismos a través de los cuales los sistemas biológicos cumplen su función. Así se ha logrado establecer que un aspecto esencial en el reconocimiento molecular es la naturaleza específica de las interacciones entre uno o más sitios de una molécula con sitios específicos de otra molécula (Steed *et al.*, 2007). Para un efectivo reconocimiento una de las moléculas debe poseer una cavidad que reúna la forma y el tamaño de la estructura de la otra molécula y también, contener grupos de unión capaces de interaccionar con regiones complementarias de dicha molécula (Hamilton, 1990; Lehn, 1985; Steed *et al.*, 2007).

Ejemplo de lo anterior es la catálisis enzimática en donde el sustrato se une fuertemente al sitio activo de la enzima –que siempre es una cavidad en forma de bolsa o hendidura– mediante enlaces no covalentes, de tal manera que queda orientado de forma adecuada para que los sitios catalíticos converjan en forma bien definida con el sustrato; el número y arreglo de las interacciones no covalentes que se presentan entre el sitio activo del receptor y la molécula huésped definen en gran medida la alta selectividad mostrada por los sistemas enzimáticos (Dugas, 1996).

Uno de los sistemas enzimáticos más estudiados es el correspondiente a la enzima timidilato sintasa (TS), la cual en muchos organismos es la única enzima capaz de sintetizar *de novo* al nucleótido deoxitimidina monofosfato (dTMP), requerido para la síntesis del ADN. La cantidad de información sobre la estructura, función y mecanismo de la TS ha conducido al diseño de sustratos análogos que

inhiben la TS humana, lo cual detiene el crecimiento de células proliferativas incluyendo aquellas que provocan cáncer. Como consecuencia de estos avances, la TS es una de las enzimas objetivo para el desarrollo de fármacos anticáncer. Entre los fármacos comerciales más conocidos están el Tomudex (nombre comercial de los laboratorios Aztra Zeneca para el raltitrexed), utilizado como quimioterapia en cáncer colon-rectal (Widemann *et al.*, 1999; Jackman *et al.*, 1996) y el fluoruracil (5-FU) utilizado contra cáncer pancreático, cáncer colon-rectal y en algunos tipos de carcinomas en la piel (Papamichael, 1999).

Un aspecto crítico en la unión de los sustratos e inhibidores es el papel que desempeñan los aminoácidos invariantes en las enzimas, ya que su mutación disminuye la actividad catalítica. En la TS de *E. coli* uno de dichos residuos es lisina en la posición 48 de la secuencia de aminoácidos (K48), el cual tiene como función estabilizar la carga negativa del grupo glutamato terminal de su cofactor CH₂THF a través de un enlace de hidrógeno con una molécula de agua (Maley, 1982).

A fin de avanzar en el entendimiento de los mecanismos de reconocimiento molecular de las enzimas, en el presente trabajo se evaluó el rol que desempeña el aminoácido básico lisina (K48) – un residuo invariante no catalítico – en la unión a la enzima TS de los antifolatos PDDF y U89, los cuales son estructuralmente similares al cofactor natural de TS.

Para cumplir con el objetivo planteado en el párrafo anterior, se llevaron a cabo, mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), las determinaciones de

las constantes de asociación (K_a) y los parámetros termodinámicos energía libre de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), de la unión de los antifolatos con la enzima TS natural (WT) y su mutante (K48Q), en la cual el aminoácido básico lisina (K48) ha sido substituida por glutamina (Q), un aminoácido que no porta carga positiva en su cadena lateral.

Por otra parte, la comprensión de los procesos mediante los cuales se lleva a cabo el reconocimiento molecular ha permitido, además del conocimiento de los fenómenos bioquímicos, la obtención de una serie de nuevos materiales con aplicaciones potenciales de gran interés tanto a nivel académico como industrial. El desarrollo de sensores moleculares con sensibilidad sin precedente, de nuevos procedimientos analíticos y de diagnóstico, de fases selectivas para cromatografía de afinidad, de análogos enzimáticos para catálisis y de nuevos fármacos, son sólo algunos ejemplos de las perspectivas tecnológicas generadas a partir de las investigaciones sobre el reconocimiento molecular (Diederich, 1991; Lehn, 1985).

Generalmente se ha asumido que para llevar a cabo estos procesos se requiere del gran tamaño de las macromoléculas biológicas. Sin embargo, descubrimientos recientes han establecido que dichos procesos pueden ocurrir en moléculas mucho más pequeñas que son sintéticamente accesibles. Esto ha despertado el interés en el desarrollo de sistemas modelo, donde uno de los principales objetivos es reproducir en forma parcial o total el comportamiento químico de los fenómenos naturales (Dugas, 1996; Lippard *et al.*, 1994).

Una enzima para la cual se han presentado avances en el diseño de análogos sintéticos es la superóxido dismutasa (SOD). Esta es una metaloenzima que constituye la primera línea de defensa del cuerpo humano contra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) generado como parte del estrés oxidativo natural. La enzima actúa como un potente antioxidante que el organismo utiliza para balancear el proceso oxidación-reducción por la vía enzimática (Vaya *et al.*, 2001).

Los compuestos sintéticos imitadores de la superóxido dismutasa (biomiméticos de SOD) se han convertido en una nueva clase de fármacos potenciales para el tratamiento del estrés oxidativo relacionado con múltiples enfermedades, en infartos, así como en el envejecimiento y se ha demostrado en organismos inferiores que es un factor de longevidad. Entre estos agentes sintéticos, los complejos metálicos de ligantes macrocíclicos constituyen un grupo importante, debido principalmente a su alta estabilidad termodinámica (Ďuračková *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 2007; Riley, 1999).

La actividad como agente imitador de la enzima SOD depende, entre otros factores de la conformación del enlace metal-ligante en el complejo, ya que durante el proceso de dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno, el Cu(II) primero se reduce a Cu(I), para finalmente volver a Cu(II). El arreglo conformacional del metal debe ser lo suficientemente flexible para permitir estos cambios de estados de oxidación del cobre dentro del mismo ligante (Lippard *et al.*, 1994).

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado complejos metálicos de cobre(II) con receptores macrocíclicos tipo ciclofano (Inoue *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 1998). Estos poseen gran estabilidad y presentan un modo de coordinación similar a la observada en proteínas binucleares, tales como la superóxido dismutasa por lo que cuentan con potencial para funcionar adecuadamente como imitadores de esta enzima. Los complejos también tienen la capacidad de cambiar fácilmente la geometría de coordinación con el centro metálico dependiendo de las condiciones del medio en que se encuentren. Esta característica es importante ya que establece la posibilidad de permitir el cambio en el estado de oxidación del cobre, requisito necesario para imitar la actividad que realiza la enzima SOD (Lippard *et al.*, 1994).

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se estudió la capacidad para imitar a la SOD de los complejos de cobre(II) de dos ciclofanos previamente reportados, el 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1]paraciclofano (PO) y el 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza[10.1.10.1]paraciclofano (PC) (Figura 1) (Inoue *et al.*, 97). Así mismo y como una prueba complementaria, se midió la actividad antioxidante de los complejos y esta es comparada con la actividad del ácido ascórbico (Vitamina C), que es un antioxidante natural ampliamente conocido. En virtud del posible uso de estos complejos como fármacos o suplementos, se evaluó también su citotoxicidad.

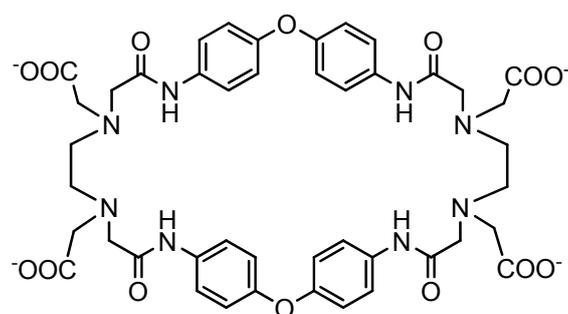
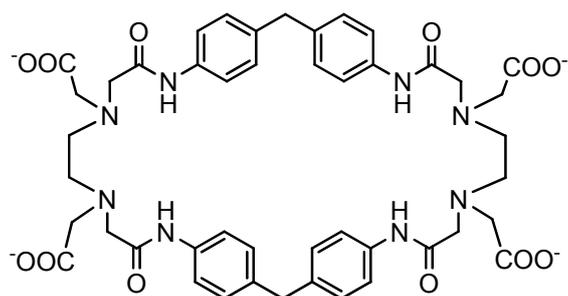
**PO****PC**

Figura 1. Estructura de los ciclofanos PO y PC.

HIPÓTESIS

El reconocimiento molecular de la enzima timidilato sintasa silvestre hacia antifolatos es afectado por la sustitución de lisina por glutamina en el sitio activo lo cual se refleja en los parámetros termodinámicos de la asociación.

Los complejos metálicos Cu_2PO y Cu_2PC poseen propiedades fisicoquímicas y estructurales que les proporcionan la capacidad para funcionar como agentes antioxidantes imitadores de la enzima superóxido dismutasa.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el proceso de reconocimiento molecular en sistemas enzimáticos naturales y sintéticos: Análisis del efecto de la unión de análogos del cofactor metilentetrahidrofolato (CH_2THF) sobre la actividad de la enzima timidilato sintasa (TS) y determinación de la capacidad de imitar a la enzima superóxido dismutasa (SOD) por los complejos de cobre(II) de los ciclofanos PO Y PC.

Objetivos específicos

1) Determinar mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), las constantes de asociación (K_a) y los parámetros termodinámicos de energía libre (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) de la unión entre las formas nativa (WT) y mutante (K48Q) de

la enzima timidilato sintasa (TS) de *E. coli* con los antifolatos 10-propargil-5,8-didezafolato (PDDF) y BW1843U89 (U89).

2) Establecer el efecto sobre el reconocimiento molecular de análogos del cofactor CH₂THF de la sustitución del residuo invariante de lisina en la posición 48 (K48) por glutamina en el sitio activo de la enzima TS de *E.coli*.

3) Determinar la actividad antioxidante y la actividad como enzimas sintéticas análogas de la SOD de los complejos de cobre(II) de los ciclofanos PO y PC.

4) Determinar la citotoxicidad de los complejos de cobre(II) de los ciclofanos PO y PC, para su potencial uso en aplicaciones terapéuticas.

CAPÍTULO 1

RECONOCIMIENTO MOLECULAR ENZIMÁTICO:

Rol del residuo invariante de lisina en la unión de folatos a la timidilato sintasa (TS) de *E. coli*: Estudio de la interacción de antifolatos con la TS mutante K48Q por calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Propiedades de las enzimas

En su sentido más amplio, una enzima es una proteína capaz de realizar una actividad catalítica. Más específicamente, puede definirse como un ensamble de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, plegados y capaces de catalizar reacciones químicas en su forma nativa. Se puede decir que es un copolímero sofisticado hecho de monómeros de aminoácidos de la misma configuración cuya estructura tridimensional está establecida por interacciones no covalentes (Dugas, 1996).

La función de un catalizador es la de proveer una vía de reacción diferente, en la cual el paso determinante de la velocidad de reacción presente una energía libre de activación más baja que la reacción sin catalizador (Figura 1.1).

La catálisis enzimática ocurre en una región específica de la enzima conocida como sitio activo o cavidad catalítica. El sitio activo consiste de aminoácidos que participan en el modo de unión y la especificidad hacia su sustrato, así como también de aminoácidos que están directamente involucrados con el proceso catalítico. Una parte integral del concepto del sitio activo es que solamente un pequeño número de aminoácidos en la enzima son responsables de su alta actividad catalítica. La sencilla teoría de la “llave y cerradura” de Emil Fischer, la cual asume inmovilidad, es apenas una primera aproximación para la unión del sustrato a la enzima (Dugas, 1996).

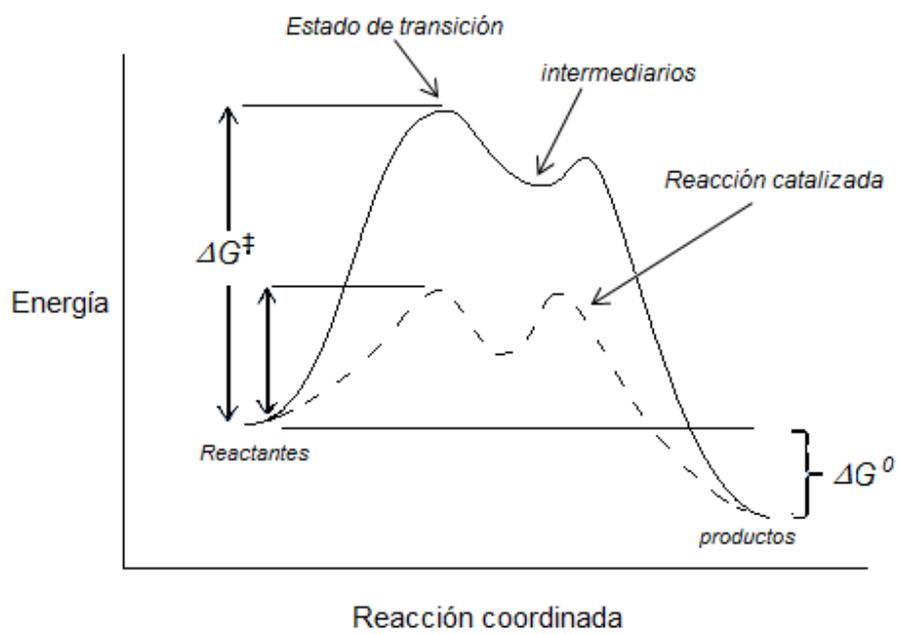


Figura 1.1. Diagrama de energía libre de una reacción química (Dugas, 1996).

Las excepcionales características de la catálisis enzimática es que la enzima une específicamente a su sustrato y la reacción toma lugar en los límites del complejo enzima-sustrato. Entonces, para entender cómo trabaja una enzima se debe conocer no solamente su estructura en estado nativo sino idealmente también las estructuras del complejo enzima-sustrato, del intermediario y del producto.

La eficiencia y selectividad presentadas por las enzimas tienen como base fundamental el concepto del fenómeno de reconocimiento molecular, el cual se define como un proceso que implica la unión selectiva de un sustrato por un receptor con la finalidad de llevar a cabo una función específica (Lehn, 1985).

Todas las formas de vida son dependientes del fenómeno de reconocimiento molecular, este desempeña un papel fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos, es la base de la especificidad observada en los neurotransmisores, los receptores hormonales y las interacciones antígeno-anticuerpo (Breckenridge, 1991).

En el caso de las enzimas, el número y arreglo de las interacciones no covalentes que se presentan entre el sitio activo y el sustrato, además de la complementariedad en forma y tamaño que exige un adecuado reconocimiento molecular, definen en gran medida la alta selectividad mostrada por estos sistemas; el sustrato se une fuertemente al sitio activo de la enzima mediante enlaces no covalentes de tal manera que queda orientado de forma adecuada

para que los sitios catalíticos converjan en forma bien definida con el sustrato (Dugas, 1996).

1.1.2 Estructura y función de la timidilato sintasa (TS)

La enzima timidilato sintasa (TS, E.C. 2.1.1.45) es uno de los pocos casos en que se tiene amplio conocimiento de su mecanismo enzimático y estructural a nivel molecular e incluso el modo de acción de algunos fármacos gracias a la aplicación de la investigación bioquímica, estructural y clínica. La TS es ubicua y es la única enzima capaz de sintetizar *de novo* al nucleótido 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP), requerido para la síntesis del ADN y su inhibición detiene la división celular (Finer-Moore *et al.*, 2003, Carreras *et al.* 1995; Sotelo-Mundo, 2001).

La estructura de la TS se ha determinado en diferentes especies: *E. coli*, *L. casei*, humano, fago T4, enzima bifuncional TS-DHFR de *Leshmania major*, *B. subtilis* y rata, entre otros. La TS es un homodímero obligatorio, ya que hay residuos de cada monómero que contribuyen al sitio activo del monómero opuesto. La interface entre los dímeros se constituye de cinco segmentos beta plegados (Figura 1.2). Tres de ellos se doblan en forma brusca (i, ii y iii) y forman una parte de la cavidad del sitio activo. Sobre de ellos se encuentran dos capas de alfa-hélices y lazos, empaquetados alrededor de una hélice alfa central (Figura 1.2) (Montfort *et al.*, 1990; Sotelo-Mundo, 2001).

Cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa. El sustrato 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) y el cofactor 5,10-metileno- 5,6,7,

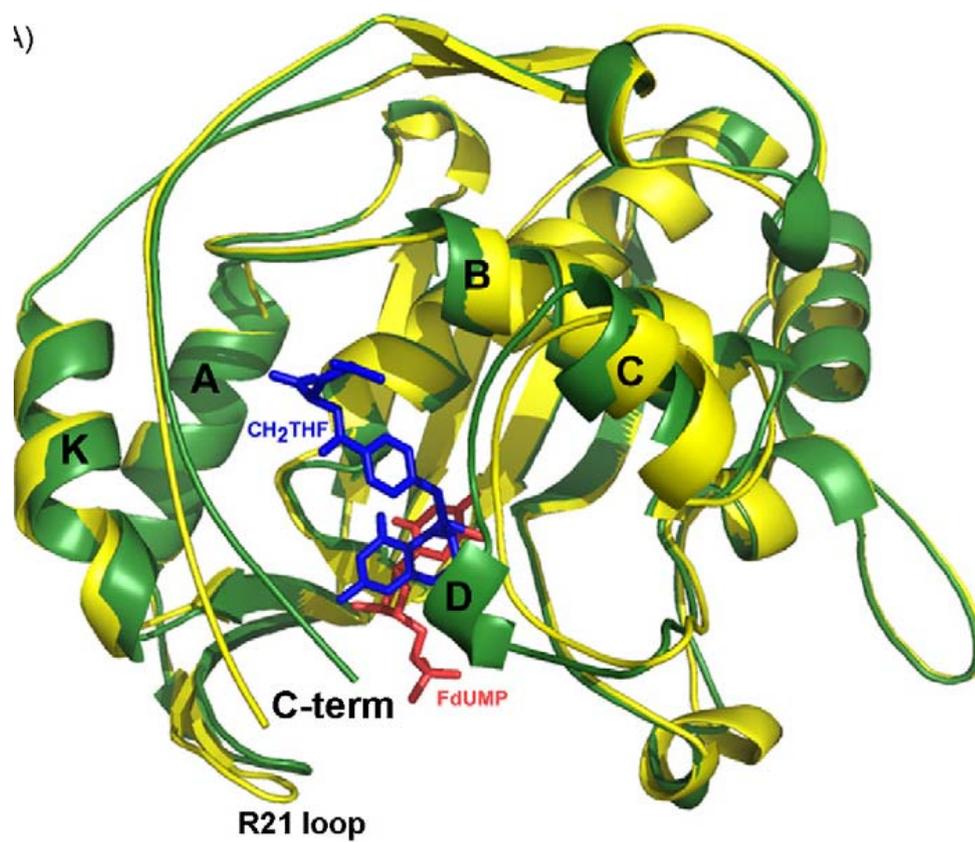


Figura 1.2. Representación de la estructura de un monómero de la TS (Montfort *et al.*, 1990; Sotelo-Mundo, 2001).

8-tetrahidrofolato (CH_2THF) están en contacto con 15 aminoácidos invariantes, mas dos argininas (R126' y R127'), del monómero opuesto que contactan al grupo fosfato del dUMP. El sitio de unión del dUMP está formado por siete aminoácidos invariantes, como se ha observado en el complejo binario con dUMP (Figura 1.3, nótese el puente de hidrógeno del agua entre el glutamato del CH_2THF y el aminoácido lisina en la posición 48 de TS silvestre). Dos aminoácidos mas, R21 y R127' forman puentes de hidrógeno con el grupo fosfato cuando se induce la conformación cerrada al unir CH_2THF .

En base a los argumentos discutidos en las secciones previas surge la pregunta ¿Cuan importantes son estos aminoácidos durante del reconocimiento molecular para la función de la TS? Una forma de investigar para responder a esta pregunta es realizar una mutación dirigida, sustituyendo un aminoácido por otro y entonces determinar las propiedades cinéticas y estructurales de la proteína mutante. Por ejemplo, la mutación de las cuatro argininas que están en contacto con el grupo fosfato del dUMP, por aminoácidos con cadena lateral neutra disminuye la eficiencia catalítica y en algunos casos produce una enzima mutante casi inactiva (Sotelo-Mundo, 2002).

1.1.3. Mecanismo de reacción de la TS.

El mecanismo de la conversión del dUMP en dTMP por acción de la TS se esquematiza en la Figura 1.4. Este se define en forma estricta como la metilación reductiva del dUMP por el cofactor CH_2THF para producir 7,8-dihidrofolato y dTMP. La producción de un mol de dTMP esta acoplada al consumo de un mol de CH_2THF .

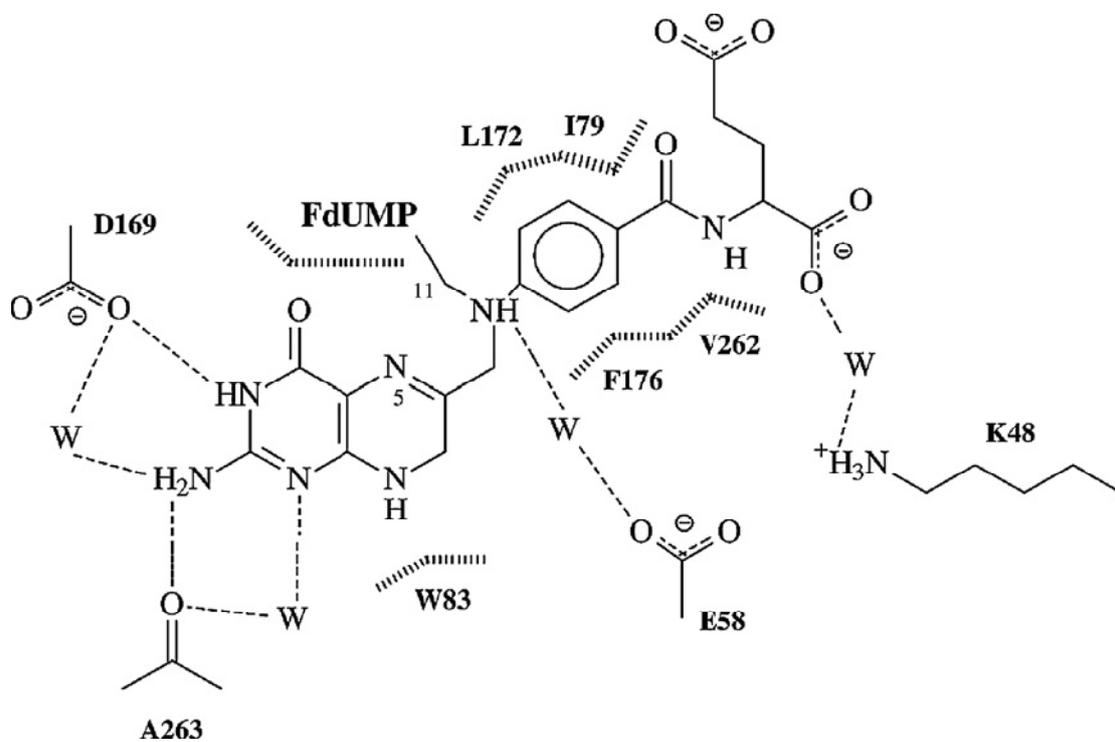


Figura 1.3. Esquema del modo de interacción entre el cofactor CH_2THF y TS silvestre en la estructura cristalina del complejo ternario con FdUMP. Las moléculas de agua se representan con la letra W, los puentes de hidrogeno se representan con líneas punteadas y las interacciones de van der Waals con líneas verticales en fila (Arvizu-Flores *et al.*, 2008).

La reacción es dependiente de la regeneración del folato por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la serinhidroximetilasa. De esa manera, la inhibición de alguna de esas dos enzimas también detiene la síntesis del ADN (Montfort *et al.*, 1990).

La reacción se inicia después de la formación reversible del complejo TS-dUMP-CH₂THF, cuando la cisteína catalítica (residuo C146) se ioniza a tiolato y ataca nucleofilicamente al C-6 del anillo pirimidínico del dUMP, formándose un enlace covalente transitorio, el reordenamiento de electrones resulta en el enol(ato), intermediario I de la Figura 1.4. Paralelamente, el C-11 (anillo imidazolino) del CH₂THF se abre y reacciona con la posición 5 del anillo pirimidínico, formándose un complejo covalente ternario (intermediario II). En este proceso se elimina un protón, seguido por una β-eliminación en el tetrahidrofolato (H₄folato) produciendo el intermediario III. La transferencia de un hidruro desde el H₄folato hacia el metileno exocíclico del intermediario III, un rearrreglo de electrones y la eliminación de la enzima producen el dTMP y dihidrofolato (Carreras *et al.*, 1995; Stroud *et al.*, 2003; Santi *et al.*, 1974).

Aunque únicamente la cisteína C146 está en contacto covalente con los reactantes, se ha postulado que los residuos en contacto con el dUMP y CH₂THF son importantes para unir los ligantes en forma productiva y además ambos participan tanto como ácidos y bases que extraen y donan protones durante el mecanismo de reacción (Carreras *et al.*, 1995).

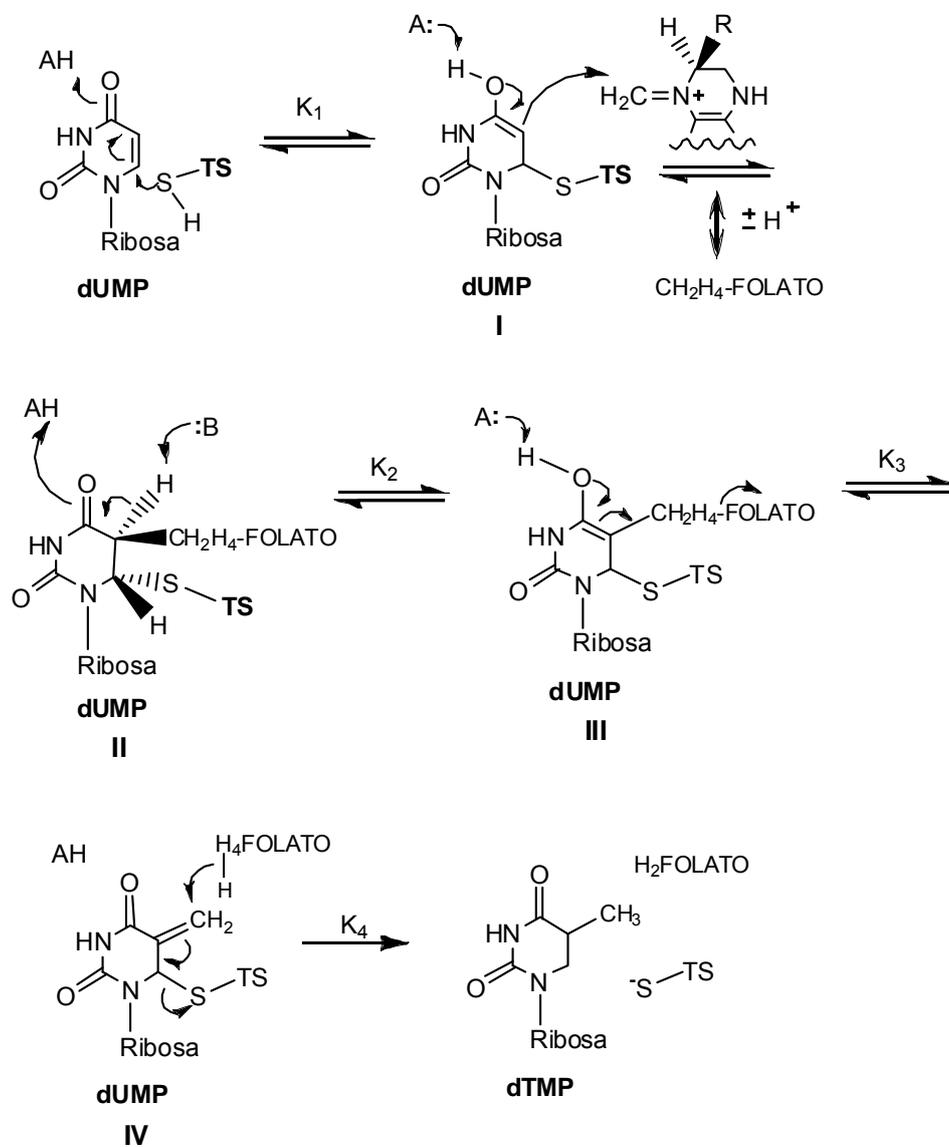


Figura 1.4. Mecanismo de reacción de la TS (Stroud *et al.*, 2003)

En resumen, los aminoácidos que forman el sitio activo de la TS son invariantes y la mutación de casi cualquiera de estos residuos resulta en una reducción de la afinidad por los ligantes, sugiriendo que la enzima ha evolucionado para mantener un ambiente óptimo y preciso para la catálisis.

1.1.4 Desarrollo de fármacos contra el cáncer: antifolatos como análogos del cofactor metiléntetrahidrofolato

Una de las estrategias utilizadas para el desarrollo de fármacos se basa en la inhibición enzimática. Los químicos han intentado optimizar las propiedades de los inhibidores enzimáticos a través de relaciones cuantitativas estructura-actividad en términos de factores estéricos, lipofílicos y electrónicos para su unión más eficiente al sitio activo de la enzima (Dugas, 1996).

Muchos compuestos poseen una estructura muy similar a la del sustrato de una enzima determinada, por lo que este podrá unirse pero no será transformado actuando como un inhibidor enzimático. Los inhibidores son básicamente de dos tipos: los inhibidores reversibles son aquellos que compiten por el sitio de unión del sustrato pero pueden ser removidos de la enzima fácilmente, lo que permite a la enzima recuperar su actividad; los inhibidores irreversibles no pueden ser removidos de la enzima y entonces su actividad no podrá ser restaurada.

El conocimiento del mecanismo mediante el cual se da el reconocimiento molecular enzima-sustrato y enzima-inhibidor ha permitido el desarrollo de fármacos para una gran cantidad de padecimientos y enfermedades; en particular inhibidores de la TS humana, se han probado como fármacos anticáncer (Chu *et al.*, 2003; Sotelo-Mundo, 2001).

El cáncer se caracteriza por la existencia de células que han perdido la regulación de su proliferación. Las células en división celular son muy dependientes de un suministro abundante de folatos reducidos, que son fundamentales para la formación de nucleótidos, mismos que son necesarios para la síntesis y reparación del ADN. Esta vulnerabilidad ha sido explotada en el ámbito de la investigación contra el cáncer, y los antifolatos representan una de las clases más ampliamente investigadas de agentes antineoplásicos (Kamen, 1997; Tesei *et al.*, 2002).

El objetivo final de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa, mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y/o farmacológicos. En este último apartado, los distintos fármacos pueden clasificarse en función de su mecanismo de acción sobre el ciclo celular. Entre los diferentes tipos de fármacos se encuentran los antimetabolitos, estos actúan en la fase de síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de ADN y ARN. Dentro de este grupo se encuentran los análogos al ácido fólico (antifolatos) y los análogos de las bases pirimidínicas (Danenberg *et al.*, 1974).

Entre los antifolatos, el más utilizado es el metotrexato (Figura 1.5) que se comporta como un inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Otro análogo del ácido fólico es el raltitrexed (Tomudex®, Figura 1.5), antifolato derivado del ácido glutámico que inhibe a la timidilato sintasa. Entre los análogos de las bases pirimidínicas se encuentran el 5-fluorouracilo (5-FU), el FdUMP y el 5-NO₂dUMP (Figura 1.5) (Sotelo-Mundo, 2001; Tsavaris *et al.*, 2002).

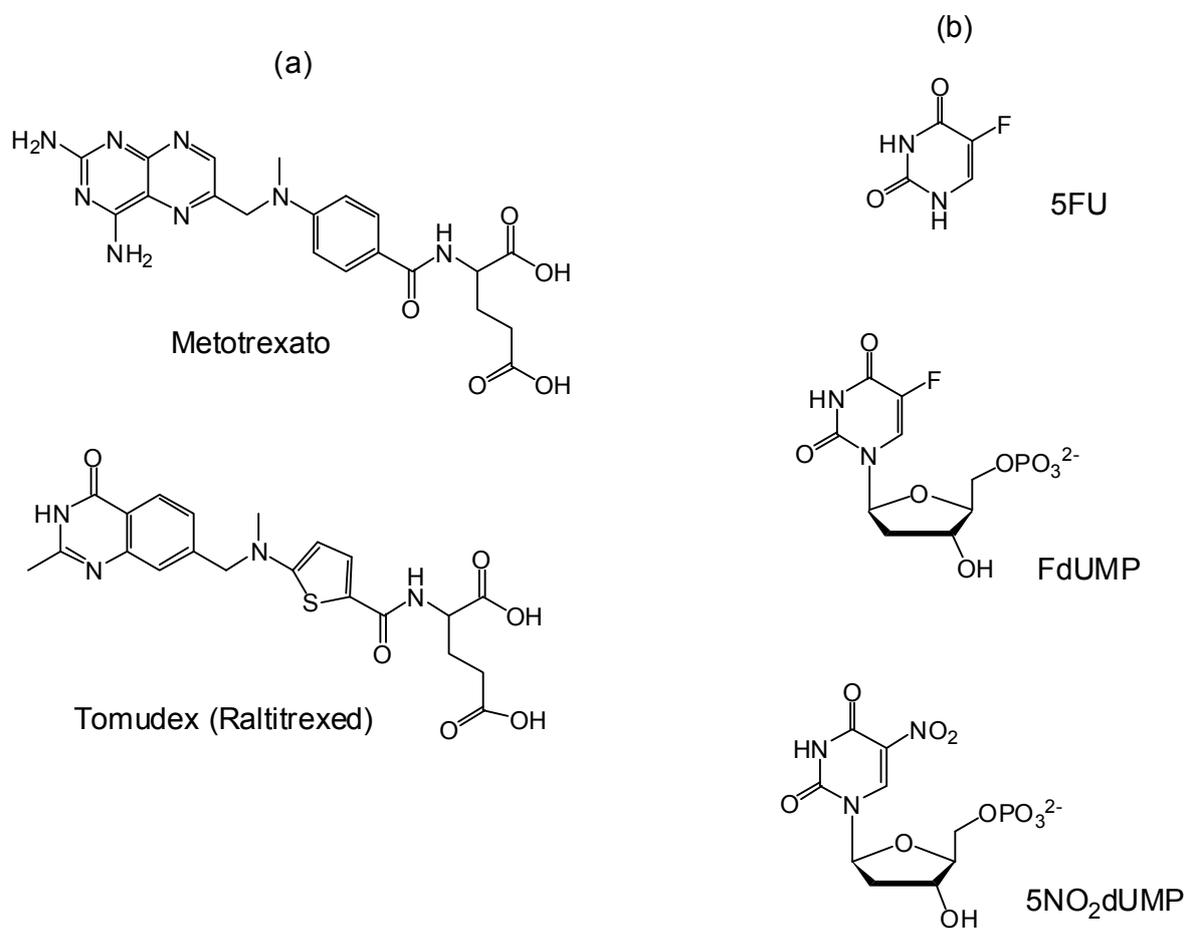


Figura 1.5. Estructuras de fármacos anticáncer: (a) Análogos al ácido fólico (antifolatos) (b) Análogos de las bases pirimidínicas.

Existe un gran interés de aplicar el conocimiento básico del mecanismo de la inhibición enzimática mediante antifolatos en terapias genéticas. Estudios *in vitro* han mostrado la posibilidad de producir células progenitoras de médula humana transformadas con un gen de TS resistente a antifolatos. Estas células mutantes son capaces de crecer en elevadas concentraciones de antifolato y continuar produciendo suficiente dTMP para mantener el requerimiento celular. Se propone trasplantar estas células transformadas de regreso al paciente canceroso con el fin de aumentar su tolerancia a altas concentraciones del fármaco sin verse afectado su sistema inmunológico por daño a los leucocitos (Bertino, 1997).

El diseño de nuevos fármacos en base a los fundamentos del reconocimiento molecular, tiene mucho futuro. En particular, aun y cuando los avances en métodos computacionales para predecir la interacción ligante-proteína han mejorado significativamente, no han logrado sustituir la determinación estructural del complejo, debido a la complejidad de modelar dichas interacciones (Verlinde *et al.* 1994).

Es evidente que los estudios estructurales y mecanísticos son de gran utilidad en múltiples aplicaciones biotecnológicas, siendo el estudio de la estructura y función de la TS un claro ejemplo (Arvizu-Flores *et al.*, 2008; Montfort *et al.*, 1990; Sotelo-Mundo, 2001; Weichsel *et al.*, 1995).

1.1.5 Calorimetría de titulación isotérmica aplicada al estudio de los mecanismos de unión de ligantes y fármacos a enzimas.

El reconocimiento molecular es la base de todo proceso biológico, desde la catálisis enzimática hasta la transducción de señales, incluyendo la intervención farmacéutica en tales procesos para el tratamiento de enfermedades (Klebe, 2000; Turnbull *et al.*, 2003).

El estudio de estos procesos puede seguirse mediante varias técnicas experimentales, algunas de estas, como la diálisis y la ultracentrifugación, se basan en la determinación directa de diferentes especies presentes en el sistema (macromolécula libre, huésped libre y complejo macromolécula-huésped). Otras técnicas, como las espectroscópicas y calorimétricas, miden una señal que es proporcional al avance de la reacción. Debido a razones prácticas, entre las que destacan principalmente cantidad de muestra y tiempo requerido, el segundo grupo constituye la preferida en laboratorios biofísicos y bioquímicos (Velázquez-Campoy *et al.*, 2005).

Particularmente, la calorimetría entró en su época de oro a principios de los años noventa, cuando debido a los avances tecnológicos y metodológicos, fue posible la medición de pequeñas cantidades de calor asociadas a interacciones no covalentes entre las moléculas biológicas (Schmidtchen, 2007).

La calorimetría mide directamente el flujo de calor asociado a un proceso que, a presión constante, es igual al cambio de entalpía ΔH . Debido a razones de sensibilidad y de exactitud, los calorímetros usados para la caracterización de

procesos de asociación pertenecen a la categoría de calorímetros de titulación por compensación dinámica de energía los cuales operan a temperatura constante (calorímetro de titulación isotérmica, ITC) (Holdgate, 2001).

El éxito de la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se basa en dos aspectos prácticos: (1) cualquier interacción receptor–sustrato libera o absorbe calor; (2) permite la determinación simultánea en un solo experimento de los cambios de energía libre (ΔG), entalpía (ΔH), entropía (ΔS), la constante de asociación (K_a) y la estequiometría (n) del complejo receptor–sustrato, a una temperatura fija. El valor de la constante de asociación (o afinidad de la unión), K_a gobierna el equilibrio, es decir, la partición entre las diferentes especies (libres y asociadas). El cambio en la composición del sistema dentro de la celda de reacción del instrumento, después de cada inyección del sustrato, desplaza el equilibrio y el reacomodo de la población dando lugar a la formación del complejo. El sistema pasará por diferentes estados de equilibrio, difiriendo en su composición según como proceda la secuencia de las inyecciones. El calor asociado a cada inyección es proporcional al incremento de concentración del complejo (avance de la reacción) y se calcula integrando el área debajo de la señal medida (equivalente a la cantidad de calor provista para mantener la misma temperatura en la celda de referencia y en la de muestra, por unidad de tiempo) (Schmidtchen, 2007).

Al final del experimento, se alcanza la saturación de la macromolécula. En la Figura 1.6 se muestra una gráfica de ITC típica que representa la unión de Ca^{2+} a moléculas de celulosa; la gráfica superior muestra los pulsos apuntando hacia

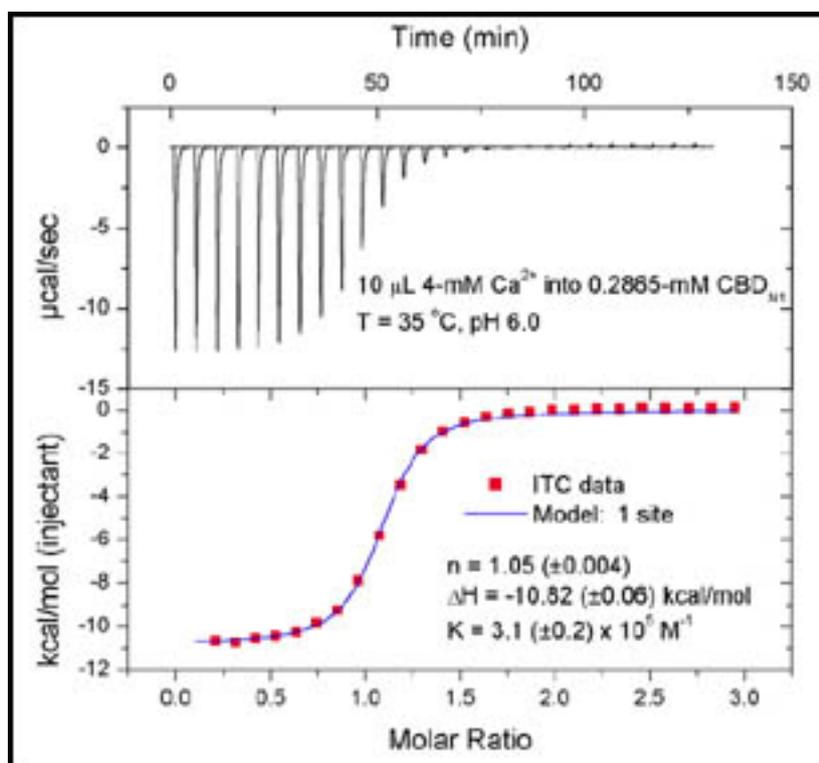


Figura 1.6 Titulación microcalorimétrica de Ca^{2+} a celulosa a 33°C . Los picos hacia abajo en la gráfica superior indican un sistema exotérmico. Los datos obtenidos en este experimento son $n=1.05$, $\Delta H=-10.82$ kcal/mol y $K_a=3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Fuente: Centre for calorimetry Services. www.michaelsmith.ubc.ca/services/Calorimetry/

abajo que indican la disminución de la energía necesaria para regresar a cero la diferencia de temperatura que se generó por la reacción contra el tiempo, mientras que en la parte inferior se presenta la integral de los pulsos de calor graficados contra la relación molar (moles de inyectante/moles del contenido de la celda). Aplicando regresión no lineal con el modelo apropiado en el proceso de análisis de información, es posible calcular la constante de asociación K_a , la entalpía de enlace ΔH , y la estequiometría, n en un solo experimento. Esto representa una gran ventaja sobre las técnicas espectroscópicas, ya que en estas la realización de un solo experimento únicamente permite determinar la constante de asociación, requiriendo experimentos adicionales para estimar ΔH .

Cuando se usan técnicas espectroscópicas, es necesario realizar experimentos a diferentes temperaturas para estimar la entalpía de asociación en base a la dependencia de temperatura de la constante de asociación que muestra la ecuación de van't Hoff (Ec. 1.1) (Velazquez-Campoy *et al.*, 2005).

$$\ln K_{asoc} = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Ec. 1.1}$$

Este enfoque presenta dos desventajas principales para las técnicas espectroscópicas. Primero, por razones prácticas en la medición de la constante de asociación, no siempre es posible cubrir un amplio rango de temperaturas. Segundo, aunque la entalpía y la entropía son fuertemente dependientes de la temperatura, la dependencia de la energía de Gibbs usualmente es débil sobre el rango accesible experimentalmente (Figura 1.7) (Schmidtchen, 2007).

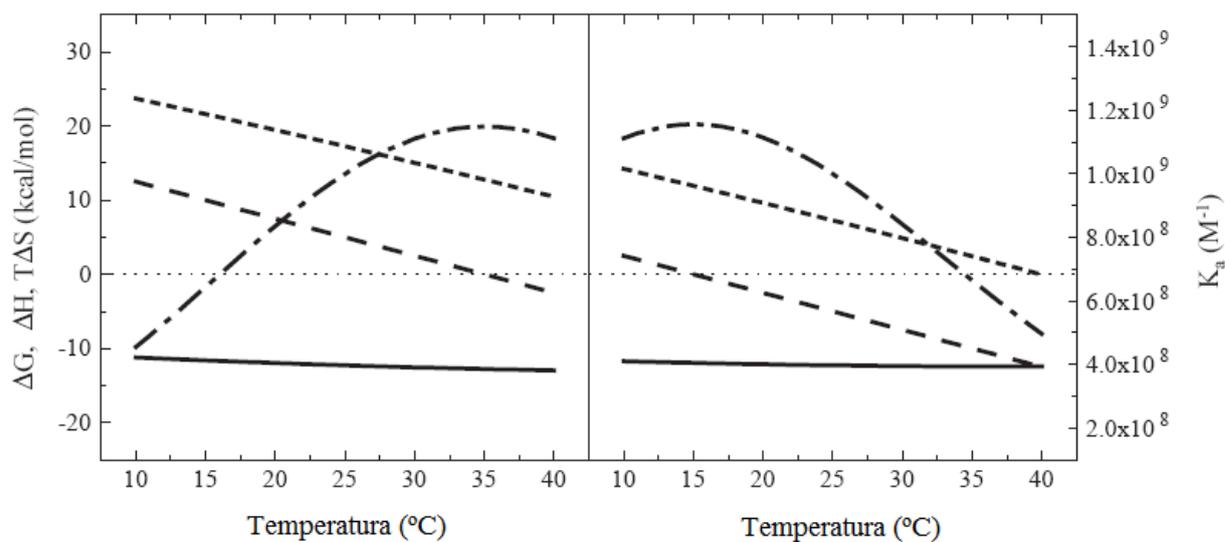


Figura 1.7. Perfil de la energía de Gibbs ΔG (línea sólida), entalpía ΔH (línea rayada) entropía $T\Delta S$ (línea punteada) y la constante de afinidad K_a (línea rayada-punteada) con respecto al cambio de temperatura para un complejo macromolécula/sustrato caracterizado como sigue: (izquierda) $K_a(25^\circ\text{C})=10^9\text{M}^{-1}$, $\Delta H(25^\circ\text{C})=5$ kcal/mol, $\Delta C_p= -5\text{kcal/K}\cdot\text{mol}$; (derecha) $K_a(25^\circ\text{C})=10^9\text{M}^{-1}$, $\Delta H(25^\circ\text{C})=-5\text{kcal/mol}$, $\Delta C_p=-5\text{kcal/K}\cdot\text{mol}$ (Velazquez-Campoy *et al.*, 2005).

Por otra parte el hecho de que el calor es una señal universal también tiene como consecuencia la debilidad de la técnica de ITC: no proporciona información directa sobre el mecanismo del proceso de formación del complejo supramolecular a nivel molecular. Así mismo se debe tener extremo cuidado en la preparación de muestras, la conducción de experimentos, el análisis de información y la discusión de resultados, ya que cualquier proceso de generación de calor adicional (calor de dilución, calor de protonación-desprotonación, entre otros) contribuirá a los datos experimentales de salida.

1.2 Experimental

1.2.1 Diseño Experimental

Las investigaciones para el desarrollo de fármacos antiproliferativos basadas en inhibición enzimática han conducido a la selección de algunas enzimas blanco como la dihidrofolato reductasa (inhibida por metotrexato) y la serina hidroximetiltransferasa, enzima involucrada en el metabolismo folato (Huennekens, 1994; Kimura *et al.*, 2004).

Otra enzima es la timidilato sintasa (TS), esta es la tercer enzima en el ciclo del metilentetrahidrofolato que cataliza la metilación reductiva de la 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) usando 5,10-metileno-5,6,7,8-tetrahidrofolato (CH₂THF) como cofactor (Figura 1.8) (Carreras *et al.*, 1995). Existe un particular interés en la enzima TS ya que en muchos organismos, representa la única fuente *de novo* de dTMP requerido para la síntesis del ADN (Finer-Moore *et al.*, 2003). Además, la TS se ha establecido como un modelo importante en estudios de reconocimiento molecular para el

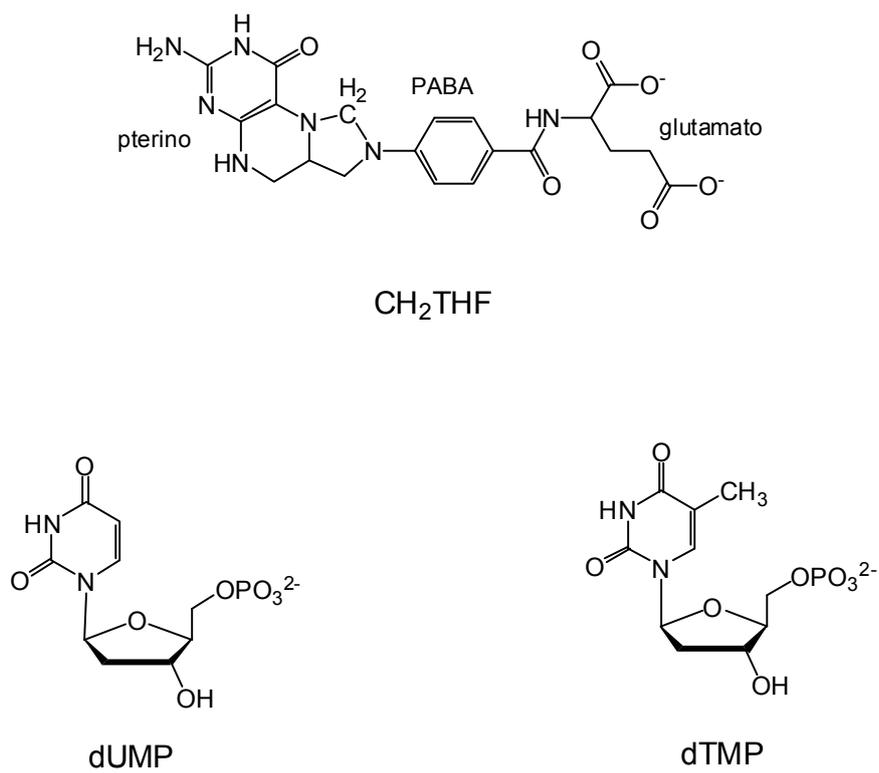


Figura 1.8 Estructura química del cofactor (CH₂THF), sustrato (dUMP) y producto (dTMP) de la reacción catalizada por TS (Arvizu-Flores *et al.*, 2008).

entendimiento de la relación estructura-función y como un prototipo para el diseño estructural de fármacos contra varias enfermedades proliferativas como cáncer así como algunas infecciones bacterianas y parasitismo (Stout *et al.*, 1999).

En general, los aminoácidos invariantes son críticos para la función de una enzima y su mutación resulta en una actividad catalítica reducida (Finer-Moore *et al.*, 2003). Uno de tales residuos en TS es lisina (K48), el cual es de tipo no catalítico que estabiliza la carga negativa del glutamato terminal de CH₂THF mediante un puente de hidrógeno mediado con agua (Maley *et al.*, 1982; Montfort *et al.*, 1990) (Ver Figura 1.3).

Esta interacción fue observada en la estructura cristalina del complejo ternario covalente de TS silvestre (TS WT) con FdUMP y CH₂THF (Hyatt *et al.*, 1997) indicando que K48 es esencial para la unión de CH₂THF y sus análogos (Kamb *et al.*, 1992; Kamb *et al.*, 1992).

La búsqueda de estructuras análogas a CH₂THF para que funcionen como antifolatos condujo al 10-propargil-5,8-dideza-folato (PDDF, Figura 1.9), el cual se une a TS de manera similar al cofactor natural induciendo a un cambio conformacional que promueve el cierre del sitio activo (Maththews *et al.*, 1990; Montfort *et al.*, 1990). Otro antifolato es el BW1843U89 (U89, Figura 1.9), este es estructuralmente similar a PDDF pero más grande ya que tiene un anillo adicional unido al grupo quinazonilona y cuando se une a TS, se distorsiona el sitio activo y se une en una conformación completamente nueva, lo que al final, provoca la re-

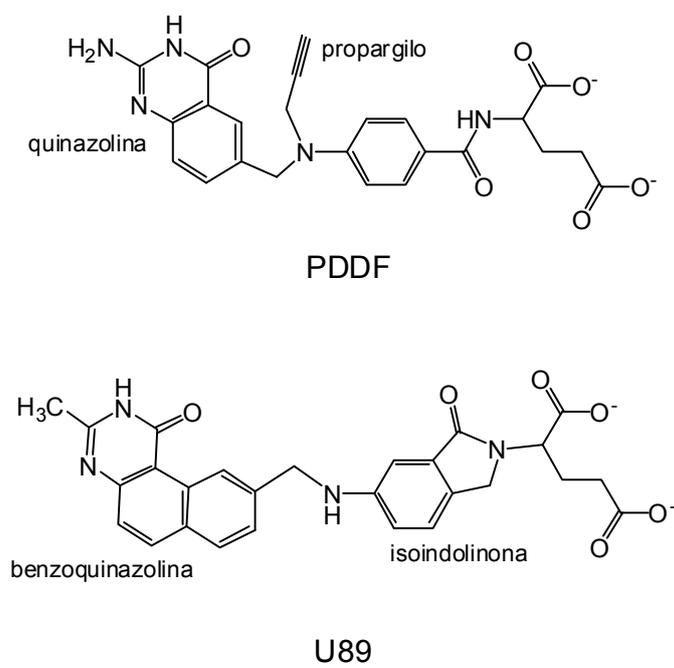


Figura 1.9 Análogos del cofactor CH₂THF.

ducción de tamaño de la cavidad del sitio activo (Weichsel *et al.*, 1995; Montfort *et al.*, 1990; Stout *et al.*, 1996).

Por otra parte, en estudios con la TS del bacteriófago T4 se observó que la mutación K48R (lisina sustituida por arginina, ambas de cadena lateral con carga positiva, ver Figura 1.10 para las estructuras de los residuos) hace decrecer la constante catalítica k_{cat} e incrementa K_m para el cofactor natural CH₂THF en dos órdenes de magnitud comparada con la forma silvestre de la enzima (WT) (LaPat-Polasko *et al.*, 1990).

La hipótesis en este trabajo es que la mutación de TS (TS K48Q), colocando glutamina en lugar de lisina (la cadena lateral de glutamina es polar sin carga neta, Figura 1.10) perjudica la unión de antifolatos estructuralmente similares al cofactor natural tales como PDDF y U89. El antifolato U89 no ha sido utilizado para la caracterización de especies mutantes de TS y dado que el grupo glutamato de U89 se encuentra alejado del sitio K48 (Weichsel *et al.*, 1995) podría ayudar para entender el papel de este residuo en el proceso de reconocimiento molecular.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se pretende contribuir al establecimiento del papel de lisina (K48) en el reconocimiento molecular de análogos del cofactor, para lo cual se estudiaron las interacciones entre TS WT y TS K48Q con los antifolatos PDDF y U89, mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

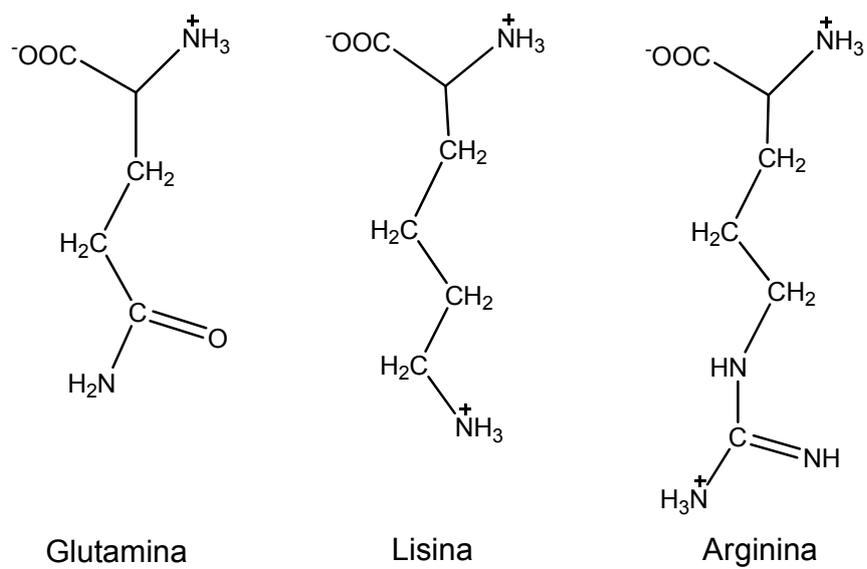


Figura 1.10. Estructura de algunos aminoácidos presentes en la vecindad del sitio activo de TS.

1.2.2 Materiales.

Los trabajos referentes al aislamiento y caracterización de las enzimas utilizadas fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Rogerio Sotelo del laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, AC. Hermosillo, Sonora.

Los antifolatos BW1843U89 (U89) y N(10)-propargilo-5,8-dideazafolato (PDDF) utilizados como huésped fueron proporcionados por el Dr. William Montfort del Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular de la Universidad de Arizona (Tucson AZ, EE. UU.).

Los siguientes reactivos y materiales se utilizaron para la preparación de todas las soluciones tal y como se adquirieron comercialmente:

1. Fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4 , ≥ 98 %. Sigma
2. Fosfato de potasio dibásico, K_2HPO_4 , ≥ 98 %. Sigma
3. Etilenglicol 99.5 %. Riedel-de-Haën
4. Dithiothreitol (DTT), 99 %. Sigma
5. 2'-Desoxiuridina-5'-monofosfato disodium salt (dUMP), 99 %. Chem Impex International.
6. Membranas para diálisis Spectra/Por. Spectrum Laboratories

1.2.3 Métodos

1.2.3.1 Determinaciones calorimétricas

Para los trabajos por ITC, las enzimas previamente purificadas utilizadas fueron dializadas contra buffer de fosfatos 20 mM pH=7.5 al cual se agregó etilenglicol al 10% y DTT 5 mM. Sin embargo el DTT se eliminó en el buffer final de la diálisis debido a que este provoca interferencias con las determinaciones calorimétricas.

Las mediciones en ITC se realizaron en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal Inc.). Las titulaciones calorimétricas se llevaron a cabo a 25°C con un complejo binario previamente equilibrado de 1 mg/mL de TS (WT o K48Q) y un exceso molar de 10 veces de dUMP en la celda del equipo. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 394 rpm y la reacción se monitoreó por duplicado mediante la adición de alícuotas de 8 μ L del antifolato al complejo en la celda. La concentración de antifolato (PDDF o U89) en la jeringa fue de 0.333 mM en buffer de fosfato más dUMP con el fin de evitar la dilución del nucleótido.

Los experimentos se dejaron correr hasta obtener un exceso de tres veces la cantidad molar de antifolato en la celda. Los datos del proceso de unión se analizaron utilizando el software Origin versión 7.0 adaptado para MicroCal promediando los datos de las titulaciones duplicadas para el cálculo de las constantes y los parámetros termodinámicos.

1.3 Resultados y Discusión

Los valores de las constantes de disociación, estequiometría y datos termodinámicos obtenidos para los cuatro sistemas estudiados: TS WT y TS K48Q con los antifolatos PDDF y U89 se presentan en la Tabla 1.1. Estos datos se obtuvieron por el ajuste no lineal de las gráficas obtenidas a partir de las titulaciones calorimétricas y se muestran en las Figuras 1.11 y 1.12.

1.3.1 Reconocimiento molecular de TS hacia PDDF y U89.

La primera observación relevante es que la constante de asociación para la formación del complejo ternario TSWT- dUMP-U89 ($K_a = 20 \mu\text{M}^{-1}$) es mayor que la constante de asociación del complejo TSWT-dUMP-PDDF ($K_a = 3 \mu\text{M}^{-1}$), por lo que U89 forma un complejo más estable con TS WT que el complejo formado con PDDF. Los valores de K_a obtenidos por ITC son similares a los reportados previamente, obtenidos mediante diálisis de equilibrio (Dev *et al.*, 1994), siendo los de ITC mucho más confiables e informativos.

Los valores de K_a de los complejos formados por la enzima mutante K48Q con U89 y PDDF son aproximadamente dos órdenes de magnitud menores respecto a TS WT, datos que son indicativos de que la mutación conlleva a una disminución en la afinidad de la enzima TS hacia ambos folatos, pero siempre con mayor afinidad hacia U89.

Tabla 1.1. Datos termodinámicos de la unión de antifolatos a TS WT y K48Q de *E. coli* determinados por ITC. Los valores de ΔH , $T\Delta S$ y ΔG se dan en kJ mol^{-1} .

Enzima- Sustrato	Antifolato	ΔH	$T\Delta S$	ΔG	K_a (μM^{-1})	K_d (μM)	N
WT-dUMP	U89	- 37.26	4.19	- 41.62	20.00	0.05	0.9
K48Q-dUMP	U89	- 39.36	-11.30	- 30.23	0.20	5.00	2.0
WT-dUMP	PDDF	- 83.32	- 46.31	- 36.93	3.03	0.33	1.2
K48Q-dUMP	PDDF	- 90.43	- 65.27	- 25.00	0.02	42.70	1.3

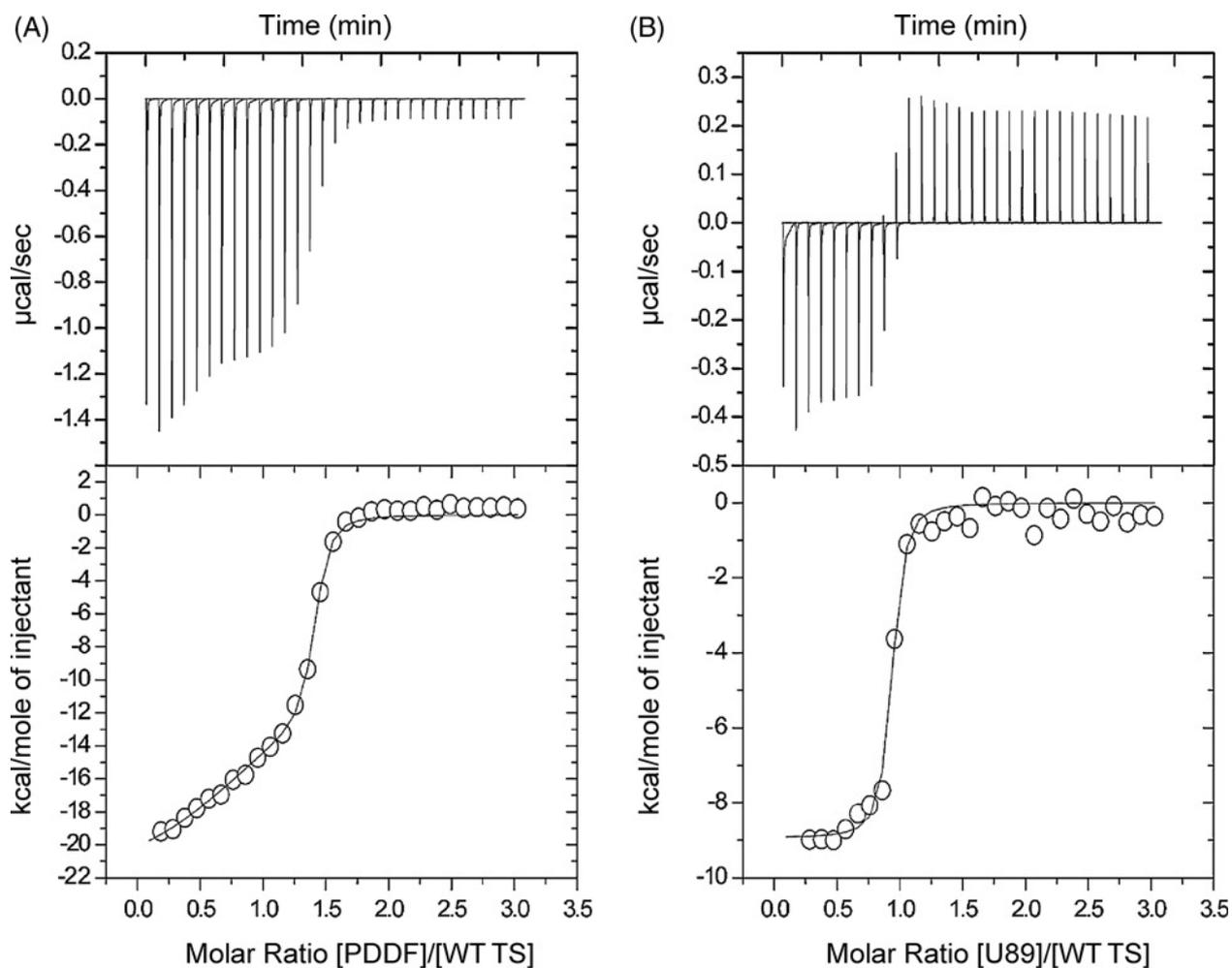


Figura 1.11 Gráficas ITC de la unión de los antifolatos (A) PDDF y (B) U89 a la enzima timidilato sintasa silvestre (WT) en presencia de dUMP en buffer de fosfato de potasio (20 mM, pH=7.5), etilenglicol (10%) y dUMP (166.6 μ M) a 25°C. La concentración de proteína en la celda fue de 1 mg/mL. La concentración de antifolato en la jeringa fue de 0.333 mM

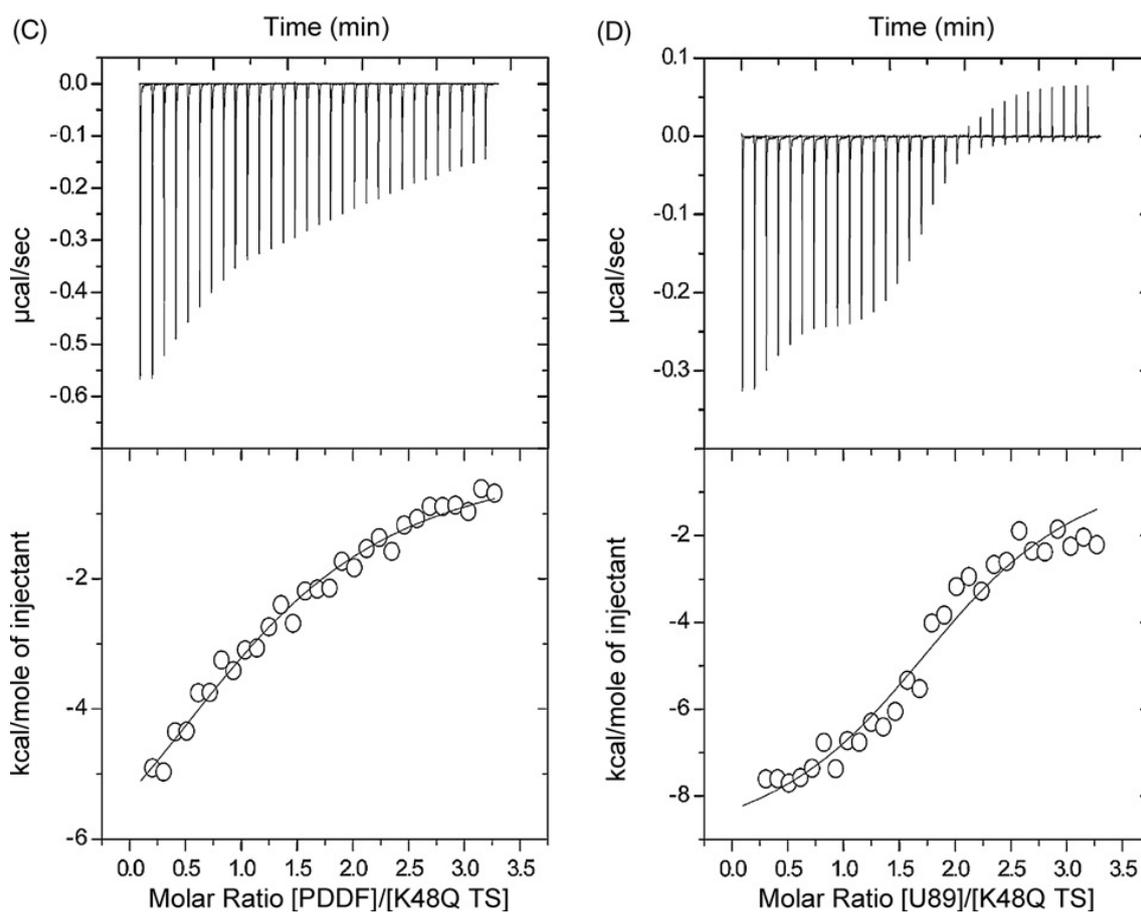


Figura 1.12. Gráficas ITC de la unión de los antifolatos (A) PDDF y (B) U89 a la enzima timidilato sintasa mutante (K48Q) en presencia de dUMP en buffer de fosfato de potasio (20 mM, pH=7.5), etilenglicol (10%) y dUMP (166.6 μM) a 25°C. La concentración de proteína en la celda fue de 1 mg/mL. La concentración de antifolato en la jeringa fue de 0.333 mM

1.3.1.1 Efecto de la mutación K48Q sobre la afinidad

Para explicar estas observaciones, debemos considerar que lisina (K48) forma parte de una red de enlaces de hidrógeno, en la cual la carga positiva de la cadena lateral de lisina funciona como ancla electrostática que posiciona en el sitio activo al grupo glutamato del folato, mediante enlace de hidrógeno con una molécula de agua (figura 1.8) (Maley *et al.*, 1982; Montfort *et al.*, 1990). Al substituir lisina por glutamina, la polaridad de la cadena lateral de glutamina en K48Q no es suficiente para la formación del puente del hidrógeno, mediado por una molécula de agua, con la carga negativa de la fracción glutamato del folato, como lo hace lisina con su carga neta positiva. En estas circunstancias, la mutación en la TS altera severamente la unión del cofactor como CH₂THF o antifolatos como el PDDF.

Las investigaciones complementarias a este trabajo, realizadas en colaboración del DIPM, CIAD y Universidad de Arizona, utilizando las técnicas de fluorescencia, dicroísmo circular y difracción de rayos X (ver artículo anexo 1), sugieren que la unión de U89 no es totalmente dependiente del enlace de hidrógeno, mediado por una molécula de agua, con lisina (K48), ya que la forma de enlace es diferente a CH₂THF y PDDF. Los datos de cristalografía también revelan que en la estructura del complejo TSWT-dUMP-U89, la distancia entre lisina 48 y el glutamato de U89 es mayor a la de un puente de hidrógeno (2.7 Å) por lo que no se esperaba un gran efecto por la mutación en la constante de asociación. Sin embargo, como se indicó, hay una diferencia de dos órdenes de magnitud entre las constantes de afinidad por efecto de la mutación (20 vs. 0.02 μM^{-1}). Por tanto, existen cambios conformacionales en solución que evidencian el

papel crítico de la lisina 48, los cuales no se reflejan en la estructura cristalográfica. Por tanto, es aun más importante el complementar estudios estructurales con técnicas calorimétricas y espectroscópicas, donde las moléculas no están restringidas en sus conformaciones por el empaquetamiento cristalino, y se pueden estudiar las interacciones de manera más cercana a las que ocurren en la célula o en solución.

Por otra parte, la mutación no parece influir en la selectividad de la enzima hacia los folatos, pues tanto en TS WT como K48Q la preferencia por U89 respecto a PDDF es aproximadamente de la misma magnitud (6 veces mayor en TS WT y 8 veces en K48Q).

1.3.2 Estequiometría de los complejos.

Los valores de la estequiometría de cada complejo también dan información sobre el modo de unión de cada folato a TS. El primer caso en la Tabla 1.1 es el del complejo ternario TS WT-dUMP-U89 con valor de $n=0.9$, esto significa que el folato solamente ocupa un sitio activo de la enzima. Este resultado es interesante ya que como se indica en la sección de antecedentes, la enzima silvestre es un homodímero obligatorio debido a que en cada monómero hay residuos que contribuyen al sitio activo del monómero opuesto (Sotelo-Mundo, 2001), de modo que la ocupación de uno de los dos sitios habla de la asimetría del sitio activo de TS. Prácticamente se observó el mismo comportamiento para la unión de PDDF a las dos formas de la enzima con valores de n cercanos a 1.

Con respecto al número de sitios de unión, los estudios cristalográficos muestran ambos sitios ocupados por antifolatos, aunque hay ligeras diferencias estructurales, como la pérdida del puente de hidrógeno entre treonina 78 y el glutamato del U89 en uno de los sitios activos (Weichsel *et al.*, 1995). Considerando que las concentraciones saturantes usadas durante la cristalización de los complejos proteicos permiten observar diferencias estructurales, esto soporta la evidencia calorimétrica de la asimetría del dímero, donde un solo sitio activo es funcional a la vez.

En contraste, cuando se midió el sistema TS K48Q-dUMP-U89 se observó que este folato si se enlaza a los dos sitios activos de la enzima mutante ($n=2.0$). Probablemente esto se debe tanto a la ausencia de lisina como a la conformación diferente de TS cuando une a U89 (Montfort *et al.*, 1990; Stout *et al.*, 1996; Weichsel *et al.*, 1995). En otras palabras, lisina 48 podría estar mediando una asimetría funcional entre ambos monómeros, en la cual paradójicamente, la enzima es más activa cuando utiliza un sitio activo a la vez en el caso de la enzima silvestre (WT) que cuando esta mutada (K48Q), ya que por efecto de la mutación la constante catalítica k_{cat} se reduce en 430 veces, de acuerdo al trabajo realizado por Arvizu-Flores y cols. (ver artículo anexo 1).

1.3.3 Parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y $T\Delta S$ de la formación de los complejos enzima-dUMP-antifolato.

Los valores de las contribuciones entálpicas y entrópicas arrojadas por las titulaciones calorimétricas son considerablemente diferentes para la unión de los

antifolatos a TS silvestre y TS mutante. Esto confirma que existen diferencias en el modo de unión entre U89 y PDDF.

La formación del complejo TSWT-dUMP-U89 tiene contribuciones favorables tanto de la entalpía ($\Delta H = -37.26 \text{ kJ mol}^{-1}$), como de la entropía ($\Delta S = 4.19 \text{ kJ mol}^{-1}$) lo que se refleja en la mayor constante de asociación ($K_a = 20 \mu\text{M}^{-1}$) entre los sistemas estudiados. El valor del factor entrópico aunque pequeño es positivo, lo que sugiere la participación del efecto hidrofóbico en la estabilidad del complejo, posiblemente por la liberación de moléculas de agua de la interface del antifolato durante la complejación, tal como fue observado por calorimetría diferencial de barrido (Chen *et al.*, 1996) y consistente con los resultados estructurales con la enzima silvestre (WT) reportados anteriormente (Weichsel *et al.*, 1995).

La mayor afinidad de la unión de U89 vs. PDDF se puede explicar por el cambio conformacional producido por el U89. Mediante cristalografía de rayos X se ha demostrado que el grupo isoindolinona del U89, que es muy hidrofóbico, queda casi completamente oculto al solvente por el cambio conformacional inducido (Figura 1.13). Solo existe un pequeño costo entrópico al incrementarse la exposición al solvente acuoso del aminoácido hidrofóbico valina 77 (Weichsel *et al.*, 1995).

En contraste, la formación del complejo TSWT-dUMP-PDDF está dirigida por la entalpía ($\Delta H = -83.32 \text{ kJ mol}^{-1}$), situación que deriva de la formación de varios puentes de hidrógeno – tanto directos como mediados por agua - entre el folato y el sitio activo del sistema. El incremento del factor entálpico en el complejo

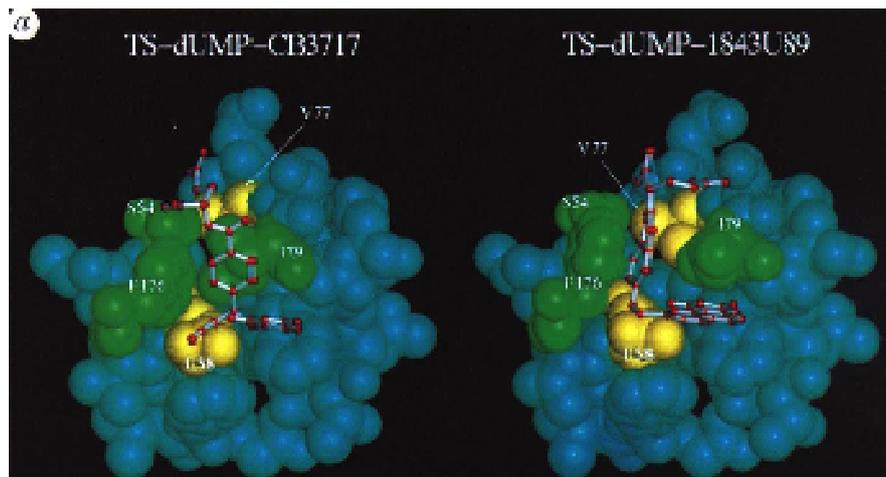


Figura 1.13 Representación de esferas y barras de la estructura cristalográfica de TS de *E. coli* en complejo ternario con dUMP y PDDF (CB3717) y TS-dUMP-U89 (1843U89). En color verde se representan los residuos que presentan mayor distorsión por el cambio de antifolato (serina 54, fenilalanina 176 e isoleucina 79). Los residuos expuestos son valina 77 y glutamato 58 (Weichsel *et al.*, 1995).

con PDDF respecto a U89, trae consigo una disminución del factor entrópico ($\Delta S = -46.31 \text{ kJ mol}^{-1}$) por el efecto de compensación entalpía-entropía, como usualmente se ha observado para muchas otras interacciones proteína-ligando (Cooper *et al.*, 2001).

Para la enzima mutante K48Q, se puede observar que las contribuciones entálpicas y entrópicas en la unión de ambos folatos son similares a aquellas de TS WT. En este caso la estabilidad del complejo se debe exclusivamente al factor entálpico en ambos complejos. Sin embargo, para el complejo K48Q-dUMP-U89, al igual que para TSWT-dUMP-U89, el factor entrópico también tiene un valor pequeño, aunque negativo. Este valor también puede indicar la participación del efecto hidrofóbico, que compensa en alguna medida el aumento en el orden del sistema debido a la formación del complejo ternario. De nueva cuenta podemos observar el efecto de compensación entalpía-entropía en la formación de los complejos de K48Q.

El análisis de los datos termodinámicos indica que la menor estabilidad de los complejos ternarios de K48Q se debe a un alto costo entrópico en la formación del complejo. De hecho, el cambio en entalpía es más favorable en ambos complejos de K48Q comparado con los complejos TS WT ($\Delta\Delta H = \Delta H_{K48Q} - \Delta H_{TSWT} = -2.10 \text{ kJ/mol}$ para U89 y -7.52 kJ/mol para PDDF), mientras que el cambio en entropía es fuertemente desfavorable ($\Delta(T\Delta S) = T\Delta S_{K48Q} - T\Delta S_{TSWT} = -15.49 \text{ kJ/mol}$ para U89 y -19.06 kJ/mol para PDDF).

Los valores negativos del término $\Delta(T\Delta S)$, atribuibles al cambio de lisina (K48) por glutamina en el sitio activo de la enzima mutante, pueden deberse a una o ambas de las siguientes razones: un mayor cambio conformacional de la enzima mutante K48Q respecto a TSWT durante la complejación de los folatos o bien, requerimientos más estrictos de orientación del sustrato en el sitio activo.

Cabe destacar que estos son los primeros experimentos realizados por calorimetría de titulación isotérmica sobre TS y antifolatos, por lo que los datos obtenidos se establecen como referencia para trabajos futuros sobre la unión de folatos a TS.

1.4 Conclusiones

Los valores de K_a obtenidos por ITC para los complejos ternarios TSWT-dUMP-U89, TSWT-dUMP-PDDF, K48Q-dUMP-U89 y K48Q-dUMP-PDDF indican que la mutación de la enzima TS a K48Q conlleva a una disminución en la afinidad de la enzima hacia ambos folatos aproximadamente en dos órdenes de magnitud. Es de destacar que los complejos ternarios con U89 son más estables que los complejos con PDDF, tanto con TSWT como con K48Q.

En contraste la mutación no afecta la selectividad de la enzima hacia los folatos, pues tanto en TS WT como K48Q la preferencia por U89 respecto a PDDF es aproximadamente de la misma magnitud: K_a 6 veces mayor para el complejo TS WT-dUMP-U89 en referencia a TS WT-dUMP-PDDF y K_a 8 veces mayor para los complejos ternarios con U89 en K48Q.

La estequiometría resultante para los complejos ternarios TS WT-dUMP-U89, TS WT-dUMP-PDDF y K48Q-dUMP-PDDF señalan que el folato solamente

ocupa un sitio activo de la enzima lo que habla de la asimetría del mismo. En cambio, en el sistema TS K48Q-dUMP-U89 el folato si se enlaza a los dos sitios activos de la enzima mutante ($n=2.0$).

Los valores de las contribuciones entálpicas y entrópicas para la unión de los antifolatos a TS silvestre y TS mutante son considerablemente diferentes, lo que confirma las diferencias en el modo de unión entre U89 y PDDF. La estabilidad de los cuatro sistemas estudiados se rige primordialmente por la entalpía. Sin embargo, en ambos complejos ternarios de U89 los valores del término entrópico ($\Delta S= 4.19 \text{ kJ mol}^{-1}$ para TS WT y -11.30 para K48Q) sugieren una participación importante del efecto hidrofóbico en la estabilidad del complejo.

De hecho, a pesar de que los valores de ΔH son más de 2 veces favorables para los complejos con PDDF, los complejos ternarios de U89 presentan una mayor estabilidad debido al factor entrópico.

La menor estabilidad termodinámica de los complejos ternarios de K48Q obedece a los valores negativos de $\Delta T\Delta S$, lo que significa un alto costo entrópico en la formación del complejo en referencia a los complejos de TS WT, atribuible a un mayor cambio conformacional de la enzima mutante K48Q respecto a TSWT durante la complejación de los folatos o bien, requerimientos más estrictos de orientación del sustrato en el sitio activo.

Los datos termodinámicos obtenidos para la unión de TS y los antifolatos PDDF y U89 se establecen como referencia para trabajos futuros, en virtud de ser los primeros obtenidos por calorimetría de titulación isotérmica.

Capítulo 2

RECONOCIMIENTO MOLECULAR QUÍMICO:

Propiedades biomiméticas de los complejos de cobre(II) de los ciclofanos PO y PC

2.1 Antecedentes

2.1.1 Sistemas modelo

Un modelo enzimático generalmente es una molécula orgánica sintética que posee una o más características presentes en un sistema enzimático, pero es más pequeño y estructuralmente más sencillo que una enzima. Consecuentemente, un modelo enzimático intenta imitar algunas funciones clave de una enzima pero en un nivel mucho más sencillo. La ventaja de lo anterior es que utilizando el modelo apropiado, se hace factible estimar la importancia relativa de cada parámetro catalítico en ausencia de todos aquellos, normalmente presentes en la enzima, que no están bajo consideración. Una ventaja muy notable del uso de estructuras artificiales para modelar una reacción enzimática es la posibilidad de manipular el compuesto de tal modo que permita el estudio de una propiedad específica (Dugas, 1996).

La química biomimética busca imitar la aceleración y selectividad características de las reacciones catalizadas por enzimas. En este campo se espera eventualmente hacer el puente, o por lo menos, reducir la brecha entre las complejas estructuras de biomoléculas y su función biológica exacta. En este sentido, se debe tener conocimiento de los factores relacionados con el mecanismo de acción de una enzima particular, entre los que se incluyen (a) la estructura del sitio activo, (b) la especificidad de la enzima y su capacidad de unir al sustrato y (c) la cinética para los diferentes pasos y posibles intermediarios de la reacción (Dugas, 1996).

Las enzimas son complicadas y solamente unos cuantos mecanismos han sido establecidos definitivamente. Este es uno de los motivos por los que los sistemas modelo son necesarios. Un modelo puede representar características generales para más de una enzima. Los requerimientos necesarios para el diseño de un buen modelo enzimático pueden resumirse en los siguientes cinco criterios (Dugas, 1996):

1. Ya que las interacciones no covalentes son la clave para la flexibilidad y especificidad biológica, el modelo debe proveer un buen sitio de unión para el sustrato.
2. El modelo debe ofrecer la posibilidad de formar puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas para auxiliar al sustrato a unirse de la manera apropiada.
3. Debe seleccionarse cuidadosamente como estarán situados los grupos catalíticos que llevarán a cabo la reacción.
4. La estructura debe ser rígida y bien definida, particularmente con respecto a la orientación del sustrato y su estereoquímica.
5. Por supuesto, el modelo debe ser preferiblemente soluble en agua y catalíticamente activo bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

Para que un modelo enzimático pueda operar, además de cumplir con los criterios ya mencionados, también tendrá que obedecer la cinética de Michaelis-Menten (comportamiento de saturación), incrementar la velocidad de reacción y mostrar catálisis bi- o multifuncional. Además es de vital importancia que sea capaz de estabilizar el estado de transición de la reacción; para cubrir este criterio,

se necesita un sistema en el que cualquier fluctuación geométrica que sufra el sustrato para alcanzar el estado de transición ocurra al mismo tiempo en que este se va transformando en el producto (Dugas, 1996).

En las secciones previas de este capítulo se apuntó que los compuestos macrocíclicos y sus complejos metálicos tienden a poseer cualidades idóneas para funcionar como modelos enzimáticos tales como su estabilidad termodinámica y costos de obtención más bajos en comparación con el de una enzima aislada (Marques *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007).

2.1.2 Metaloenzimas

Muchos procesos biológicos requieren de las propiedades redox que aportan los iones metálicos, incluyendo entre estos, la respiración, gran parte del metabolismo, la fijación de nitrógeno, fotosíntesis, transmisión nerviosa, contracción muscular, transducción de señales y protección contra agentes tóxicos y mutagénicos (Lippard *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1998).

A medida que se han descubierto sistemas que requieren de iones metálicos, se ha multiplicado el número de artículos de investigación en química bioinorgánica hasta el punto que lo que antes era una frontera en expansión ahora lo es en madurez (Dugas, 1996; Lippard *et al.*, 1994). Aunque la biología generalmente se asocia más con la química orgánica, los elementos inorgánicos son también esenciales en el proceso de la vida. La Tabla 2.1 lista los elementos inorgánicos esenciales además de algunos que desempeñan papeles importantes

Tabla 2.1 Funciones biológicas de metales selectos (Lippard *et al.*, 1994).

Metal	Función
Sodio	Acarreador de carga; balance osmótico
Potasio	Acarreador de carga; balance osmótico
Magnesio	Estructura; hidrolasa; isómerasa
Calcio	Estructura; función; acarreador de carga
Vanadio	Fijación de nitrógeno; oxidasa
Cromo	Desconocido, posiblemente involucrado en la tolerancia a la glucosa
Molibdeno	Fijación de nitrógeno; oxidasa; transferencia oxo
Tungsteno	Deshidrogenasa
Manganeso	Fotosíntesis; oxidasa; estructura
Hierro	Oxidasa; transporte y almacén de dioxígeno; transferencia de electrones; fijación de nitrógeno
Cobalto	Oxidasa; transferencia de grupos alquilo
Níquel	Hidrogenasa; hidrolasa
Cobre	Oxidasa; transporte de dioxígeno; transferencia de electrones
Zinc	Estructura; hidrolasa

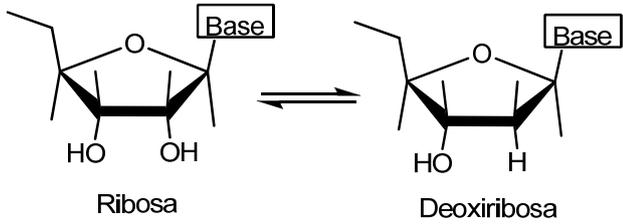
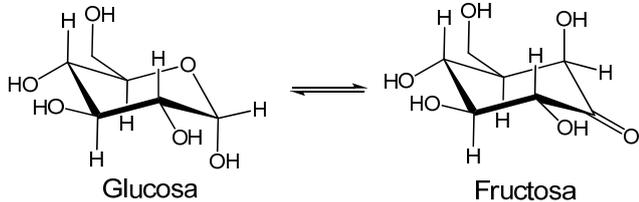
en biología. La química bioinorgánica estudia estas especies inorgánicas, con énfasis especial sobre cómo funcionan *in vivo*.

Los metales se encuentran comúnmente como constituyentes naturales de las proteínas. La naturaleza ha evolucionado para aprovechar las propiedades especiales de los procesos de la vida (Dugas, 1996; Lippard *et al.*, 1996). En este sentido, es interesante profundizar en el entendimiento cómo el centro metálico en una metaloenzima logra tener capacidades funcionales en la complejidad del ambiente proteico.

Las funciones de las metaloenzimas son variadas e incluyen fenómenos tan importantes como el transporte de oxígeno (respiración) y transferencia de electrones. La Tabla 2.2 resume muchas de las reacciones catalizadas por este grupo de macromoléculas, clasificadas en base a su función; para algunas de las transformaciones incluidas no existen moléculas orgánicas sintéticas pequeñas que funcionen como análogos bajo condiciones comparables (Lippard *et al.*, 1994).

Dentro de cada categoría por lo general existen diversos tipos de centros metálicos capaces de catalizar la transformación química necesaria. La razón de esta diversidad ha surgido de la historia evolutiva, pero más que nada incluye la biodisponibilidad de un elemento dado en la interface geosfera-biosfera durante el desarrollo inicial de la metaloenzima, así como la presión para que se dé la evolución de múltiples caminos bioquímicos para asegurar la viabilidad de las

Tabla 2.2. Funciones de algunas metaloenzimas (Lippard *et al.*, 1994).

Función	Enzima	Ejemplos Reacción
Enzimas hidrolíticas	Carboxipeptidasa	Remueve aminoácidos terminales de proteínas
	Anhidrasa carbónica	$\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$
	Fosfatasa alcalina	Hidrólisis de esteres de fosfatos
Metaloenzimas protectoras	Superóxido dismutasa	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
	Catalasa	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Deshidrogenasas	Alcohol deshidrogenasa hepática	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Química metal-nucleótido	Ribonucleótido reductasa	 <p style="text-align: center;">Ribosa Deoxiribosa</p>
Isomerización	Glucosa isomerasa	 <p style="text-align: center;">Glucosa Fructosa</p>
Fijación de nitrógeno	Nitrogenasa	$\text{N}_2 + 8\text{e}^- + 8\text{H}^+ \rightleftharpoons 2\text{NH}_3 + \text{H}_2$
Fotosíntesis	Fotosistema II	$2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$

funciones celulares críticas (Fernandes *et al.*, 2007; Lippard *et al.*, 1994; Riley, 1999).

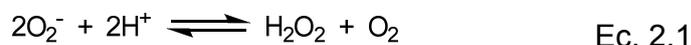
2.1.2.1 SOD como defensa celular antioxidante.

Las especies reactivas derivadas del oxígeno molecular (EROs) como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), están implicadas en varios procesos patológicos humanos, se ha demostrado que estos nocivos derivados del oxígeno son agentes de enfermedades como el infarto agudo al miocardio o un derrame cerebral. También se sabe que están asociados con el desarrollo y la evolución de los procesos inflamatorios, implicados en enfermedades como la artritis, y desempeñan un papel importante en el inicio de los trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer (Riley, 1999).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) representa la primera línea de defensa contra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); estudios preclínicos han mostrado que las enzimas SOD desempeñan un efecto protector de varias enfermedades en modelos animales (Salvemini *et al.*, 1999).

En 1969, Irwin Fridovich y Joe McCord reportaron las propiedades de la enzima superóxido dismutasa (SOD) poniendo a disposición una técnica para detectar la presencia de radicales libres en los sistemas vivientes. Este importante descubrimiento mostró a una clase de proteínas de suero que contienen cobre y

zinc capaces de catalizar la dismutación⁽¹⁾ del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Ec. 2.1) (McCord *et al.*, 1969).



A partir de entonces surgieron una enorme cantidad de reportes de investigación que han contribuido al entendimiento del papel que desempeñan las enzimas SOD en el mantenimiento de la salud de los organismos. Las SOD son una clase de oxidoreductasas que contienen Cu/Zn, Fe, o Mn en el sitio activo (Riley, 1999; Beyer *et al.*, 1987).

La CuZnSOD se encuentra en el espacio extracelular de los mamíferos, así como en el citosol de las células eucariotas, en bacterias Gram-negativas y los plastidios de plantas. La SOD/Mn se encuentra en las mitocondrias de las células de mamíferos y en *E. coli*, mientras que todos los procariontes anaerobias, si poseen actividad de SOD, contendrán exclusivamente SOD/Fe. Todos los organismos aerobios poseen exclusivamente la enzima SOD/Mn, y anaerobios facultativos contienen ambos, además de la SOD/Ni que fue descubierta en *Streptomyces griseus* (Riley, 1999).

Bajo condiciones normales en individuos sanos, la concentración de radicales libres es reducida por la MnSOD mitocondrial en el plasma, y en los espacios extracelulares por la CuZnSOD. Sin embargo este control del flujo de los radicales libres derivados del oxígeno se ve en peligro cuando la producción del

¹Como **dismutaciones** (o desproporción) se denominan las reacciones redox donde un mismo elemento en un estado de oxidación se oxida y se reduce al mismo tiempo. Como condición el reactivo siempre contiene un elemento que puede tener por lo menos tres estados de oxidación (Chang, 2007).

anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) es excesiva superando la capacidad del cuerpo para dismutar catalíticamente a este anión (Riley, 1999).

2.1.3 Aspectos termodinámicos del funcionamiento del complejo enzima-metal.

Como se discutió anteriormente, algunos iones metálicos desempeñan un papel fundamental en los organismos vivos. En un ambiente biológico, los iones metálicos que se rodean de grupos funcionales orgánicos tienen propiedades especiales las cuales deben conocerse en cierto grado si se desea entender su función (Lippard *et al.*, 1994).

Todas las propiedades moleculares son el resultado de la estructura correspondiente; en el caso de los compuestos de coordinación de metales de transición, esto incluye al centro metálico y su estado de oxidación, los átomos donadores y su patrón de sustitución, así como el arreglo geométrico de los donadores alrededor del ión metálico. Las estructuras de los compuestos de coordinación son consecuencia de las preferencias del ión metálico y la obligada geometría del ligante (Rodgers, 1995). En esta sección se abordarán propiedades relacionadas con reacciones químicas, características de la estructura electrónica de iones metálicos y sus propiedades físicas.

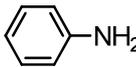
2.1.3.1 Concepto de ácido-base duro-blando.

En biología, los iones metálicos se unen a ligantes donadores de acuerdo a las preferencias regidas por la teoría de Pearson de ácidos y bases duros y blandos (Pearson, 1963; Pearson, 1987).

En la Tabla 2.3 se presenta el carácter duro-blando de los iones metálicos esenciales, así como algunos de aquellos iones utilizados en pruebas biológicas y farmacéuticas. En este esquema de clasificación, el término “blando” se refiere a las especies que son grandes y bastante polarizables, mientras que las especies “duras” son pequeñas y menos polarizables (Lippard *et al.*, 1994). En la Tabla 2.3 también se listan las preferencias de los iones metálicos, que son considerados ácidos de Lewis, por especies duro-blandas de bases de Lewis, es decir, los átomos ligantes que coordinan al ion metálico. En un medio biológico estos ligantes son proveídos por la cadena lateral de las proteínas, las bases de ácidos nucleicos, pequeños constituyentes del citoplasma celular, cofactores orgánicos y por supuesto, el agua. La Figura 2.1 presenta las estructuras químicas de ligantes orgánicos selectos y cofactores.

La regla general establece que ácidos duros unen preferentemente a bases duras en lugar de bases blandas; y viceversa, por ejemplo, el análisis de rayos X del cristal de una proteína tratada con K_2PtCl_4 indicará que el ion Pt(II) blando se unirá preferentemente a los ligantes blandos expuestos, como el grupo sulfhidrilo de cisteína o a los puentes tioéter de metionina. La unión a los grupos carboxilato de los residuos glutamato o aspartato expuestos es mucho menos probable (Lippard *et al.*, 1994). Los metales alcalinos y alcalinotérreos como el Ca^{2+} son coordinados más frecuentemente por los átomos de oxígeno de grupos carboxilato; otros iones como el Cu^{2+} son preferidos por los átomos de nitrógeno de la histidina.

Tabla 2.3. Clasificación ácido-base, duro-blando de iones metálicos y ligantes de importancia en química bioinorgánica (Lippard *et al.*, 1994).

Metales			Ligantes		
Duros					
H ⁺	Mn ²⁺	Cr ³⁺	H ₂ O	CO ₃ ²⁻	NH ₃
Na ⁺	Al ³⁺	Co ²⁺	OH ⁻	NO ₃ ⁻	RNH ₂
K ⁺	Ga ³⁺	Fe ²⁺	CH ₃ CO ₂ ⁻	ROH	N ₂ H ₄
Mg ²⁺	Ca ²⁺	Tl ²⁺	PO ₄ ³⁻	R ₂ O	RO ⁻
			ROPO ₃ ²⁻	(RO) ₂ PO ₂ ⁻	Cl ⁻
Intermedios					
Fe ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	NO ₂ ⁻		
Co ²⁺	Cu ²⁺		N ₂		
			SO ₃ ²⁻		
			Br ⁻		
			N ₃ ⁻		
Blandos					
Cu ⁺	Pt ²⁺	Pt ⁴⁺	R ₂ S	R ₃ P	
Au ⁺	Tl ⁺	Hg ²⁺	RS ⁻	CN ⁻	
Cd ⁺	Pb ²⁺		RSH	RNC	
			(RS) ₂ PO ₂ ⁻	(RO) ₂ P(O)S ⁻	
			SCN ⁻	CO	
			H ⁻	R ⁻	

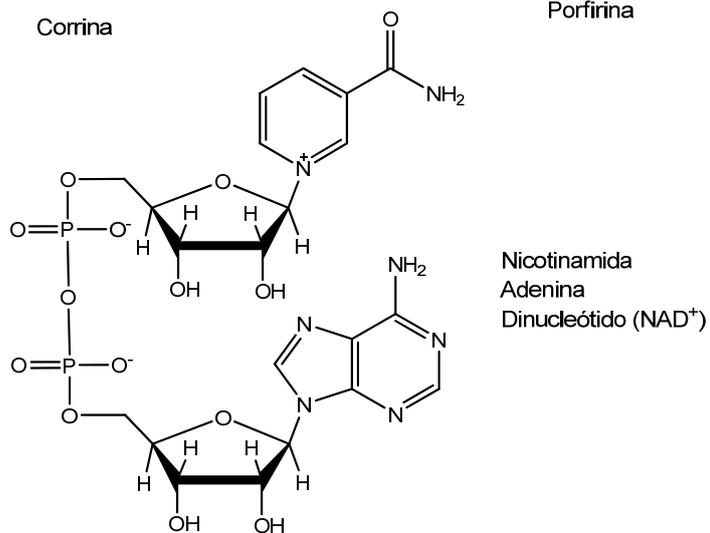
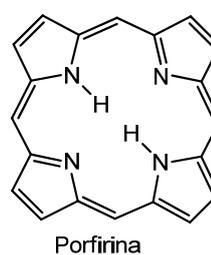
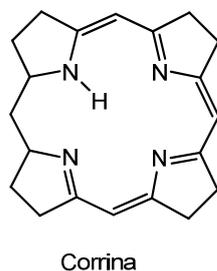
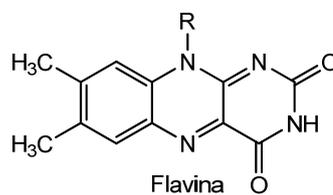
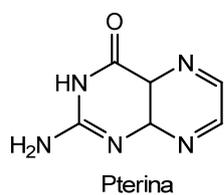
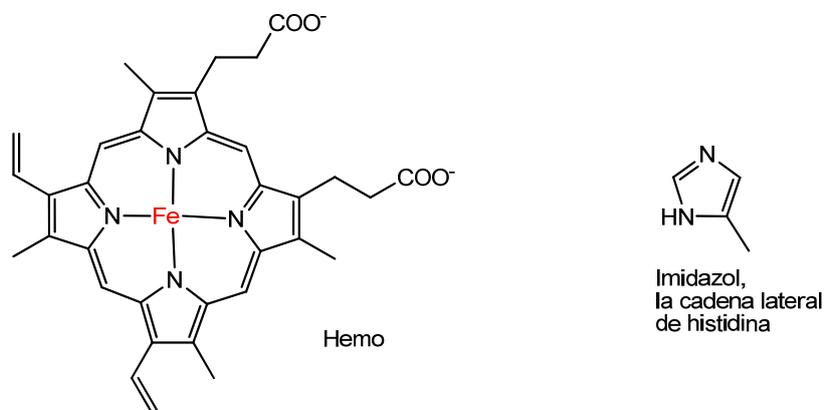
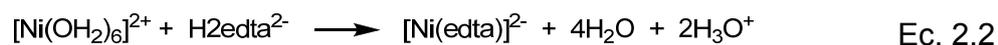


Figura 2.1. Ligantes orgánicos selectos y cofactores (Lippard *et al.*, 1994).

2.1.3.2 Efecto quelato y serie de Irving-Williams.

El término quelación se refiere a la coordinación de dos o más átomos donadores de un ligante a un átomo metálico central. El complejo resultante tiene una estabilidad inusual derivada del factor entrópico favorable, acompañado de la liberación de ligantes no quelantes, generalmente agua, de la esfera de coordinación.

Este fenómeno se ilustra en la Ecuación 2.2 para la quelación de níquel(II) en solución acuosa por el ligante hexadentado etilendiaminotetraacetato (EDTA) mostrado en la Figura 2.2 en su forma protonada.



Ligantes como el EDTA son utilizados en medicina para quelar iones metálicos que podrían estar en exceso tóxico en el plasma sanguíneo, así como aditivo en alimentos para limitar la disponibilidad de metales esenciales para las bacterias dañinas evitando así el deterioro. Este ligante también es utilizado comúnmente a soluciones amortiguadoras en investigaciones biológicas para reducir la concentración de iones metálicos libres que podrían causar reacciones no deseadas (Lippard *et al.*, 1994).

Un ejemplo importante del efecto quelato en química bioinorgánica es ofrecido por los ligantes porfirina y corrina ilustrados en la Figura 2.1. Estas moléculas macrocíclicas tienen cuatro anillos de pirrol aproximadamente coplanares con sus átomos de nitrógeno donadores dirigidos hacia el centro donde podría situarse un ion metálico. Las unidades metaloporfirinas o metaloco-

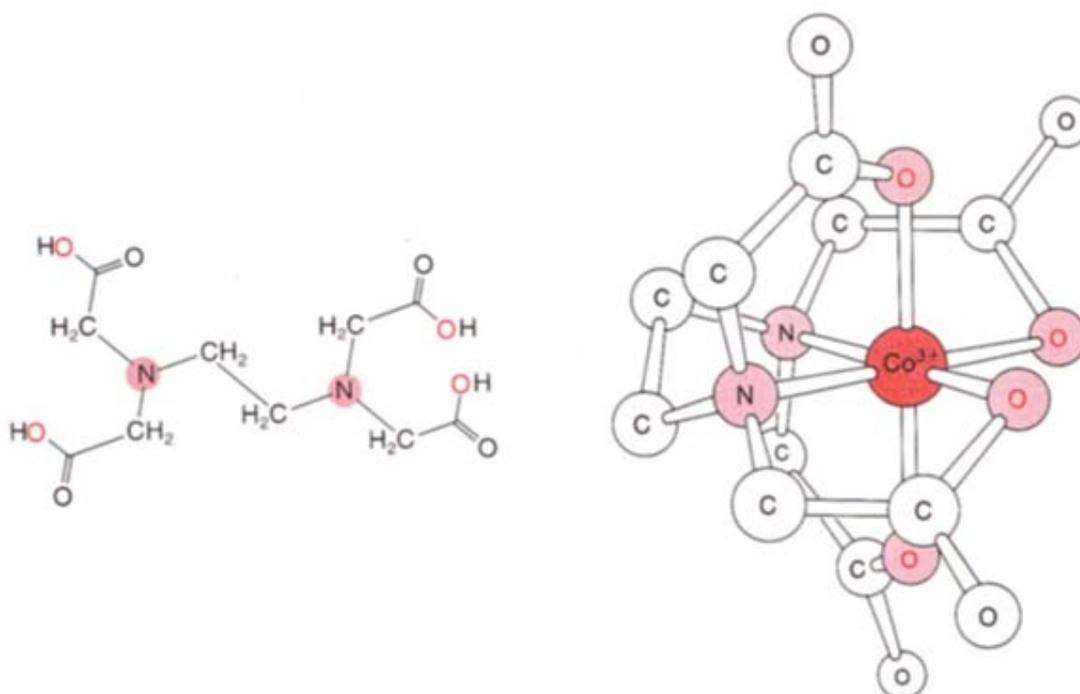


Figura 2.2 a) Ácido etilendiaminotetraacético (H₄EDTA), un agente quelante. b) Estructura de un complejo de EDTA con Co³⁺ (Lippard *et al.*, 1994).

rrinas resultantes son muy estables termodinámicamente, acomodando una variedad de iones metálicos en diferentes estados de oxidación. En consecuencia estas unidades quelantes ofrecen grupos funcionales bioinorgánicos de amplia difusión y utilidad en biología entre los que se encuentran los citocromos (Fe), clorofila (Mg) y la vitamina B-12 (Co) por mencionar unos ejemplos (Lippard *et al.*, 1994).

Otro principio útil en la química inorgánica es la preferencia de unión de iones metálicos de transición divalentes de la primera fila por un ligante dado. Estas preferencias típicamente siguen la serie de estabilidad trazada inicialmente por Irving y Williams: $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Esta secuencia conocida como serie de Irving-Williams está relacionada con el decremento en el radio iónico, un efecto que conduce a aumentar la fuerza del enlace metal-ligante (Irving *et al.*, 1953).

2.1.3.3 Valores de pK_a de ligantes coordinados.

La carga positiva del ion metálico en los sistemas biológicos estabiliza al anión del ácido (base conjugada) de ligantes próticos ligados por la esfera de coordinación. La coordinación del agua es el mejor ejemplo de este efecto, pero se presenta en muchos otros ligantes biológicos, incluyendo tioles, imidazol, fenoles, alcoholes, ácido fosfórico y ácidos carboxílico y sus derivados. La Tabla 2.4 enlista los valores de pK_a de algunos ligantes en presencia y ausencia de varios iones metálicos. Iones de metales trivalentes son más capaces de reducir los valores de

Tabla 2.4 Valores de pK_a para algunos ligantes con y sin iones metálicos (Lippard *et al.*, 1994).

Ligante y reacción	Ion metálico	pK_a (25°C, 0.1 M)
$\text{H}_2\text{O} + \text{M}^{2+} \xrightleftharpoons[+\text{H}^+]{-\text{H}^+} \text{M}-\text{OH}^+$	Ninguno	14.0
	Ca^{2+}	13.4
	Mn^{2+}	11.1
	Cu^{2+}	10.7
	Zn^{2+}	10.0
$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 + \text{M}^{2+} \xrightleftharpoons[+\text{H}^+]{-\text{H}^+} \text{M}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3^+$	Ninguno	4.7
	Mg^{2+}	4.2
	Ca^{2+}	4.2
	Ni^{2+}	4.0
	Cu^{2+}	3.0
$\text{Imidazole-NH}_2 + \text{M}^{2+} \xrightleftharpoons[+\text{H}^+]{-\text{H}^+} \text{M}-\text{Imidazole-NH}^+$	Ninguno	7.0
	Co^{2+}	4.6
	Ni^{2+}	4.0
	Cu^{2+}	3.8

pK_a de ligantes próticos que sus análogos divalentes, como es de esperarse en base a las consideraciones de carga.

La desprotonación del agua coordinada para formar el ligante hidroxido es un paso propuesto en diversos mecanismos para explicar la catálisis metaloenzimática. La coordinación de dos o más iones metálicos a un ligante prótico produce un decremento del pK_a aun más dramático; este efecto se ilustra en la Tabla 2.5 con la hidrólisis de hierro(III). En el complejo $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ el agua puede desprotonarse con un pK_a de 2.2 mientras que el ligante hidróxido en el complejo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^+$ tiene un $pK_a \sim 6$ debido a la formación de las unidades (μ -hidroxido) y μ -(oxo)di-hierro(III). Estos datos ilustran que hierro(III) acuoso y muchos otros complejos de iones metálicos no pueden existir a valores de pH fisiológico (~ 7) en ausencia de ligantes de soporte.

La unión de dos o más centros metálicos son bastante frecuentes, un ejemplo es la fracción μ_2 -imidazolato de la enzima superóxido dismutasa/cobre(II)-zinc(II) de los eritrocitos de sangre bovina (desprotonación del imidazol de la cadena lateral de histidina)

2.1.3.4 Variación de potenciales redox.

Alteraciones del átomo donador del ligante y de la estereoquímica del centro metálico puede provocar grandes diferencias en el potencial al cual ocurrirá una reacción de transferencia de electrones. Los datos en la Tabla 2.6 ilustran la capacidad de diversos ligantes para variar el potencial redox $\text{Cu(I)}/\text{Cu(II)}$, que es uno de los sistemas mejor estudiados tanto en química inorgánica como bioinor-

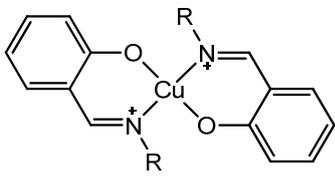
Tabla 2.5 Reacciones de hidrólisis de Fe(III), 25°C ^(a) (Lippad *et al.*, 1994).

Reacción	pK _a
$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fe}(\text{OH})^{2+} + \text{H}^+$	2.2
$2\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+} + 2\text{H}^+$	2.9
$\text{Fe}(\text{OH})^{2+} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2^+ + \text{H}^+$	3.5
$\text{Fe}(\text{OH})_2^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3^{\downarrow} + \text{H}^+$	6
$\text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fe}(\text{OH})_4^- + \text{H}^+$	10

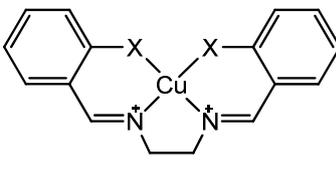
(a) No se muestran las moléculas adicionales de agua coordinada al hierro.

Tabla 2.6 Efecto del ligante sobre el potencial de reducción Cu(I)/Cu(II) en solución de DMF (Lippard *et al.*, 1994)

Compuesto	$E_{1/2}, V^*$
Cu(O-sal) ₂ en	-1.21
Cu(Me-sal) ₂	-0.90
Cu(Et-sal) ₂	-0.86
Cu(S-sal) ₂	-0.83
Cu(<i>i</i> -Pr-sal) ₂	-0.74
Cu(<i>t</i> -Bu-sal) ₂	-0.66



Cu(R-sal)₂



Cu(X-sal)₂en
X= O ó S

*Potencial al cual el complejo se encuentra mitad oxidado y mitad reducido

gánica. Cobre(I) es un ion d^{10} que prefiere adoptar geometría tetraédrica (tetraordinada) o trigonal (tricoordinada).

Por otro lado, los complejos divalentes de cobre(II) son típicamente plano cuadrado con, quizás, uno o dos ligantes adicionales débilmente unidos en forma axial. De esta manera, el ambiente de un ligante que produce una geometría tetraédrica usualmente favorecerá la estabilidad de un complejo de Cu(I) sobre el de Cu(II) haciendo a este último un agente oxidante más poderoso al aumentar su potencial redox (Lippard *et al.*, 1994).

La adición de grupos R voluminosos en los complejos de $Cu(R\text{-sal})_2$ de la Tabla 2.6, ocasiona la distorsión de la geometría plana a tetraédrica haciendo más fácil de reducir al cobre aumentando el potencial de reducción. Además, Cu(I) es un ácido blando por lo que preferirá unirse a donadores blandos como RS^- o R_2S de modo que la colocación de ligantes blandos en la esfera de coordinación también producirá un incremento en el potencial de reducción Cu(I)/Cu(II).

Los efectos del tipo de ligante y la estereoquímica en el potencial de Cu(I)/Cu(II) son manifestados no solo en los complejos inorgánicos enlistados en la Tabla 2.6 sino también en muchas proteínas que contienen cobre. Estas alcanzan altos potenciales redox a través de la distorsión de la geometría de coordinación trigonal plana y del uso de dos cadenas imidazol-histidina y una cadena tiolato-cisteína como ligantes donadores.

Existen muchos otros ejemplos importantes de variación del potencial redox debidos al ambiente de una proteína entre los que se incluyen agrupamientos

sulfuro-hierro y los citocromos. Algunas veces el potencial redox se ve influenciado por la constante dieléctrica provista por residuos en la vecindad del átomo de metal pero no necesariamente coordinados al mismo. Este fenómeno es análogo a la influencia del solvente sobre el potencial redox de complejos de coordinación simples (Lippard *et al.*, 1994).

2.1.3.5 Efectos biomacromoleculares.

La estabilidad termodinámica de un centro metálico en un ambiente biológico no solamente es determinada por las preferencias del metal hacia un estado de oxidación en particular, grupo de ligantes o la geometría de coordinación, sino también a la capacidad de la biomacromolécula para controlar, a través de su estructura tridimensional, la estereoquímica y los ligantes disponibles para la coordinación. Los residuos no coordinantes también pueden contribuir con factores tales como la hidrofiliidad o hidrofobicidad local, obstrucción estérica y grupos formadores de puentes de hidrógeno que puedan interactuar con los átomos involucrados en la esfera de coordinación aumentando o disminuyendo la estabilidad.

Estos factores que se pueden presentar en el caso de la coordinación de metales a ácidos nucleicos o a proteínas, deben ser elucidados en cualquier intento formal de entender la función de los metales en biología.

Algunas de las manifestaciones más dramáticas del efecto quelato en química bioinorgánica es la existencia de sitios de unión fuertes y específicos de metales en el núcleo de muchas metaloproteínas. La naturaleza tiene

posiblemente los quelantes más eficaces en forma de cadenas de proteína que pueden desplegarse, orientando a los residuos aminoácido donadores para proveer virtualmente cualquier estereoquímica deseada para un centro metálico.

Un buen ejemplo de este fenómeno es el sitio de unión para zinc de la superóxido dismutasa de los eritrocitos bovinos (CuZnSOD). El ambiente para la coordinación del zinc es tan favorable que la proteína libre de metal (o apoproteína, V₁V₂SOD; V=vacío) es capaz de remover trazas de zinc del buffer de fosfatos después de una diálisis. Así mismo, el sitio de unión es tan específico que cuando la enzima Cu₂SOD es tratada con un exceso de zinc divalente, el Cu²⁺ que ocupa el sitio de Zn²⁺ es desplazado. Este comportamiento químico es inusual ya que va en contra de las preferencias comunes de la serie de Irving-Williams. Evidentemente el zinc debe ser funcionalmente importante en este sitio ya que está rodeado de tal manera que se asegura la especificidad hacia este ión (Lippard *et al.*, 1994).

2.1.4 Complejos de cobre de macrociclos como modelos enzimáticos.

2.1.4.1 Análogos de SOD

Las células de mamíferos están expuestas constantemente al anión superóxido (O₂⁻), que surge principalmente como un subproducto metabólico de la cadena respiratoria (Prior *et al.*, 2005; Re *et al.*, 1999). En circunstancias normales, la concentración intracelular del nivel de O₂⁻ es controlado por la SOD. Sin embargo, durante el estrés oxidativo, como en el caso de la inflamación aguda o crónica, la producción de este anión excede el nivel en el que esta enzima

puede hacer frente. En tales casos, se ha intentado el tratamiento con fuentes exógenas de SOD para reforzar los mecanismos naturales de defensa. Sin embargo, el uso de SODs exógenas, como las que provienen de la especie bovina, está limitado por su tamaño ($M_r \sim 30$ kDa) y su complejidad, ya que afecta a la permeabilidad celular y causa problemas inmunológicos (Riley, 1999; Salvemini *et al.*, 1999).

Lo anterior ha estimulado la búsqueda de compuestos no peptídicos, análogos a SOD, capaces de imitar la actividad de las enzimas naturales y que presenten mayor biodisponibilidad. Algunos compuestos desarrollados en este campo se basan en complejos de compuestos macrocíclicos con metales como Mn(III) y Cu(II); la actividad como análogos de SOD de estos complejos depende en gran medida de la estructura del ligante (Autzen *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 1983; Maroz *et al.*, 2008; Riley, 1999).

2.1.4.1.1 Mecanismo de la SOD

La función de la SOD es desproporcionar el anión superóxido de acuerdo con la Ecuación 2.1. En esta reacción se produce otra sustancia potencialmente dañina, el peróxido de hidrógeno, pero este es degradado en un paso posterior por la enzima catalasa. Así, el trabajo en conjunto de SOD y catalasa sirven para proteger a los organismos que producen subproductos potencialmente tóxicos por el metabolismo del O_2 (Lippard *et al.*, 1994).

En base a los objetivos de este trabajo, entre la diversidad de enzimas SOD se hará énfasis principalmente a la que contiene Cu/Zn como centro metálico. La

superóxido dismutasa se compone de dos subunidades idénticas, una de las cuales contiene un átomo de cobre y la otra, un átomo de zinc. La forma por la cual actúa es un mecanismo catalítico que consta de dos pasos de difusión controlada ilustrados en las ecuaciones 2.4 y 2.5 (Salvemini *et al.*, 1999; Lippard *et al.*, 1994; Riley, 1999; Beyer *et al.*, 1987).



A estas reacciones en ocasiones se les denomina mecanismo “ping-pong” debido a que el cobre va y viene entre sus dos estados de oxidación más comunes. La protonación del ión superóxido en el segundo paso hace que la reacción sea termodinámicamente factible. Está reportado que el potencial redox para la pareja $\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$ es - 0.33 V y para $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$ es de + 0.89 V. De este modo, cualquier átomo metálico que desee efectuar la química redox de un electrón entre los estados M^{n+} y $\text{M}^{(n+1)+}$ debe tener un potencial entre los límites $-0.3 \leq E^0 \leq +0.9$ V para ser termodinámicamente capaz de funcionar como una superóxido dismutasa.

Por lo anterior, no es de sorprender que además de la CuZnSOD en la naturaleza existan SODs con Fe y con Mn, sin embargo estas últimas enzimas solamente contienen un átomo metálico en su sitio activo.

La desproporción del ion superóxido de la Ecuación 2.1 es una reacción de segundo orden con una constante de velocidad de $\sim 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y ocurre rápidamente aún en ausencia de un catalizador. No obstante las reacciones

catalizadas por la enzima CuZnSOD tienen una constante de $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, de tal manera que la velocidad total solamente se ve limitada por la difusión del ion $\text{O}_2^{\cdot -}$ hacia el sitio activo de la proteína. La velocidad de reacción de las enzimas SOD Mn y Fe se ha mostrado un poco menor, aproximadamente en un orden de magnitud, dependiendo de la fuente de la enzima (Lippard *et al.*, 1994; Riley, 1999).

Un intento de explicar la aparición evolutiva de enzimas SOD, argumenta que si la concentración de ion superóxido *in vivo* fuera desproporcionada por el proceso no catalítico, primero reaccionaría con el tejido provocando daños. Aunque los iones metálicos en forma libre también pueden catalizar eficientemente la reacción con una constante de velocidad que se encuentra alrededor de $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, se cree que las concentraciones de los cationes cúpricos o férricos en forma libre son demasiado bajas en el organismo para considerarse como una alternativa significativa en los sistemas vivos.

2.1.4.1.2 Propiedades químicas y físicas de los agentes miméticos de la SOD

La enzima MnSOD es capaz de suprimir fenotipos de cáncer en un gran número de neoplasias. Sin embargo, como ya se mencionó, el uso terapéutico de la SOD nativa tiene varias limitaciones relacionadas con la permeabilidad celular baja y vida media corta, además, de los problemas inmunológicos de la CuZnSOD bovina que fueron detectados en ensayos clínicos y que dieron lugar a su retiro del mercado (Fernandes, 2007; Maroz *et al.*, 2008).

Para superar problemas como los anteriores, se han propuesto compuestos sintéticos biomiméticos² de SOD como una nueva clase de fármacos potenciales. Los complejos de metales de transición, por ejemplo, complejos de Mn(II), Mn(III), Cu(II) y Fe(III), han mostrado importantes propiedades antioxidantes, comúnmente conocidas como actividad mimética de SOD (Fernandes *et al.*, 2007; Salvemini *et al.*, 1999; Riley, 1999). En particular, el Cu(II) participa en varias funciones biológicas, actuando como elemento catalizador en muchas metaloenzimas, incluyendo la SOD, por lo que sus complejos pueden presentar actividad de SOD para evitar altos niveles de especies reactivas del oxígeno.

Estos compuestos podrían tener ventajas sobre las enzimas naturales como agentes farmacéuticos, como la capacidad de acceso al espacio intercelular, la permeabilidad celular, la falta de inmunogenicidad, un tiempo de vida media más larga en la sangre (las enzimas humanas son estables in vivo sólo por períodos cortos, es decir, $t_{1/2} \approx$ minutos a horas), potencial para la administración oral y costos más bajos.

Existe una amplia gama de aplicaciones terapéuticas para los miméticos de SOD, considerando la multitud de efectos nocivos conocidos derivados del estrés oxidativo, inducido por un exceso de superóxido. Los fármacos catalíticos sintéticos ofrecen muchas promesas para el tratamiento de condiciones de deterioro molecular.

² El término biomimético se refiere a cualquier aspecto en el cual un proceso químico imita una reacción biológica (Breslow, 1972).

De los potenciales agentes miméticos de SOD actualmente en desarrollo, las principales ventajas son su mayor actividad, biocompatibilidad y biodistribución. La investigación en este ámbito ha sido particularmente fascinante, porque el descubrimiento de estos nuevos catalizadores ha evolucionado en paralelo con una mayor comprensión de las funciones biológicas de algunos radicales. Se puede anticipar que una mejor comprensión del papel del estrés oxidativo en la enfermedad seguirá desarrollándose. Agentes tales como los aquí descritos desempeñarán un papel importante no sólo en el desarrollo de los mecanismos fundamentales que intervienen en la génesis de las enfermedades inducidas por el estrés oxidativo sino también en su tratamiento (Davies *et al.*, 2005; Riley, 1999).

Los efectos biológicos de los miméticos de la SOD están relacionados con sus estructuras. Las elevadas constantes de estabilidad que se requieren para evitar la disociación del complejo *in vivo* podrían lograrse mediante el uso de ligantes macrocíclicos. La naturaleza del ligante macrocíclico parece importante para la actividad de la mimética de SOD de los complejos correspondientes, así como para su estabilidad en la presencia de proteínas, incluso si el ion de metal no se encuentra dentro de la cavidad del macrociclo (Fernandes *et al.*, 2007; Riley, 1999).

En algunos reportes de investigación se han sugerido compuestos macrocíclicos y sus complejos metálicos como agentes para el diagnóstico y el tratamiento de diferentes enfermedades (Fernandes *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2004). Además, algunos de estos complejos se han

presentado como una clase de imitadores de SOD potenciales, principalmente debido a su alta estabilidad termodinámica.

Se han reportado varios casos de complejos de cobre de compuestos macrocíclicos para degradar al anión superóxido (Fernandes *et al.*, 2007; Autzen *et al.*, 2003; Ďuračková *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1983). En estos estudios se ha demostrado que las modificaciones químicas en el tamaño del anillo, los átomos de los donantes y los sustituyentes de los macrociclos, pueden tener efectos profundos, tanto en la estabilidad como en la actividad imitadora de SOD de los respectivos complejos. Un complejo de cobre(II) poseedor de actividad de SOD mimética debe contener una unión flexible de los ligantes en torno a los iones de cobre(II) con el fin de permitir una reducción fácil a cobre(I).

Además, un complejo mimético SOD de cobre(II) deberá presentar cierta estabilidad, para evitar así su disociación en la región de ácido y debe poseer un sitio accesible para los radicales O_2^- y por tanto permitir una reducción rápida a cobre(I).

A pesar de que se han estudiado varios complejos de cobre(II), la mayoría de ellos no son termodinámicamente estables o altamente activos como SOD en el rango de pH fisiológico. Por esta razón, la identificación de nuevos complejos con una alta estabilidad y actividad como SOD, junto con la baja toxicidad, sigue siendo un tema difícil en la química bioinorgánica.

Otra característica importante es la solubilidad de los compuestos. Algunos de los agentes miméticos de SOD que se han desarrollado, a pesar de su actividad catalítica efectiva, no son solubles en agua. Se estima que

aproximadamente el 40% de los compuestos que entran en la fase de desarrollo no alcanzan el mercado, principalmente debido a las malas propiedades de biofarmacéutica, en las que se incluye la baja solubilidad acuosa (Fernandes *et al.*, 2007).

La mayoría de los antioxidantes catalíticos tienen un centro de metálico redox activo, pero sólo unos pocos iones metálicos tienen la capacidad de catalizar la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Como ya se mencionó anteriormente, es bien sabido que el ion cobre(II) acuoso es un dismutador de superóxido muy potente (Riley, 1999). Sin embargo, en virtud de que la albúmina de suero humano tiene un sitio de alta afinidad para el cobre(II), se excluye su uso libre como un imitador de SOD con fines terapéuticos. De hecho, en el plasma sanguíneo, la albúmina existe en muy alta concentración actuando como una proteína transportadora de cobre. Por lo tanto, si se administran iones de Cu(II) libres, se verían inmediatamente complejados por la albúmina sérica, perdiendo su capacidad de dismutar el $O_2^{\cdot-}$.

En vista de lo anterior, para poder administrar al cobre(II), este debe ser incluido en un ligante estable, que lo proteja de ser quelado por el suero y los componentes celulares. Además, este ligante debe permitir que el cobre(II) pueda cambiar su estado redox y dismutar al anión superóxido. Se ha descrito que si el ligante es un macrociclo, el complejo metálico puede tener mayor estabilidad biológica (Fernandes *et al.*, 2007).

Si bien algunos de estos compuestos han demostrado ser efectivos desproporcionadores del $O_2^{\cdot-}$, también pueden resultar ser tóxicos para las células

mamíferas. De hecho, la citotoxicidad es una limitación común para el uso de nuevos compuestos farmacéuticos por lo que estos estudios también deberán ser considerados en este tipo de investigación.

2.1.4.2 Actividad Antioxidante

Muchas de las enfermedades que afligen a la humanidad se relacionan con aquellos casos en los que el cuerpo falla en la regulación adecuada del exceso de un subproducto químico no deseado. Un ejemplo de esto es la incapacidad de controlar y limitar la concentración de un agente potencialmente nocivo que se produce como resultado de nuestra necesidad de metabolizar las reservas de energía (Riley, 1999).

El cuerpo humano depende del metabolismo aerobio para la producción de energía. Como consecuencia de esta actividad, se producen moléculas reactivas conocidas como radicales libres, que son especies químicas muy reactivas que tienen un número de electrones impar con tiempos de vida generalmente muy cortos.

Factores externos como la contaminación, la luz solar y el tabaquismo también pueden desencadenar la producción de radicales libres. Estos interactúan con otras moléculas en las células lo que puede causar daño oxidativo a proteínas, membranas y los genes. El daño oxidativo ha sido implicado como causa de muchas enfermedades como el cáncer y la enfermedad de Alzheimer y tiene un impacto en el proceso de envejecimiento del cuerpo (Prior *et al.*, 2005).

Estrés oxidativo se define como un proceso de enfermedad o daño a los tejidos que da como resultado una mayor generación de radical superóxido endógeno con sus consecuentes intermediarios reactivos de oxígeno combinado con una insuficiencia de defensas para la eliminación de radicales (Riley, 1999). Otros autores lo definen como un desequilibrio entre los compuestos oxidantes y reductores en los organismos vivos (Kesić *et al.*, 2009).

Para contrarrestar el estrés oxidativo, el organismo produce sustancias antioxidantes para defenderse. Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que retrasa o inhibe el daño oxidativo a una molécula blanco (Man *et al.*, 2000). La función de un antioxidante es la de neutralizar o eliminar a los radicales libres que pueden dañar a nuestras células. La capacidad del organismo para producir antioxidantes está controlada por la composición genética y la influencia de la exposición a factores ambientales como la dieta y el tabaquismo.

2.1.4.2.1 Agentes antioxidantes naturales: ácido ascórbico

Entre la comunidad científica, existe un continuo interés en antioxidantes celulares así como en la idea de que ciertas enfermedades son provocadas por la presencia de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (EROs), como radicales libres, peróxido de hidrógeno, entre otros (Prior *et al.*, 2005). La defensa contra el estrés oxidativo son los antioxidantes que sintetiza el organismo, las vitaminas antioxidantes incorporadas en la dieta y algunas enzimas que cumplen esa función. En la Figura 2.3 se representa un resumen del balance oxidación-reducción en el cuerpo humano. Los componentes antioxidantes son los microele-

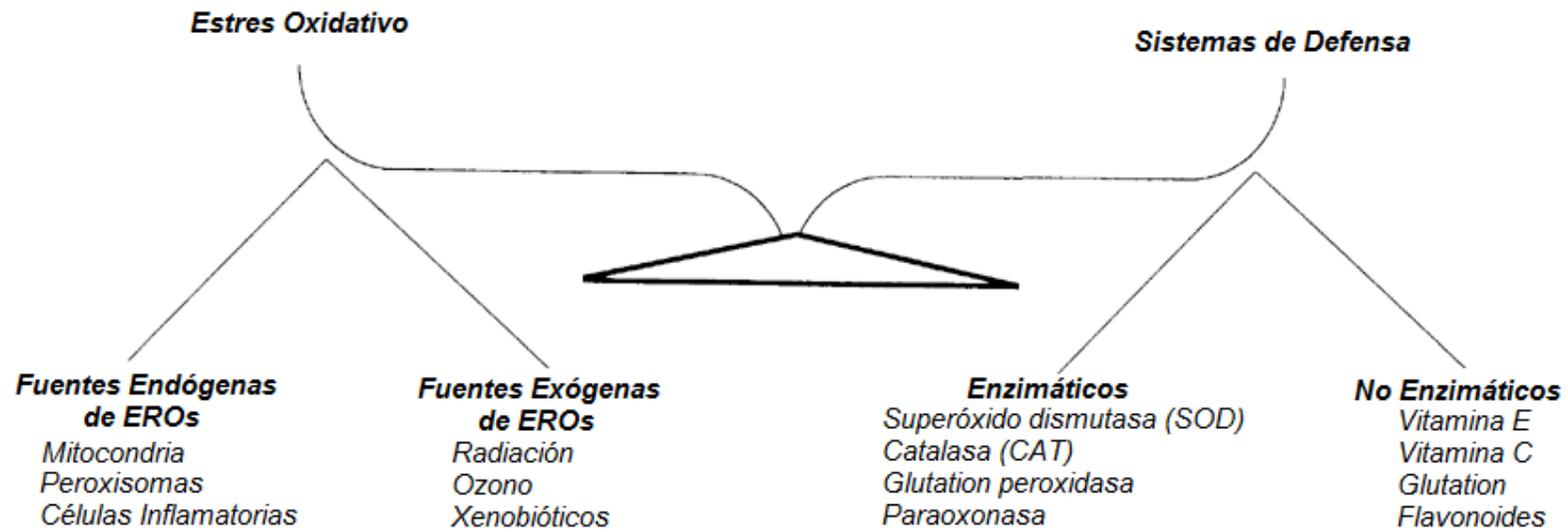


Figura 2.3 Balance del proceso oxidación-reducción en el cuerpo humano (Vaya *et al.*, 2001)

mentos presentes en la dieta que pueden retrasar o evitar la peroxidación lipídica, inhibiendo la iniciación de la oxidación o la propagación de reacciones en cadena, participando también en la eliminación de los radicales libres (Kesić *et al.*, 2009).

Existen moléculas que remueven los radicales libres por medio de una reacción directa tales como: el glutatión reducido, los tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (Vitamina C). El ácido ascórbico es un importante nutriente que comúnmente es utilizado como conservador.

Alimentos como la miel de abeja, frutas, verduras y granos contienen una amplia variedad de componentes antioxidantes, incluyendo algunas vitaminas, como el ácido L-ascórbico y compuestos fenólicos entre otros. Muchos investigadores piensan que los suplementos vitamínicos pueden reducir drásticamente el daño de los radicales libres y por lo tanto prevenir y retrasar la aparición de enfermedades crónico-degenerativas, y posiblemente extender la vida útil del organismo (Kesić *et al.*, 2009).

Estudios epidemiológicos sugieren que la disminución de antioxidantes en la ingesta se asocia con una mayor prevalencia de enfermedades tales como el asma. Algunos reportes afirman que un aumento en el nivel de ácido ascórbico en el plasma se asocia con una reducción del 20% en el riesgo de mortalidad por cualquier causa (Misso *et al.*, 2005).

El ácido ascórbico tiene importantes aplicaciones en el área de alimentos como conservador gracias a su actividad antioxidante. El γ -tocoferol, un antioxidante primario, pone fin a las reacciones en cadena de radicales libres donando hidrógenos o electrones a dichos radicales transformándolos en productos más estables. El ácido

ascórbico es un antioxidante secundario clasificado como eliminador de especies reactivas de oxígeno. Estos dos compuestos muestran una acción sinérgica contra la oxidación reduciendo la tasa de iniciación de reacciones en cadena funcionando en concentraciones muy bajas, 0,01% o menos (Van Aardt *et al.*, 2005).

En vista de la versatilidad y eficiencia del ácido ascórbico como compuesto antioxidante, es que muy frecuentemente es tomado como compuesto de referencia para comparar la actividad antioxidante de otros compuestos que se encuentran en desarrollo tal como se mostrará en este trabajo en la sección experimental.

2.1.5 Técnicas experimentales empleadas comúnmente para medir actividad antioxidante.

Un factor que constituye un reto en la selección del método para medir la capacidad antioxidante de un compuesto, es que dentro de los sistemas biológicos, hay por lo menos cuatro fuentes generales de antioxidantes: (1) las enzimas, por ejemplo, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, y la catalasa; (2) las moléculas grandes (albúmina, ceruloplasmina, ferritina, entre otras proteínas), (3) moléculas pequeñas (ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferol, carotenoides, polifenoles) y (4) algunas hormonas (estrógeno, la angiotensina, la melatonina, etc.). Por otro lado, hay múltiples fuentes de radicales libres oxidantes. Tanto oxidantes como antioxidantes tienen diferentes propiedades químicas y físicas (Prior *et al.*, 2005).

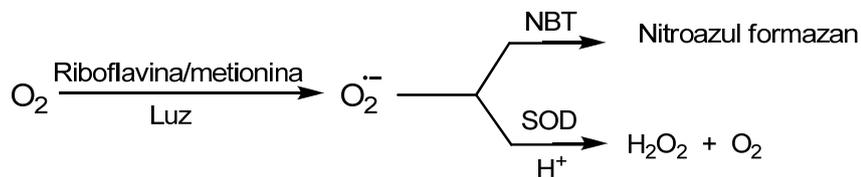
Los antioxidantes en algunos de los casos pueden actuar por múltiples mecanismos en un sistema único o bien, por un mecanismo único en diferentes

sistemas de reacción. Por otra parte, los antioxidantes pueden responder de una manera diferente a las diferentes fuentes de radicales u oxidantes. Por ejemplo, los carotenoides no son particularmente buenos atenuadores de los radicales peroxilo como lo son los compuestos fenólicos y otros antioxidantes, pero son excepcionales con el oxígeno singulete (un tipo de EROs), en la que la mayoría de los antioxidantes son relativamente ineficaces.

Evidentemente, las coincidencias entre las características de la fuente de radicales y las de los mecanismos de reacción del sistema antioxidante son fundamentales en la selección del método apropiado de ensayo de actividad antioxidante. Se debe ser consciente desde el principio que no existe un método universal mediante el cual se pueda medir con precisión la actividad antioxidante en forma cualitativa y cuantitativamente (Prior *et al.*, 2005).

2.1.5.1 Técnica para Medir Actividad de SOD.

La técnica utilizada en este trabajo para probar la actividad SOD de los complejos de cobre es un método clásico reportado por Fridovich (Fridovich, 1985) cuyo fundamento se resume en la Ec. 2.6 (Vaya *et al.*, 2001).



Ec. 2.6

La reacción inicia con la formación del anión superóxido mediante la mezcla de los reactivos riboflavina/metionina auxiliados por la presencia de luz. El indicador utilizado en este caso es el mejor conocido como nitroazul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés) (Figura 2.5), el cual reacciona con el anión superóxido para formar el compuesto nitroazul de formazan (Figura 2.5), que es una molécula altamente conjugada que absorbe luz visible de 560 nm.

El incremento en absorbancia debido a la formación del nitroazul de formazan por unidad de tiempo equivale a la velocidad de reacción y la absorbancia en ausencia de SOD y en presencia de varias cantidades de la muestra problema puede utilizarse para determinar el número de unidades/mL de SOD en la solución. Una unidad de SOD es igual a la cantidad de muestra que fotoinhibe en 50% la formación de nitroazul de formazan etiquetada como IC_{50} (Fernandes *et al.*, 2007; Tejacal *et al.*, 2005; Giannopolitis *et al.*, 1977; Stauffer, 1989).

2.1.5.2 Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (TEAC)

Trolox es el nombre comercial para el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un derivado hidrosoluble de la Vitamina E. Al igual que esta vitamina, el Trolox es un antioxidante que es utilizado en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el daño oxidativo (Prior *et al.*, 2005).

La actividad o capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC por sus siglas en inglés) es una medida de la fuerza antioxidante medida en unidades llamadas Equivalentes Trolox (TE). El ensayo TEAC se basa en la capacidad de algunos compuestos antioxidantes para reaccionar con el catión radical $ABTS^{•+}$ (6-sulfonato de

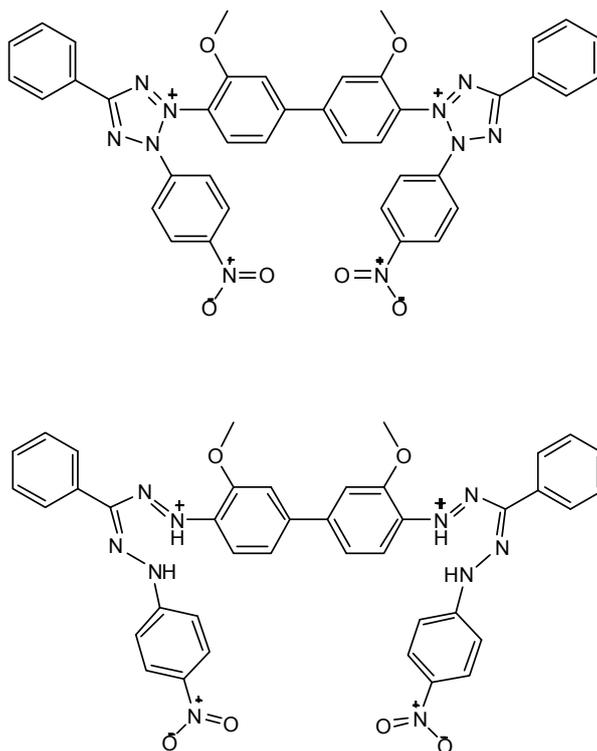


Figura 2.4 Estructura de (arriba): nitroazul de tetrazolio (NBT) y (abajo): nitroazul de formazan.

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)). En el experimento, el ácido ABTS es oxidado por los radicales peroxilo u otros oxidantes a su forma de catión radical, $ABTS^{\bullet+}$, que es de un color azul intenso; la actividad antioxidante se mide en función de la capacidad de los compuestos de prueba para reducir al catión radical $ABTS^{\bullet+}$ monitoreado por la disminución del color (Prior *et al.*, 2005). En la Figura 2.6 se presenta el proceso de oxidación del ABTS (Branchi *et al.*, 2005).

El catión radical $ABTS^{\bullet+}$ puede ser generado por dos vías: por reacción química (por ejemplo, con dióxido de manganeso, 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)·HCl (ABAP) o persulfato de potasio) o por reacción enzimática (por ejemplo, con la metamioglobina, la hemoglobina o peroxidasa). La desventaja de la generación del catión radical por reacción química es que, en general, se requiere de mucho tiempo (por ejemplo, de hasta 16 h para la generación con persulfato de potasio) o de altas temperaturas (por ejemplo, 60°C para la generación con ABAP), mientras que la generación enzimática es más rápida y las condiciones de reacción son más leves (Prior *et al.*, 2005), sin embargo los costos en el último caso son más elevados. Los máximos de absorción del $ABTS^{\bullet+}$ se presentan a longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. Entre ellos, 415 y 734 nm han sido las más estudiadas.

En cuanto a los métodos de cuantificación, la mayoría de los métodos más recientes revisados miden la disminución de la absorbancia de $ABTS^{\bullet+}$ en presencia del compuesto problema o de Trolox en un período de tiempo fijo (4-6 min), y la capacidad antioxidante se calcula como equivalentes Trolox.

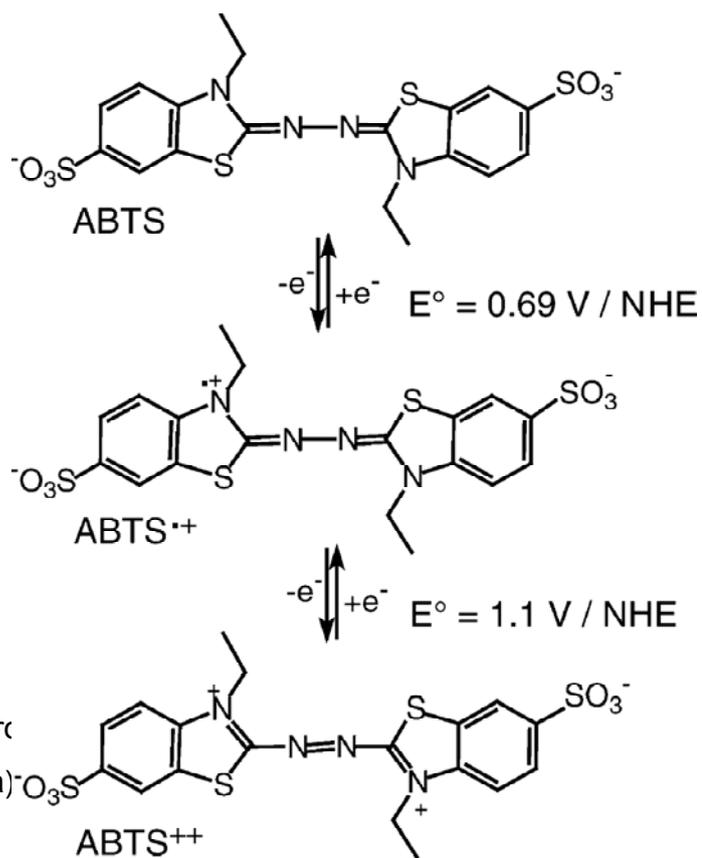


Figura 2.5 Proc
etilbenzotiazolina)

2,2'-azinobis(3-

El catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es soluble en sistemas acuosos y disolventes orgánicos y no se ve afectado por la fuerza iónica, por lo que se puede utilizar en múltiples medios para determinar las capacidades antioxidantes, tanto en los extractos y fluidos corporales hidrofílicos como lipofílicos.

El $\text{ABTS}^{\bullet+}$ utilizado en ensayos de TEAC no se encuentra en los mamíferos y por tanto representa una fuente no fisiológica de radicales. Termodinámicamente, un compuesto puede reducir al $\text{ABTS}^{\bullet+}$ si tiene un potencial redox menor que el de ABTS (0.69 V) (Branchi *et al.*, 2005).

2.2 Experimental

2.2.1 Diseño experimental

La geometría del Cu(II) en el sitio activo de la CuZnSOD es plano cuadrada distorsionada como se esquematiza en la Figura 2.7 (Lippard *et al.*, 1994) y de acuerdo al mecanismo de reacción (Ec. 2.4 y 2.5, pag. 73), la enzima debe sufrir un cambio conformacional para formar la geometría tetraédrica requerida por el Cu(I) involucrado en el mecanismo.

En el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales se han reportado una serie de macrociclos tipo ciclofano que forman complejos metálicos muy estables (Inoue *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2001) y con un modo de coordinación similar a la observada en proteínas binucleares, tales como la antioxidante superóxido dismutasa.

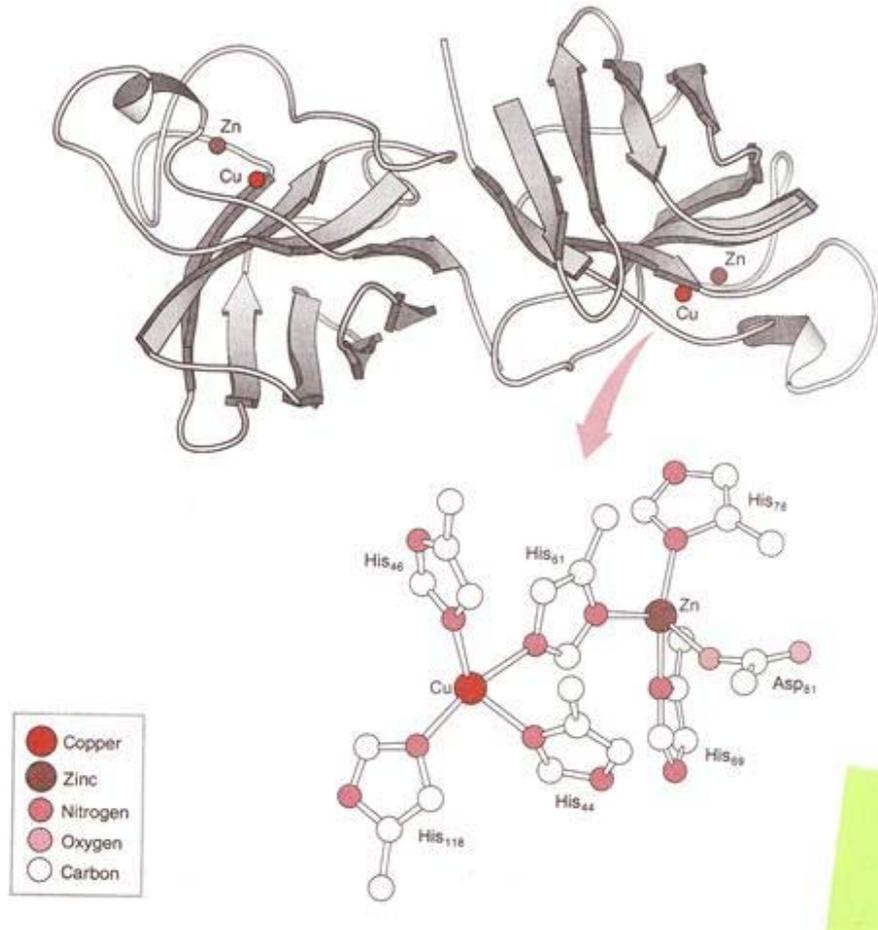


Figura 2.6 Esquema del sitio activo de la CuZnSOD (Lippard *et al.*, 1994)

Dos de estos complejos son Cu_2PO y Cu_2PC , los cuales son estudiados en el presente trabajo en virtud de sus características estructurales: poseen en medio ácido, una estructura octaédrica de tipo I en la que cada átomo de Cu está coordinado a dos oxígenos carboxilato, dos nitrógenos amina y de dos átomos de oxígeno amida (uno de los átomos de oxígeno amida puede ser sustituido por un átomo de oxígeno de agua) (Figura 2.8). En solución alcalina, el tipo de complejo, cambia a la geometría cargada tipo II, plano cuadrado $[\text{Cu}_2\text{LH}^{4-}]^{4-}$ en la que cada átomo de Cu está unido a dos nitrógenos amida desprotonada y dos nitrógenos amino. Esta flexibilidad para intercambiar las geometrías de tipo I y II es una característica importante para su potencial uso como agente imitador de SOD, ya que es un requisito indispensable asociado a los cambios en el estado de oxidación de los átomos de cobre durante el proceso de dismutación del anión superóxido, en donde el cobre pasa de Cu(II) a Cu(I) y de nuevo a Cu(II).

Además, es bien sabido que el cobre(II) tiene preferencias por una geometría tetracoordinada plana (Lippard *et al.*, 1994). Al momento de la reducción a cobre (I), la configuración más estable corresponde a una estructura de coordinación tetraédrica o trigonal. Así, la estructura del macrociclo debe estabilizar ligeramente Cu (II) sobre Cu (I), ya que la estabilización excesiva hacia la geometría plana no es favorable para la dismutación del O_2^- .

Por los motivos anteriormente expuestos, en el presente trabajo se estudió la capacidad mimética de SOD de los complejos de cobre (II) de los ciclofanos PO y PC (Figura 2.8). En lo sucesivo y por cuestiones prácticas, los complejos se nombrarán como Cu_2PO y Cu_2PC .

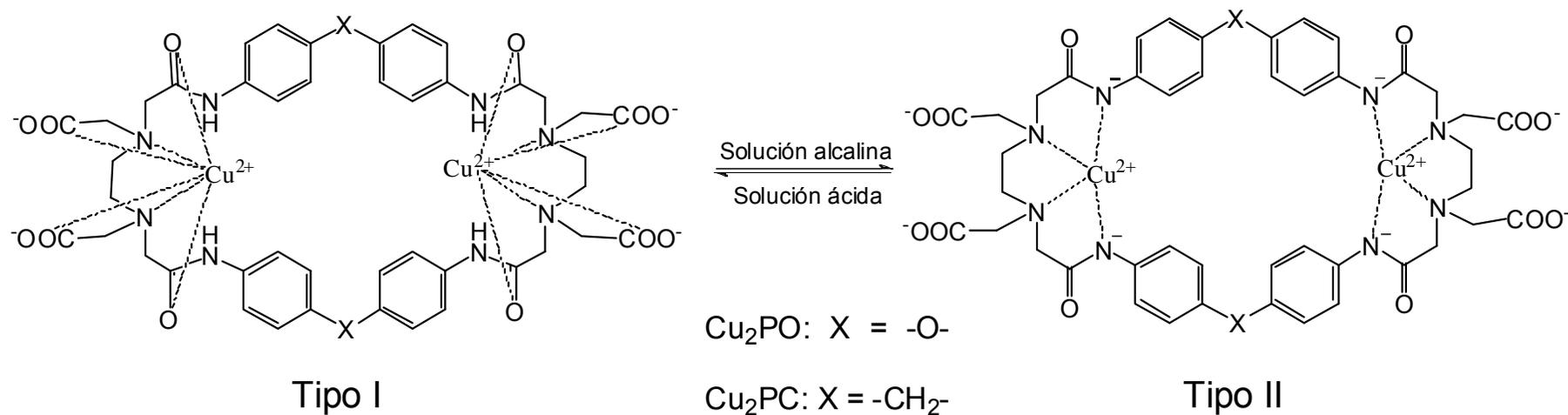


Figura 2.7 Estructuras de los complejos de cobre de los ciclofanos PO y PC probados en este trabajo como miméticos de SOD y como antioxidantes no enzimáticos. En la estructura Tipo I se muestra en su geometría de coordinación octaédrica y la estructura Tipo II indica la geometría plano cuadrado, ambas presentes en equilibrio en los experimentos (Inoue *et al.*, 1998).

Por otra parte, agentes antioxidantes naturales como la Vitamina C y E son tan populares que su demanda no puede ser totalmente satisfecha mediante fuentes naturales por lo que hace tiempo que se producen artificialmente. Con el fin de aumentar el ámbito de acción de los compuestos naturales se están realizando esfuerzos para obtener nuevas sustancias antioxidantes artificiales. Esta investigación enfoca uno de sus objetivos en ese sentido, por lo que se evaluó la capacidad antioxidante de Cu_2PO y Cu_2PC , comparando su actividad con la vitamina C.

Así mismo se evaluó su nivel de toxicidad en células in vitro con el propósito de valorar una potencial aplicación farmacéutica

2.2.2 Materiales.

Para la síntesis, y purificación de los ciclofanos se utilizaron los siguientes reactivos tal y como se adquirieron comercialmente.

1. Dianhídrido etilendiaminotetraacético (EDTA), 98%. Aldrich
2. Bis-(4-aminofenil)éter, 97%. Aldrich
3. Bis-(4-aminofenil)metano, 97%. Aldrich
4. N,N-Dimetilformamida (DMF), 99.9%. Fisher scientific
5. Etanol grado reactivo (EtOH). Merck
6. Carbonato de litio (Li_2CO_3). Mallinckrodt
7. Sílica gel 60 (230-400 mesh). Merck

Para las pruebas de actividad mimética SOD, actividad antioxidante y toxicidad celular, se utilizaron los siguientes materiales tal y como se adquirieron comercialmente (todos los reactivos fueron de grado analítico o superior):

1. L-metionina, Aldrich.
2. Sal nitroazul de tetrazolio (NBT)
3. Triton X-100 al 1%
4. Riboflavina, Aldrich.
5. Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Aldrich
6. ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), Sigma Chemical.
7. Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), Sigma Chemical.
8. Ácido ascórbico (vitamina C), Sigma Chemical.
9. Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).
10. Suero fetal bovino inactivado (FCS). Sigma Chemical
11. 2-mercaptoetanol 50 mM. Sigma Chemical
12. Penicilina, estreptomina, y anfotericina B, Sigma Chemical.
13. Fitohemaglutinina (PHA), Sigma Chemical
14. Colorante azul de tripano., Sigma Chemical

2.2.3 Métodos

2.2.3.1 Síntesis de los ciclofanos y sus complejos de Cu(II)

Los ciclofanos usados en este trabajo y sus complejos de cobre fueron sintetizados por los métodos reportados por Inoue y colaboradores (Inoue *et al.*,

1998). Los procedimientos se describen brevemente a continuación. Para la obtención de los ciclofanos PO y PC, se hizo reaccionar al dianhídrido etilendiaminotetraacético (EDTA) con el 4-aminofenileter y la 4,4'-metlendienilina, respectivamente, utilizando dimetilformamida como solvente.

Después de retirar el solvente se hizo precipitar con etanol, el sólido café obtenido se filtró y se secó para transformarlo a la correspondiente forma de sal por adición de Li_2CO_3 a una suspensión acuosa en relación molar 2:1. La sal de litio del ciclofano se recristalizó de agua en repetidas ocasiones hasta obtener un sólido blanco, y se convirtió a su forma ácida con HCl diluido a $\text{pH} = 2$. La pureza se comprobó por ^1H RMN.

El procedimiento para obtener los complejos de cobre es esencialmente igual para los dos ligantes, por lo que solo se describirá la síntesis para el complejo Cu_2PO : 0.0440 g (4.72×10^{-5} moles) del ciclofano PO se suspendieron en 10 mL de agua y se disolvieron por adición de 0.0067 g (9.0×10^{-5} moles) de Li_2CO_3 . Esta solución se agregó a otra que contiene 0.0152 g (8.91×10^{-5} moles) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para formar un precipitado de color verde claro, el cual se lavó varias veces con etanol y se secó a vacío. El polvo obtenido se suspendió en agua, solubilizándolo por adición de hidróxido de calcio adquiriendo la solución un color verde más intenso. Esta solución se filtró y se dejó evaporar el solvente hasta obtener un volumen de 5-10 mL. Se añadió acetona para precipitar y se dejó en reposo hasta el día siguiente. Se filtró, se lavó con acetona se secó a vacío a 40°C .

2.2.3.2 Actividad mimética SOD

La actividad mimética SOD de los complejos Cu₂PO y Cu₂PC se midió con el método de Beyer y Fridovich (Beyer *et al.*, 1987) modificado preparando la siguiente mezcla de reacción: 27 mL de agua bidestilada, 1.5 mL de solución de L-metionina (30 mg/mL), 1 mL de solución de nitroazul de tetrazolio (1.41 mg/mL) y 0.75 mL de solución de Triton X-100 al 1%. A 3 mL de esta mezcla de reacción se adicionaron 30 µL de solución de riboflavina (4.4 mg/100 mL) y 0.4 mL de la solución del complejo metálico en concentraciones stock adecuadas para obtener concentraciones finales de 0.015, 0.030, 0.10, 0.20, 0.30, y 0.50 µM. La mezcla se iluminó por 15 min con lámparas comerciales de luz fluorescente de 20 W y se procedió a leer su absorbancia a 560 nm.

2.2.3.3 Actividad antioxidante: método TEAC.

El ensayo TEAC se basa en la determinación de equivalentes Trolox, que es un análogo hidrosoluble de la vitamina E. La actividad antioxidante de los complejos Cu₂PO y Cu₂PC fue evaluada a una concentración de 33 µM por el método TEAC modificado (Re *et al.*, 1999).

El método TEAC mide la capacidad del compuesto de prueba para reducir al catión radical ABTS^{•+} (de color azul-verde) frente a la capacidad de Trolox. El catión radical ABTS^{•+} se generó mezclando 5 mL de una solución de ABTS 7 mM y 88 µL de una solución de K₂S₂O₈ 140 mM. Enseguida se diluyó un mililitro de la solución obtenida en 88 ml de etanol, el radical se genera después de 12-16 h en

reposo. Finalmente, en una celda de cuarzo se mezclaron 3.9 mL de la dilución de ABTS⁺⁺ mas 100 μ L de cada muestra. Se leyó la absorbancia a un t=0 y durante 30 minutos después de la mezcla inicial. Se hicieron cálculos de correlación de la capacidad de reducción de Trolox frente a cada muestra (Re *et al.*, 1999). La capacidad antioxidante se expresa en gramos Trolox equivalente por mol de muestra de prueba.

2.2.3.4 Ensayos de toxicidad celular.

Para evaluar la viabilidad del uso de los complejos de cobre en aplicaciones farmacéuticas se midió su toxicidad a células *in vitro*. Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas de donantes sanos y se separaron por centrifugación de un gradiente de densidad. La concentración de células fue ajustada a 2×10^6 células a 1640 RPM con 10% de calor, en suero fetal bovino inactivado (FCS), 2-mercaptoetanol 50 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, y 1 mg/mL anfotericina B.

Se sembraron 1.5×10^5 de CMSP (por pocillo) en 96 pocillos de cultivo de tejidos y fueron estimuladas con fitohemaglutinina (PHA, 5 mg mL⁻¹) en presencia de diferentes concentraciones de Cu₂PO (0.0, 0.04, 0.40, 4.00 y 40.0 μ M). Las células fueron incubadas a 37 ° C en 5% de CO₂, y se evaluó la viabilidad celular a las 6, 18, 24 y 48 horas post-tratamiento, mediante tinción con el colorante azul de tripano.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Características estructurales de los complejos metálicos Cu₂PO y Cu₂PC.

Los complejos metálicos Cu₂PO y Cu₂PC fueron obtenidos en su forma dianiónica ([Cu²⁺PO⁴⁻]²⁻), la cual presenta una geometría plano cuadrada, en donde cada átomo de cobre se encuentra coordinado a dos grupos amida desprotonados y dos grupos amina de la cavidad del macrociclo.

Ambos complejos cambian a geometría octaédrica al disminuir el pH de la solución. De acuerdo con estudios mediante espectroscopía UV-Visible previamente realizados, se tienen evidencias de que el cambio de geometría de Cu₂PO, de plano cuadrada a la octaédrica, se inicia a un de pH ≤ 6.4; el cambio correspondiente para Cu₂PC comienza a pH ≤ 7.1 (Velázquez, 2000). Esta diferencia se atribuye al efecto del grupo que conecta a los anillos fenileno en ambos ciclofanos. En el caso de PO el átomo de oxígeno que conecta ambos grupos fenileno aumenta la densidad electrónica del sistema conjugado, el cual incluye al NH del grupo amida; al aumentar la densidad de carga sobre el átomo de nitrógeno aumenta su basicidad, por lo que el enlace coordinado con Cu²⁺ - con la consecuente desprotonación de NH amida - se presenta a menor pH.

Como se indicó anteriormente, el potencial biomimético como SOD de los complejos Cu₂PO y Cu₂PC se fundamenta en esta capacidad de cambio de geometría del complejo metálico dependiendo de las condiciones del medio.

Adicionalmente, en las geometrías plano-cuadradas de ambos complejos, en virtud de que los átomos de cobre están coordinados a los grupos amida

desprotonados y dado que el par electrónico del grupo amida está conjugado con los grupos aromáticos, la densidad de electrones alrededor de los átomos de Cu es baja, por lo que el potencial de reducción de Cu(II) puede ser menor que en otros complejos de cobre, de modo que el cambio entre Cu(II) y Cu(I) podría ser más fácil.

Otra propiedad importante de Cu₂PO y Cu₂PC es su alta solubilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico. Muchos de los agentes biomiméticos de SOD que se han desarrollado no han llegado al mercado, debido principalmente a las malas propiedades biofarmacéuticas, entre las que se incluye la baja solubilidad acuosa (Hidalgo, 2001). Por esto, la alta solubilidad en agua presentada por Cu₂PO y Cu₂PC en las concentraciones estudiadas en el presente trabajo es una cualidad que debe resaltarse.

2.3.2 Actividad mimética SOD

La actividad mimética de la enzima superóxido dismutasa de los complejos Cu₂PO y Cu₂PC se midió mediante el ensayo de Beyer y Fridovich modificado por la formación de nitroazul de formazán vía oxidación de la sal nitroazul de tetrazolio (NBT por sus siglas en inglés) (Beyer *et al.*, 1987). Para compararse como un mimético de SOD, el compuesto ensayado debe inhibir la oxidación de NBT, los datos se representan como la IC₅₀, esto es, la concentración del complejo que inhibe el 50% de la formación de nitroazul de formazán.

Los resultados de los ensayos para Cu_2PO y Cu_2PC se presentan en la figura 2.9, en la cual se grafica la inhibición de oxidación de NBT vs la concentración del complejo.

El complejo Cu_2PO resultó muy eficaz en su actividad biomimética de SOD presentando una $\text{IC}_{50} = 34$ nM. Este valor es comparable a los valores reportados para la enzima CuZnSOD con un valor de $\text{IC}_{50} = 17$ nM (Fernandes *et al.*, 2007) y mucho mejor que los de algunos complejos de Cu(II) de oxoazamacrociclos reportados con IC_{50} de 6-30 μM (Fernandes *et al.*, 2007).

El valor de IC_{50} obtenido para el complejo Cu_2PC fue más alto que para Cu_2PO ($\text{IC}_{50} = 420$ nM). Esto significa que la actividad de SOD en este caso es menor, sin embargo es comparable con los de otros macrociclos reportados (Fernandes *et al.*, 2007).

La razón de las diferencias en la actividad SOD entre Cu_2PO y Cu_2PC probablemente pueda atribuirse a que, al valor de pH al cual se llevó a cabo el experimento (pH = 7.4), ambos complejos se encuentran en equilibrio entre las dos posibles geometrías: plano cuadrada y octaédrica; sin embargo, Cu_2PO tiene una mayor proporción del complejo metálico en geometría plano cuadrada, en virtud del valor de pH al cual se presenta dicho cambio de geometría (pH 6.4), en tanto que en Cu_2PC ocurre a pH 7.1.

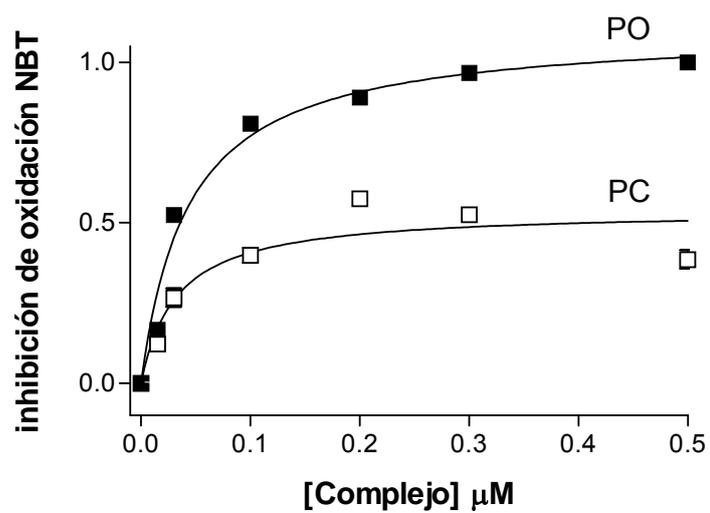


Figura 2.8 Actividad mimética de SOD de Cu_2PO y Cu_2PC , como inhibidores de la formación de nitroazul de formazán. Los datos se ajustaron a un modelo hiperbólico en la forma de la ecuación de Michaelis-Menten usando el programa GraphPad Prism versión 5.0.

2.3.3 Capacidad antioxidante

El uso de receptores ciclofanos para fines biomédicos puede ser más atractivo y útil si también están presentes otras propiedades como la actividad antioxidante contra diferentes moléculas. El Cu₂PO resultó con una actividad de 0,10 g eq Trolox mol⁻¹ esto es, casi el doble más antioxidante que Cu₂PC como se aprecia en la gráfica de Figura 2.10.

Una observación interesante es que la actividad de Cu₂PO se encuentra cercana a la de moléculas clásicas de elevada actividad antioxidante como la de ácido ascórbico con 0.15 g eq Trolox mol⁻¹. Esta es una propiedad importante cuando se utiliza este tipo de moléculas en casos como hipoxia, liberación controlada o en terapia de inflamación (Samlowski *et al.*, 2003).

El mecanismo propuesto para la actividad antioxidante de los complejos Cu₂PO y Cu₂PC consiste en la capacidad de oxidación del Cu(II) a Cu(III), reduciendo con esto al catión radical ABTS^{•+}. Las diferencias en la capacidad antioxidante de los complejos de cobre de los dos ciclofanos podrían explicarse en base a que las diferencias estructurales (debidas a los grupos -O- en Cu₂PO y -CH₂- en Cu₂PC) como distinto grado de rigidez y disponibilidad de electrones por efecto de resonancia, les confieran distintas capacidades para atrapar a los radicales y facilitar o dificultar la oxidación.

En base a estos resultados, los complejos de cobre de los ciclofanos PO y PC pueden ser considerados moléculas bioactivas, porque su capacidad antioxi-

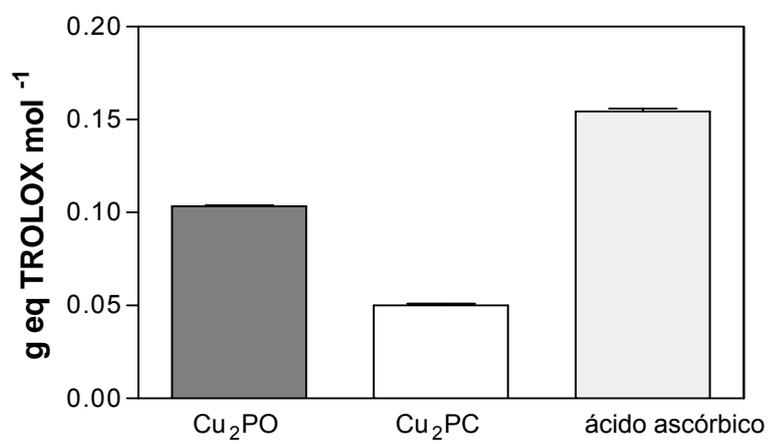


Figura 2.9 Capacidad antioxidante de los complejos de cobre Cu₂PO y Cu₂PC por el método TEAC. Programa GraphPad Prism versión 5.0.

dante es comparable, aunque inferior, a los ácidos fenólicos, flavonoides, y las vitamina C y E (Aispuro-Hernandez *et al.*, 2008; Alvarez-Parrilla *et al.*, 2005).

Toxicidad celular

2.3.4 Toxicidad celular.

Para evaluar la citotoxicidad de los Cu₂-ciclofanos, se incubaron diferentes concentraciones de Cu₂PO con células CMSP y el porcentaje de mortalidad fue evaluada por tinción con el colorante azul de tripano. La Figura 2.11 muestra que la mortalidad inducida en las células a las 6, 11 o 24 horas por Cu₂PO es muy baja, incluso para concentración más alta de Cu₂PO (40 µM). Una observación interesante es que las concentraciones bajas de Cu₂PO mostraron un efecto protector contra la mortalidad celular ya que en la muestra control (células sin Cu₂PO) la mortalidad a las 48 h de cultivo fue de 35%, mientras que, las dosis bajas de Cu₂PO la mortalidad fue inferior al 29%.

Estos resultados indican que Cu₂PO no es citotóxico para las células en las primeras 24 h de cultivo, incluso cuando se utilizan dosis altas. Más allá de las 48 h, la mortalidad de las células aumentó debido al agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo.

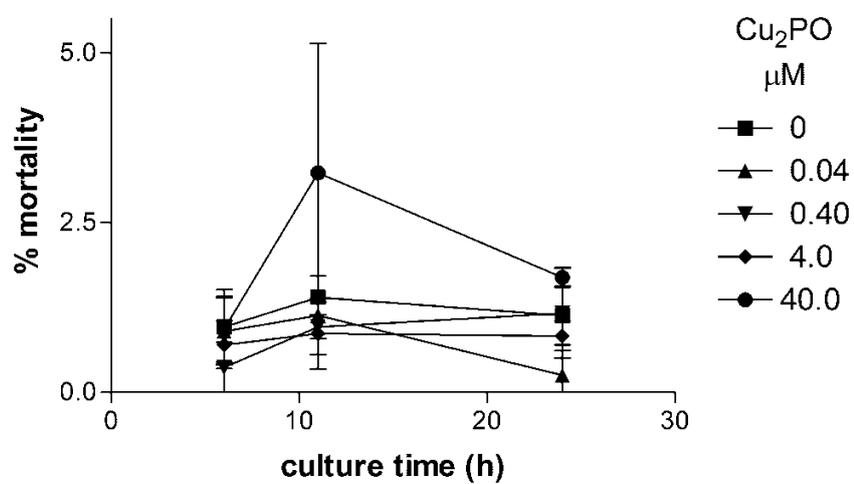


Figura 2.10 La toxicidad celular fue determinada en células mononucleares (CMSP) en diferentes tiempos de post-tratamiento con cuatro concentraciones de Cu_2PO . La gráfica representa la media \pm error estándar de un experimento representativo de dos realizados por triplicado

2.4 Conclusiones

Los complejos macrociclos/Cu(II) Cu_2PO y Cu_2PC estudiados son capaces de dismutar significativamente a aniones superóxido, por lo que pueden ser considerados buenos agentes biomiméticos de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El valor de IC_{50} obtenido para Cu_2PO es similar al de la enzima SOD. El complejo Cu_2PC presentó menor actividad mimética SOD que Cu_2PO , sin embargo es similar a la de otros macrociclos reportados.

Las propiedades como imitadores de SOD de Cu_2PO y Cu_2PC se atribuyen a sus propiedades químicas y estructurales, que les proporcionan alta estabilidad y a flexibilidad para cambiar la geometría de coordinación del sitio de enlace con cobre, de plano cuadrado a octaédrica y viceversa, dependiendo de las condiciones del medio.

Las diferencias entre ambos complejos metálicos en la actividad como SOD probablemente se deban a que en Cu_2PO , al pH que se corrieron los experimentos ($\text{pH} = 7.4$), hay una mayor proporción de la geometría plano cuadrada en referencia a la octaédrica. Sin embargo, se requiere realizar estudios espectroscópicos y electroquímicos para confirmar esta situación.

Los complejos Cu_2PO y Cu_2PC presentaron una buena capacidad antioxidante, siendo mejor la actividad de Cu_2PO con un valor comparable con otros antioxidantes naturales por lo que se puede considerar como molécula bioactiva.

Los complejos metálicos son altamente solubles en agua a las concentraciones estudiadas; además el complejo Cu_2PO no presenta efectos nocivos sobre células mononucleares e inclusive muestra un efecto protector a dosis bajas. Estas dos propiedades le proporcionan un alto potencial para su aplicación como producto farmacéutico.

CONCLUSIONES GENERALES

La mutación de la enzima TS a K48Q conlleva a una disminución en la afinidad de la enzima hacia PDDF y U89 –análogos del cofactor natural CH_2THF –, por lo que lisina en la posición 48 (K48) es un factor importante en la unión de los folatos.

La mutación no afecta la selectividad de la enzima por los antifolatos, en virtud de que la afinidad de la enzima disminuye en la misma proporción para PDDF y U89.

Los folatos U89 y PDDF solamente ocupan un sitio activo de la enzima TS, así como PDDF en la enzima mutante, lo que habla de la asimetría del sitio activo. La excepción se da en el sistema K48Q-dUMP-U89 donde el folato si se enlaza a los dos sitios activos de la enzima mutante.

La estabilidad de los cuatro sistemas estudiados es conducida por el factor entálpico. Sin embargo, en ambos complejos ternarios de U89 los valores del término entrópico indican la contribución del efecto hidrofóbico.

La menor estabilidad termodinámica de los complejos ternarios de K48Q obedece a los valores negativos de $\Delta T\Delta S$, lo que significa un alto costo entrópico en la formación del complejo en referencia a los complejos de TS WT.

Los datos termodinámicos para la unión de TS y los antifolatos PDDF y U89 se establecen como referencia para trabajos futuros, por ser los primeros obtenidos por ITC.

El complejo metálico Cu_2PO mostró una excelente actividad biomimética SOD y muy buena capacidad antioxidante. Esto, aunado a su alta solubilidad en agua y a la ausencia de efectos citotóxicos le confieren un buen potencial como producto farmacéutico.

El estudio de la importancia del reconocimiento molecular en sistemas enzimáticos naturales y sintéticos resulta en la mejor comprensión de los fenómenos que ocurren a nivel biológico y en el desarrollo de nuevos materiales con posibles aplicaciones académicas, tecnológicas e industriales.

BILBIOGRAFÍA

- Aispuro-Hernandez, E.; Garcia-Orozco, K. D.; Muhlia-Almazan, A.; del-Toro-Sanchez, L.; Robles-Sanchez, R. M.; Hernandez, J.; Gonzalez-Aguilar, G.; Yepiz-Plascencia, G.; Sotelo-Mundo, R. R. (2008) "Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148, 94-99.
- Alvarez-Parrilla, E.; De La Rosa, L. A.; Torres-Rivas, F.; Rodrigo-Garcia, J.; González-Aguilar, G. A. (2005). "Complexation of apple antioxidants: Chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD)". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 53, 121-129.
- Arvizu-Flores, A. A.; Sugich-Miranda, R.; Arreola, R.; Garcia-Orozco, K. D.; Velazquez-Contreras, E. F.; Montfort, W. R.; Maley, F.; Sotelo-Mundo, R. R. (2008). "Role of an invariant lysine residue in folate binding on *Escherichia coli* thymidylate synthase: Calorimetric and crystallographic analysis of the K48Q mutant". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 2206-2217.
- Autzen, S.; Korth, H.-G.; Boese, R.; de Groot, H.; Sustmann, R. (2003). "Studies of pyridinyl-containing 14-membered macrocyclic copper(II) complexes". *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2003, 1401-1410.
- Bertino, J. R. (1997). "Chemotherapy of colorectal cancer: History and new themes". *Seminars in Oncology*, 24, 3-7.
- Beyer, F. B., Jr.; Fridovich, I. (1987). "Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions". *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566.
- Branchi, B.; Galli, C.; Gentili, P. (2005) "Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox". *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 2604-2614.
- Breckenridge, R. J. (1991) "Molecular recognition: Models for drug design". *Experientia*, 47, 1148-1161.
- Breslow, R. (1972) "Centenary lecture. Biomimetic chemistry". *Chemical Society Reviews*, 1, 553-580.
- Carreras, C. W.; Santi, D. V. (1995) "The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase". *Annual Review of Biochemistry*, 64, 721-762.

- Chang, R., (2007) "Química". McGraw-Hill/Interamericana, México, 9ª edición.
- Chen, C.-H.; Davis, R. A.; Maley, F. (1996) "Thermodynamic stabilization of nucleotide binding to thymidylate synthase by a potent benzoquinazoline folate analogue inhibitor". *Biochemistry*, 35, 8786-8793.
- Chu, E.; Callender, M. A.; Farrell, M. P.; Schmitz, J. C. (2003) "Thymidylate synthase inhibitors as anticancer agents: From bench to bedside". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 52, 80-89.
- Cooper, A.; Johnson, C. M.; Lakey, J. H.; Nöllmann, M. (2001) "Heat does not come in different colours: Entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, salvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions". *Biophysical Chemistry*, 93, 215-230.
- Danenberg, P. V.; Langenbanch, R. J.; Heidelberger, C. (1974) "Fluorinated pyrimidines. Structures of reversible and irreversible complexes of thymidylate synthetase and fluorinated pyrimidine nucleotides". *Biochemistry*, 13, 926-933.
- Davies, K. J. A.; Pryor, W. A. (2005) "The evolution of free radical biology & medicine: A 20-year history". *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1263-1264.
- Dev, I. K.; Dallas, W. S.; Ferone, R.; Hanlon, M.; McKee, D. D.; Yates, B. B. (1994) "Mode of binding of folate analogs to thymidylate synthase. Evidence for two asymmetric but interactive substrate binding sites". *Journal of Biological Chemistry*, 269, 1873-1882.
- Diederich, F. (1991) "*Cyclophanes, Monographs in supramolecular chemistry*" Vol. 2. Editorial The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Dugas, H., (1996) "*Bioorganic chemistry. A chemical approach to enzyme action*". Third edition; Springer-Verlag: New York.
- Đuračková, Z.; Labuda, J. (1995) "Superoxidase dismutase mimetic activity of macrocyclic Cu(II)-Tetraanhydroaminobenzaldehyde (TAAB) complex". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 58, 197-303.
- Fernandes, A. S.; Gaspar, J.; Cabral, M. F.; Caneiras, C.; Guedes, R.; Rueff, J.; Castro, M.; Costa, J.; Oliveira, N. G. (2007) "Macrocyclic copper(II) complexes: Superoxide scavenging activity, structural studies and cytotoxicity evaluation". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 849-858.

- Finer-Moore, J. S.; Santi, D. V.; Stroud, R. M. (2003) "Lessons and conclusions from dissecting the mechanism of a bisubstrate enzyme: Thymidylate synthase mutagenesis, function, and structure". *Biochemistry*, *42*, 248-256.
- Fridovich, I. Greenwald, R. A., (1985) "*Handbook of methods for oxygen radical research*"; CRC Press: Boca Raton; p 51
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. (1977) "Superoxide dismutases". *Plant Physiology*, *49*, 309-314.
- Hamilton, A. D. (1990) "Molecular recognition-design and synthesis of artificial receptors employing directed hydrogen-bonding interactions". *Journal of Chemical Education*, *67*, 821-828.
- Hidalgo, I. J. (2001) "Assessing the absorption of new pharmaceuticals". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *1*, 385-401.
- Holdgate, G. A. (2001) "Making cool drugs hot: The use of isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetic". *BioTechniques*, *31*, 164-184.
- Huennekens, F. M. (1994) "The methotrexate story: A paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents". *Advances in Enzyme Regulation*, *34*, 397-419.
- Hyatt, D. C.; Maley, F.; Montfort, W. R. (1997) "Use of strain in a stereospecific catalytic mechanism: Crystal structures of *Escherichia coli* thymidylate synthase bound to FdUMP and methylenetetrahydrofolate". *Biochemistry*, *36*, 4585-4594.
- Inoue, M. B.; Inoue, M.; Sugich-Miranda, R.; Machi, L.; Velazquez, E. F.; Fernando, Q. (2001) "High steric constraints and molecular distortion in methyl-substituted amide-based paracyclophanes and the binuclear Cu²⁺ complexes: X-ray structures, NMR and absorption spectra". *Inorganica Chimica Acta*, *317*, 181-189.
- Inoue, M. B.; Velazquez, E. F.; Medrano, F.; Ochoa, K. L.; Galvez, J. C.; Inoue, M., Fernando, Q. (1998) "Binuclear copper(II) chelates of amide-based cyclophanes". *Inorganic Chemistry*, *37*, 4070-4075.
- Inoue, M. B.; Velazquez, E. F.; Inoue, M.; Fernando, Q. (1997) "Molecular recognition of phenethylamine, tyramine and dopamine with new anionic cyclophanes in aqueous media". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2113-2118.

- Irving, H.; Williams, R. J. P. (1953) "The stability of transition-metal complexes". *Journal of the Chemical Society*, 3192-3210.
- Jackman, A. L.; Harrap, K. R.; Boyle, F. T. (1996) "Tomudex™ (ZD1694): From concept to care, a programme in rational drug discovery". *Investigational New Drugs*, 14, 305-316.
- Kamb, A.; Finer-Moore, J. S.; Calvert, A. H.; Stroud, R. M. (1992) "Structural basis for recognition of polyglutamyl folates by thymidylate synthase". *Biochemistry*, 31, 9883-9890.
- Kamb, A.; Finer-Moore, J. S.; Stroud, R. M. (1992) "Cofactor triggers the conformational change in thymidylate synthase: Implications for an ordered binding mechanism". *Biochemistry*, 31, 12876-12884.
- Kamen, B. (1997) "Folate and antifolate pharmacology". *Seminars in Oncology*, 24, 30-39.
- Kesić, A.; Mazalović, M.; Crnkić, A.; Čatović, B.; Hadžidedić, Š.; Dragošević, G. (2009) "The influence of L-ascorbic acid content on total antioxidant activity of bee-honey". *European Journal of Scientific Research*, 32, 96-102.
- Kimura, E.; Nishimura, K.; Sakata, K. Oga, S.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K. (2004) "Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 814-825.
- Kimura, E.; Yatsunami, A.; Watanabe, A.; Machida, R.; Koike, T.; Fujioka, H.; Kuramoto, Y.; Sumomogi, M.; Kunimitsu, K.; Yamashita, A. (1983) "Further studies on superoxide dismutase activities of macrocyclic polyamine complexes of copper(II)". *Biochimica et Biophysica Acta*, 745, 37-43.
- Klebe, G. (2000) "Recent developments in structure-based drug design" *Journal of Molecular Medicine*, 78, 269-281.
- Labádi, I.; Benkő, M.; Markó, K.; István, S. (2009) "Mimicking a superoxide dismutase (SOD) enzyme by copper(II) and zinc(II)-complexes". *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 96, 327-333.
- LaPat-Polasko, L.; Maley, G. F.; Maley, F. (1990) "Properties of bacteriophage T4 thymidylate synthase following mutagenic changes in the active site and folate binding region". *Biochemistry*, 29, 9561-9572.
- Lehn, J. M. (1980) "Dinuclear cryptates: Dimetallic macropolycyclic inclusion complexes. Concepts-design-prospects" *Pure & Applied Chemistry*, 52, 2441-2459.

- Lehn, J. M. (1985) "Supramolecular chemistry: Receptors, catalysts, and carriers" *Science*, 227, 849-856.
- Lippard, S. J.; Berg, J. M. (1994) "*Principles of bioinorganic chemistry*". University Science Books: Mill Valley.
- Maley, G. F.; Maley, F.; Baugh, C. M. (1982) "Studies on identifying the folylpolyglutamate binding sites of *Lactobacillus casei* thymidylate synthetase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 216, 551-558.
- Man, C. K. C.; Forster, I. F. B.; Cho, P. (2000) "Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3293-3298.
- Maroz, A.; Kelso, G. F.; Smith, R. A. J.; Ware, D. C.; Anderson, R. F. (2008) "Pulse radiolysis investigation on the mechanism of the catalytic action of Mn(II)-pentaazamacrocyclic compounds as superoxide dismutase mimetics". *Journal of Physical Chemistry A*, 112, 4929-4935.
- Marques, F.; Gano, L.; Campello, M. P.; Lacerda, S.; Santos, I.; Lima, L. M. P.; Costa, J.; Antunes, P.; Delgado, R. (2006) "13- and 14-membered macrocyclic ligands containing methylcarboxylate or methylphosphonate pendant arms: Chemical and biological evaluation of their ^{153}Sm and ^{166}Ho complexes as potential agents for therapy or bone pain palliation". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 270-280.
- Marques, F.; Guerra, K. P.; Gano, L.; Costa, J.; Campello, M. P.; Lima, L. M. P.; Delgado, R.; Santos, I. (2004) " ^{153}Sm and ^{166}Ho complexes with tetraaza macrocycles containing pyridine and methylcarboxylate or methylphosphonate pendant arms". *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9, 859-872.
- Matthews, D. A.; Appelt, K.; Oatley, S. J.; Xuong, N. H. (1990) "Crystal structure of *Escherichia coli* thymidylate synthase containing bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and 10-propargyl-5,8-dideazafolate". *Journal of Molecular Biology*, 214, 923-936.
- McCord, J. M.; Fridovich, I. (1969) "Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)" *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- Misso, N. L. A.; Brooks-Wildhaber, J.; Ray, S.; Vally, H.; Thompson, P. J. (2005) "Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in sever asthma". *European Respiratory Journal*, 26, 257-264.

- Montfort, W. R.; Perry, K. M.; Fauman, E. B.; Finer-Moore, J. S.; Maley, G. F.; Hardy, L.; Maley, F.; Stroud, R. M. (1990) "Structure, multiple site binding, and segmental accommodation in thymidylate synthase on binding dUMP and an anti-folate". *Biochemistry*, 29, 6964-6977.
- Papamichael, D. (1999) "The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: Current status". *The Oncologist*, 4, 478-487.
- Pearson, R. G. (1963) "Hard and soft acids and bases". *Journal of the American Chemical Society*, 85, 3533-3539.
- Pearson, R. G. (1987) "Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases". *Journal of Chemical Education*, 64, 561-567.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005) "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Riley, D. P. (1999) "Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents". *Chemical Reviews*, 99, 2573-2587.
- Rodgers, G. E. (1995) "Química inorgánica: Introducción a la química de coordinación, del estado sólido y descriptiva" McGraw-Hill: Madrid; pp 37-99.
- Salvemini, D.; Wang, Z.-Q.; Zweier, J. L.; Samouilov, A.; Macarthur, H.; Misko, T. P.; Currie, M. G.; Cuzzocrea, S.; Sikorski, J. A.; Riley, D. P. (1999) "A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats". *Science*, 286, 304-306.
- Samlowski, W. E.; Petersen, R.; Cuzzocrea, S.; Macarthur, H.; Burton, D.; McGregor, J. R.; Salvemini, D. (2003) "A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase, M40403, inhibits dose-limiting hypotension associated with interleukin-2 and increases its antitumor effects". *Nature Medicine*, 9, 750-755.
- Santi, D. V.; McHenry, C. S.; Sommer H. (1974) "Mechanism of interaction of thymidylate synthase with 5-fluorodexoyuridylate". *Biochemistry*, 13, 471-481.

- Schmidtchen, F. P. (2007) "*Isothermal titration calorimetry. Vol. 1; Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*" Bavaria, pp. 1-10
- Sotelo-Mundo, R. R. (2001) "Estudios estructurales de la timidilato sintasa en el diseño de fármacos anticancer". *Boletín de Educación Bioquímica*, 108-113.
- Stauffer, C. E. (1989) "*Enzyme assays for food scientists*". Van Nostrand Reinhold: New York.
- Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. J. (2007) "*Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*" John Wiley & Sons: West Sussex.
- Stout, T. J.; Stroud, R. M. (1996) "The complex of the anti-cancer therapeutic, BW1843U89, with thymidylate synthase at 2.0 Å resolution: Implications for a new mode of inhibition". *Structure*, 4, 67-77.
- Stout, T. J.; Tondi, D.; Rinaldi, M.; Barlocco, D.; Pecorari, P.; Santi, D. V.; Kuntz, I. D.; Stroud, R. M.; Shoichet, B. K.; Costi, M. P. (1999) "Structure-based design of inhibitors specific for bacterial thymidylate synthase". *Biochemistry*, 38, 1607-1617.
- Stroud, R. M.; Finer-Moore, J. S. (2003) "Conformational dynamics along an enzymatic reaction pathway: Thymidylate synthase, "the movie"". *Biochemistry*, 42, 239-247.
- Tejacal, I. A., Colinas L., M. T., Martínez D., M. T., & M., S. H. R. (2005) "Daños por frío en Zapote Mamey. II. Cambios en fenoles totales y actividad enzimática". *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 25-32.
- Tesei, A.; Ricotti, L.; De Paola, F.; Amadori, D.; Frassinetti, G. L.; Zoli, W. (2002) "*In vitro* schedule-dependent interactions between the multitargeted antifolate LY231514 and gemcitabine in human colon adenocarcinoma cell lines". *Clinical Cancer Research*, 8, 233-239.
- Tsavaris, N.; Kosmas, C.; Vadiaka, M.; Kontos, A.; Fotia, M.; Angelopoulou, A.; Vrizedis, N.; Soulla, M.; Sougioultzis, S.; Koufoset, C. (2002) "Raltitrexed (Tomudex) administration in patients failing multiple prior chemotherapy regimens in advanced colorectal cancer: a pilot study". *Investigational New Drugs*, 20, 133-136.
- Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. (2003) "On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?" *Journal of the American Chemical Society*, 125, 14859-14866.

- Van Aardt, M.; Duncan, S. E.; Marcy, J. E.; Long, T. E.; O'keefe, S. F.; Nielsen-Sims, S. R. (2005) "Effect of antioxidant (α -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk". *Journal of Dairy Science*, 88, 972-880.
- Vaya, J.; Aviram, M. (2001) "Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications". *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 1, 99-117.
- Velazquez-Campoy, A.; Freire, E. (2005) "ITC in the post-genomic era...? Priceless". *Biophysical Chemistry*, 115, 115-124.
- Velázquez C. E. F. (2000) "Síntesis de [10.1.10.1] paraciclofanos funcionalizados y estudio de sus propiedades de complejación y reconocimiento molecular" Hermosillo, Sonora: Editorial Universidad de Sonora. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales.
- Verlinde, C. L. M.- J.; Hol, W. G. J. (1994) "Structure-based drug design: progress, results and challenges". *Structure*, 2, 577-587.
- Weichsel, A.; Montfort, W. R. (1995) "Ligand-induced distortion of an active site in thymidylate synthase upon binding anticancer drug 1843U89". *Nature Structural Biology*, 2, 1095-1101.
- Weichsel, A.; Montfort, W. R.; Cieśla, J.; Maley, F. (1995) "Promotion of purine nucleotide binding to thymidylate synthase by a potent folate analogue inhibitor, 1843U89". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 3493-3497.
- Widemann, B. C.; Balis, F. M.; Godwin, K. S.; McCully, C; Adamson, P. C. (1999) "The plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed (TomudexTM) in a nonhuman primate model". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 44, 439-443.
- Zhu, H.-L.; Zheng, L.-M.; Fu, D.-G.; Huang, X.-Y.; Wu, M.-F.; Tang, W.-X. (1998) "The synthesis, structure and SOD-like behaviours of a μ -imidazolato-dicopper complex with a binucleating hexaazamacrocyclic". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 70, 211-218.

ARTÍCULOS ANEXOS

Publicaciones relacionadas con el Trabajo de Tesis

1. Arvizu-Flores, A. A.; Sugich-Miranda, R.; Arreola, R.; Garcia-Orozco, K. D.; Velazquez-Contreras, E. F.; Montfort, W. R.; Maley, F.; Sotelo-Mundo, R. R. (2008). "Role of an invariant lysine residue in folate binding on *Escherichia coli* thymidylate synthase: Calorimetric and crystallographic analysis of the K48Q mutant". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 2206-2217.
2. Sugich-Miranda, R., Sotelo-Mundo R. R., Silva-Campa E., Hernández J., Gonzalez-Aguilar G. A., and Velazquez-Contreras E. F. "Antioxidant Capacity of Binuclear Cu(II)-Cyclophanes, Insights from a Synthetic Bioactive Molecules" *Journal of Biochemical and Molecular Toxicolgy*. Enviado para publicación.
3. Inoue M.B., Inoue M., Sugich-Miranda R., Machi L., Velazquez E., Fernando Q. (2001) "High steric constraints and molecular distortion in methyl-substituted amide-based paracyclophanes and the binuclear Cu²⁺ complexes: X-ray structures, NMR and absorption spectra" *Inorganica Chimica Acta* 317, 181–189