



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Estudio de fármacos modificados por complejación con biometales. Determinación de sus propiedades biológicas.

Tesista: Lic. Agustín B. Actis Dato

Directora: Dra. Patricia A. M. Williams

Directora: Dra. Evelina G. Ferrer

Año: 2025

Este trabajo de tesis doctoral fue realizado en el Centro de Química Inorgánica “Dr. Pedro J. Aymonino” (CEQUINOR-CONICET-UNLP) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Área: Química y se llevó a cabo bajo la dirección de las Dras. Patricia A. M. Williams y Evelina G. Ferrer.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional de La Plata, al Centro de Química inorgánica Prof. Aymonino y al CONICET por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis de doctorado, apoyando mi desarrollo académico y científico.

A mis directoras, Patricia A. M. Williams y Evelina G. Ferrer, por su orientación, sus valiosos consejos y su apoyo en cada etapa de este trabajo. Su dedicación y compromiso han sido fundamentales para finalizarlo de manera exitosa.

A la Dra. Valeria Martínez y a la Dra. Luciana Naso, por enseñarme muchas de las técnicas experimentales realizadas en esta investigación, las cuales fueron clave para crecer como profesional.

A mis padres, por ser un pilar en mi vida personal y académica. A Karen, Cristian, Sebastián, Damián, Julián, Lucía, Alexandra, Gonzalo, Janetsi, Gisela y Nancy, por compartir conmigo estos últimos años, celebrando cada logro y siendo refugio durante los momentos difíciles.

A la cátedra de Química Inorgánica, por darme compañeros de trabajo excelentes, por servir como cable a tierra durante las etapas más difíciles de este camino, por permitirme formarme como docente y por aportarme conocimientos valiosos para desarrollar este trabajo.

Índice

Hipótesis y objetivos.....	10
1 Introducción.....	12
1.1 Química bioinorgánica.....	13
1.1.1 Definición.....	13
1.1.2 Compuestos de coordinación.....	14
1.1.3 Metales de coordinación en la medicina: Vanadio y Zinc	15
1.2 Cáncer.....	20
1.2.1 Descripción y mecanismos moleculares	20
1.2.2 Equilibrio redox y cáncer.....	23
1.2.3 Propiedades antitumorales del vanadio	26
1.2.4 Propiedades antitumorales de los flavonoides	27
1.3 Hipertensión arterial	31
1.3.1 Descripción	31
1.3.2 Tratamiento de la hipertensión arterial	31
1.3.3 Rol del zinc en la hipertensión arterial.....	37
1.4 Enfermedades neurodegenerativas y compuestos neuroprotectores.....	38
1.4.1 Enfermedades neurodegenerativas	38
1.4.2 Compuestos de coordinación con actividad neuroprotectora	41
1.5 Bibliografía	42
2 Materiales y Métodos	55
2.1 Reactivos.....	56
2.2 Caracterización fisicoquímica	56
2.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	56
2.2.2 Análisis termogravimétrico	57
2.2.3 Análisis elemental.....	58

2.2.4	Determinaciones analíticas	58
2.2.5	Espectroscopía UV-visible	60
2.2.6	Conductividad molar	62
2.2.7	Espectroscopía de fluorescencia	63
2.2.8	Medidas de estabilidad	64
2.2.9	Resonancia magnética nuclear	64
2.2.10	Resonancia paramagnética electrónica	65
2.2.11	Espectroscopía de masas	67
2.3	Ensayos de biodisponibilidad.....	68
2.3.1	Interacción con albúmina sérica bovina	68
2.3.2	Medidas de reparto en agua/octanol como aproximación a la interfaz del sistema sangre/cerebro.....	71
2.4	Estudios de actividad biológica <i>in vitro</i> para compuestos antitumorales ..	72
2.4.1	Incubación de células con compuestos bioactivos	72
2.4.2	Análisis morfológico por tinción con cristal violeta.....	75
2.4.3	Ensayo de viabilidad celular.....	76
2.4.4	Determinación del potencial de membrana mitocondrial	76
2.4.5	Medida de especies reactivas de oxígeno	78
2.4.6	Determinación de la relación entre glutatión reducido y oxidado.....	79
2.4.7	Determinación de vanadio intracelular	82
2.4.8	Estudios de actividad antimetastásica.....	83
2.5	Estudios de actividad biológica <i>in vivo</i> para compuestos antihipertensivos.....	85
2.5.1	Animales.....	86
2.5.2	Determinación de presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas	87
2.6	Estudios de actividad biológica <i>ex vivo</i> para compuestos antihipertensivos.....	89
2.6.1	Preparación de homogenato de tejido cardíaco	89

2.6.2	Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido cardíaco	89
2.6.3	Medida de peroxidación lipídica en tejido cardíaco	89
2.6.4	Determinación de niveles de óxido nítrico en tejido cardíaco	91
2.6.5	Determinación del área de sección transversal de cardiomiocitos de ratas SHR.....	91
2.6.6	Determinación de colágeno tipo I y tipo III en tejido cardíaco de ratas SHR.....	92
2.6.7	Análisis de expresión proteica por Western Blot	92
2.7	Estudios de neuroprotección <i>in vitro</i>	94
2.7.1	Cultivo primario de neuronas corticales de embriones de rata y pretratamiento con compuestos de interés	94
2.7.2	Tratamiento con el agente excitotóxico glutamato.....	95
2.7.3	Determinación de viabilidad de neuronas	96
2.7.4	Activación de caspasas 3/7.....	96
2.7.5	Crecimiento de neuritas	97
2.7.6	Ensayo de lactato deshidrogenasa	97
2.8	Análisis estadístico	99
2.9	Bibliografía	99
3	Cáncer. Compuestos antitumorales de V(IV) y Zn(II).....	104
3.1	Introducción – Complejo antitumoral de V(IV).....	105
3.2	Resultados	106
3.2.1	Síntesis del complejo [VO(Cris)(Fen)Cl] (VOCrisFen).....	106
3.2.2	Caracterización fisicoquímica	107
3.2.3	Ensayos de biodisponibilidad.....	116
3.2.4	Estudios de actividad antitumoral <i>in vitro</i>	120
3.3	Discusión.....	125
3.4	Introducción – Complejo antitumoral de Zn(II)	126
3.5	Resultados	128

3.5.1	Síntesis del complejo $[\text{ZnCD}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ZnCD).....	128
3.5.2	Caracterización fisicoquímica	129
3.5.3	Ensayos de biodisponibilidad	137
3.5.4	Estudios de actividad antitumoral <i>in vitro</i>	141
3.5.5	Estudios de actividad antimetastásica.....	149
3.6	Discusión.....	155
3.7	Conclusión.....	156
3.8	Bibliografía	157
4	Hipertensión. Complejo de Zn(II) y el fármaco antihipertensivo α -metildopa	162
4.1	Introducción.....	163
4.2	Resultados	165
4.2.1	Síntesis del complejo ZnMD	165
4.2.2	Caracterización fisicoquímica	165
4.2.3	Ensayos de biodisponibilidad	172
4.2.4	Estudios de actividad biológica <i>in vivo</i>	176
4.2.5	Estudios de actividad biológica <i>ex vivo</i>	178
4.2.6	Estudios histológicos <i>ex vivo</i>	182
4.3	Discusión.....	186
4.4	Conclusión.....	189
4.5	Bibliografía	189
5	Neuroprotección. Compuesto neuroprotector de L-Dopa y Zn(II)	193
5.1	Introducción.....	194
5.2	Resultados	196
5.2.1	Síntesis del complejo ZnLD ($[\text{Zn}(\text{LD})(\text{H}_2\text{O})\text{OH}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	196
5.2.2	Caracterización fisicoquímica	196
5.2.3	Estudios de biodisponibilidad	201

5.2.4	Evaluación de los efectos neuroprotectores <i>in vitro</i>	204
5.3	Discusión.....	208
5.4	Conclusiones.....	210
5.5	Bibliografía	210
	Conclusiones finales	213
	Anexo: Publicaciones.....	217

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANOVA: Análisis de varianza
ASB: Albúmina sérica bovina
ATP: Adenosín trifosfato
BHE: Barrera hematoencefálica
CD: Carbidopa
Cris: Crisina
CRSC: Cotransportador renal de sodio/cloruro
DCF: 2',7'-diclorofluoresceína
DiOC6: 3,3'-dihexiloxocarbocianina ioduro
DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DMSO-d6: Dimetilsulfóxido deuterado
DVI_d: Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole
DVI_s: Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole
EDTA: Etilendiamintetraacetato de sodio
EP: Enfermedad de Parkinson
ER: Receptor de estrógeno
EROs: Especies reactivas de oxígeno
ESI-MS: Espectrometría de masas de ionización por electrospray
FA: Fracción de acortamiento
Fen: Fenantrolina
FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
H2DCFDA: Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
IC50: Concentración inhibitoria media
ICP: Plasma de acoplamiento inductivo
IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IMVI: Índice de masa ventricular izquierda
INT: Iodonitrotetrazolio
LD: L-Dopa
LDH: Lactato deshidrogenasa
MD: α -metildopa

MDA: Malondialdehído
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
MVI: Masa del ventrículo izquierdo
NADH: Nicotina adenina dinucleótido
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEM: N-etilmaleimida
NF-κB: Factor nuclear kappa B
NOX: NADPH oxidasa
OES: Espectrofotómetro de emisión óptica
OPT: O-ftalaldehído
PAINS: Compuestos de interferencia en ensayos múltiples
PAS: Presión arterial sistólica
PBS: Buffer fosfato salino
PR: Receptor de progesterona
PVDF: Fluoruro de polivinilideno
RMN: Resonancia magnética nuclear
RPE: Resonancia paramagnética electrónica
SD: Desviación estándar
SDS: Dodecilsulfato de sodio
SFB: Suero fetal bovino
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas
SOD: Superóxido Dismutasa
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TEM: Transición epitelial-mesenquimal
TGA: Análisis termogravimétrico
TPSA: Área superficial polar topológica
Tris: trishidroximetilaminometano
UV: ultravioleta
VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
VO(AcAc)₂: Acetilacetato de oxidovanadio(IV)
VOCrisFen: [VO(Crisina)(Fenantrolina)Cl]
ZIP: Proteínas tipo *Zrt* e *Irt*
ZnCD: [Zn(Carbidopa)(H₂O)₂].2H₂O
ZnLD: [Zn(L-Dopa)(H₂O)(OH)].3H₂O
ZnMD: [Zn(Metildopa)(H₂O)₂(OH)].H₂O
α-NF: Alfa-naftoflavona

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

En base a la evidencia científica, se hipotetiza que la complejación de fármacos con metales de transición podría potenciar la actividad biológica de estos a través del cambio en su conformación (que podría mejorar la biodisponibilidad y modificar la interacción con blancos celulares) y los efectos intrínsecos del metal utilizado.

Objetivo general

Llevar a cabo un estudio multidisciplinario orientado a la síntesis y caracterización, tanto en fase sólida como en solución, de nuevos complejos de coordinación de vanadio y zinc con ligandos que presentan actividad antitumoral, antihipertensiva y neuroprotectora. Además, evaluar la influencia de la coordinación en las propiedades biológicas de los compuestos obtenidos con el fin de desarrollar nuevas moléculas con potencial terapéutico.

Objetivos específicos

- Sintetizar complejos de coordinación de vanadio y zinc empleando ligandos con propiedades antitumorales, antihipertensivas y neuroprotectoras.
- Caracterizar los complejos obtenidos mediante análisis elemental, estudios de estabilidad térmica y técnicas espectroscópicas como infrarroja, UV-Visible, fluorescencia, resonancia magnética nuclear y resonancia paramagnética electrónica en fase sólida.
- Evaluar la interacción de los complejos con albúmina sérica bovina para estimar su biodisponibilidad.
- Evaluar la acción de los compuestos con actividad antitumoral sobre la viabilidad, capacidad de metástasis y estado redox de líneas celulares *in vitro*.
- Evaluar los efectos de los compuestos con actividad antihipertensiva en los valores de presión arterial sistólica, y su capacidad de protección frente a la hipertrofia y fibrosis cardíaca en un modelo de hipertensión *in vivo*. Estudiar también el estado redox y los cambios de expresión de proteínas relacionadas con éste en el tejido cardíaco (*ex vivo*).
- Evaluar, sobre cultivos neuronales *in vitro*, la capacidad de los compuestos neuroprotectores de inhibir el daño inducido por el agente excitotóxico glutamato.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Química bioinorgánica

1.1.1 Definición

La química bioinorgánica es una disciplina científica que estudia el papel de los elementos inorgánicos en los sistemas biológicos. A lo largo de las últimas décadas, esta rama de la química ha emergido como un campo interdisciplinario esencial para entender cómo los elementos participan en la estructura y función de biomoléculas como enzimas, proteínas y ácidos nucleicos, actuando en procesos biológicos complejos, tales como la catálisis enzimática, el transporte de electrones, la regulación de la señalización celular y la homeostasis de metales en organismos vivos. En la Tabla 1-I se listan algunas de las funciones biológicas que los elementos químicos cumplen en los organismos superiores (organismos multicelulares organizados en tejidos y órganos).

Tabla 1-I. Principales funciones biológicas de algunos elementos químicos en los organismos superiores.

Elemento	Principales funciones biológicas
Na	Regulación de osmolaridad; generación de gradientes electroquímicos; cotransporte de nutrientes.
K	Regulación de osmolaridad; generación de gradientes electroquímicos; cotransporte de nutrientes.
Cl	Regulación de osmolaridad; generación de gradientes electroquímicos.
Ca	Formación de huesos, dientes, etc.; contracción muscular; señalización celular.
Mg	Cofactor enzimático; relajación muscular.
P	Formación de huesos, dientes, etc. Forma parte de diversas biomoléculas, como los ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP/ADP, NADH/NAD ⁺ y NADPH/NADP ⁺ .
S	Presente en las proteínas (aminoácidos cisteína y metionina); actividad antioxidante; detoxificación a través de sulfoconjugación.
Zn	Cofactor enzimático; estabilización de estructuras terciarias en biomoléculas; sinapsis; función inmunitaria; actividad antioxidante.
Cu	Cofactor enzimático; actividad antioxidante.
Mn	Cofactor enzimático; metabolismo energético; actividad antioxidante.
Se	Funcionamiento de glándulas tiroideas; respuesta inmune.
I	Producción de hormonas tiroideas.
Cr	Regulación de glucemia; metabolismo de lípidos y proteínas.
Mo	Cofactor enzimático; detoxificación.
Fe	Transporte de oxígeno; transporte de electrones; actividad antioxidante.

Además, la química bioinorgánica hace uso de los elementos químicos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Algunos de los ejemplos más notables incluyen el fármaco arsfenamina (derivado del arsénico) utilizado para el tratamiento de la sífilis¹, el cisplatino utilizado para el tratamiento del cáncer², y los isótopos radiactivos de galio, indio y talio utilizados para el diagnóstico por imágenes³.

1.1.2 Compuestos de coordinación

Los compuestos de coordinación se definen como aquellos constituidos por un catión metálico central (usualmente un metal de transición) rodeado por otros átomos o moléculas, denominados ligandos, que actúan como donores de electrones. Los compuestos de coordinación constituyen una gran familia de compuestos utilizados en la química bioinorgánica para el tratamiento de diversas enfermedades. Uno de los primeros compuestos de coordinación empleados en la medicina fue el cis-platino (Figura 1-I), un complejo de Pt(II) de geometría cuadrada con fórmula *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], el cual ha sido utilizado como agente quimioterapéutico contra el cáncer⁴.

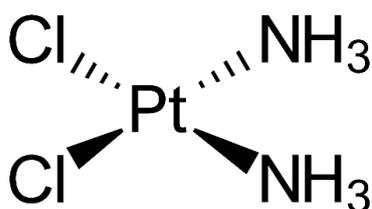


Figura 1-I. Estructura del complejo cis-platino

El descubrimiento de la actividad del cis-platino y su éxito como fármaco generaron un fuerte interés en la comunidad científica, lo que se tradujo en la aparición de una gran variedad de nuevos metalofármacos con actividad antitumoral, siendo los más importantes aquellos derivados de Rh(III), Ru(II), Ti(IV), Cu(II), Ga(III), Pd(II), Au(II) y V(IV)⁵.

Hasta la fecha, se han diseñado complejos de coordinación con una amplia gama de actividades, entre las cuales se hallan la antihipertensiva⁶, antimicrobiana⁷, antimalárica⁸, antivírica⁹, antioxidante¹⁰, neuroprotectora¹¹ y anticancerígena, entre otras. La complejación con metales ha demostrado, en general, ser una estrategia útil para potenciar la actividad biológica, disminuir la toxicidad y aumentar la biodisponibilidad de las drogas parentales.

1.1.3 Metales de coordinación en la medicina: Vanadio y Zinc

1.1.3.1 Vanadio

El vanadio es un metal de transición, de número atómico 23 (configuración electrónica: $[\text{Ar}]3d^34s^2$), nombrado a partir de la diosa nórdica de la belleza Vanadis. Es el 22^{avo} elemento más abundante en la tierra, siendo más abundante que el zinc y el cobre. Está presente en el agua de mar en forma de NaH_2VO_4 , alcanzando una concentración de 30 nM. Se conocen además más de 120 minerales compuestos por este elemento (algunos de los cuales se listan en la Tabla 1-II), siendo los principales la vanadinita, la patronita, la roscoelita, la carnotita y la descloizita¹².

Tabla 1-II. Nombre, fórmula y estados de oxidación de vanadio para algunos minerales de este elemento.

Nombre	Fórmula	Estado de oxidación de vanadio
Descloizita	$\text{Pb}(\text{Zn}, \text{Cu})\text{OH}[\text{VO}_4]$	V
Roscoelita	$\text{K}(\text{Al}, \text{V})_2(\text{OH}, \text{F})_2[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}]$	III
Patronita	$\text{V}(\text{S}_2)_2$	IV
Carnotita	$\text{K}(\text{UO}_2)[\text{VO}_4]$	V
Vanadinita	$\text{Pb}_5[\text{VO}_4]_3\text{Cl}$	V
Simplotita	$\text{Ca}[\text{V}_4\text{O}_9]$	IV

El vanadio se acumula además en los seres vivos. En los seres humanos, el contenido de vanadio en plasma sanguíneo es de 200 nM. En los tejidos alcanza una concentración media de 6 μM , acumulándose mayoritariamente en huesos, hígado y riñones. Se ha descubierto que este metal cumple diversos roles en diferentes organismos, entre los cuales se pueden mencionar: aceptor de electrones en la respiración de las bacterias del género *Shewanella*, *Pseudomonas* y *Geobacter*¹³; catalizador en la enzima Nitrato Reductasa de bacterias *Pseudomonas*¹⁴; catalizador en la enzima Nitrogenasa de algunas cianobacterias¹⁵ (Figura 1-II); catalizador en las enzimas Haloperoxidasas de ciertas algas y bacterias marinas^{16,17}. Se sabe además que los animales del subfilo Tunicata acumulan vanadio en sus células sanguíneas (denominadas vanadocitos), aunque el fin aún no está claro¹⁸.

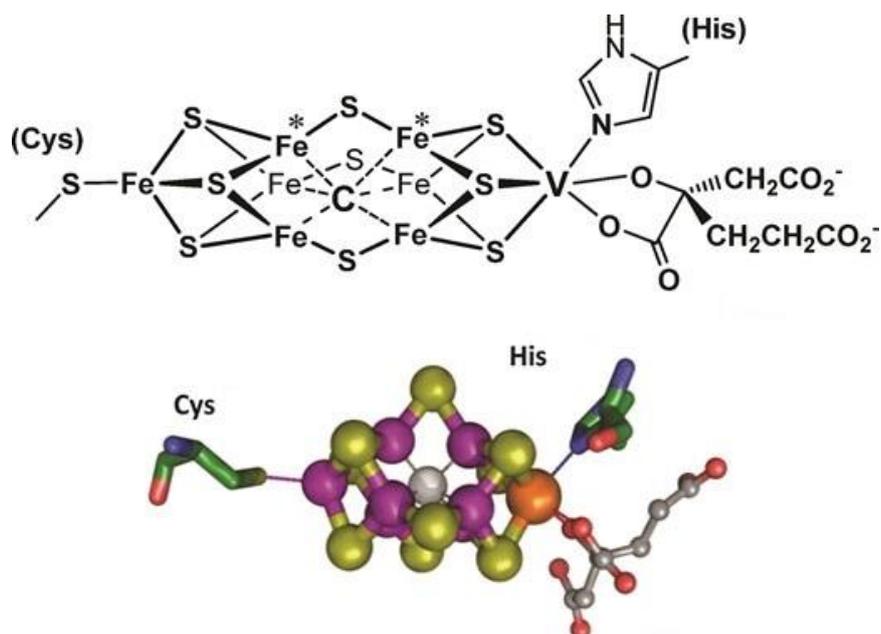


Figura 1-II. Estructura y representación tridimensional de la enzima Nitrogenasa dependiente de vanadio, presente en algunas cianobacterias.

La toxicidad del vanadio es relativamente baja; en la Tabla 1-III se muestran los valores de DL50 (dosis para la cual la mitad de los animales mueren) en ratas durante 14 días de ingesta o inhalación de diferentes compuestos de vanadio¹².

Tabla 1-III. Valores de DL50 en ratas para la ingesta/inhalación de diferentes compuestos de vanadio

Compuesto	DL50 (mg/kg; administración oral)	DL50 (mg/L; administración inhalatoria)
V ₂ O ₅	716	16,2
V ₂ O ₃	>3000	6,65
K[VO ₃]	318	4,16
NH ₄ [VO ₃]	218	2,43

Los compuestos de vanadio comenzaron a utilizarse con fines farmacológicos para el tratamiento de la diabetes en la década de los 80. La especie vanadato, en particular, posee una similitud estructural importante con los grupos fosfato (Figura 1-III), teniendo un área superficial polar topológica (TPSA) idéntica. Esto le confiere al vanadato la capacidad de competir con el fosfato por los sitios activos de muchas enzimas fosfatasas, que suelen estar involucradas en la desfosforilación de proteínas que intervienen en vías de señalización celular. Además, el vanadio es capaz de estabilizar números de coordinación de 5 y 6 con facilidad (que son los alcanzados al interactuar con el sitio

activo de las enzimas), mientras que el fosfato no. Esto provoca que el vanadato, una vez en el sitio activo, permanezca ahí por un tiempo prolongado, manteniendo a las fosfatasas inhibidas y por tanto a las moléculas de las vías de señalización fosforiladas. De esta manera, la señal de captación de glucosa se mantiene activa en las células, confiriendo a los compuestos de vanadio actividad “insulinomimética”¹⁹.

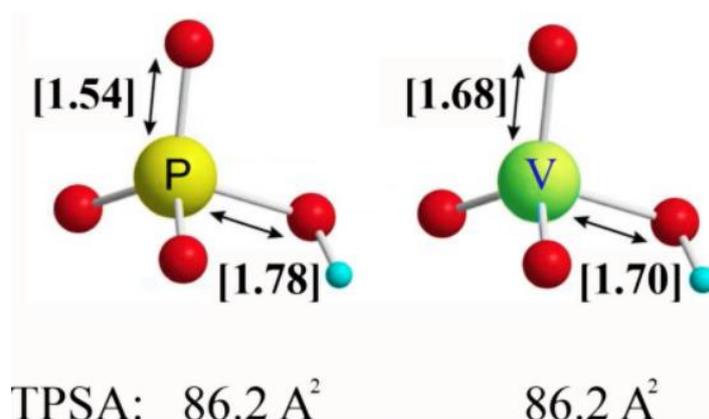


Figura 1-III. Estructura, distancia interatómica y TPSA para los grupos fosfato (izquierda) y vanadato (derecha).

A partir de los años 80, también comenzó a estudiarse las propiedades antitumorales de compuestos de vanadio, siendo los primeros compuestos probados el cloruro de vanadoceno²⁰ y algunos peroxovanadatos²¹. Desde entonces, se han sintetizado diversos complejos de vanadio con diferentes ligandos, con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad, disminuir su toxicidad y potenciar sus efectos antitumorales. Los mecanismos mediante el cual el vanadio ejerce esta actividad se discutirán más adelante.

1.1.3.2 Zinc

El zinc es el último metal de la primera serie de los metales de transición, y posee una configuración electrónica [Ar]3d¹⁰4s². En solución presenta un único estado de oxidación estable, Zn⁺² ([Ar]3d¹⁰), cuya capa llena le otorga la capacidad de adoptar diversos números y geometrías de coordinación (usualmente tetraédrica, bipirámide trigonal y octaédrica para números de coordinación 4, 5 y 6, respectivamente²²), pero a su vez dificulta el estudio de sus complejos, ya que estos no presentarán transferencias d-d en el espectro electrónico ni serán magnéticamente activos.

El cuerpo humano contiene entre 1 y 4 gramos de zinc, de los cuales el 90% se encuentra en huesos y músculos²³. El zinc presente en sangre es transportado mediante las proteínas albúmina sérica y α2-macroglobulina²⁴. Dentro de las células,

aproximadamente la mitad del zinc se encuentra unido a proteínas o dentro de vesículas, un tercio se encuentra dentro del núcleo, y el resto se encuentra en proteínas de la membrana plasmática²⁵. El almacenamiento de zinc no es tan eficiente como para otros elementos, por lo que se requiere una ingesta diaria de alrededor de 10 mg. La deficiencia de este elemento está asociada a un mal funcionamiento del sistema inmune, alopecia y lesiones de piel²⁶.

Existen tres proteínas encargadas de la homeóstasis del zinc. Las proteínas transportadoras de zinc se encargan de transportar dicho elemento desde el citoplasma hacia el exterior de la célula o hacia compartimentos intracelulares. Por otra parte, las proteínas ZIP (proteínas tipo *Zrt* e *Irt*) se encargan del proceso inverso, es decir, de introducir zinc al citoplasma desde el exterior o desde compartimentos intracelulares²⁶. Por último, las metalotioneínas (proteínas ricas en cisteína; Figura 1-IV) se asocian reversiblemente al zinc, controlando la cantidad del metal que se encontrará en su forma libre. Estas proteínas se encargan de colaborar en el plegamiento de algunas proteínas que contienen zinc, además de detoxificar el organismo al unirse a diversos metales pesados²⁷.

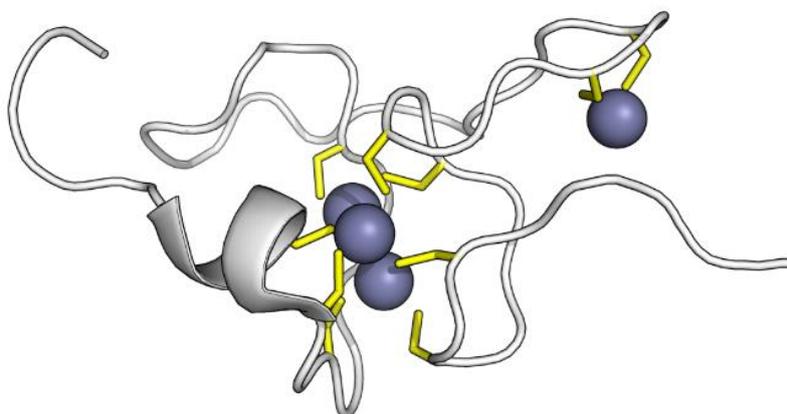


Figura 1-IV. Estructura del dominio beta de la metalotioneína Ec-1 presente en la planta de trigo. Los residuos de cisteína se ilustran en amarillo y los iones Zn^{+2} en azul.

El zinc cumple diversos roles en los organismos. Existen proteínas con motivos de unión a zinc, denominados “dedos de zinc”, que son ricos en histidina y cisteína (en patrones bien definidos que se ilustran en la Figura 1-V), e interactúan con el ion metálico a través del grupo imidazol y el grupo sulfhidrilo, respectivamente²⁸. Existen varios factores de transcripción que poseen dedos de zinc y que se activan al unirse al metal, regulando la expresión de diversos genes, entre los cuales se encuentran los relacionados a la diferenciación de linfocitos T²⁹ y la regulación de los linfocitos B

maduros³⁰. Otro rol importante del zinc se relaciona con la resistencia celular al estrés oxidativo. La enzima Superóxido Dismutasa 1 (SOD1), presente en la membrana mitocondrial externa, posee Zn(II) y Cu(II) en su sitio activo (con función estructural y catalítica, respectivamente). Su función es catalizar la transformación de dos radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno³¹. El zinc también se encuentra presente en varias peptidasas, entre las cuales se destacan las responsables de degradar péptidos de patógenos que luego serán presentados por las células presentadoras de antígeno y reconocidos por linfocitos T vírgenes³².

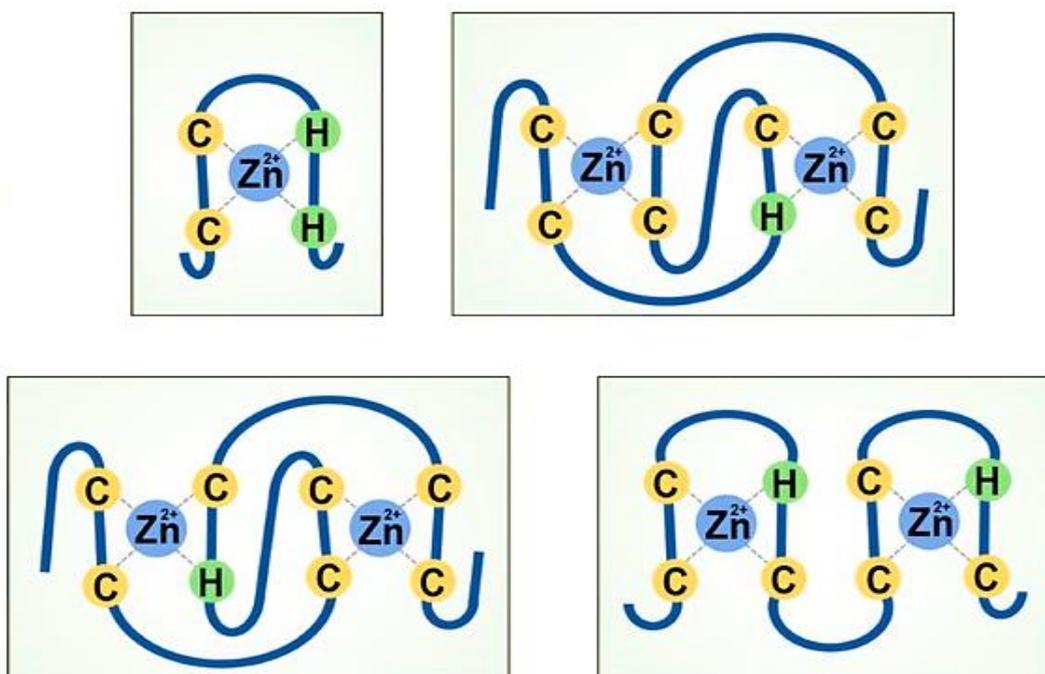


Figura 1-V. Patrones de cisteína (C) e histidina (H) presentes en los dedos de zinc.

La utilización del zinc en la medicina comenzó en la década del 40 mediante el empleo de peróxido de zinc como bacteriostático en el tratamiento de infecciones^{33, 34, 35}. En la década del 60, las sales de zinc se utilizaban para acelerar la cicatrización de heridas³⁶; dicho efecto se debe a la capacidad de este metal de modular el sistema inmune y de asociarse a metaloproteasas de matriz dependientes de zinc, colaborando así a la remodelación de la matriz extracelular y a la migración de los queratinocitos (células que generan queratina, una proteína estructural)³⁷.

La actividad biológica de los complejos de coordinación de Zn(II) comenzó a estudiarse en la década del 60. Los primeros en estudiarse fueron aquellos con actividad antiviral³⁸. Se ha demostrado que el Zn(II) es capaz de interactuar con la estructura de

ciertas proteínas virales e inhibir su actividad, aunque su efecto es altamente dependiente de la naturaleza del virus^{39, 40, 41, 42}.

A finales de la década de los 90s, se descubrió que la suplementación con Zinc era capaz de regular la glucemia⁴³ (debido a que el metal está involucrado en la vía de biosíntesis de la insulina e influye en su conformación estructural⁴⁴), lo que condujo al estudio de complejos con actividad insulinomimética^{45, 46}.

Los complejos de Zinc con actividad antitumoral y antihipertensiva comenzaron a estudiarse en la década de los 80 y los 2010, respectivamente. Se cree que, en este tipo de complejos, el papel principal del Zn(II) es el de la modificación estructural del ligando (gracias a su capacidad para adoptar distintas geometrías) que puede modificar su interacción con distintos blancos celulares y mejorar su biodisponibilidad, el de actuar como catalizador en reacciones hidrolíticas (como la ruptura de las hebras del ácido desoxirribonucleico (ADN)), y el de suplir este elemento que resulta indispensable para una gran cantidad de procesos celulares que ya se discutieron previamente^{47, 6}.

En los últimos años, el zinc se estudia mayoritariamente en forma de nanopartículas (generalmente de ZnO) que poseen potencial para diversas aplicaciones, entre las que se encuentran el tratamiento del cáncer⁴⁸, el diagnóstico por imágenes, el transporte (*delivery*) de drogas⁴⁹ y el uso como agente antimicrobiano⁵⁰.

1.2 Cáncer

1.2.1 Descripción y mecanismos moleculares

El término cáncer engloba a un conjunto de enfermedades que se producen a raíz de la proliferación celular desregulada; las células dejan de responder a los mecanismos que limitan su crecimiento generando tumores, y son capaces de diseminarse por el cuerpo. El cáncer puede afectar a cualquier tipo de células, por lo que existen más de cien tipos diferentes, que a su vez pueden variar en su comportamiento y respuesta a los tratamientos⁵¹.

Para que una célula se transforme en cancerígena, debe sufrir mutaciones en genes relacionados con el control de su división. Existen dos tipos de genes, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores, cuya alteración puede conducir a que

una célula se divida sin control. La sobreexpresión o subexpresión de estos genes puede deberse a fenómenos como la translocación cromosómica (migración de una porción de un cromosoma a otro), mutaciones puntuales (reemplazo, inserción o delección de un único nucleótido), amplificación genética (aumento del número de copias de un gen), deleciones (eliminación de copias de un gen), inserción genética (introducción de dos o más nucleótidos a un gen)⁵² y alteraciones en la epigenética (cambios en el patrón de metilación del ADN, modificación de histonas y cambios en la posición del nucleosoma)⁵³. Factores como las sustancias químicas mutagénicas^{54, 55, 56}, agentes biológicos como algunos virus^{57, 58} y bacterias⁵⁹, y factores físicos como la radiación ionizante⁶⁰ aumentan la probabilidad de sufrir mutaciones en el genoma y desarrollar neoplasias.

Los proto-oncogenes son aquellos que conducen a la oncogénesis cuando se expresan más de lo normal (ya que suelen codificar factores de transcripción, moléculas de transducción de señales y reguladores del ciclo celular)⁶¹. Dentro de los proto-oncogenes se encuentran: el gen RAS, que codifica una molécula involucrada en la vía de señalización que controla la proliferación y supervivencia celular⁶²; el gen CCND1 que corresponde a ciclina D1, una proteína que promueve el progreso del ciclo celular (desde la fase G1 a la S)⁶³; el gen HER2, codificante de receptores transmembrana que reconocen al factor de crecimiento epidérmico humano⁶⁴; el gen c-Myc, que codifica para un factor de transcripción que se une a motivos del ADN llamados *E-box* (5'-CACGTG-3') y promueve la expresión de genes relacionados con la proliferación celular⁶⁵.

Los genes supresores de tumores, en contraste, conducen a la oncogénesis cuando su expresión se ve disminuida, y suelen encargarse de inhibir la proliferación celular excesiva, controlar el daño en el genoma y repararlo, e inducir la apoptosis⁶⁶. Ejemplos de genes supresores de tumores son: el gen TP53, codificante de la proteína P53, la cual se encarga de detectar daños en el ADN y, en caso de hallarlos, detener el ciclo celular, inducir la reparación, y llevar a la célula a apoptosis si esta no se logra⁶⁷; el gen CDH1 que codifica a las E-cadherinas, unas proteínas de membrana que se encargan de la inhibición por contacto de la división celular (cuando entran en contacto con otras E-cadherinas de una célula vecina, disparan una cascada de señalización que inhibe la proliferación, manteniendo así la morfología normal de los tejidos)⁶⁸; NF1, el gen codificante de la proteína neurofibromina 1, una GTPasa que actúa como regulador negativo del proto-oncogén RAS (por lo que una disminución en la expresión de NF1 es equivalente a un aumento en la expresión de RAS)⁶⁹; los genes BRCA1 y BRCA2, correspondientes a proteínas de reparación del daño en el ADN⁷⁰.

Además de adquirir mutaciones, las células tumorales deben evadir al sistema inmune para poder duplicarse y propagarse; dicho proceso se denomina “inmunoedición” y consta de tres fases. Una vez generada una célula tumoral, esta comenzará a generar antígenos tumorales que se reconocerán como extraños y por lo tanto dispararán una respuesta inmune. La mayoría de estas células serán eliminadas por el sistema inmune en esta primera etapa, denominada “Fase de eliminación”^{71, 72}. Algunas células neoplásicas no son eliminadas por completo en la fase de eliminación y continúan acumulando mutaciones hasta volverse menos inmunogénicas, entrando en la segunda fase denominada “fase de equilibrio”, donde se genera una población de células tumorales que no son eliminadas por completo por el sistema inmune pero tampoco logran multiplicarse de forma desmedida ni propagarse⁷³. Dado que las células tumorales presentan una inestabilidad genómica aumentada debido a su epigenética alterada, continúan acumulando mutaciones durante la fase de equilibrio. La “fase de escape” comienza cuando alguna de estas células desarrolla mutaciones que le permite evadir el sistema inmune que la mantiene en equilibrio. Ejemplos de esas mutaciones pueden ser la ausencia de antígenos tumorales, la pérdida de función de moléculas relacionadas con el complejo de histocompatibilidad clase I, o la liberación de citoquinas y moléculas inmunoregulatoras que generan un microambiente tumoral inmunosupresivo⁷⁴. Durante la fase de escape, la subpoblación tumoral que logró evadir al sistema inmune se multiplica de manera descontrolada e invade otros tejidos mediante el proceso de metástasis. El proceso de inmunoedición es frecuentemente comparado con un proceso evolutivo, donde prosperará la línea tumoral que haya adquirido suficientes mutaciones genéticas (las cuales ocurren al azar) para contrarrestar al sistema inmune, que puede ser considerado como la presión de selección⁷⁵.

Para que el proceso de metástasis ocurra, las células tumorales deben experimentar una transición epitelial-mesenquimal (TEM) (Figura 1-VI). En este proceso hay una disrupción de la adhesión célula-célula y de la polaridad celular, un remodelado del citoesqueleto y una alteración en la adhesión célula-matriz que, en conjunto, permiten a las células metastásicas atravesar la membrana basal, entrar en el torrente sanguíneo e invadir tejidos distantes⁷⁶. La TEM ocurre a través de una serie de factores de transcripción como ZEB1, ZEB2, SNAIL, SLUG y TWIST. Todos ellos provocan la represión de la expresión de E-cadherinas y el aumento de la expresión de vimentina (proteína que forma filamentos que protegen a las células mesenquimales del estrés y contribuyen a su motilidad), fibronectina (proteína que favorece la adhesión a la membrana basal y la angiogénesis), N-cadherina (proteínas de adhesión célula-célula

que facilitan la migración celular colectiva) y metaloproteinasas que ayudan a degradar la membrana basal⁷⁷.

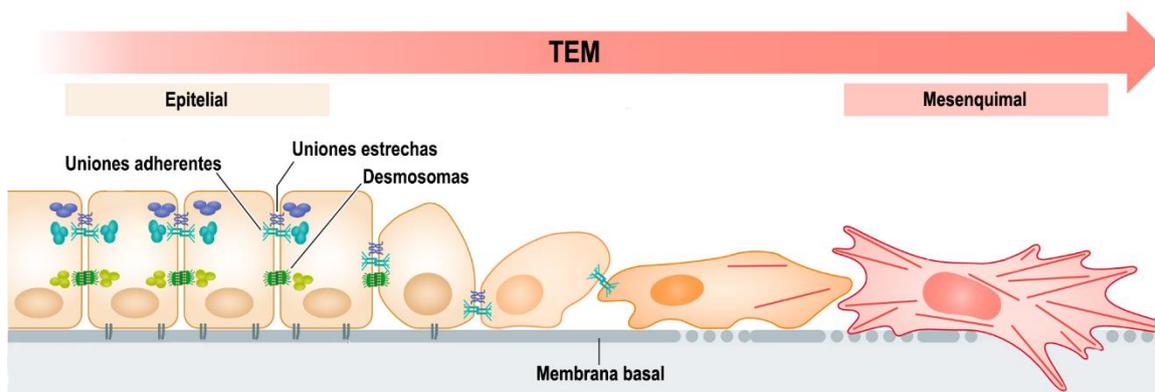


Figura 1-VI. Esquema de la transición epitelial-mesénquima en una célula tumoral.

1.2.2 Equilibrio redox y cáncer

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son aquellas especies parcialmente reducidas de oxígeno que resultan muy reactivas. Entre ellas se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), el ácido hipocloroso (HOCl), el oxígeno singlete y el radical hidroxilo ($\cdot OH$)⁷⁸. Estas especies pueden originarse como subproducto del metabolismo celular⁷⁹ o a partir de agentes exógenos como los asbestos, el cromo, algunos herbicidas, la radiación ionizante y el humo del tabaco⁸⁰.

Las EROs cumplen un rol en la señalización celular. En particular, el H_2O_2 actúa oxidando reversiblemente residuos de cisteína de ciertas proteínas de señalización, modificando su estructura⁸¹. Es importante mantener un equilibrio en los niveles intracelulares de EROs para el funcionamiento normal de la célula. Un exceso de EROs puede conducir al daño de las biomoléculas que la constituyen, mientras que niveles muy bajos pueden provocar el funcionamiento anormal de las vías de señalización. Para mantener el equilibrio redox, existen mecanismos antioxidantes que degradan las EROs: la enzima SOD1 se encarga de transformar los aniones superóxido, generados como subproducto de la respiración celular, en H_2O_2 y oxígeno molecular; la enzima catalasa actúa sobre el H_2O_2 para convertirlo en oxígeno molecular y agua; la enzima glutatión peroxidasa (la cual usa glutatión como cofactor) cumple el mismo rol. El H_2O_2 , además de actuar en vías de señalización y de ser degradado por las enzimas antioxidantes, es capaz de reaccionar con iones metálicos (Fe^{+2} , Cu^+) para generar radicales $\cdot OH$ capaces de reaccionar con las estructuras celulares y alterarlas (Figura 1-VII)⁸².

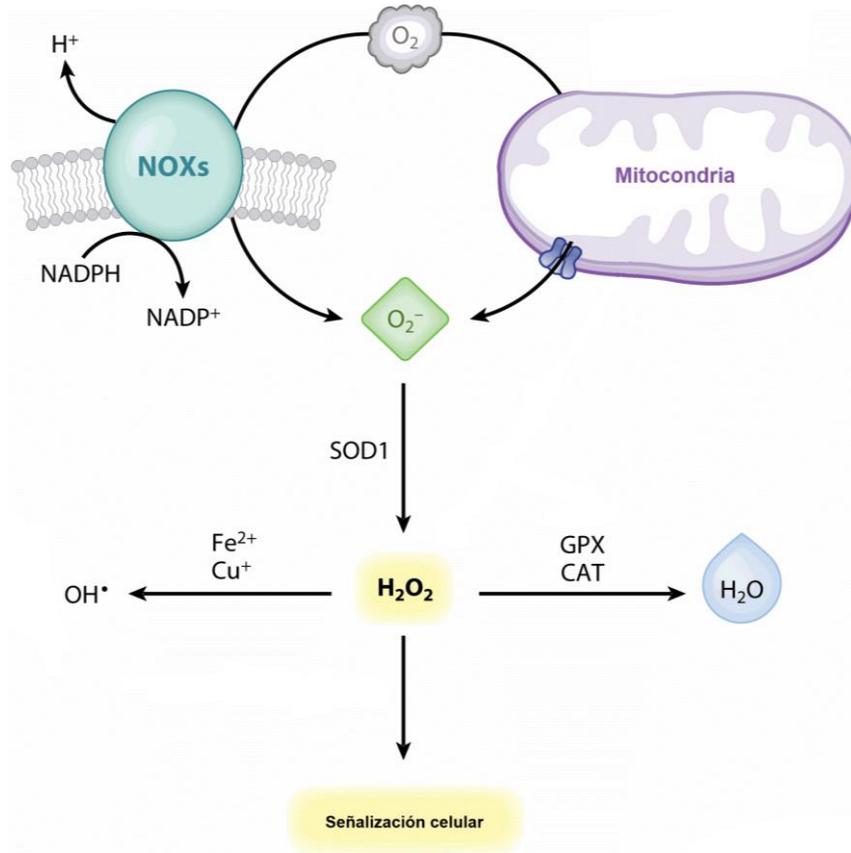


Figura 1-VII. Esquema de las vías de generación y regulación de EROs. NOXs: NADPH Oxidasas. SOD1: Superóxido Dismutasa 1. GPX: Glutatión Peroxidasa. CAT: Catalasa.

Existe una fuerte relación entre los niveles de EROs y el cáncer. Debido a su capacidad para dañar estructuras celulares, los niveles elevados de EROs provocan un aumento en el daño del ADN, lo que conduce a la mutación del mismo y a una mayor probabilidad de aparición de células tumorales^{83,84}. Además, las EROs pueden estimular la vía de señalización de la proteína RAS, cuyo proto-oncogén se mencionó anteriormente, encargada de promover la proliferación celular. Una mayor actividad en esta vía de señalización conduce a una mayor producción de EROs en las enzimas NADPH oxidasas, creando así un ciclo de retroalimentación positiva⁸⁵. La capacidad de metástasis de las células tumorales también se ve afectada por los niveles de EROs, ya que estos son capaces de actuar sobre las vías de señalización que dan lugar a la expresión de genes relacionados a este proceso, como lo son los genes codificantes de metaloproteinasas de matriz y los de moléculas de adhesión⁸⁶. Para que los tumores puedan aumentar su tamaño y nuevos tumores puedan crecer a partir de la metástasis, se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos que aporten oxígeno y nutrientes a las células tumorales. Este proceso es denominado angiogénesis, y se ha comprobado

que las EROs pueden inducirla a través del aumento en la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)⁸⁷ (Figura 1-VIII).

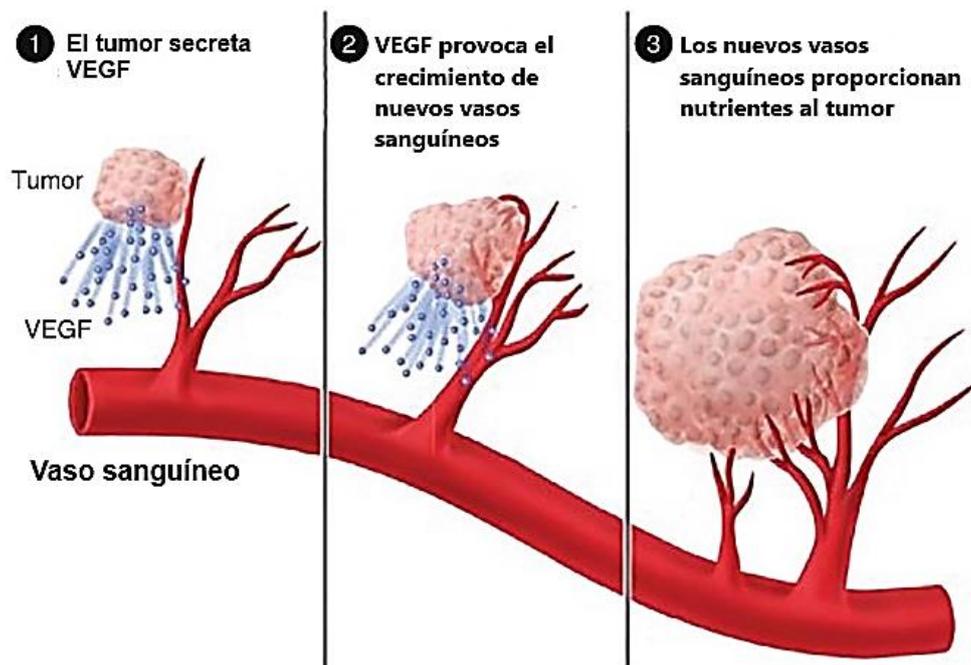


Figura 1-VIII. Esquema del proceso de angiogénesis.

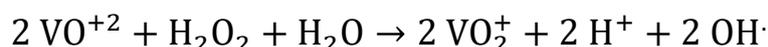
Cuando los niveles de EROs son extremadamente altos, estos pueden dañar la membrana mitocondrial con la subsecuente liberación de la proteína citocromo c (cuya función es la de transportar electrones en la cadena transportadora de electrones). La presencia de citocromo c en el citoplasma activa la vía intrínseca de la apoptosis, provocando la muerte de la célula⁸⁸. Niveles muy altos de EROs también pueden desatar la vía extrínseca de la apoptosis de manera indirecta, a través del aumento en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa⁸⁹. La necrosis celular también puede darse si el daño a las estructuras celulares es muy pronunciado. En base a esto, se han desarrollado drogas con propiedades antitumorales cuyos mecanismos de acción son los de aumentar los niveles de EROs, inhibir los sistemas antioxidantes, o ambos a la vez⁷⁸. Dado que las células tumorales tienen niveles basales de EROs aumentados con respecto a las células normales, es esperable que el tratamiento con estos compuestos presente selectividad frente a estas células.

En los últimos años, han surgido moléculas con actividad antitumoral cuyo mecanismo de acción es el de inducir el estrés reductivo (es decir, provocar un gran aumento de la proporción de especies antioxidantes frente a las oxidantes)^{90, 91}. El estrés reductivo induce la generación de EROs dentro de la mitocondria, lo cual conduce a

procesos de oxidación que afectan su integridad y resultan citotóxicos^{92, 93}. Además, es esperable que las vías de señalización celular estimuladas por EROs que promueven la división celular acelerada y la metástasis se vean inhibidas en un entorno de estrés reductivo.

1.2.3 Propiedades antitumorales del vanadio

Uno de los mecanismos a través del cual el vanadio ejerce su acción antitumoral es a través de la generación de EROs. En las células tumorales, que se distinguen de las normales por tener un pH más bajo, un nivel alterado de enzimas antioxidantes, un estado redox diferente, un mayor contenido de agua y una producción constante de H₂O₂⁹⁴, la generación de EROs por acción de V(IV) puede ocurrir fácilmente debido a siguiente reacción⁹⁵:



Los radicales hidroxilos son altamente reactivos y son capaces de reaccionar con las estructuras celulares y dañarlas. Además, el VO₂⁺ puede reconvertirse en VO⁺² a través de su reacción con la molécula NADPH, provocando una generación de radicales hidroxilos en cadena⁹⁶:



Los complejos de V(IV) capaces de interactuar con el ADN, como [VO(fenantrolina)₂] (capaz de intercalarse entre los nucleótidos mediante interacciones π-π con los anillos aromáticos) y vanadoceno (capaz de interactuar a través de puentes de hidrógeno con los grupos fosfato de los nucleótidos) (Figura 1-IX), tienen la capacidad de inducir el clivaje de sus hebras mediante la acción de los radicales hidroxilos generados⁹⁷.

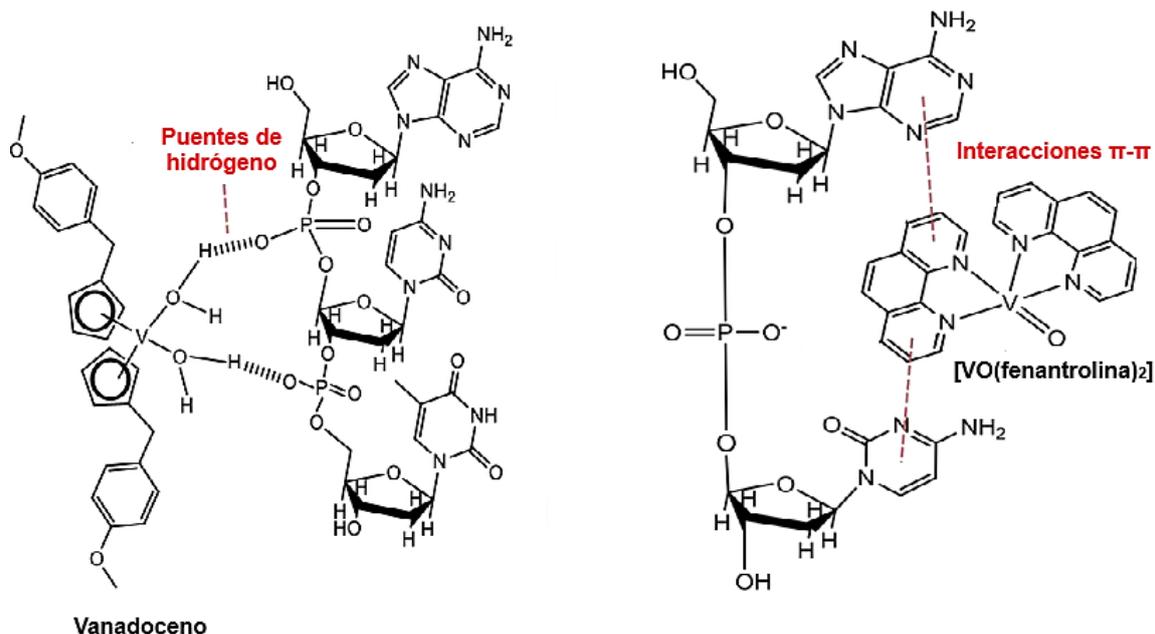


Figura 1-IX. Tipos de interacción entre los complejos de coordinación vanadoceno (izquierda) y $[VO(\text{fenantrolina})_2]$ (derecha) con el ADN.

Otro efecto que confiere a los compuestos de vanadio actividad antitumoral es la inhibición de la duplicación celular. Estos compuestos son capaces de arrear el ciclo celular a través de la inhibición de las enzimas fosfatasa de proteína-tirosina encargadas de la desfosforilación del complejo ciclina B. La desfosforilación de dicho complejo es esencial para la progresión de la mitosis⁹⁸.

La alteración en la función de las enzimas fosfatasa también resulta en la acumulación de proteínas fosforiladas pertenecientes a las vías de señalización celular, que conllevan a la activación de diversos factores entre los cuales destaca el factor nuclear kappa B (NF- κ B). NF- κ B regula la expresión de varios genes que regulan los procesos de inflamación, crecimiento y apoptosis. Dependiendo el tipo de célula y la dosis administrada, los compuestos de vanadio pueden ser capaces de inducir la apoptosis mediante la activación de NF- κ B^{97, 99, 100}.

1.2.4 Propiedades antitumorales de los flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de plantas, y son responsables del color y aroma de sus flores. Se encuentran en las raíces, tallos, frutos, flores y granos, y cumplen diversas funciones, incluyendo la tolerancia al estrés abiótico, la protección

contra la radiación ultravioleta, la absorción de nutrientes del suelo y el crecimiento del tubo polínico¹⁰¹.

La estructura básica de los flavonoides consiste en un grupo benzodihidropirano (cromano) unido a un anillo aromático a través de la posición 2,3 o 4 (Figura 1-X). Los flavonoides pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas, antocianinas e isoflavonas, dependiendo de la posición de unión de este anillo aromático, de la presencia o ausencia de un doble enlace entre C2 y C3, y de la naturaleza del anillo heterocíclico (Figura 1-XI)¹⁰².

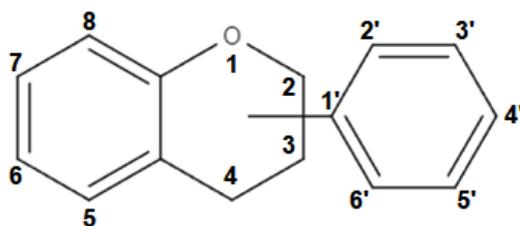


Figura 1-X. Estructura básica de los flavonoides.

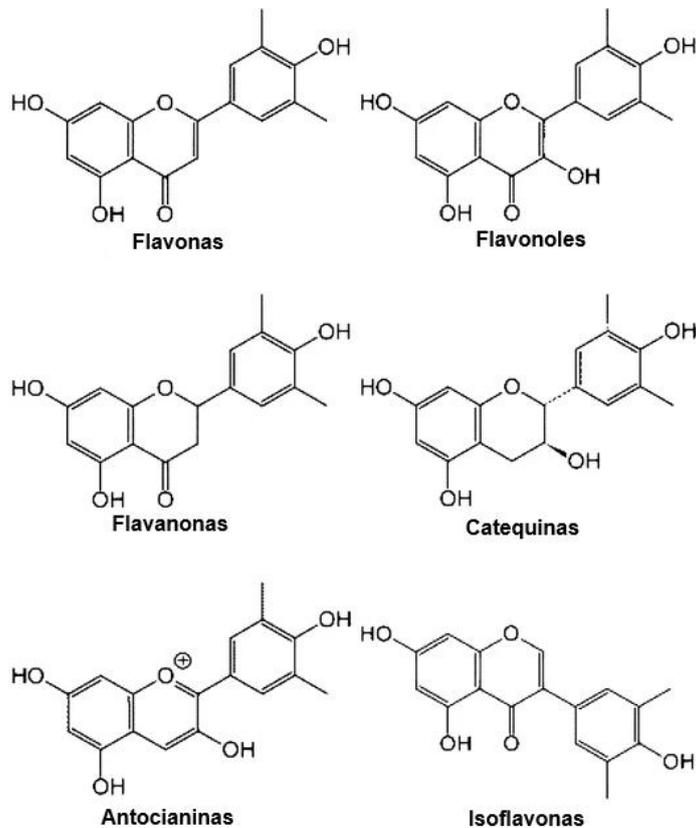


Figura 1-XI. Estructuras básicas de los subgrupos de flavonoides.

Dada su amplia disponibilidad en los vegetales, cereales, legumbres y frutas, los flavonoides son incorporados regularmente al organismo a través de la dieta (Tabla 1-IV)¹⁰³. Si bien las cantidades ingeridas en ciertas regiones pueden llegar a ser altas, la biodisponibilidad de los flavonoides usualmente resulta baja, debido a una pobre absorción y una alta metabolización¹⁰⁴.

Tabla 1-IV. Subtipos de flavonoides y sus fuentes en la dieta.

Subgrupo	Ejemplos	Fuentes
Flavonas	Luteolina, crisina, apigenina	Manzanilla, perejil, raíces
Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina	Té negro, manzana, brócoli
Catequinas	Epigallocatequina, teaflavina, tearubigina	Té verde, cacao, vino rojo
Flavanonas	Naringenina, naringina, hesperidina	Tomate, frutos cítricos
Isoflavonas	Genisteína, daidzeína, puerarina	Soja, plantas herbáceas
Antocianinas	Cianidina, malvidina, delphinidina	Vino rojo, bayas

Se ha demostrado que estas moléculas poseen propiedades positivas para la salud, ya que presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antihipertensiva y antitumoral¹⁰⁵. La actividad antitumoral surge a partir de mecanismos de regulación del estrés oxidativo y de las vías de señalización de duplicación celular e inflamación.

La inflamación (mecanismo de respuesta inmune innata) ocurre durante estadios tempranos del cáncer y se ha relacionado con la progresión de este, ya que se liberan en el microambiente tumoral factores de crecimiento, supervivencia celular y angiogénesis que favorecen al crecimiento de las células tumorales¹⁰⁶. Los flavonoides pueden modular varias vías de señalización involucradas en la aparición de la inflamación, de las cuales destaca la vía del factor de transcripción NF- κ B^{107, 108}.

Se ha demostrado que algunos flavonoides son capaces de inhibir las vías de señalización MAPK/ERK y mTOR/AKT^{109, 110, 111}, las cuales modulan la proliferación celular y en las que participa la proteína RAS, sobre la cual se discutió anteriormente. Este efecto contrarrestaría al aumento de duplicación celular causado por la mayor expresión del proto-oncogén RAS.

La capacidad de los flavonoides para eliminar EROs se origina a partir de la capacidad de estos para donar un protón de su grupo hidroxilo a otros radicales, generando un radical relativamente estable denominado o-semiquinona. Este radical

será eliminado a través de tres vías: la reacción con otro radical o la oxidación, las cuales originan una quinona, o la dimerización con otra o-semiquinona (Figura 1-XII)¹¹². Cabe mencionar que la presencia de iones metálicos puede catalizar la producción de radicales o-semiquinona, lo cual puede convertir a los flavonoides en agentes prooxidantes bajo ciertas condiciones¹¹³. Esto explicaría el aumento de producción de EROs de complejos metálicos antitumorales respecto a los flavonoides desde los cuales fueron sintetizados¹⁷². Dicho efecto puede ser potenciado por coordinación con un segundo ligando lipofílico y planar, como ocurre con el compuesto Cu(II)-naringenina-batofenantrolina¹¹⁴.

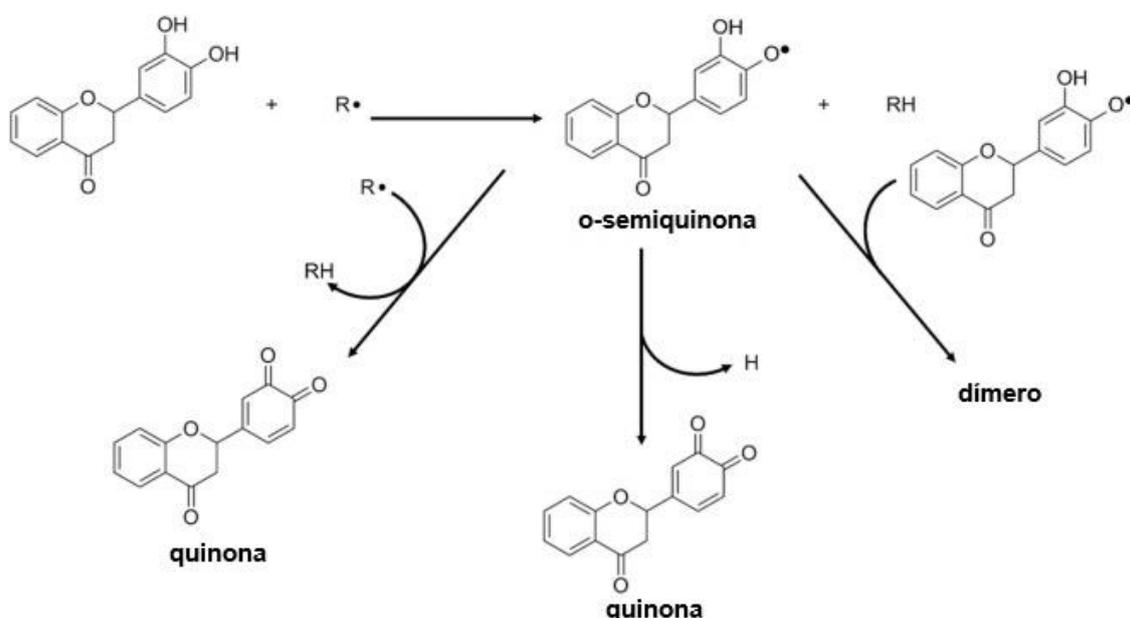


Figura 1-XII. Reacción de flavonoides con radicales y eliminación del radical o-semiquinona resultante a través de tres vías: reacción con otro radical, oxidación y dimerización.

La actividad antimetastásica de varios flavonoides ha sido evaluada *in vitro* en diversas líneas celulares tumorales. Se ha comprobado que los flavonoides presentan actividad antimetastásica principalmente a través de la inhibición de los genes asociados a la transición epitelial-mesénquima, como SNAIL y SLUG, o en la inhibición de las vías de señalización asociadas a este proceso¹¹⁵. Ejemplos reportados de flavonoides con esta acción son la apigenina en las líneas de cáncer de próstata PC-3 y DU145¹¹⁶, la luteolina en las líneas de cáncer colorrectal HT-29¹¹⁷ y la scutellarina en las líneas tumorales de vejiga T24 y UMUC3¹¹⁸.

1.3 Hipertensión arterial

1.3.1 Descripción

La hipertensión arterial es una enfermedad frecuente que se produce por el aumento anormal y sostenido de la presión que ejerce la sangre sobre las paredes de las arterias. Se consideran hipertensos a los individuos con presión arterial sistólica (PAS) mayor a 140 mmHg y presión arterial diastólica mayor a 90 mmHg de manera sostenida. La hipertensión puede clasificarse en hipertensión primaria e hipertensión secundaria. La hipertensión primaria se da en el 90% de los casos y su origen es multifactorial; tanto la genética como los factores externos influyen en su desarrollo. Los factores de riesgo de la presión arterial primaria son la obesidad, el alto consumo de alcohol, la resistencia a la insulina, el alto consumo de sal, el envejecimiento, el estrés, el estilo de vida sedentario y el bajo consumo de calcio y/o potasio¹¹⁹. El 10% restante de los casos presenta hipertensión secundaria, es decir, hipertensión como consecuencia de otra afección conocida (dentro de las cuales están la enfermedad renal crónica, la displasia fibromuscular, neurofibromatosis, hiperaldosteronismo, hipertiroidismo, apnea del sueño, etc.)¹²⁰.

1.3.2 Tratamiento de la hipertensión arterial

Para comprender el mecanismo de acción de las drogas utilizadas habitualmente en el tratamiento de la hipertensión, es necesario entender cómo se regula la presión arterial. La presión arterial sistólica es directamente proporcional al volumen de sangre, a la frecuencia cardíaca, al volumen sistólico (cantidad de sangre bombeada por sístole), a la resistencia vascular periférica (que dependerá de la contracción/relajación de los vasos sanguíneos y a la rigidez/elasticidad de estos) y a la viscosidad de la sangre¹²¹. Los mecanismos de regulación actúan sobre algunas de estas variables, y pueden dividirse en mecanismos de regulación humoral y mecanismos de regulación nerviosa.

Los mecanismos de regulación humoral son aquellos en donde intervienen sustancias químicas, como hormonas y moléculas de señalización. Dentro de estas sustancias las que más destacan son: la angiotensina II y la aldosterona, producidas en los riñones, cuya función es la vasoconstricción y el aumento del volumen sanguíneo a través de la retención de sodio y agua¹²²; la vasopresina, liberada por el hipotálamo, que provoca la vasoconstricción y el aumento de volumen sanguíneo a través de la reabsorción de agua en los riñones¹²³; la endotelina, producida en el endotelio de los

vasos sanguíneos, cuya función es la de vasoconstricción¹²⁵; y el péptido natriurético atrial, producido en las células de las aurículas del corazón como respuesta al aumento de la presión arterial, que promueve la dilatación de los vasos sanguíneos, la excreción de sodio y la inhibición de la producción de renina (enzima necesaria para la biosíntesis de angiotensina II)¹²⁴.

Los mecanismos de regulación nerviosa se basan en la activación e inhibición de los nervios simpático y parasimpático, que constituyen al sistema nervioso autónomo. Estos nervios tienen actividades opuestas; la actividad simpática produce el aumento de la presión arterial a través de la vasoconstricción y el aumento de la frecuencia cardíaca, mientras que la actividad parasimpática provoca la vasodilatación y el descenso de la frecuencia cardíaca¹²⁶. La activación e inhibición de estos nervios está a su vez regulada por el centro cardiovascular localizado en el sistema nervioso central, que se encarga de recibir información de los barorreceptores (receptores de presión) y quimiorreceptores (receptores de sustancias disueltas en la sangre, como oxígeno y dióxido de carbono) que se encuentran a lo largo de los vasos sanguíneos¹²⁷. El nervio simpático logra sus efectos a través del neurotransmisor noradrenalina (Figura 1-XIII.A) que interacciona con los receptores postsinápticos α 1-adrenérgicos del músculo liso de los vasos sanguíneos provocando la contracción de estos, y β 1-adrenérgicos del corazón provocando el aumento de la frecuencia cardíaca. El mismo nervio simpático también contiene receptores presinápticos α 2-adrenérgicos, los cuales funcionan como un mecanismo de retroalimentación negativa que inhiben la liberación de noradrenalina cuando su concentración en el espacio sináptico es elevada¹²⁸. El nervio parasimpático, en cambio, hace uso del neurotransmisor acetilcolina (Figura 1-XIII.B), el cual interactúa con los receptores nicotínicos neuromusculares ubicados en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, relajándola¹²⁹.

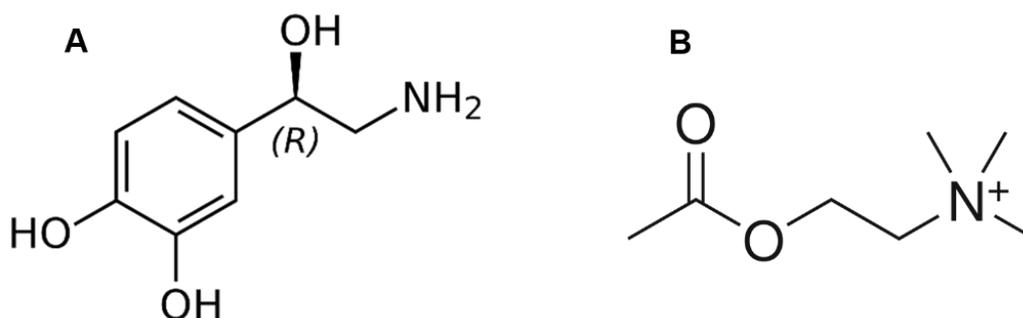


Figura 1-XIII. A: Estructura del neurotransmisor noradrenalina. B: Estructura del neurotransmisor acetilcolina.

Los fármacos antihipertensivos actúan sobre diferentes blancos de la regulación de la presión arterial, y se subdividen según su mecanismo de acción. Los beta-bloqueantes, entre los que se encuentran las drogas acebutolol, atenolol, bisoprolol y propanolol (Figura 1-XIV), son antagonistas competitivos de los receptores β -adrenérgicos, inhibiendo la acción de la noradrenalina sobre estos. Por lo tanto, reducen la frecuencia cardíaca y la contractilidad del corazón¹³⁰.

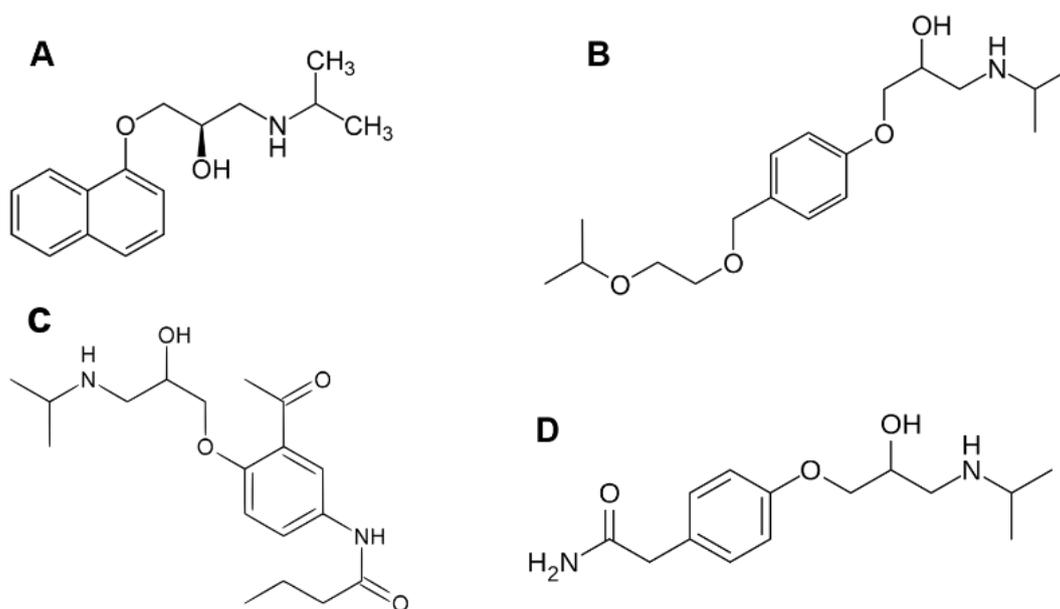


Figura 1-XIV. Estructuras de algunos fármacos beta-bloqueantes. A: propanolol. B: Bisoprolol. C: Acebutolol. D: Atenolol.

Los diuréticos son drogas que promueven la excreción de agua e inhiben la reabsorción de sodio en los riñones, provocando la disminución del volumen de sangre y el descenso de la presión arterial. De los diuréticos disponibles, los más utilizados para el tratamiento de la hipertensión son las tiazidas, compuestos derivados de la benzotiazida (Figura 1-XV)¹³¹.

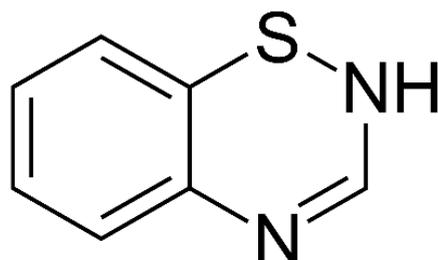


Figura 1-XV. Estructura del compuesto benzotiazida, a partir del cual derivan los diuréticos tiazídicos.

Dentro del sistema renina–angiotensina–aldosterona existe una familia de compuestos que son capaces de inhibir la enzima que cataliza la reacción de conversión de angiotensina I a angiotensina II (forma activa) a través del bloqueo de su sitio activo. Dicha enzima se denomina enzima convertidora de angiotensina, por lo que estos compuestos reciben el nombre de “inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina” (IECA)¹³². Los IECA más utilizados son captopril, enalapril y lisinopril (Figura 1-XVI).

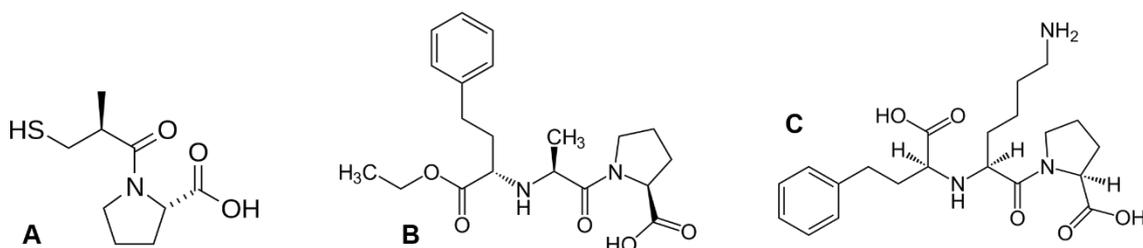


Figura 1-XVI. Estructura de algunos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
A: captopril. B: enalapril. C: lisinopril.

Por otra parte, como alternativa a los IECA, existen fármacos denominados sartanes (Figura 1-XVII) que han sido diseñados para inhibir la actividad del eje renina-angiotensina a través del bloqueo selectivo de los receptores de angiotensina II. Como consecuencia se relaja la musculatura lisa de las venas y arterias del cuerpo, reduciendo la presión arterial. De este modo, se logra el control de la presión arterial sin la aparición de efectos adversos comunes de los IECA, como la tos mediada por la bradiquinina y el angioedema.

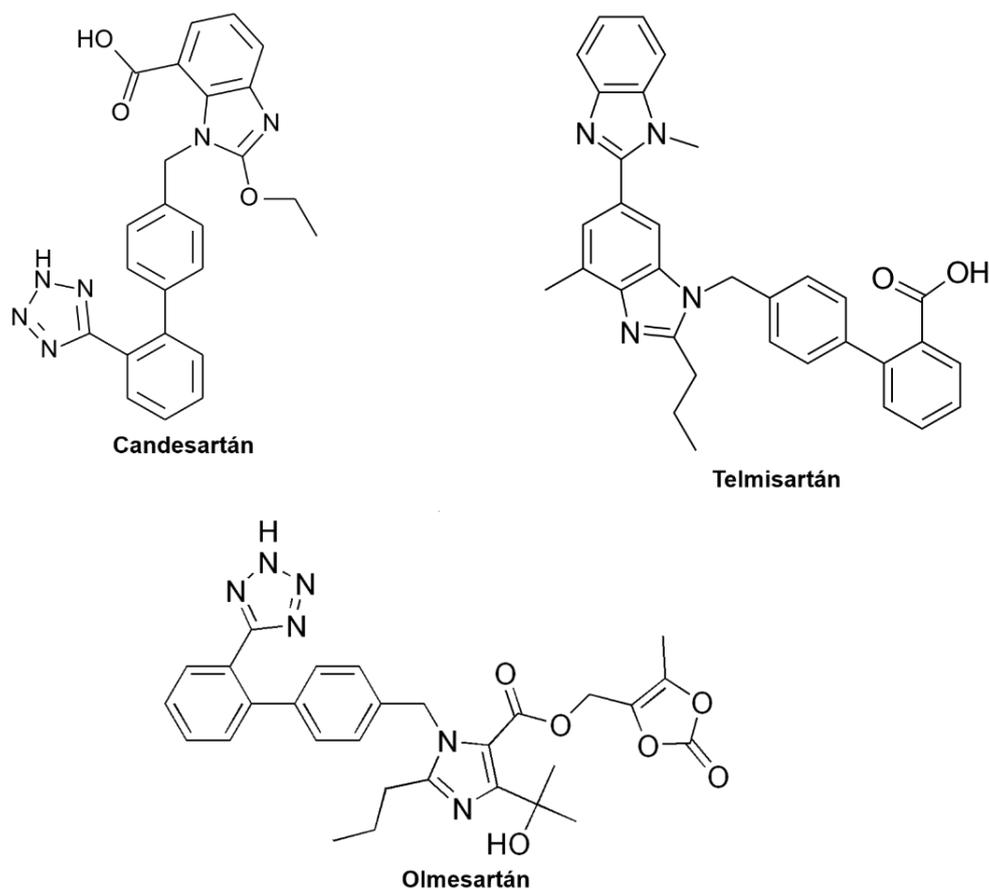


Figura 1-XVII. Algunas de las moléculas de la familia de los sartanes (candesartán, telmisartán y olmesartán).

La contracción muscular es producto de un aumento de la concentración de Ca^{+2} citoplasmático (que es transportado desde el exterior celular y desde las reservas del retículo endoplasmático), el cual provoca que las cabezas de miosina puedan avanzar a través de los filamentos de actina, provocando el acortamiento del miocito (Figura 1-XVIII). Los bloqueadores de canales de calcio impiden que el calcio extracelular ingrese desde el espacio extracelular al citoplasma, reduciendo la capacidad de contracción de los músculos. Los bloqueadores de canales de calcio utilizados para el tratamiento de la hipertensión pertenecen a la familia de las dihidropiridinas (Figura 1-XIX) y son específicos de los canales ubicados en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, logrando que estos se dilaten¹³³.

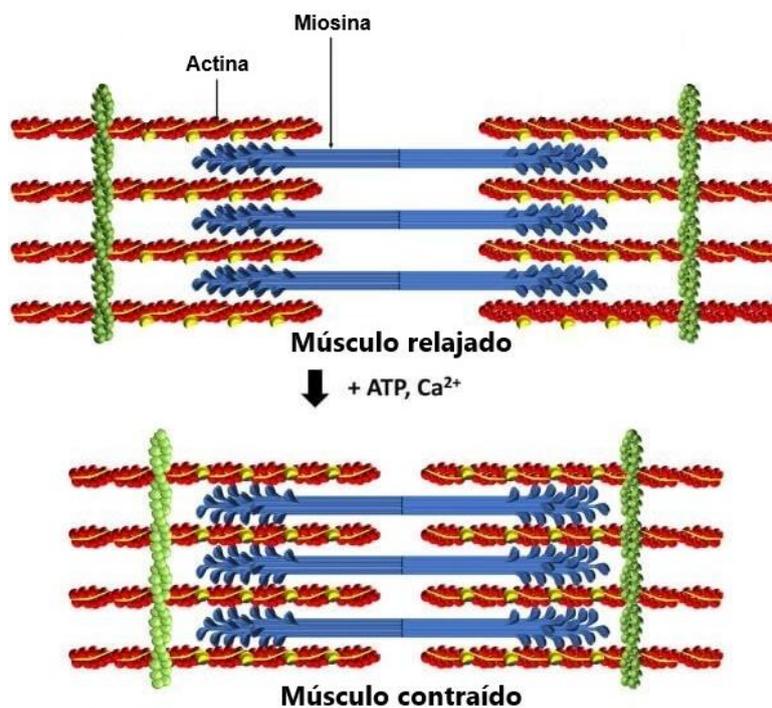


Figura 1-XVIII. Esquema del funcionamiento del sistema actina/miosina que provoca la contracción muscular.

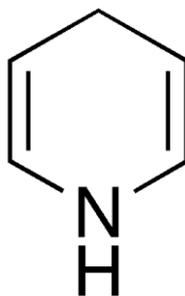


Figura 1-XIX. Estructura de la dihidropiridina, de la cual derivan los compuestos bloqueadores de canales de calcio utilizados para el tratamiento de la hipertensión.

Por último, existen moléculas que intervienen en la regulación nerviosa simpática. Los bloqueadores de receptores α_1 -adrenérgicos inhiben la función vasoconstrictora de la noradrenalina liberada por el nervio simpático¹³⁴; se destacan entre estos las drogas prazosina y doxazosina (Figura 1-XX). Los agonistas α_2 -adrenérgicos disparan la retroalimentación negativa sobre el nervio simpático, reduciendo la liberación de noradrenalina al espacio sináptico¹³⁵; ejemplos de estos compuestos son la clonidina y la α -metildopa (Figura 1-XX).

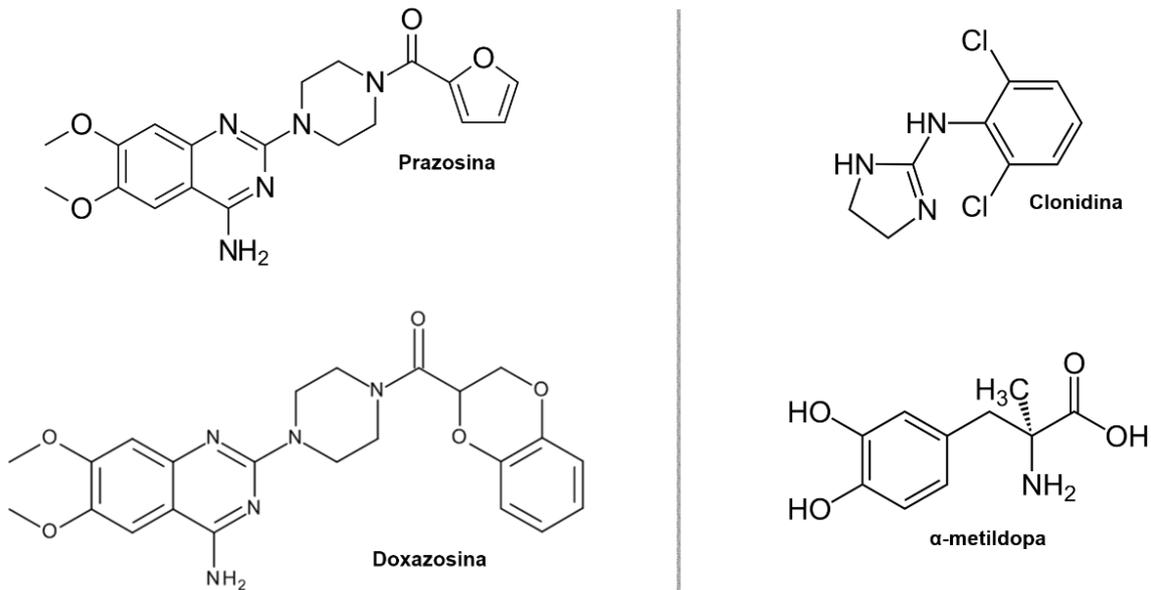


Figura 1-XX. Estructura de los fármacos bloqueadores α_1 -adrenérgicos prazosina y doxazosina (izquierda) y de los fármacos agonistas α_2 -adrenérgicos clonidina y α -metildopa (derecha)

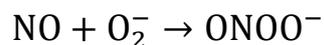
1.3.3 Rol del zinc en la hipertensión arterial

Existe una amplia evidencia de la asociación entre la deficiencia de zinc y la hipertensión. La deficiencia de zinc es una comorbilidad común en numerosas enfermedades crónicas como la diabetes tipo II y la enfermedad renal crónica^{136,137}. Además, las poblaciones con una baja ingesta de Zn^{+2} en la dieta presentan una alta prevalencia de hipertensión^{138,139}. Asimismo, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se ha observado que la restricción de zinc en la dieta exacerba los niveles de presión arterial sistólica¹⁴⁰ mientras que su suplementación los atenúa¹⁴¹.

La modulación de la excreción renal de sodio es clave en la regulación de la presión arterial. El cotransportador renal de sodio/cloruro (CRSC), presente en el túbulo contorneado distal de los riñones, juega un papel crítico en la reabsorción de sodio^{142,143} y su desregulación está implicada en varios desórdenes genéticos que causan hipotensión e hipertensión¹⁴². Las metaloproteinasas dependientes de zinc se encargan de regular la actividad de las quinasas WNK, que a su vez regulan la actividad del CRSC¹⁴⁴. Se ha demostrado en modelos *in vivo* e *in vitro* que niveles normales de zinc son clave para el correcto funcionamiento del CRSC y regulación de la presión arterial¹⁴⁵.

En modelos *in vivo* de ratas SHR, la deficiencia de zinc causa una menor actividad de las enzimas SOD dependientes de zinc en los tejidos vasculares¹⁴⁰. La menor

actividad de SOD implica un aumento en los niveles del anión superóxido^{146,147,148}, que reacciona con el óxido nítrico para generar peroxinitrito:



La depleción del óxido nítrico, que actúa como vasodilatador, conlleva a la vasoconstricción y el aumento de la presión arterial¹⁴⁹. La administración del compuesto SOD-mimético 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL) fue capaz de disminuir la presión arterial de las ratas SHR con dieta deficiente en zinc, comprobando la importancia del correcto funcionamiento de las enzimas SOD en la regulación de la presión arterial¹⁴⁰.

Esta evidencia respalda la hipótesis de que la complejación de ligandos antihipertensivos con Zn^{+2} representa una estrategia prometedora para potenciar su actividad biológica. Esto se debe no solo a la capacidad de este catión para modificar la estructura de dichas moléculas (lo que podría alterar su interacción con distintos blancos celulares) sino también a la incorporación de zinc al organismo, el cual resulta esencial en la regulación de la presión arterial. Hasta la fecha, la mayoría de los complejos metálicos de Zn^{+2} reportados por nuestro grupo de trabajo utilizan como ligando a los sartanes que, como se mencionó anteriormente, ejercen su acción a través del antagonismo de los receptores de angiotensina II. En general, se hipotetiza que la coordinación con zinc mejora la interacción entre el fármaco y dicho receptor, potenciando el efecto antihipertensivo^{150,6, 151}.

1.4 Enfermedades neurodegenerativas y compuestos neuroprotectores

1.4.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una pérdida progresiva de número y función de ciertas poblaciones neuronales. Pueden clasificarse de acuerdo a las características clínicas (cognitivas y motoras), a la región anatómica de la neurodegeneración (degeneraciones frontotemporales, espinocerebrales, etc.) o por la anomalía molecular (amiloidosis, tauopatías, etc.)¹⁵². Muchas de las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades conformacionales, en las cuales ciertas

proteínas sufren cambios en su plegamiento que alteran su función y pueden conducir a su agregación y acumulación, en formas insolubles, dentro o fuera de las neuronas. Este proceso altera el funcionamiento normal de estas¹⁵³.

Las amiloidosis son enfermedades conformacionales donde se generan cúmulos de fibras amiloides, las cuales son estructuras proteicas (derivadas de proteínas normales mal plegadas) ricas en laminas beta y resistentes a la proteólisis (Figura 1-XXI). El Alzheimer es un ejemplo de enfermedad neurodegenerativa del tipo amiloidosis¹⁵⁴.

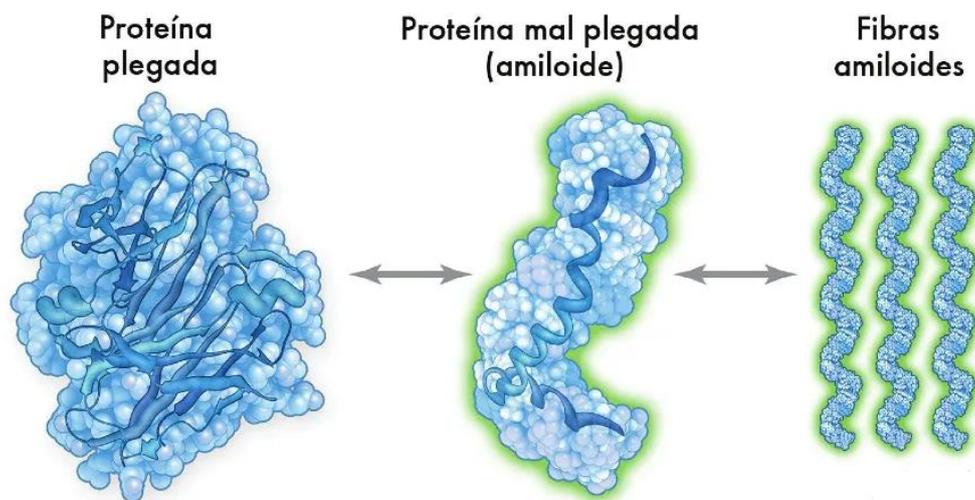


Figura 1-XXI. Esquema del proceso de generación de fibras amiloides.

Las tauopatías son enfermedades conformacionales donde las proteínas Tau (que junto con los microtúbulos forman parte del citoesqueleto de las neuronas) sufren modificaciones postraduccionales aberrantes (como la acetilación y la hiperfosforilación). Estos eventos provocan cambios conformacionales que conllevan a su agrupamiento en forma de filamentos (Figura 1-XXII)¹⁵⁵. Un ejemplo de tauopatía es la enfermedad de Pick, que provoca demencia y afasia¹⁵⁶. El Alzheimer, además de las fibras amiloides, también presenta agrupamiento en proteínas Tau¹⁵⁷. El agrupamiento de proteínas Tau ha sido asociado además a la aparición de la enfermedad de Parkinson¹⁵⁸.

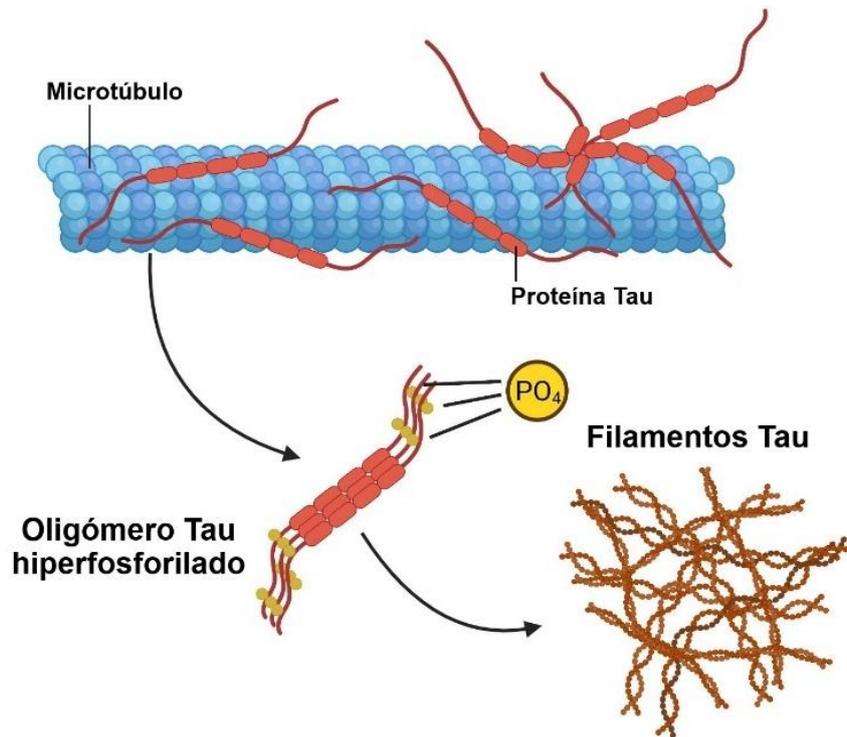


Figura 1-XXII. Esquema de la generación de filamentos Tau a partir de las modificaciones postraduccionales anormales de la proteína.

En las sinucleinopatías la proteína que se agrega es la α -sinucleína, cuya función aún no se comprende completamente, pero se cree que cumple un rol en la liberación de neurotransmisores desde las vesículas sinápticas¹⁵⁹. El agrupamiento de estas proteínas, que da lugar a estructuras llamadas cuerpos de Lewy (Figura 1-XXIII), se debe a mutaciones en su gen; se han hallado seis mutaciones altamente correlacionadas con la aparición de sinucleinopatías. Dentro de estas enfermedades, la más destacable es la enfermedad de Parkinson¹⁶⁰.

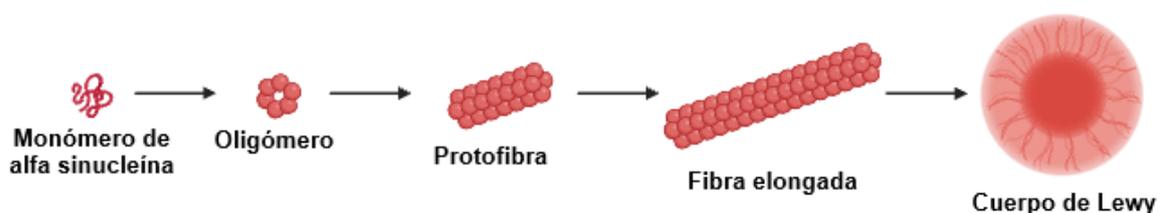


Figura 1-XXIII. Esquema de la formación de los cuerpos de Lewy a partir de la agregación de α -sinucleína.

Otra clase de enfermedades neurodegenerativas conformacionales son las proteínopatías TDP-43 (entre las que se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica) que

se producen por la agrupación de la proteína TDP-43, responsable del metabolismo del ácido ribonucleico y la regulación transcripcional¹⁵².

En los últimos años se ha descubierto que las enfermedades neurodegenerativas conformacionales pueden ser transmitidas de manera análoga a las enfermedades infecciosas. La transmisión se da a través de proteínas mal plegadas, denominadas priones, que pueden actuar como núcleo de agregación de otras proteínas¹⁶¹. Experimentos en animales han demostrado que la excreción de priones puede darse a través de la orina, las heces, la leche, la saliva, las secreciones nasales e incluso a través de la piel de los individuos enfermos¹⁶².

1.4.2 Compuestos de coordinación con actividad neuroprotectora

La neuroprotección es el efecto de evitar la muerte o disfunción neuronal frente a situaciones adversas como enfermedades neurodegenerativas, presencia de agentes neurotóxicos, isquemias, etc. Mecanismos de neuroprotección incluyen la inhibición de la apoptosis neuronal¹⁶³, la inhibición de receptores de glutamato (neurotransmisor que puede resultar excitotóxico en concentraciones elevadas, como se discutirá más adelante)¹⁶⁴ o la disminución del estrés oxidativo (el cuál colabora en la aparición y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas debido a que aumenta la expresión del canal cisteína-glutamato, provocando una mayor excreción de glutamato al espacio sináptico^{165, 166}).

La coordinación con un centro metálico ha demostrado ser efectiva también para potenciar las propiedades neuroprotectoras de varios tipos de moléculas, entre las cuales se encuentran aminoácidos, bases de Schiff, polifenoles, triazinas, derivados de etilendiamina, etc. Los metales que más se han utilizado para la síntesis de complejos neuroprotectores son zinc, cobre y manganeso. Los compuestos de coordinación suelen ejercer su acción neuroprotectora de maneras diferentes dependiendo de su estructura química: en general, los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} son capaces de promover la supervivencia neuronal mediante la activación de la cascada de señalización Akt¹⁶⁷; el complejo Mn(II)-curcumina y los manganosalenos (complejos derivados de manganeso y N,N'-Bis(salicilideno)etilendiamina (Figura 1-XXIV.A)) han demostrado ejercer efectos neuroprotectores a través de su actividad SOD, originada gracias a la reducción y oxidación del par redox Mn(II)/Mn(III)^{168, 169}; los complejos de Zn(II)/Cu(II)-curcumina son capaces de secuestrar EROs (gracias a la estructura polifenólica de la curcumina

(Figura 1-XXIV.B)) e inhibir la apoptosis mediante el aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la disminución de la expresión de la proteína proapoptótica Bax¹⁷⁰; el compuesto de coordinación de 5-hidroxitriptófano (Figura 1-XXIV.C) y Cu(II) también presentó efectos neuroprotectores a través de sus efectos antiapoptóticos, que se evidenciaron mediante una menor activación de las caspasas 3/7¹¹. Por otra parte, se ha demostrado que la agregación de proteínas para formar fibras amiloides requiere la interacción de estas estructuras con iones metálicos. El tratamiento con ligandos quelantes en roedores fue capaz de secuestrar dichos iones, provocando que estas estructuras se mantuvieran en su forma soluble y que el avance de las amiloidosis se retrase¹⁷¹.

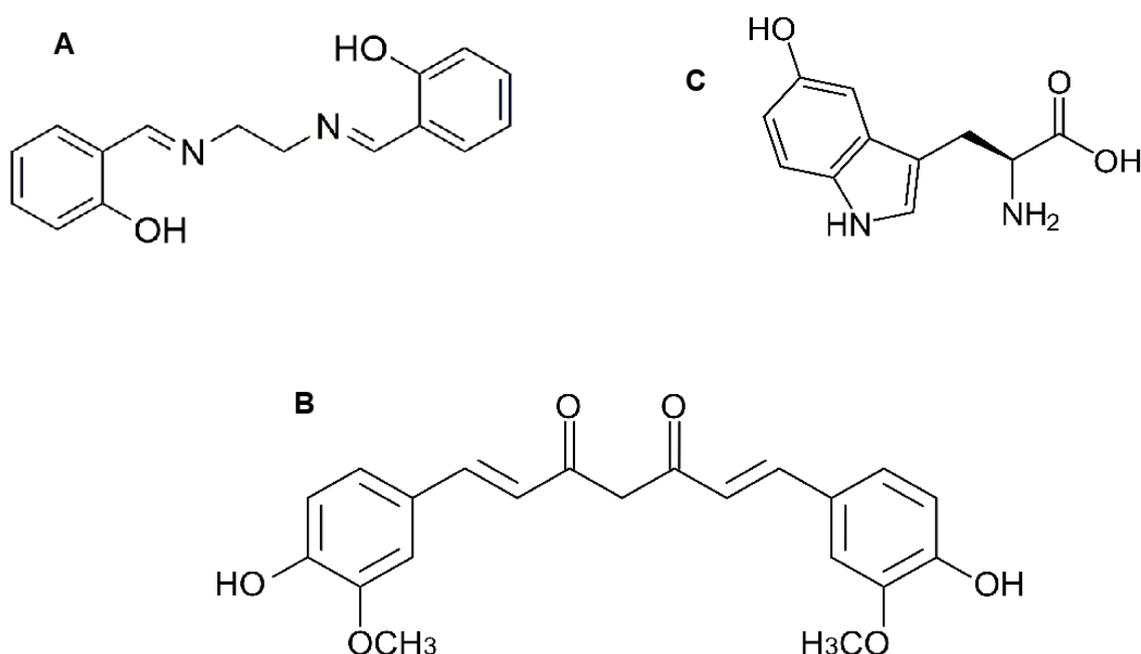


Figura 1-XXIV. Estructuras de algunos ligandos utilizados para la síntesis de complejos con actividad neuro protectora:
A) Bis(salicilideno)etilendiamina; B) Curcumina; C) 5-hidroxitriptófano.

1.5 Bibliografía

- (1) Ros-Vivancos, C.; González-Hernández, M.; Navarro-Gracia, J. F.; Sánchez-Payá, J.; González-Torga, A.; Portilla-Sogorb, J. [Evolution of treatment of syphilis through history]. *Rev. Espanola Quimioter. Publicacion Of. Soc. Espanola Quimioter.* **2018**, 31 (6), 485–492.
- (2) Li, Z.; Shen, Q.; Mao, Z.; Tan, C. Rising Interest in the Development of Metal Complexes in Cancer Immunotherapy. *Chem. – Asian J.* **2022**, 17 (13), e202200270. <https://doi.org/10.1002/asia.202200270>.

- (3) Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>.
- (4) Williams, C. J.; Whitehouse, J. M. Cis-Platinum: A New Anticancer Agent. *BMJ* **1979**, *1* (6179), 1689–1691. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6179.1689>.
- (5) Baran, E. J. Metallopharmaceuticals: A New Perspective for Pharmacology and Medicine. *An. Acad. Nac. Cienc. Exactas Físicas Nat. B. Aires* **2011**, No. 63, 88–97.
- (6) Martínez, V. R.; Aguirre, M. V.; Todaro, J. S.; Lima, A. M.; Stergiopoulos, N.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. Zinc Complexation Improves Angiotensin II Receptor Type 1 Blockade and *In Vivo* Antihypertensive Activity of Telmisartan. *Future Med. Chem.* **2021**, *13* (1), 13–23. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0093>.
- (7) Wang, X.; Du, Y.; Fan, L.; Liu, H.; Hu, Y. Chitosan- Metal Complexes as Antimicrobial Agent: Synthesis, Characterization and Structure-Activity Study. *Polym. Bull.* **2005**, *55* (1–2), 105–113. <https://doi.org/10.1007/s00289-005-0414-1>.
- (8) Biot, C.; Castro, W.; Botté, C. Y.; Navarro, M. The Therapeutic Potential of Metal-Based Antimalarial Agents: Implications for the Mechanism of Action. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (21), 6335. <https://doi.org/10.1039/c2dt12247b>.
- (9) Karges, J.; Cohen, S. M. Metal Complexes as Antiviral Agents for SARS-CoV-2. *ChemBioChem* **2021**, *22* (16), 2600–2607. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100186>.
- (10) Rodríguez-Arce, E.; Saldías, M. Antioxidant Properties of Flavonoid Metal Complexes and Their Potential Inclusion in the Development of Novel Strategies for the Treatment against Neurodegenerative Diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *143*, 112236. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112236>.
- (11) Martínez Medina, J. J.; Naso, L. G.; Pérez, A. L.; Rizzi, A.; Okulik, N. B.; Valcarcel, M.; Salado, C.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Synthesis, Characterization, Theoretical Studies and Biological (Antioxidant, Anticancer, Toxicity and Neuroprotective) Determinations of a Copper(II) Complex with 5-Hydroxytryptophan. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 414–426. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.098>.
- (12) Rehder, D. *Bioinorganic Vanadium Chemistry*, 1st ed.; Wiley, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470994429>.
- (13) Rehder, D. Is Vanadium a More Versatile Target in the Activity of Primordial Life Forms than Hitherto Anticipated? *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (6), 957. <https://doi.org/10.1039/b717565p>.
- (14) Antipov, A. N.; Lyalikova, N. N.; Khijniak, T. V.; L'vov, N. P. Molybdenum-free Nitrate Reductases from Vanadate-reducing Bacteria. *FEBS Lett.* **1998**, *441* (2), 257–260. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01510-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01510-5).
- (15) Boison, G.; Steingen, C.; Stal, L. J.; Bothe, H. The Rice Field Cyanobacteria *Anabaena Azotica* and *Anabaena* Sp. CH1 Express Vanadium-Dependent Nitrogenase. *Arch. Microbiol.* **2006**, *186* (5), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0150-4>.
- (16) Carter-Franklin, J. N.; Butler, A. Vanadium Bromoperoxidase-Catalyzed Biosynthesis of Halogenated Marine Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15060–15066. <https://doi.org/10.1021/ja047925p>.
- (17) Kaysser, L.; Bernhardt, P.; Nam, S.-J.; Loesgen, S.; Ruby, J. G.; Skewes-Cox, P.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; Moore, B. S. Merochlorins A–D, Cyclic Meroterpenoid Antibiotics Biosynthesized in Divergent Pathways with Vanadium-Dependent Chloroperoxidases. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (29), 11988–11991. <https://doi.org/10.1021/ja305665f>.

- (18) De Pao Mendonca, K.; Chaurand, P.; Campos, A.; Angeletti, B.; Rovezzi, M.; Delage, L.; Borchiellini, C.; Le Bivic, A.; Issartel, J.; Renard, E.; Levard, C. Hyper-Accumulation of Vanadium in Animals: Two Sponges Compete with Urochordates. *Sci. Total Environ.* **2024**, *914*, 169410. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169410>.
- (19) Costa Pessoa, J. Thirty Years through Vanadium Chemistry. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *147*, 4–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.004>.
- (20) Köpf-Maier, P.; Wagner, W.; Hesse, B.; Köpf, H. Tumor Inhibition by Metallocenes: Activity against Leukemias and Detection of the Systemic Effect. *Eur. J. Cancer* **1985**, *17* (6), 665–669. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(81\)90270-X](https://doi.org/10.1016/0014-2964(81)90270-X).
- (21) Djordjevic, C.; Wampler, G. L. Antitumor Activity and Toxicity of Peroxo Heteroligand Vanadates(V) in Relation to Biochemistry of Vanadium. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *25* (1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(85\)83007-5](https://doi.org/10.1016/0162-0134(85)83007-5).
- (22) Rulíšek, L.; Vondrášek, J. Coordination Geometries of Selected Transition Metal Ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in Metalloproteins. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *71* (3–4), 115–127. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(98\)10042-9](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(98)10042-9).
- (23) Chasapis, C. T.; Loutsidou, A. C.; Spiliopoulou, C. A.; Stefanidou, M. E. Zinc and Human Health: An Update. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86* (4), 521–534. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>.
- (24) Reyes, J. G. Zinc Transport in Mammalian Cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **1996**, *270* (2), C401–C410. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.2.C401>.
- (25) Chimienti, F.; Aouffen, M.; Favier, A.; Seve, M. Zinc Homeostasis-Regulating Proteins: New Drug Targets for Triggering Cell Fate. *Curr. Drug Targets* **2003**, *4* (4), 323–338. <https://doi.org/10.2174/1389450033491082>.
- (26) Hara, T.; Takeda, T.; Takagishi, T.; Fukue, K.; Kambe, T.; Fukada, T. Physiological Roles of Zinc Transporters: Molecular and Genetic Importance in Zinc Homeostasis. *J. Physiol. Sci.* **2017**, *67* (2), 283–301. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0521-4>.
- (27) Krężel, A.; Maret, W. Thionein/Metallothionein Control Zn(II) Availability and the Activity of Enzymes. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13* (3), 401–409. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0330-y>.
- (28) Cassandri, M.; Smirnov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G.; Raschellà, G. Zinc-Finger Proteins in Health and Disease. *Cell Death Discov.* **2017**, *3* (1), 17071. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>.
- (29) Wang, L.; Wildt, K. F.; Castro, E.; Xiong, Y.; Feigenbaum, L.; Tessarollo, L.; Bosselut, R. The Zinc Finger Transcription Factor Zbtb7b Represses CD8-Lineage Gene Expression in Peripheral CD4⁺ T Cells. *Immunity* **2008**, *29* (6), 876–887. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.019>.
- (30) Planeta Kepp, K. Bioinorganic Chemistry of Zinc in Relation to the Immune System. *ChemBioChem* **2022**, *23* (9), e202100554. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100554>.
- (31) Marikovsky, M.; Ziv, V.; Nevo, N.; Harris-Cerruti, C.; Mahler, O. Cu/Zn Superoxide Dismutase Plays Important Role in Immune Response. *J. Immunol.* **2003**, *170* (6), 2993–3001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.2993>.
- (32) Lázaro, S.; Gamarra, D.; Del Val, M. Proteolytic Enzymes Involved in MHC Class I Antigen Processing: A Guerrilla Army That Partners with the Proteasome. *Mol. Immunol.* **2015**, *68* (2), 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.014>.

- (33) Mallett, S. P.; Guralnick, W. C. Zinc Peroxide in the Treatment of Mouth Infections. *J. Am. Dent. Assoc.* **1942**, *29* (3), 384–388. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1942.0010>.
- (34) Meloney, F. L.; Harvey, H. D. The combined use of zinc peroxide and sulfanilamide in the treatment of chronic, undermining, burrowing ulcers due to the micro-aerophilic hemolytic streptococcus: *Ann. Surg.* **1939**, *110* (6), 1050–1094. <https://doi.org/10.1097/00000658-193912000-00006>.
- (35) Meloney, F. L. Present role of zinc peroxide in treatment of surgical infections. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1952**, *149* (16), 1450. <https://doi.org/10.1001/jama.1952.02930330018006>.
- (36) Pories, Walter J.; Henzel, John H.; Rob, Charles G.; Strain, William H. Acceleration of wound healing in man with zinc sulphate given by mouth. *The Lancet* **1967**, *289* (7482), 121–124. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(67\)91031-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)91031-8).
- (37) Lin, P.-H.; Sermersheim, M.; Li, H.; Lee, P. H. U.; Steinberg, S. M.; Ma, J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients* **2017**, *10* (1), 16. <https://doi.org/10.3390/nu10010016>.
- (38) Akihama, S.; Toyoshima, S. Antiviral Effect of Zinc Complexes on Japanese B Encephalitis Virus. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1962**, *10* (12), 1254–1257. <https://doi.org/10.1248/cpb.10.1254>.
- (39) Fridlender, B.; Chejanovsky, N.; Becker, Y. Selective Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Polymerase by Zinc Ions. *Virology* **1978**, *84* (2), 551–554. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90274-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90274-X).
- (40) Korant, B. D.; Butterworth, B. E. Inhibition by Zinc of Rhinovirus Protein Cleavage: Interaction of Zinc with Capsid Polypeptides. *J. Virol.* **1976**, *18* (1), 298–306. <https://doi.org/10.1128/jvi.18.1.298-306.1976>.
- (41) Bracha, M.; Schlesinger, M. J. Inhibition of Sindbis Virus Replication by Zinc Ions. *Virology* **1976**, *72* (1), 272–277. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(76\)90330-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(76)90330-5).
- (42) Read, S. A.; Obeid, S.; Ahlenstiel, C.; Ahlenstiel, G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Adv. Nutr.* **2019**, *10* (4), 696–710. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz013>.
- (43) Chen, M.-D.; Liou, S.-J.; Lin, P.-Y.; Yang, V. C.; Alexander, P. S.; Lin, W.-H. Effects of Zinc Supplementation on the Plasma Glucose Level and Insulin Activity in Genetically Obese (Ob/Ob) Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **1998**, *61* (3), 303–311. <https://doi.org/10.1007/BF02789090>.
- (44) Li, Y. V. Zinc and Insulin in Pancreatic Beta-Cells. *Endocrine* **2014**, *45* (2), 178–189. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0032-x>.
- (45) Yoshikawa, Y.; Ueda, E.; Miyake, H.; Sakurai, H.; Kojima, Y. Insulinomimetic Bis(Maltolato)Zinc(II) Complex: Blood Glucose Normalizing Effect in KK-Ay Mice with Type 2 Diabetes Mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281* (5), 1190–1193. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4456>.
- (46) Adachi, Y.; Yoshida, J.; Koder, Y.; Kato, A.; Yoshikawa, Y.; Kojima, Y.; Sakurai, H. A New Insulin-Mimetic Bis(Allixinato)Zinc(II) Complex: Structure?Activity Relationship of Zinc(II) Complexes. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9* (7), 885–893. <https://doi.org/10.1007/s00775-004-0590-8>.
- (47) Pellei, M.; Del Bello, F.; Porchia, M.; Santini, C. Zinc Coordination Complexes as Anticancer Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *445*, 214088. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214088>.

- (48) Bisht, G.; Rayamajhi, S. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine* **2016**, *3*, 9. <https://doi.org/10.5772/63437>.
- (49) Xiong, H. ZnO Nanoparticles Applied to Bioimaging and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (37), 5329–5335. <https://doi.org/10.1002/adma.201301732>.
- (50) Gudkov, S. V.; Burmistrov, D. E.; Serov, D. A.; Rebezov, M. B.; Semenova, A. A.; Lisitsyn, A. B. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. *Front. Phys.* **2021**, *9*, 641481. <https://doi.org/10.3389/fphy.2021.641481>.
- (51) Al-Ostoot, F. H.; Salah, S.; Khanum, S. A. An Overview of Cancer Biology, Pathophysiological Development and It's Treatment Modalities: Current Challenges of Cancer Anti-Angiogenic Therapy. *Cancer Invest.* **2024**, *42* (7), 559–604. <https://doi.org/10.1080/07357907.2024.2361295>.
- (52) Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. Review of Cancer from Perspective of Molecular. *J. Cancer Res. Pract.* **2017**, *4* (4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.
- (53) Portela, A.; Esteller, M. Epigenetic Modifications and Human Disease. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>.
- (54) Poon, S. L.; McPherson, J. R.; Tan, P.; Teh, B. T.; Rozen, S. G. Mutation Signatures of Carcinogen Exposure: Genome-Wide Detection and New Opportunities for Cancer Prevention. *Genome Med.* **2014**, *6* (3), 24. <https://doi.org/10.1186/gm541>.
- (55) Trafialek, J.; Kolanowski, W. Dietary Exposure to Meat-Related Carcinogenic Substances: Is There a Way to Estimate the Risk? *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2014**, *65* (6), 774–780. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.917146>.
- (56) Antwi, S. O.; Eckert, E. C.; Sabaque, C. V.; Leof, E. R.; Hawthorne, K. M.; Bamlet, W. R.; Chaffee, K. G.; Oberg, A. L.; Petersen, G. M. Exposure to Environmental Chemicals and Heavy Metals, and Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Causes Control* **2015**, *26* (11), 1583–1591. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0652-y>.
- (57) Farrell, P. J. Epstein–Barr Virus and Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2019**, *14* (1), 29–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023>.
- (58) Hassan, M. M.; Li, D.; El-Deeb, A. S.; Wolff, R. A.; Bondy, M. L.; Davila, M.; Abbruzzese, J. L. Association Between Hepatitis B Virus and Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26* (28), 4557–4562. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.3526>.
- (59) El Tekle, G.; Garrett, W. S. Bacteria in Cancer Initiation, Promotion and Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2023**, *23* (9), 600–618. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00594-2>.
- (60) Imaoka, T.; Nishimura, M.; Iizuka, D.; Daino, K.; Takabatake, T.; Okamoto, M.; Kakinuma, S.; Shimada, Y. Radiation-Induced Mammary Carcinogenesis in Rodent Models: What's Different from Chemical Carcinogenesis? *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2009**, *50* (4), 281–293. <https://doi.org/10.1269/jrr.09027>.
- (61) Anderson, M. W.; Reynolds, S. H.; You, M.; Maronpot, R. M. Role of Proto-Oncogene Activation in Carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **1992**, *98*, 13–24. <https://doi.org/10.1289/ehp.929813>.
- (62) Saremi, S.; Kolahi, M.; Tabandeh, M. R.; Hashemitabar, M. Induction of Apoptosis and Suppression of Ras Gene Expression in MCF Human Breast Cancer Cells. *J. Cancer Res. Ther.* **2022**, *18* (4), 1052–1060. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_624_20.
- (63) Jiang, Y.; Zhang, C.; Lu, L.; Wang, X.; Liu, H.; Jiang, Y.; Hong, L.; Chen, Y.; Huang, H.; Guo, D. The Prognostic Role of Cyclin D1 in Multiple Myeloma: A Systematic

- Review and Meta-Analysis. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2022**, *21*, 15330338211065252. <https://doi.org/10.1177/15330338211065252>.
- (64) Mohanty, S. S.; Sahoo, C. R.; Padhy, R. N. Role of Hormone Receptors and HER2 as Prospective Molecular Markers for Breast Cancer: An Update. *Genes Dis.* **2022**, *9* (3), 648–658. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.12.005>.
- (65) Ala, M. Target C-Myc to Treat Pancreatic Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2022**, *23* (1), 34–50. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.2017223>.
- (66) Joyce, C.; Rayi, A.; Kasi, A. Tumor-Suppressor Genes. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
- (67) Williams, A. B.; Schumacher, B. P53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (5), a026070. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>.
- (68) Mendonsa, A. M.; Na, T.-Y.; Gumbiner, B. M. E-Cadherin in Contact Inhibition and Cancer. *Oncogene* **2018**, *37* (35), 4769–4780. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>.
- (69) Philpott, C.; Tovell, H.; Frayling, I. M.; Cooper, D. N.; Upadhyaya, M. The NF1 Somatic Mutational Landscape in Sporadic Human Cancers. *Hum. Genomics* **2017**, *11* (1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0109-3>.
- (70) Roy, R.; Chun, J.; Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: Different Roles in a Common Pathway of Genome Protection. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12* (1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>.
- (71) Shankaran, V.; Ikeda, H.; Bruce, A. T.; White, J. M.; Swanson, P. E.; Old, L. J.; Schreiber, R. D. IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. *Nature* **2001**, *410* (6832), 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>.
- (72) Smyth, M. J.; Crowe, N. Y.; Godfrey, D. I. NK Cells and NKT Cells Collaborate in Host Protection from Methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma. *Int. Immunol.* **2001**, *13* (4), 459–463. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.4.459>.
- (73) Teng, M. W. L.; Swann, J. B.; Koebel, C. M.; Schreiber, R. D.; Smyth, M. J. Immune-Mediated Dormancy: An Equilibrium with Cancer. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *84* (4), 988–993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>.
- (74) Mittal, D.; Gubin, M. M.; Schreiber, R. D.; Smyth, M. J. New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases—Elimination, Equilibrium and Escape. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *27*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.
- (75) Greaves, M. Evolutionary Determinants of Cancer. *Cancer Discov.* **2015**, *5* (8), 806–820. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0439>.
- (76) Roche, J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers* **2018**, *10* (2), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>.
- (77) Brabletz, S.; Schuhwerk, H.; Brabletz, T.; Stemmler, M. P. Dynamic EMT: A Multi-tool for Tumor Progression. *EMBO J.* **2021**, *40* (18), e108647. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108647>.
- (78) Yang, H.; Villani, R. M.; Wang, H.; Simpson, M. J.; Roberts, M. S.; Tang, M.; Liang, X. The Role of Cellular Reactive Oxygen Species in Cancer Chemotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37* (1), 266. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>.

- (79) Sena, L. A.; Chandel, N. S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* **2012**, *48* (2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- (80) Vallyathan, V.; Shi, X. The Role of Oxygen Free Radicals in Occupational and Environmental Lung Diseases. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105* (suppl 1), 165–177. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s1165>.
- (81) Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016* (1), 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>.
- (82) Reczek, C. R.; Chandel, N. S. ROS-Dependent Signal Transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *33*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>.
- (83) Sallmyr, A.; Fan, J.; Rassool, F. V. Genomic Instability in Myeloid Malignancies: Increased Reactive Oxygen Species (ROS), DNA Double Strand Breaks (DSBs) and Error-Prone Repair. *Cancer Lett.* **2008**, *270* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.036>.
- (84) Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. Insertion of Specific Bases during DNA Synthesis Past the Oxidation-Damaged Base 8-oxodG. *Nature* **1991**, *349* (6308), 431–434. <https://doi.org/10.1038/349431a0>.
- (85) Ferro, E.; Goitre, L.; Retta, S. F.; Trabalzini, L. The Interplay between ROS and Ras GTPases: Physiological and Pathological Implications. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/365769>.
- (86) Nishikawa, M. Reactive Oxygen Species in Tumor Metastasis. *Cancer Lett.* **2008**, *266* (1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.031>.
- (87) Ushio-Fukai, M.; Nakamura, Y. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer Lett.* **2008**, *266* (1), 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.044>.
- (88) Simon, H.-U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Apoptosis Induction. *APOPTOSIS* **2000**, *5* (5), 415–418. <https://doi.org/10.1023/A:1009616228304>.
- (89) Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D. A. Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863* (12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
- (90) Leitão, M. I. P. S.; Tuross-Cabal, M.; Sanchez-Sanchez, A. M.; Gomes, C. S. B.; Herrera, F.; Martin, V.; Petronilho, A. Antitumor Activity and Reductive Stress by Platinum(II) N-Heterocyclic Carbenes Based on Guanosine**. *Chem. – Eur. J.* **2023**, *29* (40), e202301078. <https://doi.org/10.1002/chem.202301078>.
- (91) Martínez, V. R.; Aguirre, M. V.; Todaro, J. S.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Candesartan and Valsartan Zn(II) Complexes as Inducing Agents of Reductive Stress: Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *New J. Chem.* **2021**, *45* (2), 939–951. <https://doi.org/10.1039/D0NJ02937H>.
- (92) Zhang, H.; Limphong, P.; Pieper, J.; Liu, Q.; Rodesch, C. K.; Christians, E.; Benjamin, I. J. Glutathione-dependent Reductive Stress Triggers Mitochondrial Oxidation and Cytotoxicity. *FASEB J.* **2012**, *26* (4), 1442–1451. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199869>.
- (93) Zhang, L.; Tew, K. D. Reductive Stress in Cancer. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2021; Vol. 152, pp 383–413. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.03.009>.

- (94) Sun, Y. Free Radicals, Antioxidant Enzymes, and Carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, 8 (6), 583–599. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90156-D](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90156-D).
- (95) Djordjevic, C. Antitumor Activity of Vanadium Compounds. *Met. Ions Biol. Syst.* **1995**, 31, 595–616.
- (96) Aureliano, M.; De Sousa-Coelho, A. L.; Dolan, C. C.; Roess, D. A.; Crans, D. C. Biological Consequences of Vanadium Effects on Formation of Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (6), 5382. <https://doi.org/10.3390/ijms24065382>.
- (97) Evangelou, A. M. Vanadium in Cancer Treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 42 (3), 249–265. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00221-9](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00221-9).
- (98) Morinville, A.; Maysinger, D.; Shaver, A. From Vanadis to Atropos: Vanadium Compounds as Pharmacological Tools in Cell Death Signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, 19 (11), 452–460. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01257-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01257-7).
- (99) Mercurio, F.; Manning, A. M. Multiple Signals Converging on NF- κ B. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, 11 (2), 226–232. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80030-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80030-1).
- (100) Bours, V.; Bentires-Alj, M.; Hellin, A.-C.; Viatour, P.; Robe, P.; Delhalle, S.; Benoit, V.; Merville, M.-P. Nuclear Factor- κ B, Cancer, and Apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 60 (8), 1085–1089. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00391-9).
- (101) Hassan, S.; Mathesius, U. The Role of Flavonoids in Root-Rhizosphere Signalling: Opportunities and Challenges for Improving Plant-Microbe Interactions. *J. Exp. Bot.* **2012**, 63 (9), 3429–3444. <https://doi.org/10.1093/jxb/err430>.
- (102) Batra, P.; Sharma, A. K. Anti-Cancer Potential of Flavonoids: Recent Trends and Future Perspectives. *3 Biotech* **2013**, 3 (6), 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>.
- (103) Marzocchella, L.; Fantini, M.; Benvenuto, M.; Masuelli, L.; Tresoldi, I.; Modesti, A.; Bei, R. Dietary Flavonoids: Molecular Mechanisms of Action as Anti-Inflammatory Agents. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2011**, 5 (3), 200–220. <https://doi.org/10.2174/187221311797264937>.
- (104) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79 (5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- (105) Xiao, Z.-P.; Peng, Z.-Y.; Peng, M.-J.; Yan, W.-B.; Ouyang, Y.-Z.; Zhu, H.-L. Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2011**, 11 (2), 169–177. <https://doi.org/10.2174/138955711794519546>.
- (106) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, 144 (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (107) Wang, Y.; Lu, P.; Zhang, W.; Du, Q.; Tang, J.; Wang, H.; Lu, J.; Hu, R. GEN-27, a Newly Synthetic Isoflavonoid, Inhibits the Proliferation of Colon Cancer Cells in Inflammation Microenvironment by Suppressing NF- κ B Pathway. *Mediators Inflamm.* **2016**, 2016, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/2853040>.
- (108) Kadioglu, O.; Nass, J.; Saeed, M. E. M.; Schuler, B.; Efferth, T. Kaempferol Is an Anti-Inflammatory Compound with Activity towards NF- κ B Pathway Proteins. *Anticancer Res.* **2015**, 35 (5), 2645–2650.
- (109) Zhao, G.; Han, X.; Cheng, W.; Ni, J.; Zhang, Y.; Lin, J.; Song, Z. Apigenin Inhibits Proliferation and Invasion, and Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Melanoma Cells. *Oncol. Rep.* **2017**, 37 (4), 2277–2285. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5450>.

- (110) Pal, H. C.; Sharma, S.; Strickland, L. R.; Agarwal, J.; Athar, M.; Elmets, C. A.; Afaq, F. Delphinidin Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Targeting EGFR/VEGFR2 Signaling Pathways. *PLoS ONE* **2013**, *8* (10), e77270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077270>.
- (111) Shimizu, M.; Shirakami, Y.; Sakai, H.; Yasuda, Y.; Kubota, M.; Adachi, S.; Tsurumi, H.; Hara, Y.; Moriwaki, H. (-)-Epigallocatechin Gallate Inhibits Growth and Activation of the VEGF/VEGFR Axis in Human Colorectal Cancer Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *185* (3), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.036>.
- (112) Seyoum, A.; Asres, K.; El-Fiky, F. K. Structure–Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Phytochemistry* **2006**, *67* (18), 2058–2070. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002>.
- (113) Slika, H.; Mansour, H.; Wehbe, N.; Nasser, S. A.; Iratni, R.; Nasrallah, G.; Shaito, A.; Ghaddar, T.; Kobeissy, F.; Eid, A. H. Therapeutic Potential of Flavonoids in Cancer: ROS-Mediated Mechanisms. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112442. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>.
- (114) Caro-Ramírez, J. Y.; Rivas, M. G.; Gonzalez, P. J.; Williams, P. A. M.; Naso, L. G.; Ferrer, E. G. Copper(II) Cation and Bathophenanthroline Coordination Enhance Therapeutic Effects of Naringenin against Lung Tumor Cells. *BioMetals* **2022**, *35* (5), 1059–1076. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00422-4>.
- (115) Liskova, A.; Koklesova, L.; Samec, M.; Smejkal, K.; Samuel, S. M.; Varghese, E.; Abotaleb, M.; Biringer, K.; Kudela, E.; Danko, J.; Shakibaei, M.; Kwon, T. K.; Büsselberg, D.; Kubatka, P. Flavonoids in Cancer Metastasis. *Cancers* **2020**, *12* (6), 1498. <https://doi.org/10.3390/cancers12061498>.
- (116) Chien, M.-H.; Lin, Y.-W.; Wen, Y.-C.; Yang, Y.-C.; Hsiao, M.; Chang, J.-L.; Huang, H.-C.; Lee, W.-J. Targeting the SPOCK1-Snail/Slug Axis-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Apigenin Contributes to Repression of Prostate Cancer Metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38* (1), 246. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1247-3>.
- (117) Yao, Y.; Rao, C.; Zheng, G.; Wang, S. Luteolin Suppresses Colorectal Cancer Cell Metastasis via Regulation of the miR-384/Pleiotrophin Axis. *Oncol. Rep.* **2019**. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7136>.
- (118) Lv, W.; Liu, Q.; An, J.; Song, X. Scutellarin Inhibits Hypoxia-induced Epithelial-mesenchymal Transition in Bladder Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (12), 23169–23175. <https://doi.org/10.1002/jcp.28883>.
- (119) Carretero, O. A.; Oparil, S. Essential Hypertension: Part I: Definition and Etiology. *Circulation* **2000**, *101* (3), 329–335. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.3.329>.
- (120) Lederer, E. D. Secondary Hypertension. In *Clinical Decisions in Nephrology, Hypertension and Kidney Transplantation*; Lerma, E. V., Rosner, M., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013; pp 515–531. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4454-1_43.
- (121) London, G. M.; Pannier, B. Arterial Functions: How to Interpret the Complex Physiology. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25* (12), 3815–3823. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq614>.
- (122) Atlas, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J. Manag. Care Pharm.* **2007**, *13* (8 Supp B), 9–20. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9>.
- (123) Treschan, T. A.; Peters, J.; Wartier, D. C. The Vasopressin System. *Anesthesiology* **2006**, *105* (3), 599–612. <https://doi.org/10.1097/00000542-200609000-00026>.

- (124) Brenner, B. M.; Ballermann, B. J.; Gunning, M. E.; Zeidel, M. L. Diverse Biological Actions of Atrial Natriuretic Peptide. *Physiol. Rev.* **1990**, *70* (3), 665–699. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.3.665>.
- (125) Barton, M.; Yanagisawa, M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension* **2019**, *74* (6), 1232–1265. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105>.
- (126) Mancia, G.; Grassi, G. The Autonomic Nervous System and Hypertension. *Circ. Res.* **2014**, *114* (11), 1804–1814. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302524>.
- (127) Wehrwein, E. A.; Joyner, M. J. Regulation of Blood Pressure by the Arterial Baroreflex and Autonomic Nervous System. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2013; Vol. 117, pp 89–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53491-0.00008-0>.
- (128) Motiejunaite, J.; Amar, L.; Vidal-Petiot, E. Adrenergic Receptors and Cardiovascular Effects of Catecholamines. *Ann. Endocrinol.* **2021**, *82* (3–4), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2020.03.012>.
- (129) McArdle, P. F.; Rutherford, S.; Mitchell, B. D.; Damcott, C. M.; Wang, Y.; Ramachandran, V.; Ott, S.; Chang, Y.-P. C.; Levy, D.; Steinle, N. Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Variants Are Associated with Blood Pressure; Findings in the Old Order Amish and Replication in the Framingham Heart Study. *BMC Med. Genet.* **2008**, *9* (1), 67. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-67>.
- (130) Gorre, F.; Vandekerckhove, H. Beta-Blockers: Focus on Mechanism of Action Which Beta-Blocker, When and Why? *Acta Cardiol.* **2010**, *65* (5), 565–570. <https://doi.org/10.1080/AC.65.5.2056244>.
- (131) Blowey, D. L. Diuretics in the Treatment of Hypertension. *Pediatr. Nephrol.* **2016**, *31* (12), 2223–2233. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3334-4>.
- (132) Sweitzer, N. K. What Is an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor? *Circulation* **2003**, *108* (3). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000075957.16003.07>.
- (133) Elliott, W. J.; Ram, C. V. S. Calcium Channel Blockers: Calcium Channel Blockers. *J. Clin. Hypertens.* **2011**, *13* (9), 687–689. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2011.00513.x>.
- (134) Nash, D. T. Alpha-adrenergic Blockers: Mechanism of Action, Blood Pressure Control, and Effects on Lipoprotein Metabolism. *Clin. Cardiol.* **1990**, *13* (11), 764–772. <https://doi.org/10.1002/clc.4960131104>.
- (135) Giovannitti, J. A.; Thoms, S. M.; Crawford, J. J. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesth. Prog.* **2015**, *62* (1), 31–38. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-62.1.31>.
- (136) Lastra, G.; Syed, S.; Kurukulasuriya, L. R.; Manrique, C.; Sowers, J. R. Type 2 Diabetes Mellitus and Hypertension. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2014**, *43* (1), 103–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.005>.
- (137) Prasad, A. S. Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease. *Adv. Nutr.* **2013**, *4* (2), 176–190. <https://doi.org/10.3945/an.112.003210>.
- (138) Kunutsor, S. K.; Laukkanen, J. A. Serum Zinc Concentrations and Incident Hypertension: New Findings from a Population-Based Cohort Study. *J. Hypertens.* **2016**, *34* (6), 1055–1061. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000923>.
- (139) Medeiros, D. M.; Brown, B. J. Blood Pressure in Young Adults as Influenced by Copper and Zinc Intake. *Biol. Trace Elem. Res.* **1983**, *5* (3), 165–174. <https://doi.org/10.1007/BF02916620>.

- (140) Sato, M.; Yanagisawa, H.; Nojima, Y.; Tamura, J.; Wada, O. Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase. *Clin. Exp. Hypertens.* **2002**, *24* (5), 355–370. <https://doi.org/10.1081/CEH-120004797>.
- (141) Dimitrova, A.; Strashimirov, D.; Betova, T.; Russeva, A.; Alexandrova, M. Zinc Content in the Diet Affects the Activity of Cu/ZnSOD, Lipid Peroxidation and Lipid Profile of Spontaneously Hypertensive Rats. *Acta Biol. Hung.* **2008**, *59* (3), 305–314. <https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.3.4>.
- (142) Verouti, S. N.; Boscardin, E.; Hummler, E.; Frateschi, S. Regulation of Blood Pressure and Renal Function by NCC and ENaC: Lessons from Genetically Engineered Mice. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *21*, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.12.012>.
- (143) Wang, J.; Sun, C.; Gerdes, N.; Liu, C.; Liao, M.; Liu, J.; Shi, M. A.; He, A.; Zhou, Y.; Sukhova, G. K.; Chen, H.; Cheng, X. W.; Kuzuya, M.; Murohara, T.; Zhang, J.; Cheng, X.; Jiang, M.; Shull, G. E.; Rogers, S.; Yang, C.-L.; Ke, Q.; Jelen, S.; Bindels, R.; Ellison, D. H.; Jarolim, P.; Libby, P.; Shi, G.-P. Interleukin 18 Function in Atherosclerosis Is Mediated by the Interleukin 18 Receptor and the Na-Cl Co-Transporter. *Nat. Med.* **2015**, *21* (7), 820–826. <https://doi.org/10.1038/nm.3890>.
- (144) Murillo-de-Ozores, A. R.; Rodríguez-Gama, A.; Bazúa-Valenti, S.; Leyva-Ríos, K.; Vázquez, N.; Pacheco-Álvarez, D.; De La Rosa-Velázquez, I. A.; Wengi, A.; Stone, K. L.; Zhang, J.; Loffing, J.; Lifton, R. P.; Yang, C.-L.; Ellison, D. H.; Gamba, G.; Castañeda-Bueno, M. C-Terminally Truncated, Kidney-Specific Variants of the WNK4 Kinase Lack Several Sites That Regulate Its Activity. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (31), 12209–12221. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003037>.
- (145) Williams, C. R.; Mistry, M.; Cheriyan, A. M.; Williams, J. M.; Naraine, M. K.; Ellis, C. L.; Mallick, R.; Mistry, A. C.; Gooch, J. L.; Ko, B.; Cai, H.; Hoover, R. S. Zinc Deficiency Induces Hypertension by Promoting Renal Na⁺ Reabsorption. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2019**, *316* (4), F646–F653. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00487.2018>.
- (146) Mugge, A.; Elwell, J. H.; Peterson, T. E.; Harrison, D. G. Release of Intact Endothelium-Derived Relaxing Factor Depends on Endothelial Superoxide Dismutase Activity. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **1991**, *260* (2), C219–C225. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.2.C219>.
- (147) Omar, H. A.; Cherry, P. D.; Mortelliti, M. P.; Burke-Wolin, T.; Wolin, M. S. Inhibition of Coronary Artery Superoxide Dismutase Attenuates Endothelium-Dependent and -Independent Nitrovasodilator Relaxation. *Circ. Res.* **1991**, *69* (3), 601–608. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.3.601>.
- (148) Laight, D. W.; Kaw, A. V.; Carrier, M. J.; Änggård, E. E. Interaction between Superoxide Anion and Nitric Oxide in the Regulation of Vascular Endothelial Function. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124* (1), 238–244. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701814>.
- (149) Bouloumié, A.; Bauersachs, J.; Linz, W.; Schölkens, B. A.; Wiemer, G.; Fleming, I.; Busse, R. Endothelial Dysfunction Coincides With an Enhanced Nitric Oxide Synthase Expression and Superoxide Anion Production. *Hypertension* **1997**, *30* (4), 934–941. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.4.934>.
- (150) Restrepo Guerrero, A. G.; Martínez, V. R.; Velez Rueda, J. O.; Portiansky, E. L.; De Giusti, V.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Complexation of the Antihypertensive Drug Olmesartan with Zn: In Vivo Antihypertensive and Cardiac Effects. *Biol. Trace Elem. Res.* **2024**, *202* (1), 246–257. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03670-8>.
- (151) Martínez, V. R.; Martins Lima, A.; Stergiopoulos, N.; Velez Rueda, J. O.; Islas, M. S.; Griera, M.; Calleros, L.; Rodríguez Puyol, M.; Jaquenod De Giusti, C.; Portiansky,

- E. L.; Ferrer, E. G.; De Giusti, V.; Williams, P. A. M. Effect of the Structural Modification of Candesartan with Zinc on Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *946*, 175654. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175654>.
- (152) Dugger, B. N.; Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9* (7), a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.
- (153) Carrell, R. W.; Lomas, D. A. Conformational Disease. *The Lancet* **1997**, *350* (9071), 134–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02073-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02073-4).
- (154) Ma, C.; Hong, F.; Yang, S. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules* **2022**, *27* (4), 1210. <https://doi.org/10.3390/molecules27041210>.
- (155) Chi, H.; Sang, T.-K.; Chang, H.-Y. Tauopathy. In *Cognitive Disorders*; Foyaca Sibat, H., Ed.; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73198>.
- (156) Pickering-Brown, S.; Baker, M.; Yen, S.-H.; Liu, W.-K.; Hasegawa, M.; Cairns, N.; Lantos, P. L.; Rossor, M.; Iwatsubo, T.; Davies, Y.; Allsop, D.; Furlong, R.; Owen, F.; Hardy, J.; Mann, D.; Hutton, M. Pick's Disease Is Associated with Mutations in Thetau Gene. *Ann. Neurol.* **2000**, *48* (6), 859–867. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200012\)48:6<859::AID-ANA6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200012)48:6<859::AID-ANA6>3.0.CO;2-1).
- (157) Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X.; Grundke-Iqbal, I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **2010**, *7* (8), 656–664. <https://doi.org/10.2174/156720510793611592>.
- (158) Lei, P.; Ayton, S.; Finkelstein, D. I.; Adlard, P. A.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Tau Protein: Relevance to Parkinson's Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42* (11), 1775–1778. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.07.016>.
- (159) Lamotte, G.; Singer, W. Synucleinopathies. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2023; Vol. 196, pp 175–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98817-9.00032-6>.
- (160) Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M. G. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *J. Park. Dis.* **2017**, *7* (s1), S51–S69. <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>.
- (161) Walker, L. C.; Jucker, M. Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annu. Rev. Neurosci.* **2015**, *38* (1), 87–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033828>.
- (162) Gough, K. C.; Maddison, B. C. Prion Transmission: Prion Excretion and Occurrence in the Environment. *Prion* **2010**, *4* (4), 275–282. <https://doi.org/10.4161/pri.4.4.13678>.
- (163) Robertson, G. S.; Crocker, S. J.; Nicholson, D. W.; Schulz, J. B. Neuroprotection by the Inhibition of Apoptosis. *Brain Pathol.* **2000**, *10* (2), 283–292. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x>.
- (164) S. Pandya, R.; Mao, L.; Zhou, H.; Zhou, S.; Zeng, J.; John Popp, A.; Wang, X. Central Nervous System Agents for Ischemic Stroke: Neuroprotection Mechanisms. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2011**, *11* (2), 81–97. <https://doi.org/10.2174/187152411796011321>.
- (165) McBean, G. J.; Aslan, M.; Griffiths, H. R.; Torrão, R. C. Thiol Redox Homeostasis in Neurodegenerative Disease. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.004>.

- (166) Wąsik, A.; Antkiewicz-Michaluk, L. The Mechanism of Neuroprotective Action of Natural Compounds. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69* (5), 851–860. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.018>.
- (167) Barthel, A.; Ostrakhovitch, E. A.; Walter, P. L.; Kampkötter, A.; Klotz, L.-O. Stimulation of Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling by Copper and Zinc Ions: Mechanisms and Consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *463* (2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.015>.
- (168) Rouco, L.; Maneiro, M. Neuroprotective Effects of Metalosalen Complexes against Oxidative Stress. *Neural Regen. Res.* **2021**, *16* (1), 121. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.286966>.
- (169) Vajragupta, O. Manganese Complexes of Curcumin and Its Derivatives: Evaluation for the Radical Scavenging Ability and Neuroprotective Activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35* (12), 1632–1644. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.011>.
- (170) Yan, F.-S.; Sun, J.-L.; Xie, W.-H.; Shen, L.; Ji, H.-F. Neuroprotective Effects and Mechanisms of Curcumin–Cu(II) and –Zn(II) Complexes Systems and Their Pharmacological Implications. *Nutrients* **2017**, *10* (1), 28. <https://doi.org/10.3390/nu10010028>.
- (171) Bica, L.; Crouch, P. J.; Cappai, R.; White, A. R. Metallo-Complex Activation of Neuroprotective Signalling Pathways as a Therapeutic Treatment for Alzheimer's Disease. *Mol BioSyst* **2009**, *5* (2), 134–142. <https://doi.org/10.1039/B816577G>.
- (172) L. Naso, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams. Correlation of the Anticancer and Pro-oxidant Behavior and the Structure of Flavonoid-oxidovanadium(IV) Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *492*, 215271. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215271>

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Reactivos

Todos los productos químicos sólidos y los solventes utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y se emplearon tal como se suministraron. α -metildopa (ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilpropanoico), carbidopa (ácido (2S)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidrazino-2-metilpropanoico) y L-Dopa (L-3,4 dihidroxifenilalanina) fueron adquiridos en la droguería Saporiti, Argentina; crisina en Sigma-Aldrich, Estados Unidos; $ZnCl_2$ en Biopack, Argentina; clorhidrato de fenantrolina en Merck, Alemania; y acetilacetato de vanadilo, en Fluka Munich, Alemania.

2.2 Caracterización fisicoquímica

2.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

En la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se hacen incidir ondas electromagnéticas del rango infrarrojo ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) a una muestra y se registra la transmitancia y/o absorbancia de esta a cada número de onda. La energía absorbida por las moléculas en esta región está asociada a los diferentes modos de vibración de sus átomos (Figura 2-1), y la frecuencia de dichas vibraciones dependerá de la naturaleza de los átomos involucrados y su entorno¹. Por lo tanto, esta técnica permite identificar la presencia de determinados grupos funcionales en los ligandos y concluir si estos se ven involucrados en la coordinación con el metal.

Procedimiento experimental: Cantidades adecuadas de la muestra (1 - 2 mg) y bromuro de potasio (Merck) (0,1 - 0,2 g) fueron pulverizadas con mortero y homogeneizadas a fin de obtener una mezcla que luego se sometió a presión (3 - 5 toneladas) en prensa hidráulica "Delfabro". La pastilla resultante se analizó en el Espectrómetro FTIR "Bruker IFS 66" desde 4000 a 400 cm^{-1} , con 60 scans acumulados y una resolución espectral de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Los espectros obtenidos fueron visualizados con el software "OPUS 4.2".

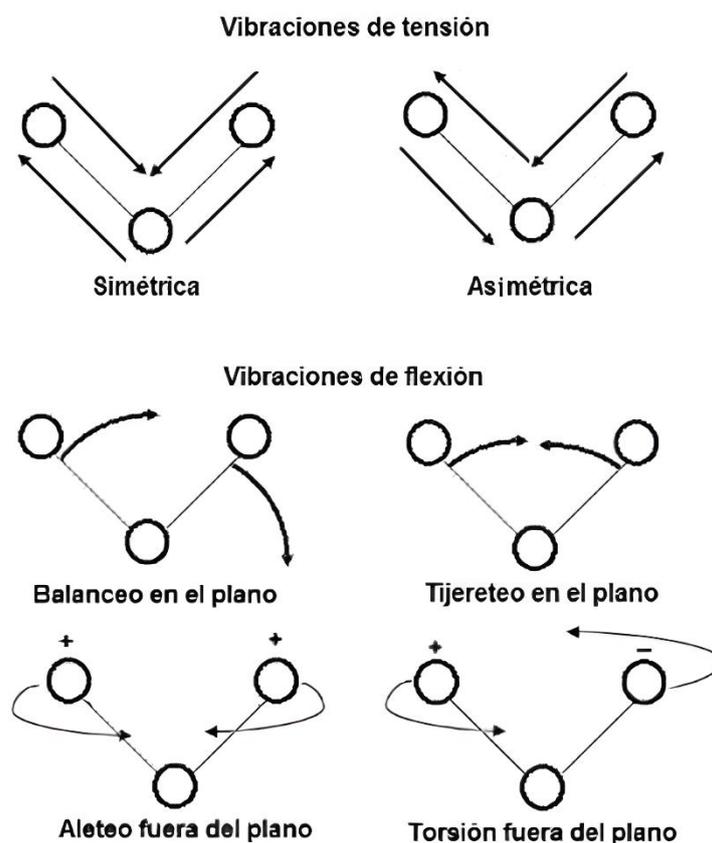


Figura 2-1. Esquema de los modos de vibración posibles en una molécula triatómica.

2.2.2 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se trata de una técnica donde se registran las variaciones de masa de una muestra en función del aumento de la temperatura en condiciones controladas de velocidad de calentamiento y de flujo y proporción de gases (usualmente O_2 y N_2). Por lo tanto, se puede obtener información acerca de procesos impulsados por el aumento de la temperatura, tales como la descomposición térmica, reacciones redox, transiciones de fase, absorción, adsorción, desorción, entre otros². En el caso particular de la síntesis de nuevos compuestos de coordinación, el TGA es especialmente útil para determinar la presencia de moléculas de solvente en la estructura del compuesto, así como clasificarlas en moléculas de solvatación o de coordinación, dependiendo de la temperatura a la que estas son eliminadas de la muestra³. Además, el peso del residuo final del complejo metálico da una idea de la proporción de elementos metálicos que posee la muestra, ya que por lo general se obtienen óxidos de metales como producto final de descomposición.

Procedimiento experimental: Se utilizó un analizador termogravimétrico “SHIMADZU TGA-50” con una atmósfera de O₂ con flujo de 50 ml/min, una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y un rango de muestra de 5 - 10 mg. El proceso de descomposición térmica se ejecutó hasta aproximadamente 900 °C (o hasta alcanzar peso constante) y el residuo final se identificó mediante espectroscopía FTIR.

2.2.3 Análisis elemental

El análisis elemental es una técnica analítica de alta precisión que consta de la combustión de una pequeña cantidad de una muestra seguida del análisis de sus gases resultantes (habitualmente CO₂, SO₂, H₂O, NO₂, etc.) a través de cromatografía de gases, logrando así determinar la proporción de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre en el compuesto⁴.

Procedimiento experimental: Los diferentes análisis elementales para C, H y N en este trabajo de tesis se realizaron mediante servicios a terceros en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE-CONICET) de la Universidad de Buenos Aires y se efectuaron en un analizador “Carlo Erba Elemental Analyzer 1108”, en el que se llevó a cabo la combustión de la muestra para transformarla en CO₂, H₂O y N₂. La separación de los gases se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa con columna de porapac de longitud variable, y para la detección se utilizó un detector de conductividad térmica. Se utilizaron dos patrones para la calibración del método: 2,5-bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno y ácido sulfanílico.

2.2.4 Determinaciones analíticas

Para las determinaciones analíticas de Zn, V y Cl⁻ se realizaron los siguientes procedimientos experimentales puestos a punto en nuestros laboratorios.

2.2.4.1 Determinación de Zinc por método de Zincon

Para la determinación de Zinc se utilizó el método de Zincon (Ácido 2 - [2 - [(Z) - N - [(E) - (6 - oxo - 3 - sulfociclohexa - 2, 4 - dien - 1 - ilideno) amino] - C - fenilcarbonimidol] hidrazinil] benzoico). Este cromóforo es capaz de coordinar de manera tetradentada con iones de zinc y cobre en solución acuosa, generando un compuesto azulado que se puede cuantificar mediante técnicas espectrofotométricas⁵ (2-II).

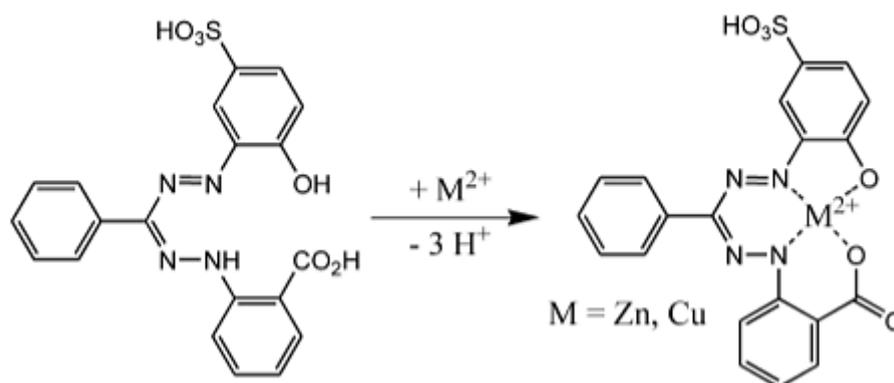


Figura 2-II. Reacción de complejación entre Zincon y un catión Zn(II) o Cu(II).

Procedimiento experimental: Se preparó una solución madre de sal sódica de Zincon (Santa Cruz Biotechnology) 1,6 mM, mezclando 0,0077 g del sólido con 200 μL de NaOH 1M y llevando a volumen final de 10 mL con agua destilada. La mezcla de reacción para la determinación se realizó a partir de 25 μL de la solución madre de Zincon, 950 μL de tampón borato (borato de sodio 50 mM; pH 9) y 25 μL del compuesto de interés disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) de manera tal de obtener una concentración final de entre 0 - 40 μM . Después de incubar a 20 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, se midió la absorbancia a 620 nm. Se utilizó ZnSO_4 (concentraciones finales variables entre 0 - 40 μM) para generar una curva de calibración a partir de la cual se calculó el contenido de Zinc de las muestras.

2.2.4.2 Determinación de vanadio

La determinación de vanadio se realizó midiendo espectrofotométricamente la concentración del anión fosfotungstovanadato, obtenido a partir de la reacción de vanadio(V) con ácido fosfórico y wolframato de sodio⁶. Dicho compuesto posee un máximo de absorción en la banda localizada a 435 nm.

Procedimiento experimental: 15 - 20 mg de muestra sólida se sometieron a digestión ácida mediante el agregado de ácido sulfúrico y ácido nítrico en relación 3:1 y calentamiento. Dicho proceso se repitió entre tres y cinco veces con la finalidad de destruir la materia orgánica y oxidar al vanadio. Luego, se añadió 5 mL de ácido fosfórico 50% v/v y 5 mL de wolframato de sodio 10% p/v. La mezcla se calentó a ebullición por 15 minutos y luego se aforó a 50 mL con agua destilada. La solución obtenida fue medida en un espectrofotómetro "Shimadzu UV 2600" a 435 nm y el contenido de

vanadio se obtuvo al comparar los resultados con una curva de calibración realizada con soluciones de NH_4VO_3 de concentración conocida.

2.2.4.3 Determinación de iones cloruro por método de Mohr

Para determinar el contenido de iones cloruro en los compuestos de coordinación se utilizó el método de Mohr⁷, el cual consta de una titulación basada en la reacción de precipitación que ocurre entre dichos aniones y los cationes Ag^+ . Como indicador de punto final se utilizó K_2CrO_4 , el cual es capaz de reaccionar con el exceso de iones Ag^+ agregados para dar la especie coloreada Ag_2CrO_4 :



Procedimiento experimental: La muestra se digirió con ácido nítrico concentrado a ebullición para liberar a los iones Cl^- de la estructura del compuesto, en cantidades tales de conseguir una concentración de compuesto de aproximadamente 0,1 M. La titulación se realizó agregando una solución de AgNO_3 0,1 M gota a gota hasta la aparición del precipitado rojo producto de la reacción entre el exceso de Ag^+ y el indicador de punto final K_2CrO_4 . Antes de la titulación fue necesario neutralizar la muestra digerida a fin de evitar la formación de la especie $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, predominante en medio ácido.

2.2.5 Espectroscopía UV-visible

La espectroscopía ultravioleta (UV) - visible es una técnica de caracterización que permite analizar el entorno de especies metálicas y orgánicas en muestras sólidas (a través de reflectancia difusa) o en solución, siempre que estas especies exhiban transiciones electrónicas en el rango de energía correspondiente a la radiación UV y visible. Esta técnica posibilita la identificación de las contribuciones de componentes orgánicos e inorgánicos en las muestras, así como el estudio detallado del entorno de ciertos átomos metálicos.

2.2.5.1 Espectroscopía UV-Visible en solución

La espectroscopía UV-visible es un método analítico mediante el cual se mide la absorción de luz de una muestra en el rango del espectro ultravioleta - visible (200 - 800 nm). La absorción en este rango suele asociarse a la excitación de electrones en un átomo o molécula que resulta en transiciones electrónicas desde el estado basal a

orbitales de mayor energía, seguida de una relajación donde la energía ganada es disipada térmicamente⁸. En el caso particular de los complejos de transición, además, pueden presentarse transiciones electrónicas entre los orbitales d de valencia del metal de transición que experimentan un desdoblamiento debido a la interacción con los ligandos en el espacio, y transiciones del tipo transferencia de carga ligando-metal y metal-ligando, donde pueden producirse tránsitos electrónicos entre los orbitales de dichas especies⁹.

La diferencia de energía entre los estados basal y excitado se describe mediante la ecuación:

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde ΔE es la diferencia de energía, h es la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s), λ es la longitud de onda de la onda electromagnética absorbida y c es la velocidad de la luz en el vacío (3×10^8 m/s).

La cantidad de luz de una determinada longitud de onda absorbida es medida a través de un espectrofotómetro y se expresa como absorbancia (A):

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Donde I_0 , I son las intensidades de luz emitida y detectada luego de la absorción, respectivamente.

La absorbancia, a su vez, se relaciona con la concentración de la solución mediante la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

Donde l es el camino óptico (normalmente fijado en 1 cm en los espectrofotómetros), C es la concentración de la solución medida y ϵ es el coeficiente de extinción molar, en unidades $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, el cual refleja la probabilidad de tránsito electrónico.

Procedimiento experimental: Los espectros UV-visible fueron obtenidos a partir de soluciones 10^{-5} - 10^{-1} M de las muestras en un espectrofotómetro "Shimadzu UV 2600" (rango de 185 - 900 nm; resolución de 0,1 nm). En todos los casos se utilizaron cubetas

de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Para el análisis de los espectros se utilizó el software “Shimadzu LabSolutions UVProbe 2.43”.

2.2.5.2 Espectroscopía de reflectancia difusa

La espectroscopía de reflectancia difusa es una técnica utilizada para identificar bandas de absorción (tránsitos d-d o transferencias de carga) en compuestos en estado sólido. Esto es útil ya que, en los complejos de transición, la estructura puede verse modificada una vez que estos se encuentran en solución, habitualmente debido a la disociación de ligandos o el intercambio de estos con moléculas de solvente¹⁰.

La metodología consiste en irradiar una muestra en polvo con luz en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja cercana. Parte de esta luz es absorbida por la muestra y otra parte es reflejada de forma difusa. La radiación reflejada se recoge mediante una esfera integradora y es detectada por el equipo. Lo que se mide es la relación entre la luz dispersada por una capa de muestra de espesor infinito y la luz reflejada por una referencia ideal que no absorbe radiación, en función de la longitud de onda¹¹.

Procedimiento experimental: Para las medidas de reflectancia difusa se adicionó al equipo “Shimadzu UV 2600” el accesorio ISR-2600PLUS. Se utilizó BaO como estándar.

2.2.6 Conductividad molar

La conductividad molar es la capacidad, para una sustancia en solución, de conducir la corriente eléctrica y se define como la inversa de la resistividad, por lo que posee unidades de $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. La conductividad dependerá tanto del solvente como de la cantidad y naturaleza de los electrolitos presentes en la solución, por lo que otorga información importante sobre la estructura de un compuesto disuelto. En este trabajo, la conductividad fue medida en nuestro laboratorio y comparada con datos bibliográficos para estimar si los complejos de coordinación obtenidos se disocian en solución o son compuestos del tipo no electrolito¹².

Procedimiento experimental: Se prepararon soluciones de los compuestos a estudiar en un solvente adecuado (típicamente agua o DMSO) a concentración 10^{-3} M. La conductividad fue medida a temperatura ambiente con un conductímetro “TDS Probe 850.084, Sper Scientific Direct”. Se registró además la variación de conductividad a lo largo de 4 horas para evaluar además la estabilidad de los compuestos.

2.2.7 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es el resultado final de un proceso que consta de tres etapas secuenciales: la excitación, donde los electrones de la molécula adquieren energía en forma de radiación electromagnética y experimentan un salto desde su estado basal a uno excitado; la relajación no radiante, donde la molécula pierde energía ya sea por colisiones con moléculas de solvente (relajación vibracional) o por la vibración de la misma molécula (conversión interna), provocando saltos electrónicos a niveles de menor energía; la fluorescencia propiamente dicha (o relajación radiante), donde el electrón libera su energía restante en forma de radiación (Figura 2-III). Debido a que la radiación emitida es de menor energía a la incidente, su longitud de onda (λ_{em}) será mayor a la longitud de onda de la radiación de excitación (λ_{ex}).

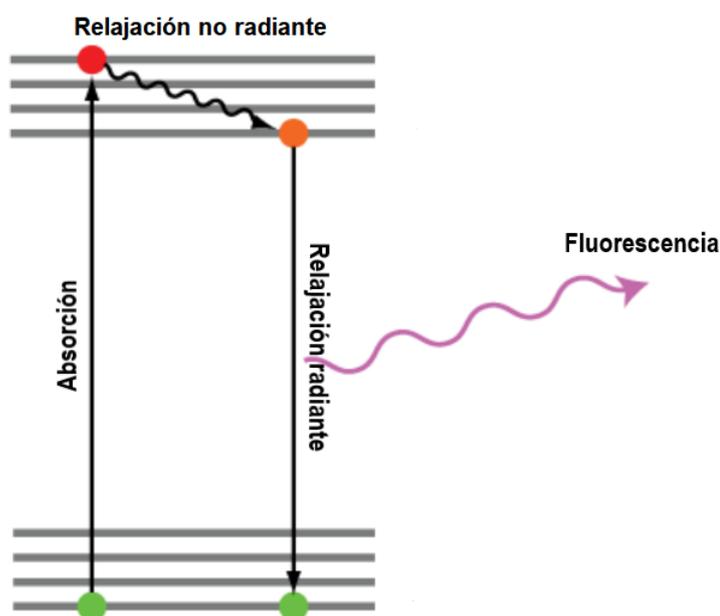


Figura 2-III. Esquema del proceso que da lugar al fenómeno de fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia son de gran utilidad a la hora de estudiar distintos procesos químicos. En este trabajo en particular, fueron utilizados para estudiar la formación de complejos de coordinación (que se evidencia mediante la aparición o modificación de bandas debido a la interacción metal-ligando) y la interacción de estos con albúmina sérica bovina, para lo cual se suele estudiar la desactivación (*quenching*) de fluorescencia a la longitud de onda de emisión característica de la misma.

Procedimiento experimental: Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos en un espectrofluorómetro “Shimadzu RF-6000” utilizando cubetas de cuarzo con ancho de rendija de entrada y salida de 10 nm. El paso de longitud de onda de barrido fue de 1 nm y la velocidad de barrido de 6000 nm/minuto. Primero se obtuvieron los espectros 3D para establecer la longitud de onda de excitación y emisión de los compuestos, y a partir de estos datos se trabajaron con los espectros 2D correspondientes. Los datos se procesaron con el software “LabSolutions RF 1.11”.

2.2.8 Medidas de estabilidad

Con el propósito de analizar la estabilidad de los compuestos en solución y asegurarse de que no experimenten cambios antes de su aplicación en pruebas biológicas, se examinó la variación de sus espectros electrónicos a lo largo del tiempo (además de los estudios por medida de conductividad ya mencionados).

Procedimiento experimental: Los compuestos se disolvieron en un solvente adecuado a concentraciones de entre 10^{-2} a 10^{-5} M (dependiendo del coeficiente de extinción molar de la banda de interés) y se midió el espectro en el rango del UV-visible cada 5 minutos durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. La estabilidad de los compuestos se determinó al observar la variación de sus características espectrales con el paso del tiempo.

2.2.9 Resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica basada en la capacidad de una muestra (sometida a un campo magnético que desdobra sus niveles de energía de espín nuclear) para absorber energía en la región de frecuencias de las ondas de radio (10 kHz - 10 THz). Para que la muestra pueda estudiarse mediante RMN, debe poseer núcleos con momento de spin nuclear diferente de cero, siendo los más medidos ^1H y ^{13}C . Los solventes utilizados en la disolución de las muestras se utilizan en su forma deuterada (núcleos ^2H reemplazando a los núcleos ^1H), evitando así la interferencia con la medida.

La frecuencia de la radiación absorbida por el núcleo (que se corresponde con la cantidad de energía necesaria para cambiar la orientación de su espín nuclear) dependerá no sólo de su naturaleza, sino también de su entorno químico. Esto se debe mayoritariamente a procesos de “enmascaramiento”, donde la presencia de electrones produce un campo magnético opuesto al campo magnético externo aplicado a la

muestra, haciendo que el núcleo experimente dicho campo externo en menor medida y por lo tanto absorba radiación a frecuencias menores. Los procesos de enmascaramiento se vuelven importantes cuando hay grandes densidades electrónicas cercanas al núcleo, como por ejemplo átomos de oxígeno, nitrógeno, dobles enlaces, etc. Por este fenómeno, la técnica de RMN ofrece una gran cantidad de información sobre la estructura de una muestra, siendo especialmente útil para la elucidación de estructuras de moléculas orgánicas¹³.

Procedimiento experimental: Todos los espectros RMN fueron medidos mediante servicios a terceros. Los espectros ^1H y ^{13}C de soluciones de las muestras en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) fueron obtenidos a 25 °C utilizando un espectrómetro “Bruker Ultrashield 600”, con frecuencias de 600 y 150 MHz, respectivamente. Se empleó tetrametilsilano como patrón para calibrar el valor 0 de desplazamiento químico (δ). Los espectros obtenidos se analizaron con el software “MestReNova 12.0.0”.

2.2.10 Resonancia paramagnética electrónica

La resonancia paramagnética electrónica (RPE) se utiliza para analizar cómo las sustancias con uno o más electrones desapareados (paramagnéticas) absorben radiación en la región de microondas (104–106 MHz). Los espectros de RPE surgen a partir de la interacción entre los electrones desapareados y el campo magnético aplicado¹⁴, y proporcionan información sobre la estructura electrónica y el entorno de coordinación de una muestra. Entre los parámetros que se pueden determinar a partir de los espectros de RPE se encuentra el tensor giromagnético (g), que describe el momento magnético de los electrones desapareados y puede dar indicios sobre el estado de espín de la molécula. Para un electrón libre, este valor es de 2,0023, mientras que en el catión oxidovanadio(IV) es más bajo, alrededor de 1,95.

Los estados electrónicos se ven influidos por la interacción con el espín nuclear, lo que en el caso del ^{51}V en el catión oxidovanadio(IV) (con espín nuclear $I = 7/2$) resulta en la división de los estados electrónicos en ocho estados energéticos distintos ($2I + 1 = 8$). Estos estados energéticos están separados por la constante de acoplamiento hiperfino, A , y se traducen en un espectro característico de 8 líneas (Figura 2-IV).

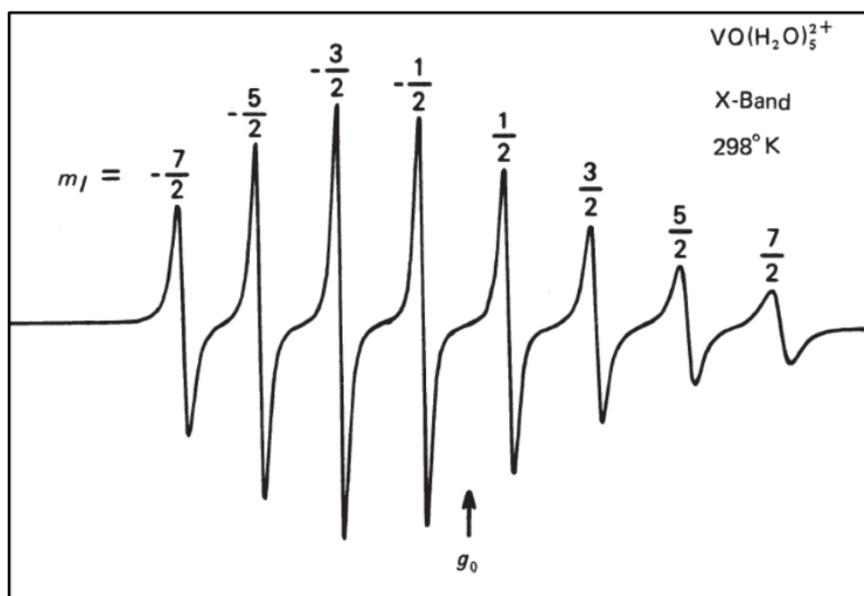


Figura 2-IV. Espectro de RPE en banda X del catión $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a temperatura ambiente.

Fuente: Chasteen, N. D. (1981)¹⁵.

Cada línea en un espectro de RPE corresponde a una transición electrónica permitida en el sistema, ofreciendo información sobre el entorno de coordinación. La magnitud de A permite identificar los núcleos acoplados y determinar cuántos núcleos están involucrados en una transición de EPR. En particular, la componente paralela, respecto al campo magnético aplicado, de la constante de acoplamiento hiperfino ($A_{||}$) se puede relacionar con el tipo y la cantidad de ligandos en el plano ecuatorial¹⁶.

Procedimiento experimental: Los espectros de RPE se midieron en colaboración con el Departamento de Física de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los espectros de RPE en banda X se obtuvieron de muestras en polvo y soluciones en DMSO a temperaturas entre 100 K (-173,15 °C) y 298 K (24,85 °C) en un espectrómetro “Bruker EMX-Plus”, equipado con una cavidad rectangular con modulación de campo de 100 kHz. Se corrigió la línea base de los espectros, cuando fue necesario, utilizando el programa de procesamiento “WinEPR” (Bruker, Inc). Los valores g - y A - se obtuvieron mediante simulaciones utilizando la herramienta “EasySpin 5.2.3”¹⁷ y asumiendo un hamiltoniano de spin axial de la forma: $H = \mu_B [g_{||}B_zS_z + g_{\perp} (B_xS_x + B_yS_y)] + [A_{||}S_zI_z + A_{\perp} (S_xI_x + S_yI_y)]$, donde μ_B es el magnetón de Bohr y $g_{||}$, g_{\perp} , $A_{||}$, A_{\perp} son los componentes de los tensores axiales g y A , respectivamente; $B_{x/y/z}$, $S_{x/y/z}$, $I_{x/y/z}$ son los componentes del campo magnético y de los operadores de spin del electrón y del núcleo V, respectivamente.

2.2.11 Espectroscopía de masas

La espectroscopía de masas es una técnica analítica selectiva y sensible que consiste en la fragmentación de una muestra en fase gaseosa por ionización, con la consecuente separación en base a la relación carga/masa, y la detección de las especies generadas.

Los componentes principales del espectrómetro de masas incluyen el sistema de entrada, la fuente de iones, el analizador de masas, el detector y el procesador de señales. El sistema de entrada permite la introducción de la muestra sin la pérdida de vacío del equipo (en caso de requerirlo). La fuente de iones produce la ionización y fragmentación del analito mediante bombardeo con un haz de electrones o átomos de alta energía, con luz laser o mediante interacción con otros iones. Las especies ionizadas generadas migran hacia el analizador de masas mediante un campo eléctrico. Dentro de los analizadores más utilizados se encuentran el analizador cuadrupolar acoplado a cromatógrafo de gases, el analizador magnético y el analizador de trampa de iones. A partir del espectro de masas, se puede inferir el peso molecular del analito a partir de la masa del ion molecular, y la estructura del mismo a partir del patrón de iones fragmentados¹⁸.

En este trabajo se utilizó la espectrometría de masas de ionización por electrospray (en inglés: Electrospray Ionization Mass Spectroscopy, o ESI-MS), en la cual la muestra en solución se hace pasar a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico. A la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, que se evaporan por un proceso de desorción del campo eléctrico o por evaporación del solvente, liberando así los iones de la muestra a la fase gaseosa. Particularmente, en este tipo de espectrometría de masas, las muestras no sufren fragmentación y se opera a presión atmosférica.

Parte experimental: Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro de masas "Bruker micrOTOF-Q II", equipado con una fuente ESI que funciona en modo positivo. Las medidas se realizaron mediante servicios a terceros en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires (UMYMFOR).

2.3 Ensayos de biodisponibilidad

2.3.1 Interacción con albúmina sérica bovina

La albúmina plasmática es la proteína de mayor abundancia en la sangre y sus funciones son transportar y distribuir moléculas endógenas y exógenas, así como contribuir a la presión coloidosmótica sanguínea. Que se produzca la unión de un fármaco con albúmina permite su absorción, distribución, metabolismo y excreción. Por lo tanto, la eficacia de un fármaco estará relacionada, en parte, con su afinidad con la albúmina¹⁹.

Mas allá de sus características estructurales, la capacidad de una molécula para unirse a la albúmina dependerá de otros factores tales como el pH del plasma, las concentraciones de la molécula y la proteína, y la presencia de otros agentes con mayor afinidad por el sitio de unión. La facilidad de disociación del fármaco también es un factor importante, ya que cuanto más fuerte sea la interacción con la albúmina, más lenta será su liberación desde el reservorio de la proteína¹⁹.

La albúmina sérica bovina (ASB) se utiliza frecuentemente en estudios de interacción con fármacos debido a su alta homología (76%) con la albúmina sérica humana²⁰. Debido a la presencia de residuos aromáticos, ASB presenta fluorescencia intrínseca. La espectroscopia de fluorescencia es una técnica útil para estudiar la interacción entre un fármaco (*quencher*) y ASB, debido a que este proceso puede disminuir la fluorescencia basal a través de fenómenos tales como reacciones de estado excitado, reordenamientos moleculares, transferencia de energía, formación de complejo de estado fundamental y extinción colisional. Tal disminución se denomina “desactivación de fluorescencia” (*quenching*), y proporciona información sobre el mecanismo de unión, las constantes de unión, los sitios de unión y las distancias intermoleculares²¹.

En esta técnica, una solución de ASB es excitada a 280 nm (longitud de onda a la que absorben los residuos de tirosina, triptófano y fenilalanina) y se obtiene una banda de fluorescencia a 336 nm. La desactivación de fluorescencia, debido a la interacción con diferentes concentraciones del compuesto, se analiza mediante la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia antes y después del agregado del compuesto, respectivamente; K_q es la constante bimolecular de velocidad de *quenching*; τ_0 es la vida media del fluoróforo en ausencia del compuesto (se asume igual a 10^{-8} s para albúmina²²); $[Q]$ es la concentración del compuesto; K_{sv} es la constante de *quenching* de Stern-Volmer.

El *quenching* de fluorescencia puede darse por medio de un proceso considerado dinámico (como resultado de un encuentro difusivo entre el *quencher* y el fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado) o estático (como resultado de la formación de un complejo fluorescente en el estado fundamental (*quencher* - fluoróforo)). El gráfico de Stern -Volmer puede ser lineal si el *quenching* es simple (estático o dinámico) o tener curvatura si es combinado (estático y dinámico a la vez). Sin embargo, el gráfico no define el tipo de *quenching*. Para distinguir entre *quenching* estático o dinámico se puede examinar el efecto de la temperatura sobre la constante K_{sv} ; el valor aumentará con el incremento de la temperatura si el proceso es dinámico, y disminuirá con el aumento de la temperatura si es estático.

La ecuación de Scatchard es útil para representar el equilibrio entre el *quencher* libre y enlazado a los sitios de unión de ASB:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_b) + \eta \log [Q]$$

Donde $[Q]$ es la concentración del *quencher*, K_b es la constante de unión y η es el número de sitios de unión. El valor de K_b es importante para entender la distribución de un fármaco en el plasma. En general, debe ser bastante alto como para asegurar el transporte y distribución a través del organismo, pero al mismo tiempo lo suficientemente bajo como para que el compuesto sea capaz de liberarse y así alcanzar su objetivo. Por tal motivo, el rango óptimo se considera $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ ²³.

La interacción entre dos moléculas se da a través de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc²⁴. Para caracterizar las fuerzas existentes en la interacción compuesto-ASB, se pueden analizar los parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y ΔS . Las magnitudes y signos de estos parámetros pueden explicar las principales fuerzas involucradas en la unión. Las temperaturas que se utilizan son 25, 30 y 37 °C, ya que en este rango ASB no sufre ninguna degradación estructural. Los valores de ΔH y ΔS se pueden estimar a través de la ecuación de Van't Hoff:

$$\ln(K_b) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

Donde T es la temperatura en grados Kelvin, K_b es la constante de unión a la temperatura dada y R es la constante de los gases. Luego, ΔG puede calcularse con la ecuación:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Valores negativos de ΔG implican que la interacción ocurre espontáneamente. Ross y Subramanian han caracterizado los tipos de asociación a proteínas. Se ha asociado el signo y la magnitud del parámetro termodinámico con varios tipos y combinación de interacciones que pueden tener lugar en el proceso de asociación de proteínas, estos pueden ser: $\Delta H > 0$ y $\Delta S > 0$, fuerzas hidrofóbicas; $\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno; $\Delta H < 0$ y $\Delta S > 0$, interacciones electrostáticas²⁵.

Procedimiento experimental: ASB (Sigma-Aldrich) se disolvió en tampón Tris-HCl (trishidroximetilaminometano (Tris) 12,11 g/L; NaCl 5,85 g/L; pH ajustado a 7,4 con HCl concentrado) a una concentración final de 6 μM . Los compuestos disueltos en DMSO se añadieron a la solución de ASB (concentraciones finales variables entre 0 - 100 μM) y se homogeneizó cuidadosamente para evitar la desnaturalización de la proteína. Las mezclas se incubaron por al menos 20 minutos a 25 °C (298 K), 30 °C (303 K) y 37 °C (310 K), y se midieron los espectros de fluorescencia para cada combinación de concentración y temperatura, con $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 290 - 450 \text{ nm}$, en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000. Los valores de fluorescencia obtenidos a partir de las curvas de *quenching* de fluorescencia de ASB fueron corregidos por efecto de filtro²⁶ interno, dado que se puede producir pérdida de la intensidad de la fluorescencia observada debido a la absorción de luz de la muestra, con la fórmula $F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} * e^{\frac{A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}}{2}}$. En el caso en que las bandas de fluorescencia de ASB y el compuesto se solaparan, la corrección se realizó a través de desconvolución de las curvas con el software "Origin 2022".

2.3.2 Medidas de reparto en agua/octanol como aproximación a la interfaz del sistema sangre/cerebro

El coeficiente de partición (P) se define como la razón entre las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico compuesto por dos disolventes inmiscibles. En el caso del n-octanol y agua:

$$P_{ow} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{agua}}$$

Con frecuencia, los valores de coeficientes de partición se expresan como $\log(P)$.

Se ha demostrado que existe una correlación entre los valores de P_{ow} y la razón de concentración cerebro/sangre²⁷. Por lo tanto, conocer el P_{ow} de una sustancia da una idea de su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (lo cual es requisito si se desea que dicha sustancia actúe sobre neuronas) por difusión simple. En este trabajo, los valores de P se determinaron mediante el método del frasco de agitación²⁸, donde se miden las concentraciones del compuesto en cada fase antes y después del equilibrio de partición, el cual es alcanzado mediante una agitación vigorosa seguida de un tiempo de reposo donde se alcanza la separación total de los solventes.

Procedimiento experimental: Las sustancias se disolvieron en agua de manera de alcanzar una solución de concentración 10^{-4} M. Volúmenes idénticos de solución y de n-octanol se colocaron en tubos de ensayo y se agitaron vigorosamente con un agitador mecánico durante 20 minutos para alcanzar el equilibrio de concentraciones en ambas fases. Para facilitar la separación de las fases, los tubos se centrifugaron durante 2 horas. La concentración antes y después de la partición se determinaron mediante espectroscopía UV-visible (utilizando un patrón de C vs absorbancia) y el P_{ow} se calculó en base a estos valores, utilizando la fórmula:

$$P_{ow} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{agua}} = \frac{C_{agua (inicial)} - C_{agua (final)}}{C_{agua (final)}}$$

Donde $C_{agua(inicial)}$ y $C_{agua(final)}$ son las concentraciones de la sustancia en la fase acuosa antes y después de la partición, respectivamente. El uso de esta ecuación es posible debido a que los volúmenes de solución y de n-octanol utilizados fueron idénticos, y por lo tanto puede asumirse que la concentración del compuesto en la fase orgánica

corresponderá a la diferencia de las concentraciones en la fase acuosa antes y después de la partición.

2.4 Estudios de actividad biológica *in vitro* para compuestos antitumorales

2.4.1 Incubación de células con compuestos bioactivos

La esterilidad durante el trabajo con células se aseguró mediante la utilización de un flujo laminar "Biotraza BBS-V800". Las líneas celulares se cultivaron en frascos de 25 o 75 cm² a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% CO₂ (en una estufa "Arcano ECO2"), en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich), el cual contiene elevadas concentraciones de aminoácidos, glucosa y vitaminas, suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (SFB). Cuando las células alcanzaron el 80 - 90% de confluencia, fueron despegadas utilizando TrypLE™ (Gibco), una enzima recombinante que sustituye a la tripsina animal. De acuerdo al experimento, las células se sembraron con DMEM + 10% SFB en placas de 96, 48, 24 o 6 pocillos, o en placas de Petri de 100 mm³ y se incubaron en las condiciones antes descritas. Luego de alcanzar 80 a 90% de confluencia, se removió el medio y se colocó DMEM fresco con cantidades variables del compuesto de interés (complejos, ligandos, sales, etc.) disueltos en un solvente adecuado (usualmente DMSO, con concentración final de 0,5% DMSO en DMEM). Los controles consistieron en DMEM + solvente, sin compuesto. La incubación con el compuesto fue de entre 24 a 72 horas, dependiendo del ensayo.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron:

HEK-293: La línea celular HEK-293 (Figura 2-V) es una línea de uso común en la investigación biológica, derivada originalmente del tejido renal de un embrión humano a principios de la década de 1970. Surgió a partir de la transformación de dichas células con adenovirus tipo 5. Presentan una morfología típica de células adenotransformadas, crecen en monocapa y son capaces de continuar creciendo luego de alcanzar la confluencia²⁹. Esta línea celular ha sido utilizada ampliamente como modelo de células humanas normales en investigación³⁰.

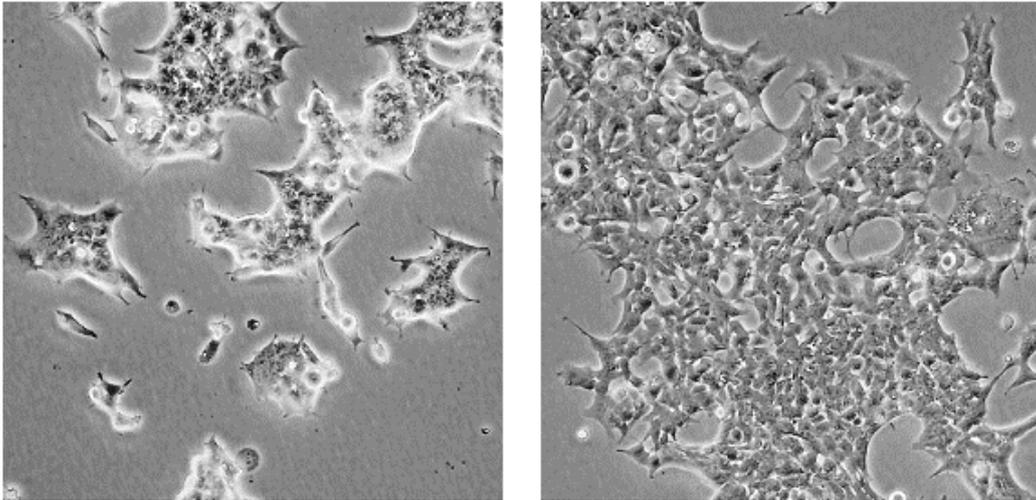


Figura 2-V. Micrografía de células HEK-293 en baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha).

A549: La línea A549 (Figura 2-VI) deriva de un tumor pulmonar de un paciente masculino caucásico de 58 años. A partir de allí se realizaron cultivos de explantes y la línea fue propagada *in vitro* por más de 1000 generaciones³¹. Las células A549 crecen en monocapa, son capaces de adherirse al soporte de cultivo y tienen un tamaño de entre 10 a 14 μm . Su morfología se caracteriza por ser fibroblastoide con forma de huso alargado, núcleo centrado y múltiples nucleolos³². Esta línea ha constituido uno de los modelos preclínicos más empleados para estudiar las bases genéticas y moleculares del cáncer de pulmón, ya que son células con alta actividad metabólica, expresan marcadores y genes tumorales y han servido como base de pruebas de fármacos antitumorales como paclitaxel, docetaxel y bevacizumab³³.

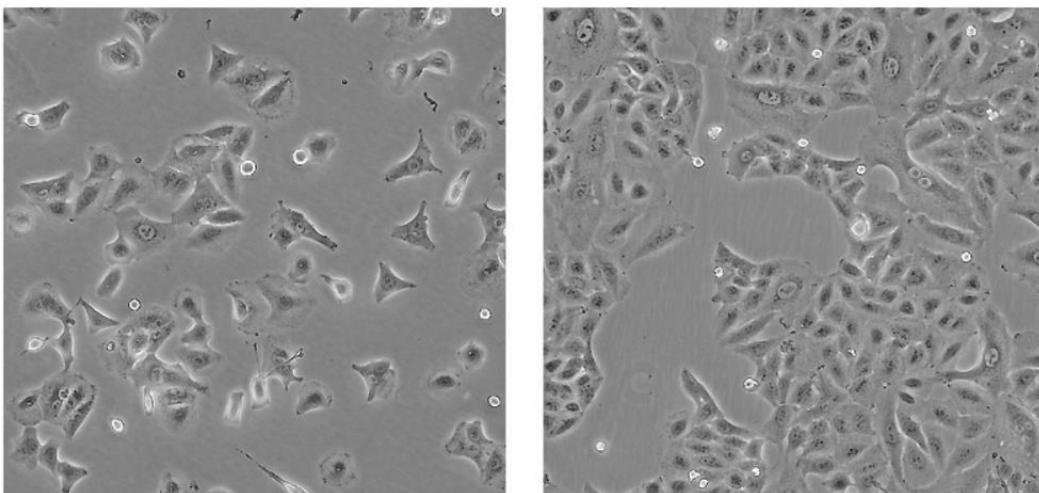


Figura 2-VI. Micrografía de células A549 en baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha).

MDA-MB-231: La línea MDA-MB-231 (Figura 2-VII) es una línea tumoral de mama triple negativo, es decir que carece de receptores para estrógeno (ER), progesterona (PR) y factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), los cuales suelen ser blancos para el tratamiento del cáncer de mama. Fue originada en 1973 a partir de una paciente de 51 años de edad. Poseen una morfología de huso, crecen en monocapa en forma azarosa y son capaces de alcanzar la confluencia³⁴.

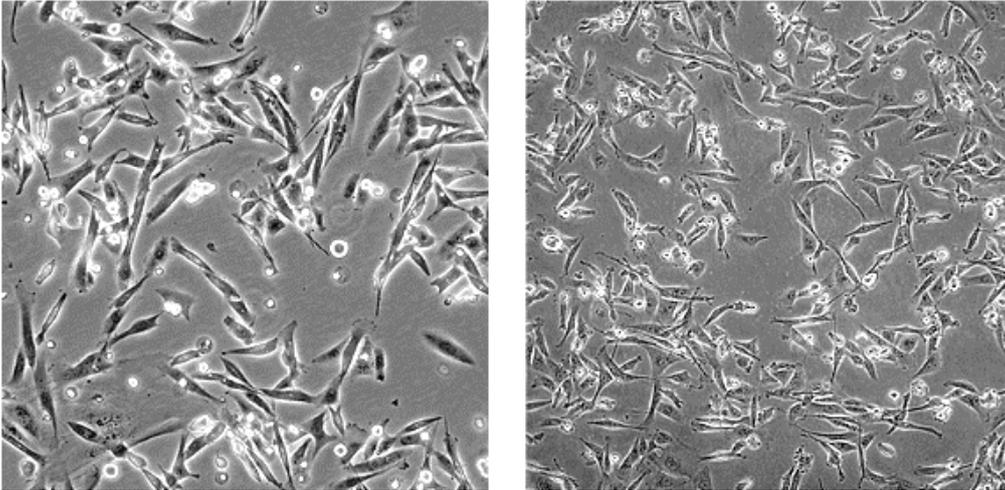


Figura 2-VII. Micrografía de células MDA-MB-231 en baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha).

LM3: La línea LM3 (Figura 2-VIII) es una línea celular tumoral mamaria murina obtenida a partir de la implantación del tumor M3 en ratones Balb/c. Posee una morfología epitelial poliédrica, se adhieren al soporte de cultivo para generar una monocapa y poseen un tiempo de duplicación de 19 horas³⁵. Al igual que MDA-MB-231, carece de receptores ER y PR; sin embargo, sí expresa receptores HER-2³⁶.

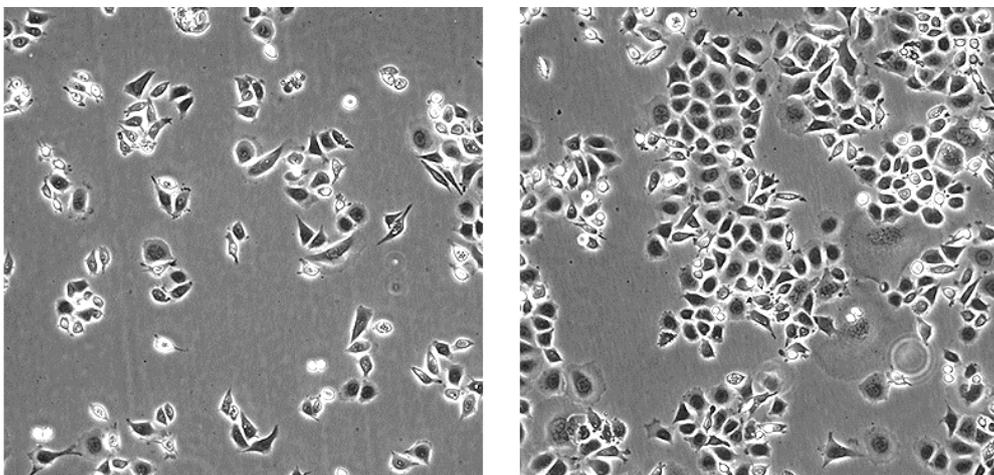


Figura 2-VIII. Micrografía de células LM3 en baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha).

HCT 116: La línea HCT 116 (Figura 2-IX) es una línea celular de carcinoma colorrectal humano generada a partir de un varón adulto. Las células son adherentes, poseen morfología epitelial y presentan una mutación característica en codón 13 del protooncogén *ras*. *In vitro*, las células HCT116 presentan un tiempo de duplicación de aproximadamente 18 horas³⁷.

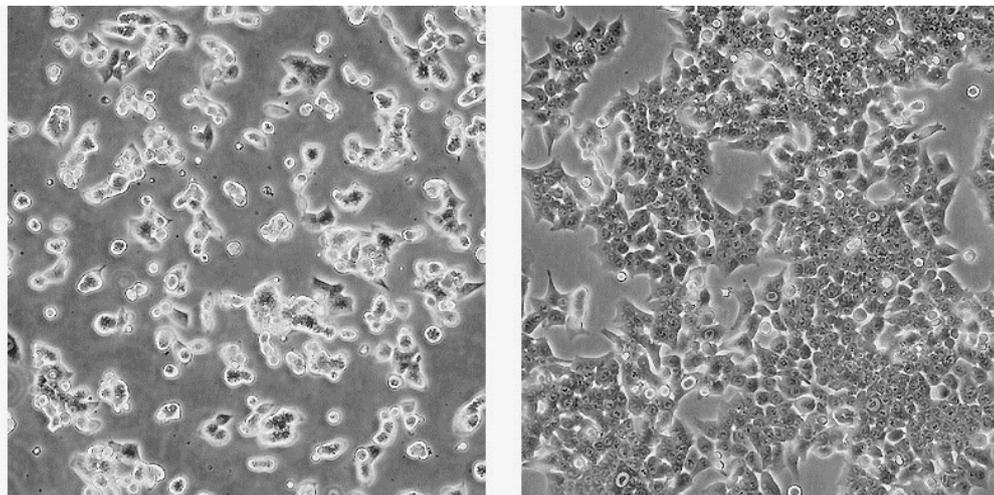


Figura 2-IX. Micrografía de células HCT 116 en baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha).

2.4.2 Análisis morfológico por tinción con cristal violeta

El cristal violeta es un colorante que tiene una estructura con carga positiva y puede penetrar la membrana celular y unirse a proteínas aniónicas y al ADN, lo que resulta en células que exhiben una coloración violeta. Esto permite evaluar la forma, el tamaño y la estructura general de las células bajo el microscopio. Además, proporciona información sobre los contenidos celulares generales, incluido el citoplasma y, en células eucariotas, el núcleo³⁸.

Procedimiento experimental: Luego de la incubación con los compuestos de interés, se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con tampón fosfato salino (PBS. Composición: NaCl 8,0 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L). Luego, se fijaron las células con metanol por 5 minutos y posteriormente se tiñeron con una solución de cristal violeta 0,5% p/v en metanol al 25% v/v. Por último, se lavaron los pocillos con agua y se observó la morfología de las células en un microscopio óptico “Semedix”. Las imágenes se registraron con una cámara fotográfica “Tucsen ISH500”.

2.4.3 Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular se realizó mediante el método de MTT, el cual se basa en la reducción, por acción de la enzima mitocondrial Succinato Deshidrogenasa, del compuesto soluble y de coloración amarilla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Cuando esto ocurre, se forma la especie reducida formazán, que es insoluble y de coloración azul - violácea (Figura 2-X). La cantidad de formazán producida se evalúa espectrofotométricamente una vez disuelto en DMSO, siendo la absorbancia obtenida proporcional a la cantidad de células vivas.

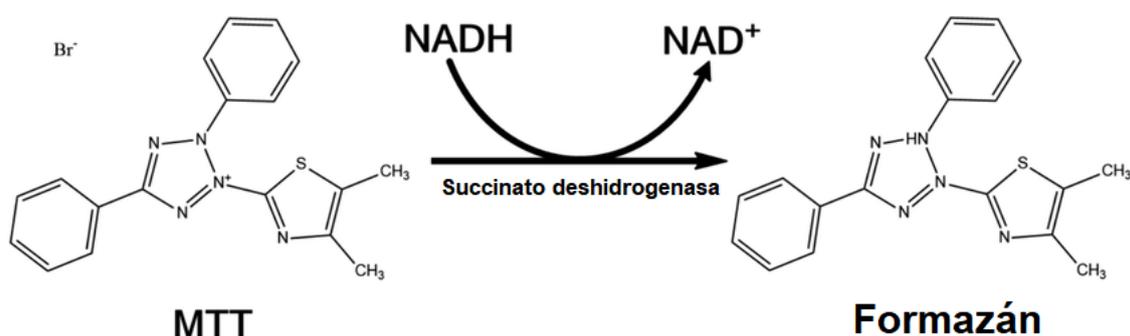


Figura 2-X. Reacción de reducción de MTT a formazán por acción de la enzima succinato deshidrogenasa.

Procedimiento experimental: Se incubaron células en placa de 96 o 48 pocillos durante 24 horas con el compuesto a estudiar. Luego, se quitó el medio y se lavó con PBS. Se agregó una solución de MTT (Sigma-Aldrich) en DMEM (0,5 mg/ml) y se incubó durante 2 - 4 horas para que ocurra la reacción de reducción. Se descartó el medio con MTT, y los cristales de formazán formados se disolvieron con 50 - 100 μ L de DMSO. La absorbancia de la solución de coloración violeta resultante se midió en un lector de placas IVDIAGNOSTIK M201 a 560 nm. Los valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) se definieron como la concentración del compuesto a la cual se obtuvo una viabilidad del 50% del control, y provinieron de una regresión logística ajustada a los puntos de viabilidad vs. concentración obtenidos en el ensayo.

2.4.4 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

El metabolismo celular involucra la oxidación de moléculas orgánicas para la obtención de energía. Los electrones liberados en el proceso son transportados a través de una serie de moléculas que se encuentran en la membrana mitocondrial interna y que reciben el nombre de “cadena transportadora de electrones”, siendo el O₂ el aceptor

final de electrones que se reducirá a H_2O . La energía liberada durante este transporte de electrones es aprovechada para bombear cationes H^+ hacia el espacio intermembrana, creando así un gradiente electroquímico que da lugar al potencial de membrana mitocondrial. Este gradiente impulsa el reingreso de H^+ al interior de la mitocondria a través del canal de la enzima ATP sintasa, que destina esta energía a la generación de ATP (adenosín trifosfato) (Figura 2-XI).

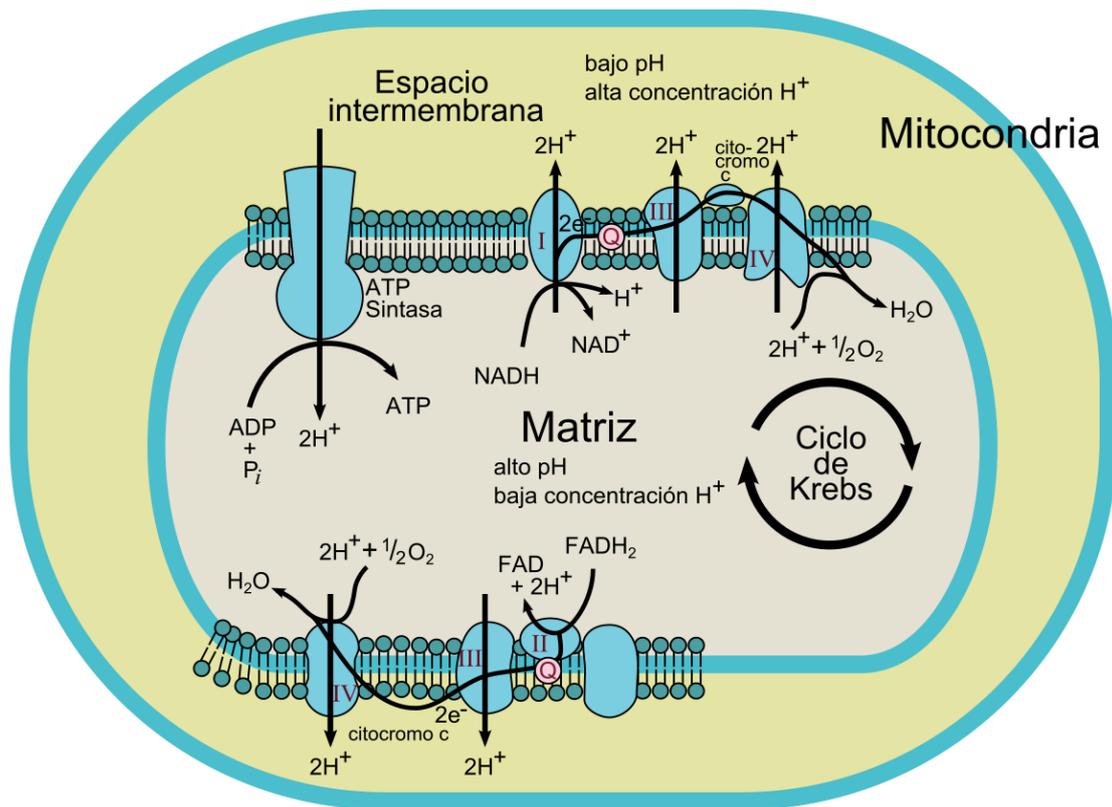


Figura 2-XI. Esquema del funcionamiento de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria.

El potencial de membrana mitocondrial puede medirse mediante fluorimetría a través de sondas fluorescentes lipofílicas y catiónicas, que tienen tendencia a ingresar al interior de la mitocondria debido a la densidad de carga negativa que se genera allí durante la creación del gradiente electroquímico. Una disminución en los niveles basales de fluorescencia indica una pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial y una subsecuente liberación de la sonda. En este trabajo se utilizó la sonda fluorescente 3,3'-dihexiloxocarbocianina yoduro (DiOC_6) (Figura 2-XII).

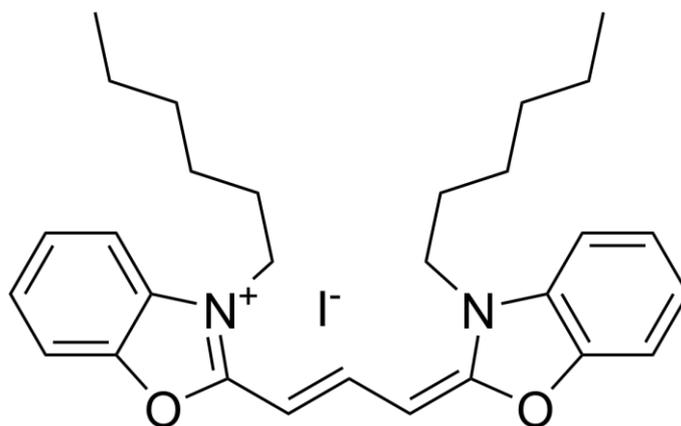


Figura 2-XII. Estructura de la sonda DiOC6.

Procedimiento experimental: Se incubaron células en placa de 48 pocillos durante 24 horas con el compuesto a estudiar. Luego se quitó el medio y se lavó con PBS. Se agregó una solución de la sonda DiOC6 (Santa Cruz Biotechnology) en PBS con concentración final de 400 nM y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se removió la sonda, se añadieron 500 μ L de PBS en cada pocillo y se raspó el fondo con una espátula de metal. La suspensión obtenida se midió en el espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 a λ_{ex} = 485 nm y λ_{em} = 535 nm.

2.4.5 Medida de especies reactivas de oxígeno

Las EROs se cuantificaron mediante el método del diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA). Este compuesto no posee fluorescencia, pero la adquiere al transformarse en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Para que este proceso ocurra, es necesario que H2DCFDA pierda sus grupos acetato (gracias a la acción de esterasas intracelulares) y se oxide. Dicha oxidación es inducida por la presencia de EROs, por lo que los niveles de fluorescencia serán directamente proporcionales a la concentración de las mismas (Figura 2-XIII).

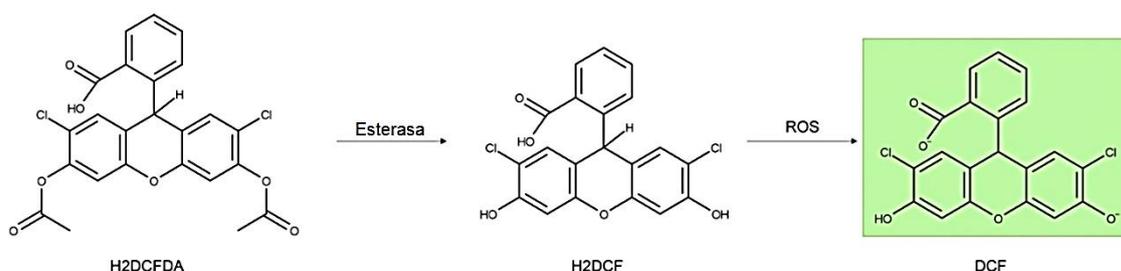


Figura 2-XIII. Reacción de conversión de H2DCFDA al compuesto fluorescente DCF.

Procedimiento experimental: Se incubaron células en placa de 48 pocillos durante 24 horas con el compuesto a estudiar. Luego se quitó el medio y se lavó con PBS. Se agregó una solución de H2DCFDA (Santa Cruz Biotechnology) en PBS ($C_{\text{final}} = 10 \mu\text{M}$) y se incubó durante 90 minutos a 37°C . Posteriormente, se removió la sonda y se añadió Tritón X-100 0,1% para conseguir la lisis de las células. El lisado obtenido se midió en el espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 a λ_{ex} : 485 nm y λ_{em} : 520 nm.

2.4.6 Determinación de la relación entre glutatión reducido y oxidado

Glutatión es un tripéptido (ácido glutámico - cisteína - glicina) que actúa como uno de los principales antioxidantes en la célula. El grupo sulfhidrilo de la cisteína, gracias a su capacidad de participar en reacciones de reducción y conjugación, es el responsable de la acción antioxidante de esta molécula³⁹. Los niveles relativos de glutatión oxidado (GSH) y glutatión reducido (GSSG) son un indicativo del estado redox de la célula, y en condiciones fisiológicas normales el balance es mantenido mediante reacciones de oxidación y reducción mediadas por las enzimas Glutatión Reductasa y Glutatión Peroxidasa (Figura 2-XIV). Un desbalance en la relación GSH/GSSG da cuenta de un estado de estrés oxidativo o reductivo⁴⁰.

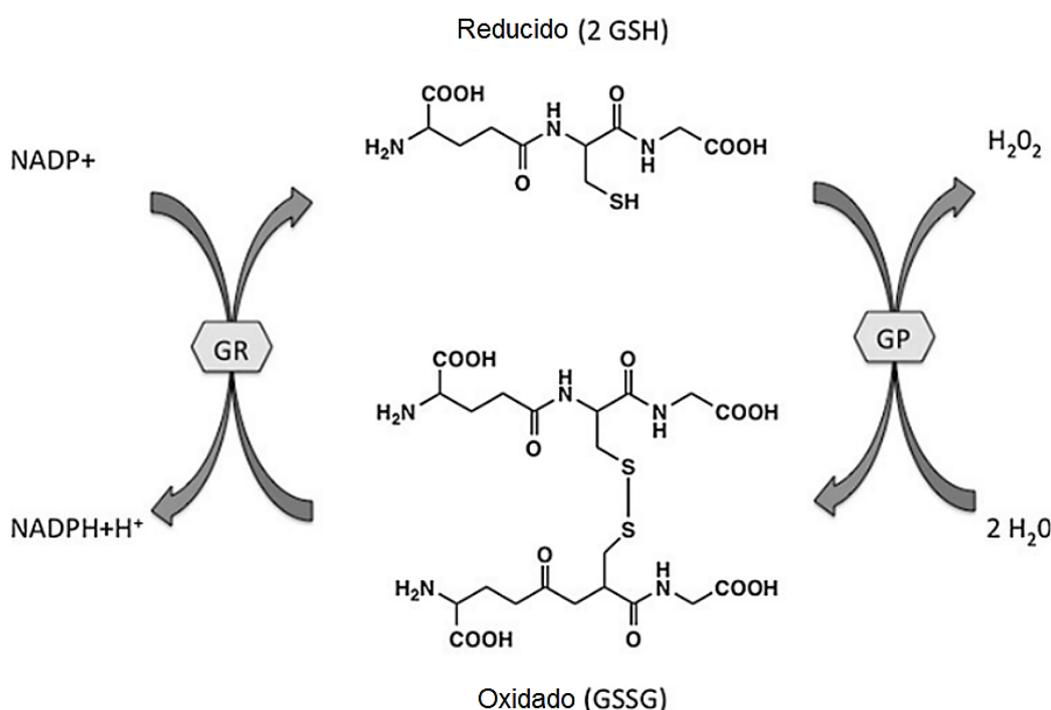


Figura 2-XIV. Interconversión entre glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) mediada por la acción de las enzimas glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GP).

En este trabajo, los niveles de GSH y GSSG intracelulares se determinaron a través del uso de la sonda fluorescente o-ftalaldehído (OPT), la cual es capaz de reaccionar de forma selectiva con dichas especies formando la especie GS-OPT, cuyos máximos de absorción y emisión son 340 nm y 420 nm, respectivamente. Para la determinación de GSH, la sonda fue añadida directamente a la suspensión celular previamente lisada con detergente Tritón X-100. Para que la especie fluorescente GS-OPT se forme es necesario que los residuos de cisteína del glutatión se encuentren libres, por lo que en estas condiciones el GSSG no es capaz de reaccionar con el OPT (Figura 2-XV).

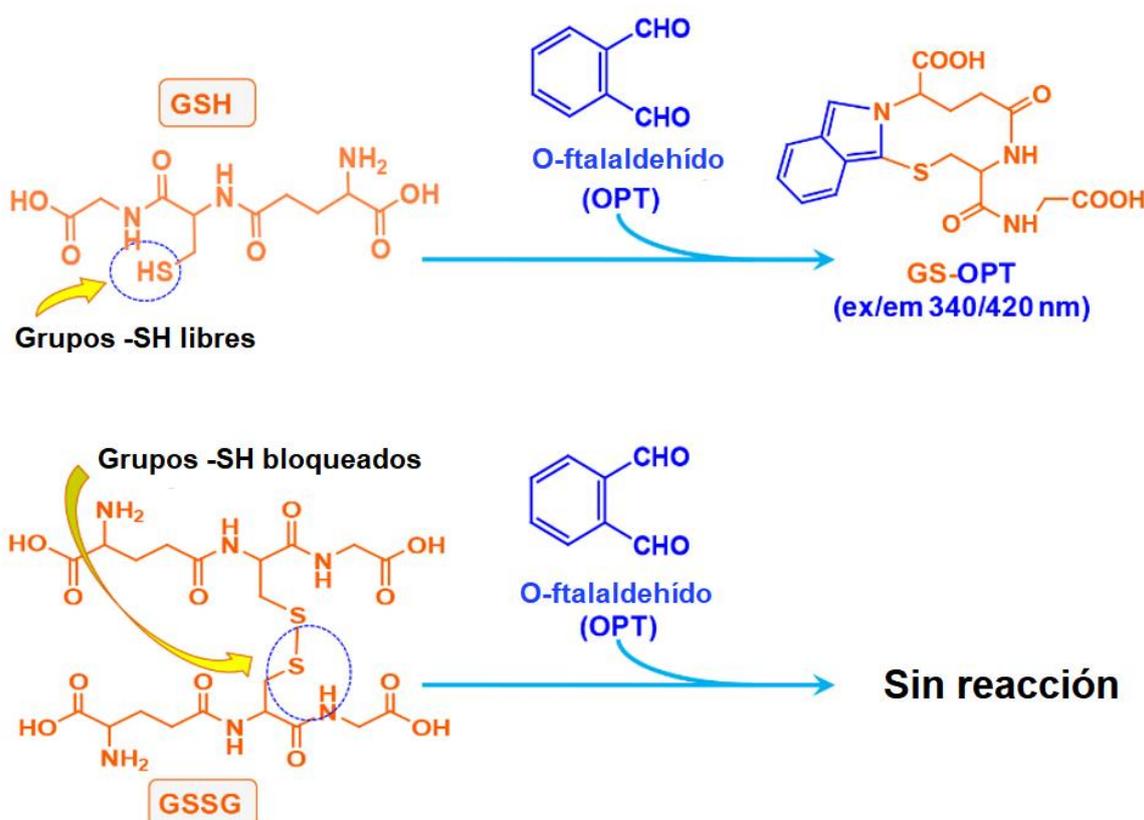
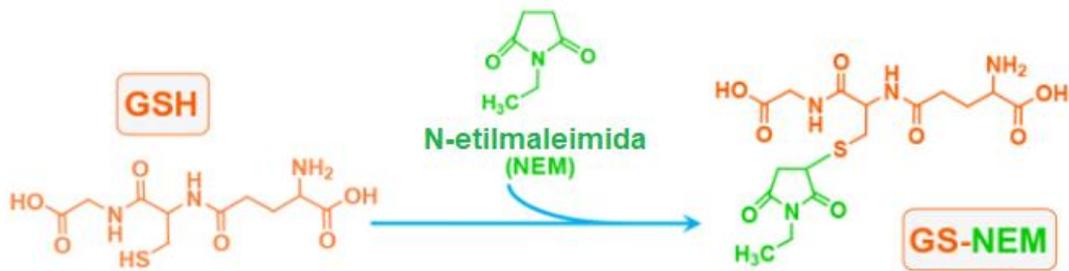


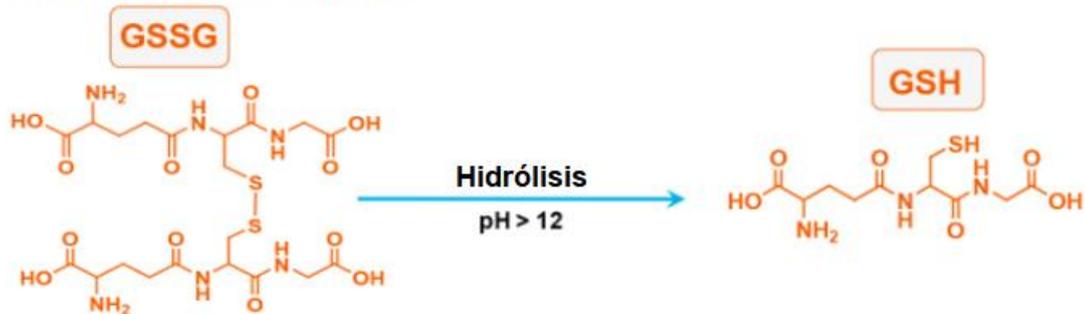
Figura 2-XV. Reacción que permite la cuantificación de GSH a través de la sonda OPT.

Para la determinación del GSSG, antes de añadir OPT es necesario agregar N-etilmaleimida (NEM), un compuesto que se encarga de bloquear los residuos de cisteína libres del GSH. Luego, se añadió NaOH para alcanzar pH 12, logrando así la hidrólisis del GSSG a GSH. Finalmente, se colocó la sonda OPT para cuantificar el GSH proveniente de dicha hidrólisis (Figura 2-XVI). Cabe recalcar que la especie GS-NEM no se ve afectada por este cambio de pH.

Paso 1: Bloqueo de GSH



Paso 2: Hidrólisis de GSSG



Paso 3: Conjugación entre GSH y OPT

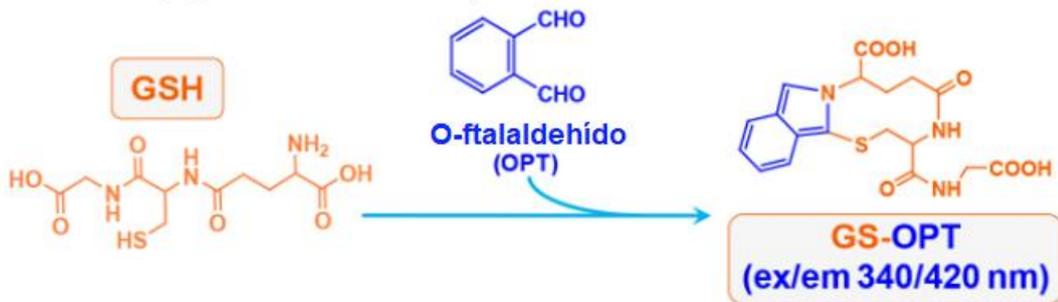


Figura 2-XVI. Reacciones que permiten la cuantificación de GSSG con la sonda OPT.

Procedimiento experimental: Se incubaron células en placa de 48 pocillos durante 24 horas con el compuesto a estudiar. Luego, se quitó el medio y se lavó con PBS. Se agregaron 300 μ L de Triton X-100 0,1% y se incubó durante 1 hora para que ocurra la lisis celular.

Para la determinación de GSH: Para cada pocillo se realizó una mezcla de reacción con 100 μ L de lisado, 100 μ L de solución metanólica de OPT (Sigma-Aldrich; 1 mg/mL) y 2800 μ L de tampón fosfato-EDTA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M; etilendiamintetraacetato de

sodio (EDTA) 5 mM; pH 8). Se incubó durante 15 minutos y se midió la absorbancia a λ_{ex} : 340 nm y λ_{em} : 420 nm.

Para la determinación de GSSG: Para cada pocillo se realizó una mezcla de 100 μL de lisado y 100 μL de NEM (Sigma-Aldrich) 0,04 M. Se incubó durante 10 minutos. Luego, se agregaron 1700 μL de NaOH 0,1 M y se incubó 30 minutos. Finalmente se añadieron 100 μL de solución metanólica de OPT (1 mg/mL), se incubó 15 minutos y se midió la absorbancia a λ_{ex} : 340 nm y λ_{em} : 420 nm.

2.4.7 Determinación de vanadio intracelular

La determinación de vanadio intracelular se realizó utilizando un plasma de acoplamiento inductivo (ICP) en conjunto con un espectrofotómetro de emisión óptica (OES). Este método ofrece bajos límites de detección, un amplio rango dinámico lineal y alta precisión. Permite la determinación simultánea de todos los elementos metálicos y presenta ventajas sobre las técnicas de absorción atómica, como la atomización completa y la ausencia prácticamente total de radiación de fondo.

Las mediciones para la cuantificación de vanadio por ICP-OES en este estudio se llevaron a cabo en el espectrofotómetro de emisión óptica "Shimadzu ICPE-9800", siguiendo la norma EPA 6010, y fueron realizadas en la Planta Piloto Multipropósito - Laboratorio de Servicios a la Industria y al Sistema Científico (PLAPIMU-LaSeISiC) de la Universidad Nacional de La Plata.

Procedimiento experimental: Se cultivaron 2×10^6 células por pocillo en 10 mL de DMEM con SFB 10% v/v en placas de 100 mm². Después de 24 horas de crecimiento, habiendo alcanzado una confluencia de 70 a 80%, se realizó un lavado de la monocapa con PBS y se incubaron las células a concentraciones correspondientes a la IC50 (determinado en el ensayo de viabilidad celular) del complejo a estudiar en DMEM durante 24 horas. Luego, se removió el medio, se lavó la monocapa con PBS y se disociaron las células de la placa utilizando TrypLE™ (Gibco). La suspensión celular obtenida fue centrifugada y el pellet resultante se lavó con PBS y se lisó durante toda la noche con 100 μL NaOH 0,1 M a 4 °C. Al día siguiente, se cuantificó el contenido de proteínas de 2 μL de los lisados celulares utilizando el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar, con el fin de normalizar las concentraciones de vanadio luego obtenidas. Los volúmenes restantes de lisado fueron aforados a 1 mL con HNO₃ 20% v/v y se trataron en un baño ultrasónico "Ney Ultrasonik 300" a 50 °C durante 1 hora. Luego, se calentaron a 80 °C durante 1 hora, se centrifugaron y se almacenaron

los sobrenadantes a 4 °C para cuantificar la concentración de vanadio mediante ICP-OES.

2.4.8 Estudios de actividad antimetastásica

2.4.8.1 Ensayo de sanación de herida

El ensayo de sanación de herida es una técnica *in vitro* ampliamente utilizada para evaluar la capacidad de migración de distintos tipos de líneas celulares, entre las cuales se hallan las líneas tumorales. Este método simula el proceso de cierre de una herida *in vivo* en condiciones controladas, permitiendo estudiar cómo las células migran para cubrir un espacio vacío creado artificialmente⁴¹.

Procedimiento experimental: Se sembraron células en placas de 12 pocillos. Al alcanzar la confluencia, se realizó un rasguño en la monocapa celular utilizando una punta de micropipeta de 200 µL para generar un espacio sin células. Luego, se añadieron los compuestos a estudiar en concentraciones no deletéreas. Una vez que el grupo control (DMSO) alcanzó el cierre completo de la herida (100% de migración), las células fueron teñidas con cristal violeta, y las heridas fueron fotografiadas y comparadas con su tamaño original antes de la migración. El porcentaje de migración (100 - % del área de la herida) se cuantificó utilizando el software "ImageJ 1.54j".

2.4.8.2 Ensayo de migración en Transwell

El ensayo de migración en Transwell (Figura 2-XVII) es otra alternativa para estudiar la capacidad de migración de una línea celular. En este caso, se utilizan cámaras de plástico huecas, selladas en un extremo con una membrana con poros a través de los cuales pueden migrar las células; estas cámaras son una versión modificada de las "cámaras de Boyden"⁴² para poder ser utilizadas en placas de cultivo. Dentro de las cámaras Transwell se depositan las células a estudiar (con o sin tratamiento con compuestos). Las cámaras se colocan dentro de placas de 24 pocillos, las cuales contienen medio de cultivo con algún compuesto que induce la migración de las células a través de los poros (quimioatrayente).

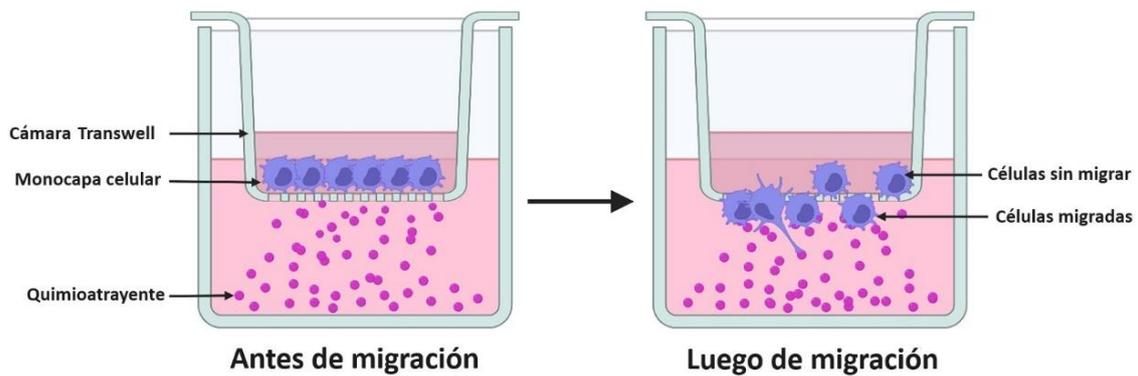


Figura 2-XVII. Esquema del sistema utilizado para el ensayo de migración en Transwell.

Procedimiento experimental: Se añadió una solución de colágeno (10 μ L en 10 mL de medio de cultivo DMEM) a las cámaras Transwell de 24 pocillos y se incubó durante toda la noche a 37 °C; el colágeno facilita la adhesión de las células a la membrana porosa. Posteriormente, se retiró la solución de colágeno y se sembraron en las cámaras 2×10^4 células suspendidas en DMEM con 10% SFB, y se agregó DMEM suplementado con 10% SFB a los pocillos situados debajo de las cámaras. Se incubó durante 4 horas a 37 °C para lograr la adhesión de las células a las membranas de las cámaras. Después de este periodo, se retiró el medio tanto del interior como del exterior de las cámaras. Se añadió DMEM (sin SFB) con concentraciones no deletéreas de los compuestos a estudiar dentro de las cámaras y DMEM con 10% de SFB (quimioatrayente) a los pocillos debajo de las cámaras. Se realizó una nueva incubación durante toda la noche para permitir la migración de las células. Se retiró el medio y las células se fijaron con metanol durante 10 minutos, para luego ser coloreadas con cristal violeta durante otros 10 minutos. Las cámaras se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante, y sus membranas se colocaron en portamuestras y se montaron con bálsamo de Canadá. Se contaron las células a partir de imágenes de microscopía, y la capacidad de migración se calculó como el porcentaje de la migración del control (DMSO).

2.4.8.3 Ensayo de invasión en Transwell

El ensayo de invasión en Transwell (Figura 2-XVIII) es similar al ensayo de migración, pero con el agregado de una capa de Matrigel (membrana basal soluble extraída del tumor Engelbreth-Holm-Swarm) que actúa como un análogo de la membrana basal de las células de mamíferos. Las células tumorales deberán degradar, a través de la secreción de enzimas digestivas, la capa de Matrigel antes de ser capaces de atravesar por la membrana porosa. Esto se asemeja al proceso que ocurre *in vivo* con la membrana basal durante la metástasis⁴³.

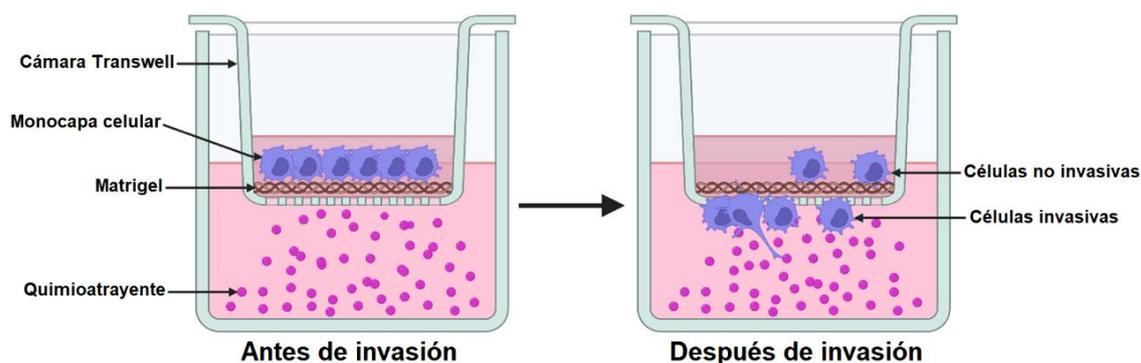


Figura 2-XVIII. Esquema del sistema utilizado para el ensayo de invasión en Transwell.

Procedimiento experimental: Se añadió una solución fría de Matrigel (25 μ L en 100 μ L finales de medio de cultivo DMEM) a las cámaras Transwell de 24 pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente para lograr la solidificación del mismo. Posteriormente, se retiró el líquido remanente y se sembraron 2×10^4 células suspendidas en DMEM con 10% SFB, y se añadió DMEM suplementado con 10% SFB a los pocillos situados debajo de las cámaras. Se incubó durante 4 horas a 37 °C para lograr la adhesión de las células a las membranas de las cámaras. Después de este periodo, se retiró el medio tanto del interior como del exterior de las cámaras. Se añadió DMEM (sin SFB) con concentraciones no deletéreas de los compuestos a estudiar dentro de las cámaras y DMEM con 10% de SFB (quimioatrayente) a los pocillos debajo de las cámaras. Se realizó una nueva incubación durante toda la noche para permitir el proceso de invasión de las células. Se retiró el medio y las células se fijaron con metanol durante 10 minutos, para luego ser coloreadas con cristal violeta durante otros 10 minutos. Las cámaras se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante, y sus membranas se colocaron en portamuestras y se montaron con bálsamo de Canadá. Se contaron las células a partir de imágenes de microscopía, y la capacidad de invasión se calculó como el porcentaje de la invasión del control (DMSO).

2.5 Estudios de actividad biológica *in vivo* para compuestos antihipertensivos

Estos experimentos se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CONICET - UNLP), con la colaboración de la Dra. Valeria Martínez.

2.5.1 Animales

Los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas establecidas en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud. Además, fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo el número de protocolo T02-02-2023. Las ratas SHR (derivadas de la cepa Wistar Kyoto), machos, de 12 semanas de edad y con un peso corporal de 200-300 g fueron obtenidas del Instituto de Investigaciones Médicas "Dr. Alfredo Lanari" de la Universidad de Buenos Aires. La edad de 12 semanas fue seleccionada basada en evidencia previa de hipertrofia cardíaca y desarrollo de hipertensión en esta etapa⁴⁴. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos (n = 4-5 por grupo) utilizando el método de la ecuación de recursos⁴⁵. Los animales fueron alojados en condiciones estandarizadas de laboratorio con una temperatura de 23 ± 1 °C, un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, y un rango de humedad del 60 al 70%. Se les proporcionó acceso *ad libitum* a alimento comercial estándar para ratas y ratones (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua.

α -metildopa (MD), su complejo con Zn(II) (ZnMD) y ZnCl₂ fueron administrados a las ratas SHR a través de la dieta utilizando bolas de mantequilla de maní como transporte, siendo una alternativa más rentable e induciendo un menor estrés que los métodos de administración tradicionales⁴⁶. Las ratas consumieron 200 mg/día de mantequilla de maní comercial (Maní King, Buenos Aires, Argentina) conteniendo 100 mg/kg/día de MD o el equivalente molar para ZnMD (164,12 mg/kg/día) o ZnCl₂ (64,52 mg/kg/día). Las dosis fueron seleccionadas en base a informes previos del efecto antihipertensivo de MD en ratas SHR⁴⁷. El grupo de control recibió la mantequilla de maní sin el agregado de compuestos.

Cada semana los animales experimentales fueron pesados y su presión arterial sistólica fue evaluada mediante pletismografía de cola no invasiva, como se describirá luego. Para examinar la hipertrofia cardíaca, se realizó ecocardiografía transtorácica bidimensional utilizando un transductor de 7 MHz en las ratas, al principio y al final del protocolo experimental, bajo anestesia con aproximadamente 2-3% de isoflurano en un flujo de oxígeno. Las mediciones se realizaron siguiendo las directrices proporcionadas por la Sociedad Americana de Ecocardiografía⁴⁸. La masa del ventrículo izquierdo (MVI) se calculó utilizando el método delineado por Devereux y Reichek⁴⁹. Además, el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) se determinó como la relación entre la MVI y la

longitud tibial. Por último, se calculó la fracción de acortamiento (FA) utilizando la siguiente ecuación:

$$FA = \frac{(DVI_d - DVI_s) * 100}{DVI_d}$$

Donde DVI_d es el diámetro del ventrículo izquierdo en diástole y DVI_s es el diámetro del ventrículo izquierdo en sístole.

Al finalizar el protocolo de 8 semanas los animales fueron sacrificados administrando una única dosis de uretano (1 g/kg de peso corporal). Después de confirmar la ausencia de reflejos, se extrajo el corazón y se separó el ventrículo izquierdo. La tibia fue removida para calcular la relación entre la masa del ventrículo izquierdo y la longitud de la tibia. Posteriormente, los ventrículos izquierdos fueron divididos y congelados rápidamente en nitrógeno líquido, preservándolos a una temperatura de -80 °C. Las fracciones congeladas fueron luego utilizadas para medir niveles de EROs, peroxidación lipídica y óxido nítrico, y llevar a cabo determinaciones de inmunoblot.

Se fijaron secciones coronales (5 μ m) derivadas del ecuador del ventrículo izquierdo en formaldehído al 10% durante 24 horas. Después de la fijación, las secciones se embebieron en parafina y se tiñeron para realizar el análisis histológico.

2.5.2 Determinación de presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas

La presión arterial sistólica (PAS) de las ratas SHR fue determinada mediante el uso de un pletismógrafo de cola. Este método es no invasivo y barato, por lo cual resulta muy útil en experimentos donde es necesario realizar mediciones de un gran grupo de animales y/o durante un período prolongado de tiempo. Se requiere una exposición a altas temperaturas para dilatar las arterias de la cola, seguida de la inmovilización del animal en un cepo, lo cual supone un estrés que puede influir en los valores de PAS, siendo esta la principal desventaja del método⁵⁰.

Procedimiento experimental: La PAS fue medida semanalmente utilizando un pletismógrafo en la cola de las ratas. Para esto, cada rata fue colocada en un recipiente cerrado con un flujo de aire a 37 °C durante 5 minutos. Luego, el animal fue colocado en un cepo inmovilizador, y se insertó en su cola un manguito de oclusión, un sensor de presión y un sensor de pulso (Figura 2-XIX). Tanto la presión como el pulso fueron

representados simultáneamente mediante un software, pudiendo así determinar la PAS (presión mínima a la cual el pulso desaparece en el gráfico) y la presión arterial diastólica (presión a la cual el pulso es recuperado) (Figura 2-XX).

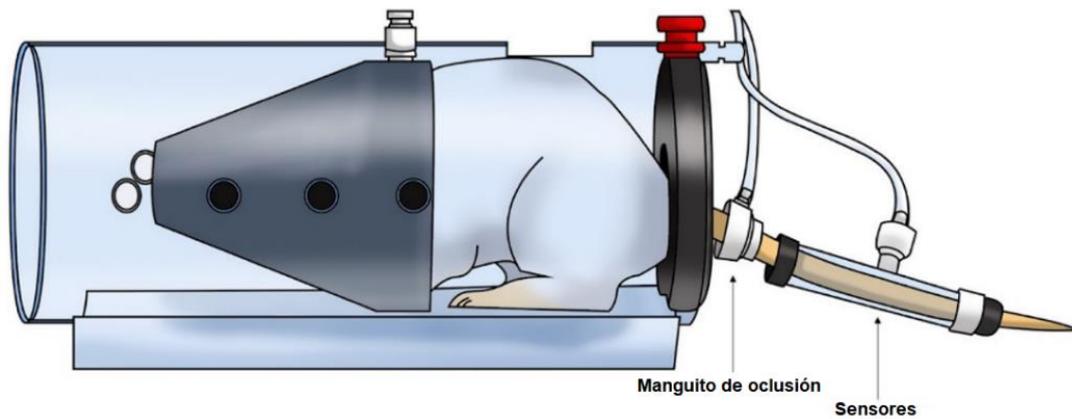


Figura 2-XIX. Esquema del sistema utilizado para medir la presión arterial sistólica de ratas SHR.

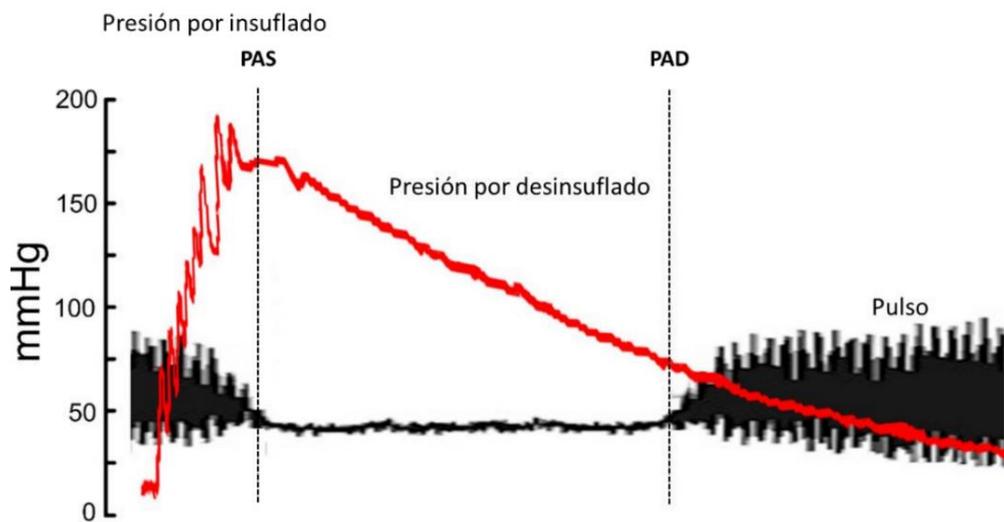


Figura 2-XX. Medida representativa de la presión y señales de pulso utilizando un esfigmomanómetro de cola. PAS: Presión arterial sistólica. PAD: Presión arterial diastólica.

2.6 Estudios de actividad biológica *ex vivo* para compuestos antihipertensivos

2.6.1 Preparación de homogenato de tejido cardíaco

Se homogeneizó una fracción de tejido proveniente de la aurícula izquierda del corazón de ratas SHR sobre hielo con 1 mL de tampón Tris (Tris 40 mM; pH ajustado a 7,4 con HCl 1M) por cada 100 mg de tejido utilizando un homogeneizador Pro-Scientific Bio-gen Series Pro 2000. El homogenato obtenido se utilizó para las determinaciones de EROs, óxido nítrico y peroxidación lipídica.

2.6.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido cardíaco

La determinación de EROs se llevó a cabo utilizando la misma técnica descrita anteriormente para los cultivos celulares.

Procedimiento experimental: Se tomaron 50 μ L de homogenato de tejido cardíaco y se mezclaron con 2 mL de buffer Tris 40 mM y la sonda H₂DCFDA a una concentración final de 2,7 μ M. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se detectaron las EROs por fluorimetría con un lector de placas “Varioskan LUX Multimode Microplate Reader” (Thermofisher) a λ_{ex} : 485 nm y λ_{em} : 535 nm. Los datos se normalizaron asignando un valor arbitrario de 100% al grupo control sin tratamiento.

2.6.3 Medida de peroxidación lipídica en tejido cardíaco

La peroxidación lipídica es un proceso necesario para generar moléculas de señalización, y normalmente ocurre gracias a la acción de radicales libres generados en reacciones del tipo Fenton (Figura 2-XXI) o mediado por enzimas tales como la lipoxigenasa. Los niveles altos de radicales libres asociados al estrés oxidativo provocan un aumento desmedido en la peroxidación lipídica, causando cambios en los fosfolípidos de las membranas celulares y resultando en alteraciones en la fluidez, permeabilidad y de gradientes iónicos de la misma, lo cual puede llevar a la muerte celular⁵¹.

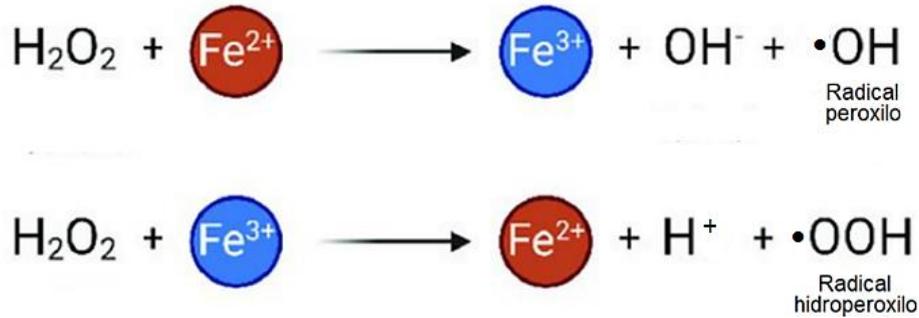


Figura 2-XXI. Reacciones de Fenton, donde la dupla $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ está involucrada en un ciclo que genera radicales hidroxilo e hidroperoxilo a partir de peróxido de hidrógeno.

El proceso de peroxidación lipídica (Figura 2-XXII) genera un subproducto denominado malondialdehído (MDA), que puede ser cuantificado a través del aducto que se forma en su reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) mediante espectrofotometría (máximo de absorbanza a 532 nm a pH 3,5)⁵².

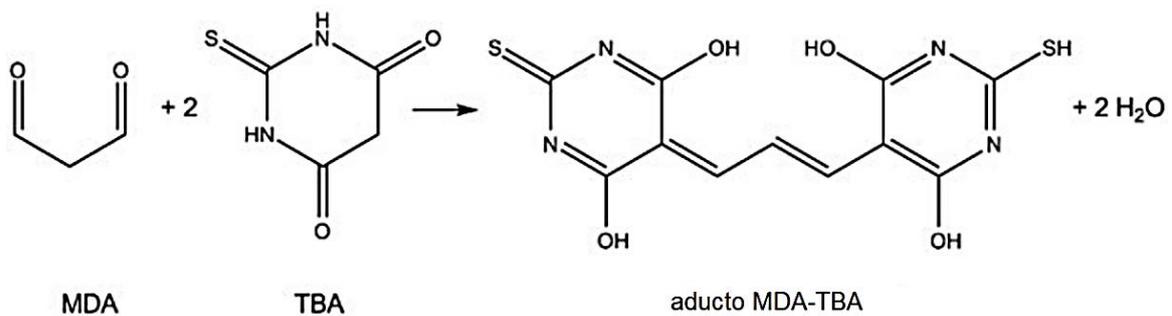


Figura 2-XXII. Reacción entre ácido tiobarbitúrico y malondialdehído.

Procedimiento experimental: Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 200 μL de homogenato de tejido cardíaco, 50 μL de solución acuosa de dodecilsulfato de sodio (SDS) 8,1%, 375 μL de solución acuosa de ácido acético 10% ajustada a pH 3,5 con NaOH y 375 μL de solución acuosa de TBA 0,8%. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a 95 °C. Luego se realizó una centrifugación para eliminar los remanentes de tejido, y se midió en un lector de placas “Thermofisher Varioskan LUX” la absorbancia a 532 nm del sobrenadante para determinar la concentración del aducto MDA-TBA₂.

2.6.4 Determinación de niveles de óxido nítrico en tejido cardíaco

El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización que está involucrada en el descenso de la hipertensión arterial, mediante la inducción de la relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos⁵³. Además, el NO actúa como un regulador del remodelado cardíaco, específicamente como un mediador que inhibe la cascada de señalización que conduce a la hipertrofia cardíaca⁵⁴.

Se determinaron los niveles de NO fluorométricamente a través del seguimiento del producto de la reacción de 2,3-diaminonaftaleno con iones nitrito (Figura 2-XXIII), los cuales provienen de la rápida oxidación de NO en las células⁵⁵.

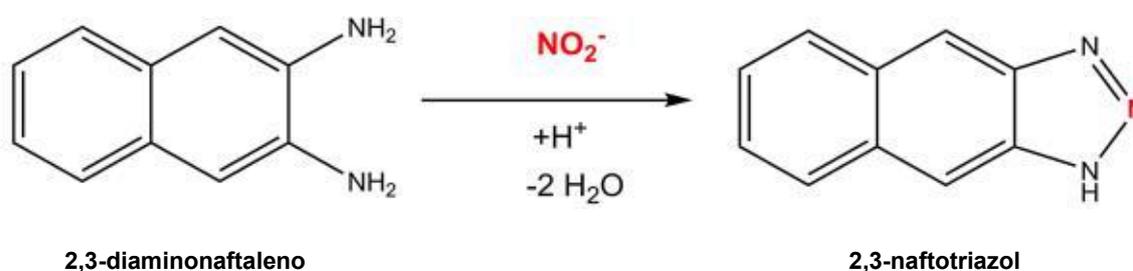


Figura 2-XXIII. Reacción entre 2,3-diaminonaftaleno y aniones nitrito.

Procedimiento experimental: 20 μL de una solución de 2,3-diaminonaftaleno (0,05 mg/mL en HCl 0,62 N) se combinaron con 200 μL de lisado. La mezcla fue incubada durante 15 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$. La reacción fue detenida mediante la adición de 10 μL de NaOH 2,8 N. La intensidad de fluorescencia del producto de reacción, 2,3-naftotriazol, fue medida a $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ en un lector de placas “Thermofisher Varioskan LUX”. Se realizó una curva de calibración con soluciones de nitrito de sodio de concentración conocida para correlacionar la fluorescencia medida con valores de concentración.

2.6.5 Determinación del área de sección transversal de cardiomiocitos de ratas SHR

Un indicador de hipertrofia cardíaca asociada a hipertensión es el aumento del área transversal de los cardiomiocitos⁵⁶, por lo que fue evaluado para estudiar el grado de

hipertrofia cardíaca en las ratas SHR luego del tratamiento de 8 semanas con MD, ZnMD y ZnCl₂.

Procedimiento experimental: Las secciones coronales embebidas en parafina fueron teñidas con hematoxilina eosina para determinar el área transversal (AT) de los miocitos cardíacos. Las imágenes histológicas se digitalizaron a 40x de magnificación utilizando una cámara de video digital “Olympus DP71” montada en un microscopio de campo amplio “Olympus BX53”. Las mediciones se limitaron a células que eran redondeadas a ovoides con núcleos redondos visibles, y se contaron 50 células en al menos 10 imágenes obtenidas de cada ventrículo izquierdo. Las determinaciones de AT se realizaron utilizando software de análisis de imágenes “Image-Pro Plus v6.3”.

2.6.6 Determinación de colágeno tipo I y tipo III en tejido cardíaco de ratas SHR

Se ha observado que la hipertrofia cardíaca provoca un aumento de tejido conectivo (fibrosis) donde se presenta una sobreproducción de colágeno tipo I y una disminución en la proporción de colágeno tipo III, lo cual provoca un aumento en la rigidez de la matriz extracelular y dificulta la contracción de los cardiomiocitos⁵⁷. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el contenido de colágeno tipo I y III para estimar el impacto negativo de la fibrosis sobre el funcionamiento de dichas células.

Procedimiento experimental: Para evaluar los niveles de colágeno, las secciones del ventrículo izquierdo fueron teñidas con la técnica de Picrosirius rojo (Direct Red 80, Aldrich, Milwaukee, WI 53233, EE. UU.). Las muestras fueron observadas bajo luz polarizada utilizando un analizador “U-ANT” (Olympus) y un polarizador “U-POT” (Olympus) para analizar la birrefringencia del colágeno teñido. Las imágenes histológicas se digitalizaron a 20x de magnificación utilizando una cámara de video digital “Olympus DP71” montada en un microscopio de campo amplio “Olympus BX53”. El contenido de colágeno total se calculó sumando los contenidos de colágeno tipo I y III en cada sección.

2.6.7 Análisis de expresión proteica por Western Blot

La técnica de Western Blot (Figura 2-XXIV) es utilizada para detectar y cuantificar proteínas utilizando anticuerpos específicos. En primer lugar, la muestra a evaluar es lisada en presencia de inhibidores de proteasas, inhibidores de fosfatasa y detergentes,

a fin de solubilizar y mantener la integridad de las proteínas presentes. Luego, la muestra se centrifuga para recuperar el sobrenadante y descartar la fracción sólida que no es de interés. El contenido de proteínas es cuantificado para asegurar que se parte de la misma masa total en todos los casos y que las diferencias detectadas posteriormente se deban sólo a cambios en la expresión proteica. Las muestras se siembran en geles de poliacrilamida-SDS donde las proteínas son desnaturalizadas y pierden la estructura secundaria y terciaria, pudiendo ser así separadas en base a su relación carga/masa mediante una electroforesis. Luego de la separación, las moléculas alojadas en el gel se transfieren (utilizando un campo eléctrico) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), que posteriormente se bloquea con proteínas de leche para evitar que los anticuerpos se unan de forma inespecífica a sus sitios vacantes. Finalmente, el revelado se lleva a cabo con anticuerpos primarios (que reconocen a las proteínas de manera específica) y secundarios (que se unen a los anticuerpos primarios y están acoplados a algún marcador medible, como un fluoróforo o una enzima). La intensidad de las bandas obtenidas es proporcional a la cantidad de proteínas detectadas y por ende a los niveles de expresión de estas.

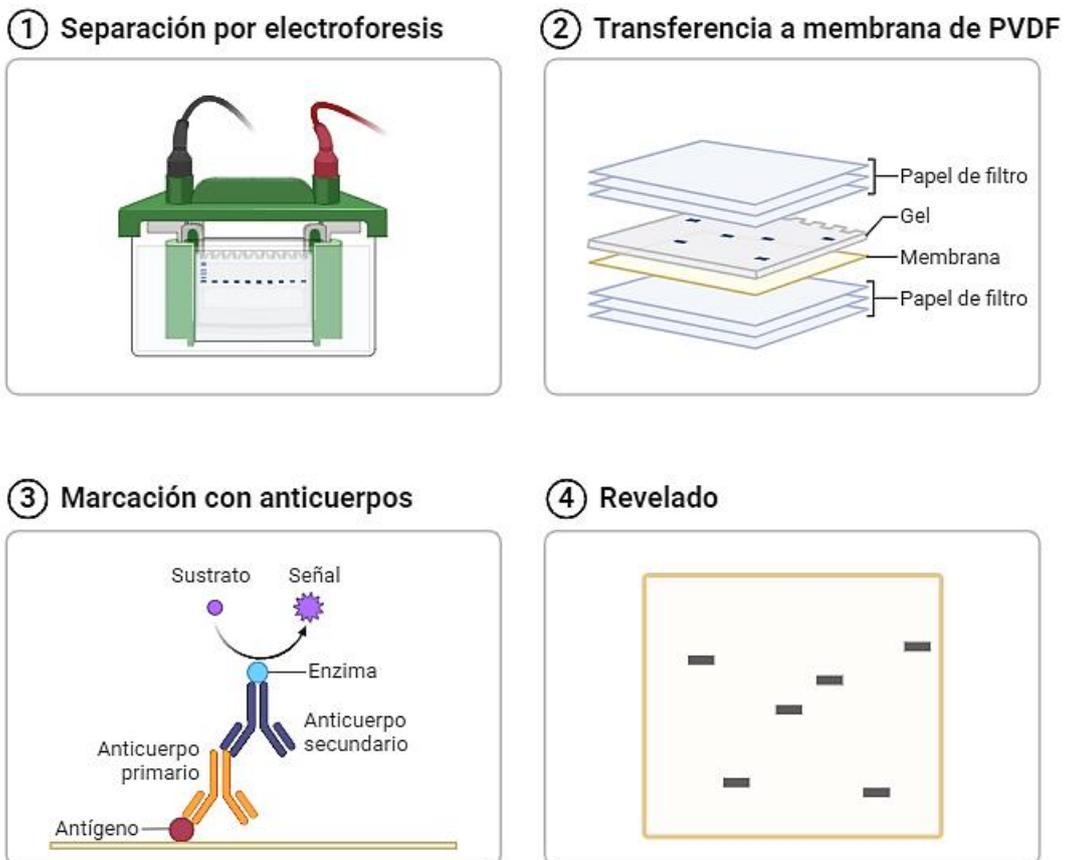


Figura 2-XXIV. Esquema de un protocolo de Western Blot.

Procedimiento experimental: Se prepararon homogenatos a partir de tejido ventricular tratado con inhibidores de proteasas y fosfatasas provenientes del tampón RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8,0; EDTA 1 mM; 0,5 mM ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético; 1% Triton X-100; 0,1% desoxicolato de sodio; 0,1% SDS; 140 mM NaCl; 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo; diluido con agua bidestilada). Después de una centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el contenido de proteínas utilizando el método de Bradford con albúmina sérica bovina como estándar. Las proteínas de los homogenatos cardíacos (60 µg) se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Luego, las membranas se sondaron con anticuerpos desarrollados contra p47^{phox} (sc-17845; Santa Cruz Biotechnology, 1:1.000), gp91^{phox} (sc-130548; Santa Cruz Biotechnology, 1:1.000), SOD1 (sc-17767; Santa Cruz Biotechnology, 1:1.000), Na⁺/K⁺ ATPasa (ST0533, Thermofisher, 1:1.000) y GAPDH (sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, 1:1.000). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa anti-conejo (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, 1:10.000) o anti-ratón Ig-G H&L (ab 205719; Abcam, 1:10.000). La inmunoreactividad se visualizó mediante un kit de detección de quimioluminiscencia basado en peroxidasa (Merck Millipore). La intensidad de la señal de las bandas en las inmunoblots fue cuantificada por densitometría utilizando el software "ImageJ 1.54j".

2.7 Estudios de neuroprotección *in vitro*

2.7.1 Cultivo primario de neuronas corticales de embriones de rata y pretratamiento con compuestos de interés

Las neuronas corticales de embriones de ratas Sprague-Dawley de 18 días de edad se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de poli-L-lisina a razón de 30.000 células por pocillo. Las células se mantuvieron en medio neuronal completo (medio neuronal BrainPhys™ suplementado con suplemento neuronal SM1 (Neurocult™) durante 8 días a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron pretratadas con diferentes concentraciones de los compuestos a estudiar (ZnCl₂, L-Dopa y Zn-L-Dopa, a concentraciones de 1 y 10 µM) durante 1 h en medio neuronal completo. Luego, se removieron los compuestos y se realizó una incubación de 18 horas con medio neuronal completo. Al finalizar este periodo de

incubación, las neuronas se encontraron listas para realizar los ensayos *in vitro* pertinentes.

Todos los procedimientos en neuronas se realizaron en la empresa Innoprot (Bizkaia, España) en colaboración con la Dr. Clarisa Salado.

2.7.2 Tratamiento con el agente excitotóxico glutamato

Para evaluar los efectos neuroprotectores de los compuestos a estudiar, se realizó una incubación en presencia del agente excitotóxico glutamato (Figura 2-XXV) luego del pretratamiento con dichos compuestos. El glutamato, en condiciones fisiológicas, es uno de los principales neurotransmisores, pero resulta tóxico en concentraciones elevadas⁵⁸. La neuroprotección de los compuestos se asoció con la capacidad de evitar el efecto negativo del glutamato sobre distintos parámetros, tales como la viabilidad, el crecimiento de neuritas, la integridad de la membrana plasmática y la activación de las caspasas 3/7.

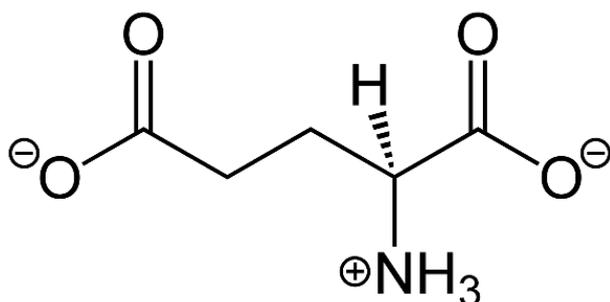


Figura 2-XXV. Estructura de glutamato.

Procedimiento experimental: Para este ensayo, las células se incubaron con 100 μM de glutamato durante 15 min en medio sin suplemento neuronal SM1. Después de la exposición al glutamato, el medio se reemplazó por un medio completo y las células se incubaron durante 24 horas adicionales. Como control de neuroprotección se realizó, de la misma manera que con los compuestos a estudiar, un pretratamiento con MK801 10 μM (dibenzocicloheptenimina; un antagonista no competitivo del receptor de N-metil-D-aspartato, un receptor de glutamato).

2.7.3 Determinación de viabilidad de neuronas

Para la determinación de la viabilidad celular, se utilizó la tinción con bisbenzimidida (Hoechst 33342; Figura 2-XXVI), un compuesto fluorescente capaz de unirse a las regiones del ADN ricas en adenina-timina.

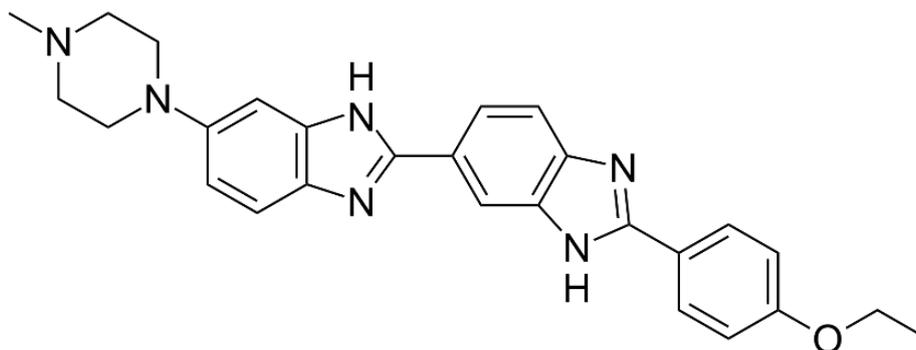


Figura 2-XXVI. Estructura de bisbenzimidida (Hoechst 33342).

Procedimiento experimental: La solución madre de Hoechst 33342 se preparó en PBS (1 mg/mL). Se realizó una dilución de trabajo en PBS de concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$. Las células se tiñeron durante 5 minutos con la solución de trabajo y luego se lavaron 3 veces para eliminar el exceso de colorante. Los núcleos se contaron con un microscopio de fluorescencia “Cell Insight CX7”, utilizando valores de λ_{ex} y λ_{em} de 380 y 460 nm, respectivamente.

2.7.4 Activación de caspasas 3/7

La activación de las caspasas 3/7 se determinó utilizando el reactivo de detección CellEvent™ (Invitrogen), el cual consta de un colorante fluorescente conjugado con un tetrapéptido (Asp-Glu-Val-Asp) que impide la unión de dicho colorante al ADN. Cuando las caspasas 3/7 (relacionadas con el proceso de apoptosis⁵⁹) se encuentran activadas, el tetrapéptido se escinde y el colorante se une al ADN, pudiendo así ser detectado mediante microscopía de fluorescencia.

Procedimiento experimental: Las neuronas corticales se tiñeron con 5 μM de CellEvent™ durante 1 h, se lavaron 3 veces y se observaron mediante un microscopio de fluorescencia “Cell Insight CX7” a λ_{ex} :488 nm y λ_{em} :530 nm. Se calculó la proporción de células apoptóticas respecto al número de células totales.

2.7.5 Crecimiento de neuritas

Para estudiar el crecimiento de las neuritas se las visualizó mediante inmunocitoquímica usando anticuerpos anti β III-tubulina⁶⁰, una proteína constituyente de los microtúbulos que se encuentra casi exclusivamente en neuronas (Figura 2-XXVII).

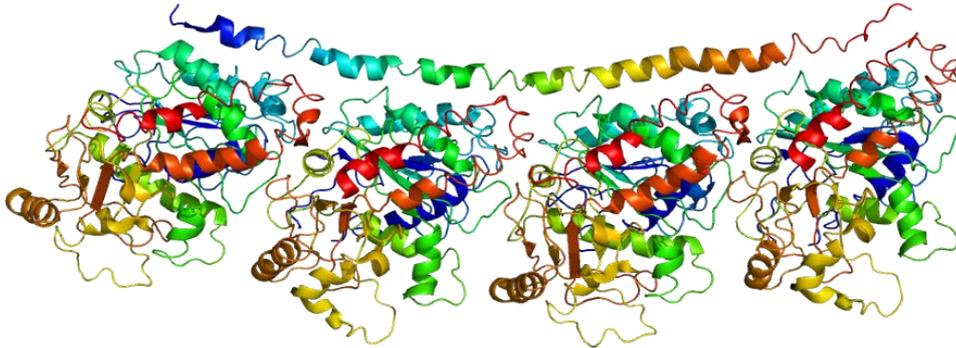


Figura 2-XXVII. Estructura terciaria de la proteína β III-tubulina.

Procedimiento experimental: Las células se fijaron con metanol durante 10 min. Después de la fijación, se realizaron tres lavados con PBS y se bloqueó con solución de 3% ASB en PBS durante 30 min. El anticuerpo TUJ-1 (específico de β III-tubulina) se añadió, en relación 1/1000, a una solución 0,5% ASB en PBS y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo Alexa 488 (1/400) y se incubaron durante 30 minutos. Por último, las células se observaron en un microscopio de fluorescencia “Cell Insight CX7” a λ_{ex} :488 nm y λ_{em} :515 nm. Se adquirieron cuatro imágenes por pocillo y se analizaron con el software “Cellomics” (Thermofisher) para determinar la longitud total de las neuritas.

2.7.6 Ensayo de lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que es liberada al espacio extracelular cuando la membrana plasmática pierde su integridad. Por lo tanto, puede estimarse el daño a la membrana cuantificando la actividad de dicha enzima en el medio de cultivo⁶¹. LDH cataliza la reducción reversible de piruvato a ácido láctico en presencia de nicotina adenina dinucleótido (NADH), el cual es simultáneamente oxidado a NAD^+ (Figura 2-XXVIII).

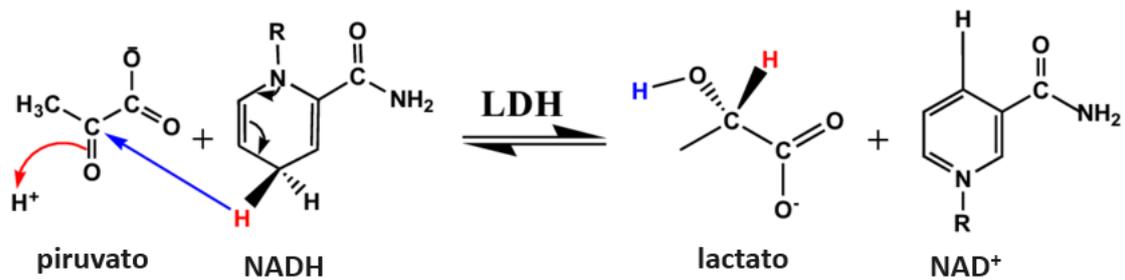


Figura 2-XXVIII. Reacción de reducción de piruvato catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Procedimiento experimental: Se recolectó el medio de cultivo 24 horas después de la inducción de la toxicidad por glutamato y se realizó un ensayo de LDH utilizando un "kit de detección de citotoxicidad (LDH)" (Roche, Mannheim, FR, Alemania) para medir la liberación de LDH. El funcionamiento de este kit se basa en la incubación del medio de cultivo con lactato, NAD^+ , yodinitrotetrazolio (INT) y la enzima diaforasa. La presencia de LDH convierte NAD^+ en NADH , el cual es utilizado por la enzima diaforasa para convertir el compuesto amarillo INT en una sal roja de formazán (Figura 2-XXIX). Dicha sal fue cuantificada a 490 nm utilizando el lector "Microplater Multi Mode Synergy 2" (Biotek).

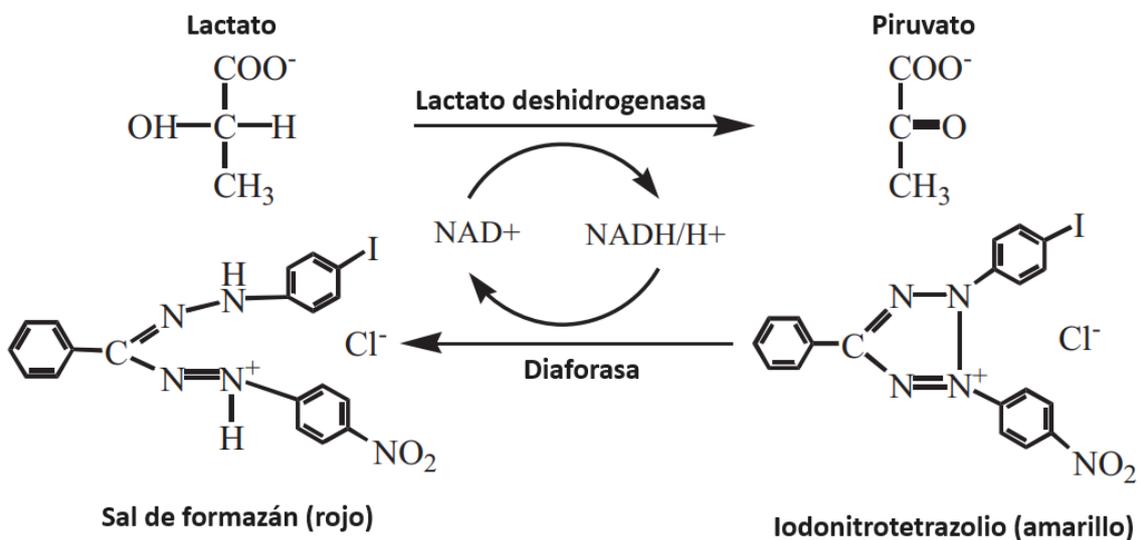


Figura 2-XXIX. Reacción utilizada por el "kit de detección de citotoxicidad (LDH)" de Roche para cuantificar niveles de enzima lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo.

2.8 Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD) y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. La evaluación de las diferencias entre grupos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), usando para el análisis *post-hoc* la prueba de Tukey. Para comparar los valores de la presión arterial sistólica se utilizó un ANOVA bifactorial usando la prueba *post-hoc* de Bonferroni. Los resultados se presentaron en gráficos generados con el programa SigmaPlot 12.0 o GraphPad Prism 9.3.0, y este último se utilizó para realizar los test estadísticos.

2.9 Bibliografía

- (1) Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2–3), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>.
- (2) Rabiei, K.; Mohammadkhani, Z.; Keypour, H.; Kouhdareh, J. Palladium Schiff Base Complex-Modified Cu(BDC-NH₂) Metal–Organic Frameworks for C–N Coupling. *RSC Adv.* **2023**, *13* (12), 8114–8129. <https://doi.org/10.1039/D3RA01020A>.
- (3) Palermo, P. J. Solid Dosage-Form Analysis. In *Separation Science and Technology*; Elsevier, 2001; Vol. 3, pp 235–267. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(01\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(01)80008-8).
- (4) Rezl, V.; Janák, J. Elemental Analysis by Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1973**, *81* (2), 233–260.
- (5) Säbel, C. E.; Neureuther, J. M.; Siemann, S. A Spectrophotometric Method for the Determination of Zinc, Copper, and Cobalt Ions in Metalloproteins Using Zincon. *Anal. Biochem.* **2010**, *397* (2), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.10.037>.
- (6) Abd-Alkareem, M. G. Spectrophotometric Method For The Determination Of Vanadium In Residue Crude Oil at Mulla-Abdulla Gas Station. *University of Tikrit-College of Pharmacy* **2012**.
- (7) Korkmaz, D. Precipitation Titration: Determination of Chloride by the Mohr Method. In *Methods*; **2001**; pp 1–6.
- (8) Perkampus, H.-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*; Springer-Verlag: Berlin, **1992**.
- (9) McCarthy, P. J.; Güdel, H. U. Optical Spectroscopy of Exchange-Coupled Transition Metal Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *88*, 69–131. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(88\)80002-X](https://doi.org/10.1016/0010-8545(88)80002-X).
- (10) Simmons, E. L. The Application of Diffuse Reflectance Spectroscopy to the Chemistry of Transition Metal Coordination Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **1974**, *14* (2), 181–196. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80394-X](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80394-X).
- (11) Weckhuysen, B. M.; Schoonheydt, R. A. Recent Progress in Diffuse Reflectance Spectroscopy of Supported Metal Oxide Catalysts. *Catal. Today* **1999**, *49* (4), 441–451. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00458-1).

- (12) Ali, I.; Wani, W. A.; Saleem, K. Empirical Formulae to Molecular Structures of Metal Complexes by Molar Conductance. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.* **2013**, *43* (9), 1162–1170. <https://doi.org/10.1080/15533174.2012.756898>.
- (13) Riedi, P. C.; Lord, J. S. ChemInform Abstract: Fundamentals of NMR. *ChemInform* **1995**, *26* (50), chin.199550285. <https://doi.org/10.1002/chin.199550285>.
- (14) Yadav, L. D. S. Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy. In *Organic Spectroscopy*; Springer Netherlands: Dordrecht, **2005**; pp 224–249. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2575-4_7.
- (15) Chasteen, N. D. Vanadyl(IV) EPR Spin Probes Inorganic and Biochemical Aspects. In *Biological Magnetic Resonance*; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1981**; pp 53–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3201-5_2.
- (16) Smith, T. S.; LoBrutto, R.; Pecoraro, V. L. Paramagnetic Spectroscopy of Vanadyl Complexes and Its Applications to Biological Systems. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *228* (1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(01\)00437-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(01)00437-4).
- (17) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- (18) Williams, D. A. Chapter 3 Fundamentals of Mass Spectrometry. In *Pharmacochemistry Library*; Elsevier, **1997**; Vol. 26, pp 19–45. [https://doi.org/10.1016/S0165-7208\(97\)80150-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7208(97)80150-X).
- (19) Bi, S.; Sun, Y.; Qiao, C.; Zhang, H.; Liu, C. Binding of Several Anti-Tumor Drugs to Bovine Serum Albumin: Fluorescence Study. *J. Lumin.* **2009**, *129* (5), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.12.010>.
- (20) Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bruneau, J.; Bérubé, G.; Asselin, É.; Tajmir-Riahi, H.-A. Probing the Binding Sites of Antibiotic Drugs Doxorubicin and N-(Trifluoroacetyl) Doxorubicin with Human and Bovine Serum Albumins. *PLoS ONE* **2012**, *7* (8), e43814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043814>.
- (21) Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Kandagal, P. B.; Shaikh, S. M. T. Investigation of the Interaction between Trazodone Hydrochloride and Bovine Serum Albumin. *J. Lumin.* **2006**, *121* (1), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2005.12.001>.
- (22) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (23) Topală, T.; Bodoki, A.; Oprean, L.; Oprean, R. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Med. Pharm. Rep.* **2014**, *87* (4), 215–219. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>.
- (24) Leckband, D. Measuring the Forces That Control Protein Interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29* (1), 1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.1>.
- (25) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- (26) Peng, S.-H.; Lv, B.-B.; Ali, A.; Wang, J.-M.; Ying, X.; Wang, H.; Liu, J.-B.; Ji, L.-N.; Liu, H.-Y. The Magnetic Properties, DNA/HSA Binding and Nuclease Activity of Manganese N-Confused Porphyrin. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, *20* (05), 624–638. <https://doi.org/10.1142/S1088424616500449>.

- (27) *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates*; Tihanyi, K., Vastag, M., Eds.; Bentham Science publishers, **2011**. <https://doi.org/10.2174/97816080512051110101>.
- (28) OECD. *Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1; OECD, **1995**. <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
- (29) Russell, W. C.; Graham, F. L.; Smiley, J.; Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36* (1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>.
- (30) Kavsan, V. M.; Iershov, A. V.; Balynska, O. V. Immortalized Cells and One Oncogene in Malignant Transformation: Old Insights on New Explanation. *BMC Cell Biol.* **2011**, *12* (1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-23>.
- (31) Lieber, M.; Todaro, G.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W. A Continuous Tumor-cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells. *Int. J. Cancer* **1976**, *17* (1), 62–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170110>.
- (32) Jiang, R.; Shen, H.; Piao, Y.-J. The Morphometrical Analysis on the Ultrastructure of A549 Cells. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **2010**, *51* (4), 663–667.
- (33) Maione, P.; Gridelli, C.; Troiani, T.; Ciardiello, F. Combining Targeted Therapies and Drugs with Multiple Targets in the Treatment of NSCLC. *The Oncologist* **2006**, *11* (3), 274–284. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-3-274>.
- (34) Cailleau, R.; Young, R.; Olivé, M.; Reeves, W. J. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions2. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53* (3), 661–674. <https://doi.org/10.1093/jnci/53.3.661>.
- (35) Urtreger, A.; Ladeda, V.; Puricelli, L.; Rivelli, A.; Vidal, M.; DeLustig, E.; Joffe, E. Modulation of Fibronectin Expression and Proteolytic Activity Associated with the Invasive and Metastatic Phenotype in Two New Murine Mammary Tumor Cell Lines. *Int. J. Oncol.* **1997**. <https://doi.org/10.3892/ijo.11.3.489>.
- (36) Zárata, L. V.; Miret, N. V.; Nicola Candia, A. J.; Zappia, C. D.; Pontillo, C. A.; Chiappini, F. A.; Monczor, F.; Candolfi, M.; Randi, A. S. Breast Cancer Progression and Kynurenine Pathway Enzymes Are Induced by Hexachlorobenzene Exposure in a Her2-Positive Model. *Food Chem. Toxicol.* **2023**, *177*, 113822. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113822>.
- (37) Brattain, M. G.; Fine, W. D.; Khaled, F. M.; Thompson, J.; Brattain, D. E. Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma. *Cancer Res.* **1981**, *41* (5), 1751–1756.
- (38) Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016* (4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>.
- (39) Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30* (1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- (40) Zitka, O.; Skalickova, S.; Gumulec, J.; Masarik, M.; Adam, V.; Hubalek, J.; Trnkova, L.; Kruseova, J.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Redox Status Expressed as GSH:GSSG Ratio as a Marker for Oxidative Stress in Paediatric Tumour Patients. *Oncol. Lett.* **2012**, *4* (6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>.

- (41) Liang, C.-C.; Park, A. Y.; Guan, J.-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- (42) Chen, H.-C. Boyden Chamber Assay. In *Cell Migration*; Humana Press: New Jersey, 2004; Vol. 294, pp 015–022. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:015>.
- (43) Castellone, R. D.; Leffler, N. R.; Dong, L.; Yang, L. V. Inhibition of Tumor Cell Migration and Metastasis by the Proton-Sensing GPR4 Receptor. *Cancer Lett.* **2011**, *312* (2), 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.013>.
- (44) Li, J.; Kemp, B. A.; Howell, N. L.; Massey, J.; Mińczuk, K.; Huang, Q.; Chordia, M. D.; Roy, R. J.; Patrie, J. T.; Davogustto, G. E.; Kramer, C. M.; Epstein, F. H.; Carey, R. M.; Taegtmeyer, H.; Keller, S. R.; Kundu, B. K. Metabolic Changes in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts Precede Cardiac Dysfunction and Left Ventricular Hypertrophy. *J. Am. Heart Assoc.* **2019**, *8* (4), e010926. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010926>.
- (45) Charan, J.; Kantharia, N. D. How to Calculate Sample Size in Animal Studies? *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2013**, *4* (4), 303–306. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>.
- (46) Warren, M. R.; Radulescu, A.; Dornbos, P.; Cuomo, D.; Zumwalt, S.; Bueso-Mendoza, D.; Nitcher, M.; LaPres, J. J.; Threadgill, D. W. Peanut Butter as an Alternative Dose Delivery Method to Prevent Strain-Dependent Orogastic Gavage-Induced Stress in Mouse Teratogenicity Studies. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2021**, *107*, 106948. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106948>.
- (47) Chatelain, P.; Waelbroeck, M.; Camus, J.-C.; De Neef, P.; Robberecht, P.; Roba, J.; Christophe, J. Comparative Effects of α -Methyldopa, Propranolol and Hydralazine Therapy on Cardiac Adenylate Cyclase Activity in Normal and Spontaneously Hypertensive Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, *72* (1), 17–25. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(81\)90292-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(81)90292-2).
- (48) Jones, E. F.; Harrap, S. B.; Calafiore, P.; Tonkin, A. M. Development and validation of echocardiography methods for estimating left ventricular mass in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1992**, *19* (5), 361–364. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1992.tb00472.x>.
- (49) Devereux, R. B.; Reichek, N. Echocardiographic Determination of Left Ventricular Mass in Man. Anatomic Validation of the Method. *Circulation* **1977**, *55* (4), 613–618. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.55.4.613>.
- (50) Van Vliet, B. N.; Chafe, L. L.; Antic, V.; Schnyder-Candrian, S.; Montani, J.-P. Direct and Indirect Methods Used to Study Arterial Blood Pressure. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44* (2), 361–373. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00126-X).
- (51) Gaschler, M. M.; Stockwell, B. R. Lipid Peroxidation in Cell Death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *482* (3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.
- (52) Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95* (2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- (53) Hermann, M.; Flammer, A.; Lüscher, T. F. Nitric Oxide in Hypertension. *J. Clin. Hypertens.* **2006**, *8* (s12), 17–29. <https://doi.org/10.1111/j.1524-6175.2006.06032.x>.
- (54) Garcia, J. A. D.; Incerpi, E. K. Factors and Mechanisms Involved in Left Ventricular Hypertrophy and the Anti-Hypertrophic Role of Nitric Oxide. *Arq. Bras. Cardiol.* **2008**, *90* (6), 409–416. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2008000600010>.

- (55) Mizuno, O.; Kobayashi, S.; Hirano, K.; Nishimura, J.; Kubo, C.; Kanaide, H. Stimulus-specific Alteration of the Relationship between Cytosolic Ca²⁺ Transients and Nitric Oxide Production in Endothelial Cells *Ex Vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130* (5), 1140–1146. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703420>.
- (56) Toffolo, R. L.; Ianuzzo, C. D. Myofibrillar Adaptations during Cardiac Hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *131* (2), 141–149. <https://doi.org/10.1007/BF00925950>.
- (57) Yang, C. M.; Kandaswamy, V.; Young, D.; Sen, S. Changes in Collagen Phenotypes during Progression and Regression of Cardiac Hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **1997**, *36* (2), 236–245. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00186-7).
- (58) Nicosia, N.; Giovenzana, M.; Misztak, P.; Mingardi, J.; Musazzi, L. Glutamate-Mediated Excitotoxicity in the Pathogenesis and Treatment of Neurodevelopmental and Adult Mental Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (12), 6521.
- (59) Scabini, M.; Stellari, F.; Cappella, P.; Rizzitano, S.; Texido, G.; Pesenti, E. In Vivo Imaging of Early Stage Apoptosis by Measuring Real-Time Caspase-3/7 Activation. *Apoptosis* **2010**, *16*, 198–207.
- (60) Popova, D.; Jacobsson, S. O. P. A Fluorescence Microplate Screen Assay for the Detection of Neurite Outgrowth and Neurotoxicity Using an Antibody against β III-Tubulin. *Toxicol. In Vitro* **2014**, *28* (3), 411–418.
- (61) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *6*. <https://doi.org/doi:10.1101/pdb.prot095497>.

Capítulo 3

Cáncer

Compuestos antitumorales de V(IV) y Zn(II)

3.1 Introducción – Complejo antitumoral de V(IV)

El flavonoide crisina (Cris) (Figura 3-I) posee varias actividades biológicas, entre las cuales se hallan las actividades antioxidante, anticancerígena, antiviral y neuroprotectora. Tiene baja solubilidad en condiciones fisiológicas, baja biodisponibilidad, metabolismo rápido y excreción rápida, lo que limita su utilización como agente quimioterapéutico¹. Debido a esto, se buscó modificar su estructura para mejorar sus actividades biológicas.

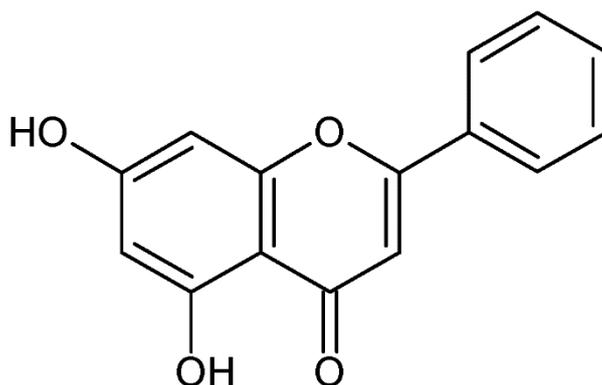


Figura 3-I. Estructura de la molécula crisina.

Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación se dedicaron al estudio del comportamiento anticancerígeno de crisina y de su complejo con vanadio $[V^{IV}O(Cris)_2(EtOH)]_2$ (VOCris) (Figura 3-II) en células de osteoblastos², células de cáncer de mama³ y células de cáncer de pulmón humano⁴. Los resultados obtenidos demostraron que la formación del complejo de coordinación mejoró los efectos biológicos del flavonoide. Con la finalidad de aumentar el número de compuestos correlacionados estructuralmente con crisina y su complejo VOCris, en este trabajo se seleccionó la base heterocíclica fenantrolina (Fen) como segundo ligando debido a su carácter lipofílico y planar. Ligandos con estas características pueden unirse al ADN mediante intercalación con sus pares de bases, mejorando la acción anticancerígena de los complejos binarios de partida, además de conferir lipofilicidad, lo que podría mejorar el transporte del compuesto a través de las membranas celulares⁵. Hasta la fecha, sólo se han informado unos pocos complejos ternarios de crisina basados en los metales Ga(III), Cu(II) y Ru(II), que demostraron ser más citotóxicos que la crisina libre en diferentes líneas celulares de cáncer^{6,7,8}.

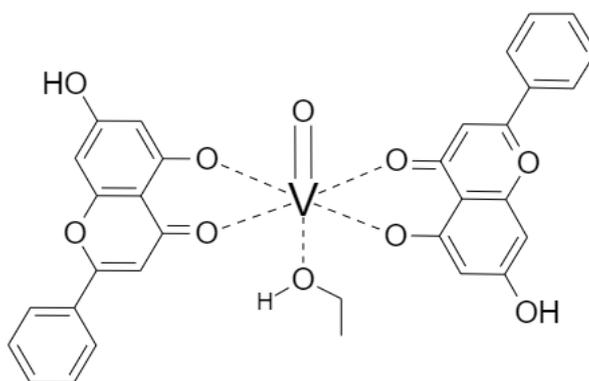


Figura 3-II. Estructura del complejo $[V^{IV}O(Cris)_2(EtOH)]_2$ (VOCris).

En este trabajo se sintetizó el complejo heteroléptico $[V^{IV}OCrisFenCl]$ (VOCrisFen) con el objetivo de mejorar el comportamiento biológico del complejo VOCris, y se lo caracterizó en estado sólido y en solución. La actividad biológica del complejo como fármaco anticancerígeno se estudió en la línea celular de cáncer de pulmón humano A549 y se evaluó la toxicidad en la línea celular no tumoral derivada de riñón embrionario humano HEK293. El mecanismo de acción se estudió mediante el estudio de la generación de EROs intracelulares, la depleción de antioxidantes naturales (glutatión), el daño de la membrana mitocondrial y la captación celular de vanadio. También se determinó la interacción del complejo con ASB como una aproximación a la interacción con la proteína plasmática humana.

3.2 Resultados

3.2.1 Síntesis del complejo $[VO(Cris)(Fen)Cl]$ (VOCrisFen)

El complejo VOCris, reportado previamente por nuestro grupo de investigación, se utilizó como reactivo de partida para obtener el complejo ternario de VO-crisina-fenantrolina deseado.

El complejo VOCrisFen (Figura 3-III) se sintetizó añadiendo 0,1 mmol de VOCris y 0,2 mmol de fenantrolina clorhidrato (Fen.HCl) a 25 mL de acetona. La suspensión se mantuvo en reflujo durante 3 horas. El sólido verde-amarillento obtenido se filtró en caliente, se lavó con acetona caliente reiteradas veces y se secó al aire.

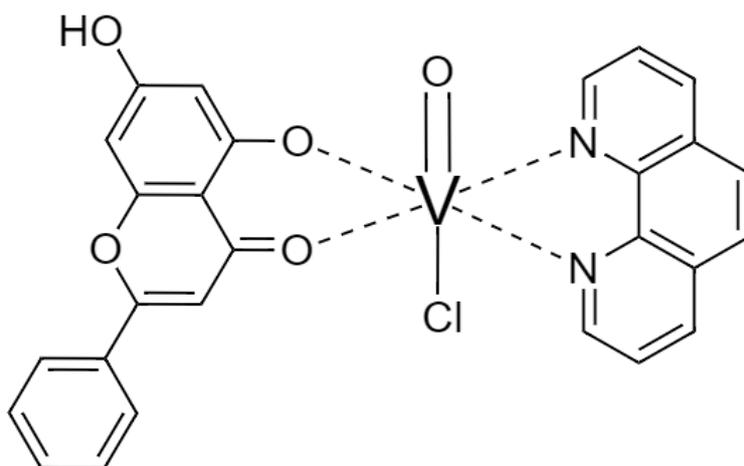


Figura 3-III. Estructura del complejo [VO(Cris)(Fen)Cl] (VOCrisFen).

3.2.2 Caracterización fisicoquímica

Estudios en fase sólida

3.2.2.1 Análisis elemental

El análisis elemental realizado para el compuesto VOCrisFen mostró porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno consistentes con los porcentajes teóricos esperados para la fórmula $C_{27}H_{17}O_5N_2VCl$ propuesta. Asimismo, el contenido de vanadio determinado en nuestro laboratorio por métodos espectrofotométricos (Sección 2.2.4.2) fue similar al calculado (Tabla 3-I).

Tabla 3-I. Porcentajes elementales esperados (de acuerdo a la fórmula $C_{27}H_{17}O_5N_2VCl$) y obtenidos para VOCrisFen.

Elemento	% Calculado	% Experimental
C	60,5	60,4
N	5,2	5,3
H	3,2	3,3
V	9,5	9,6

3.2.2.2 Análisis termogravimétrico

El TGA (atmósfera de oxígeno, 50 mL/min) mostró que el complejo es estable hasta 260 °C, lo que indica que no hay presencia de moléculas de solvatación o de solvente

coordinado (Figura 3-IV). El compuesto se degradó en dos etapas consecutivas, observadas entre 295 y 400 °C y entre 400 y 525 °C. A partir de 525 °C se alcanzó una masa porcentual constante de 17,2%, coincidente con el valor esperado de 17,0% para el residuo de V_2O_5 (cuya identidad fue confirmada por espectroscopía FTIR (Figura 3-V)) obtenido en la descomposición del complejo de acuerdo a la estructura $[VO(Cris)(Fen)Cl]$ propuesta. Las bandas características de V_2O_5 aparecen en 1018, 829, 611 y 476 cm^{-1} y corresponden a la vibración de estiramiento de los enlaces terminales de oxígeno ($\nu V=O$), la vibración de los enlaces de oxígeno doblemente coordinados (puente de oxígeno) y las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de oxígeno triplemente coordinado, respectivamente⁹.

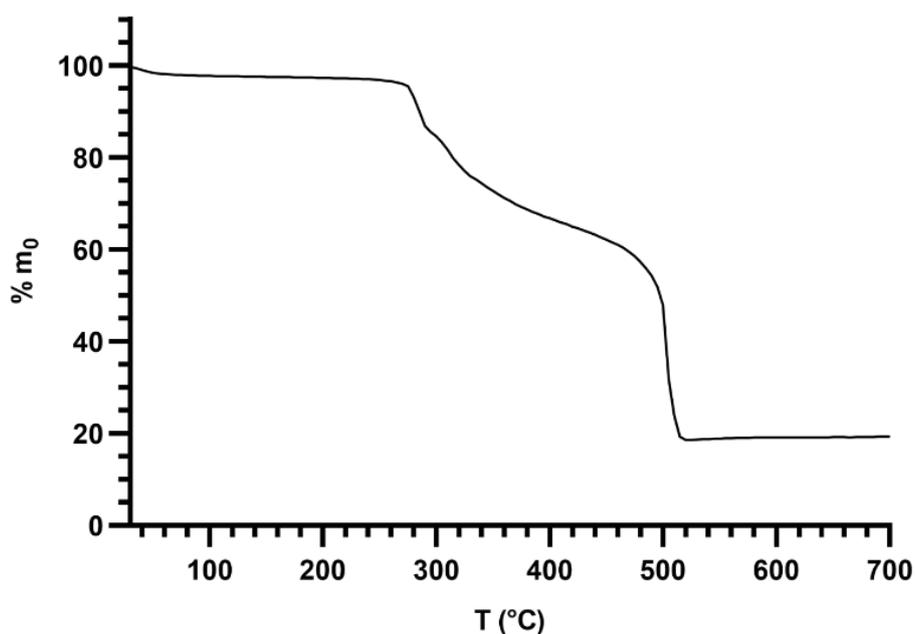


Figura 3-IV. Curva del TGA de la descomposición de VOcrisFen.

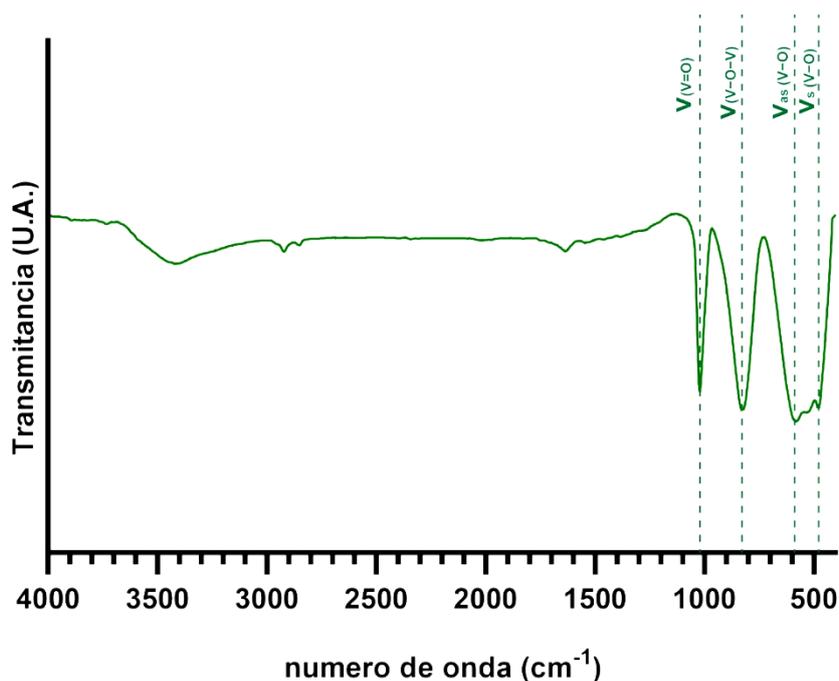


Figura 3-V. Espectro FTIR del residuo final obtenido en la termogravimetría del complejo VOCrisFen.

3.2.2.3 Espectroscopía FTIR

El espectro infrarrojo de VOCrisFen permaneció similar al del compuesto binario de partida VOCris (Figura 3-VI), manteniendo las modificaciones en las bandas vibracionales del estiramiento $\nu\text{C}=\text{O}$ (1635 cm^{-1}) y de las torsiones de O-H (1596 , 1351 y 1247 cm^{-1}) que indican la coordinación de crisina al centro metálico. Los modos vibracionales de fenantrolina en el rango de $1600\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ (intensidades medias) están asociados con los modos de estiramiento de los enlaces $\nu\text{C}=\text{C}$ y $\nu\text{C}=\text{N}$. Dichas bandas parecen estar superpuestas con las de crisina, sin embargo, puede observarse que la banda de estiramiento $\nu\text{C}=\text{N}$ de fenantrolina a 1646 cm^{-1} se desplazó a 1635 cm^{-1} luego de la coordinación, y se encuentra enmascarada por la banda de estiramiento $\nu\text{C}=\text{O}$ (alta intensidad) del ligando crisina. Las bandas principales de movimiento de los hidrógenos aromáticos en fase y fuera de fase para fenantrolina (852 y 738 cm^{-1} , respectivamente) se desplazaron a 847 y 725 cm^{-1} , mostrando que fenantrolina también está interaccionando con el catión oxidovanadio (IV)¹⁰. Además, la sustitución de un ligando de crisina por uno de fenantrolina podría producir una disminución de la donación de electrones π al grupo $\text{V}=\text{O}$. El cambio de la banda de estiramiento $\nu\text{V}=\text{O}$ de 968 a 957 cm^{-1} es indicativo de una disminución del orden de enlace y un aumento de la longitud del enlace de acuerdo con el reemplazo de una molécula de crisina por fenantrolina.

En resumen, estos resultados sugieren que el ion metálico interactúa con crisina a través de los grupos C=O y C(5)-O desprotonado, y con los átomos de N de fenantrolina.

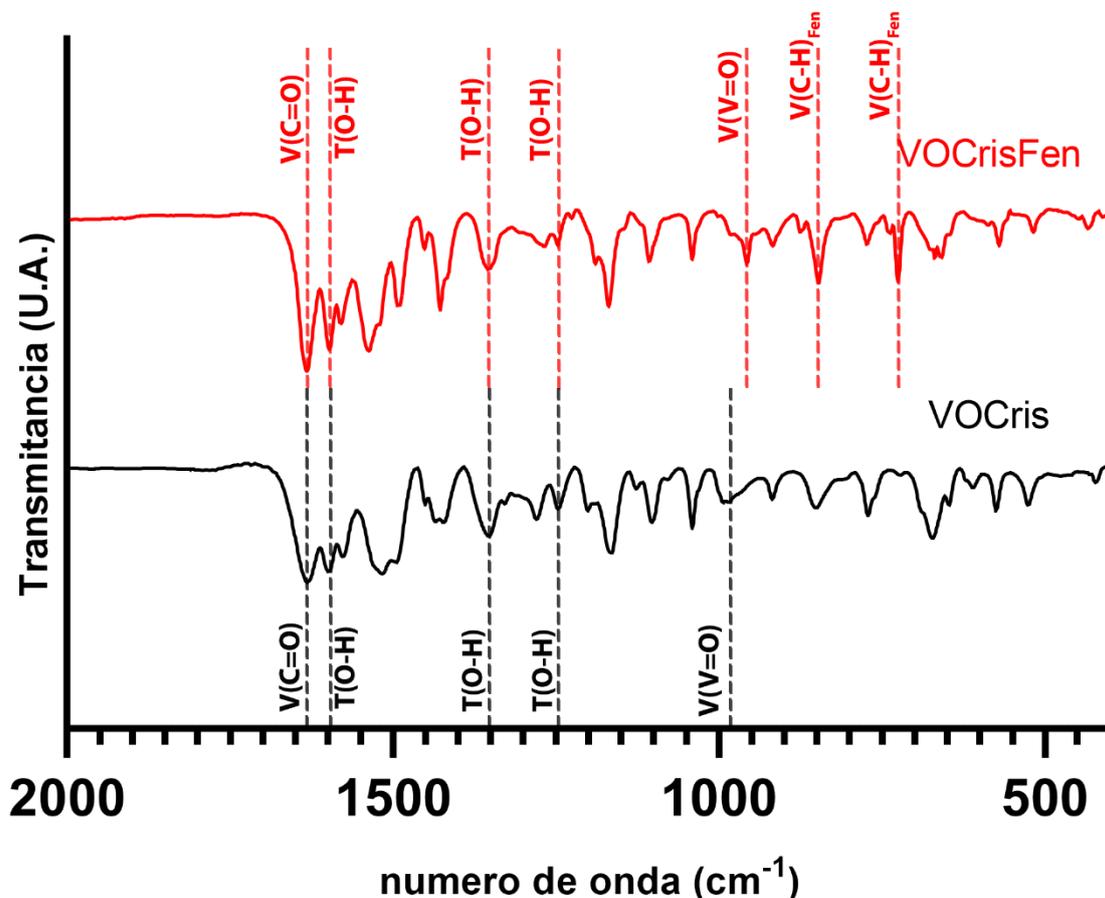


Figura 3-VI. Espectros FTIR de los compuestos VOCris y VOCrisFen.

3.2.2.4 Resonancia paramagnética electrónica

El espectro de resonancia paramagnética electrónica (RPE) del polvo microcristalino de VOCrisFen a 120 K (Figura 3-VII) mostró una línea RPE única (cuasi-isotrópica) que no presenta el típico patrón de división hiperfina de ocho líneas del núcleo ^{51}V ($I = 7/2$). Este tipo de espectro sugiere la presencia de interacciones espín-espín entre iones de oxidovanadio(IV) vecinos en el complejo sólido, que colapsan la interacción hiperfina en una sola línea¹¹. El espectro a temperatura ambiente presentó las mismas características. Este formato de espectro fue observado previamente para los complejos de oxidovanadio(IV) con otros flavonoides como apigenina, naringenina y quercetina^{12,13,14}, siendo un patrón característico de los sistemas magnéticamente extendidos de este catión.

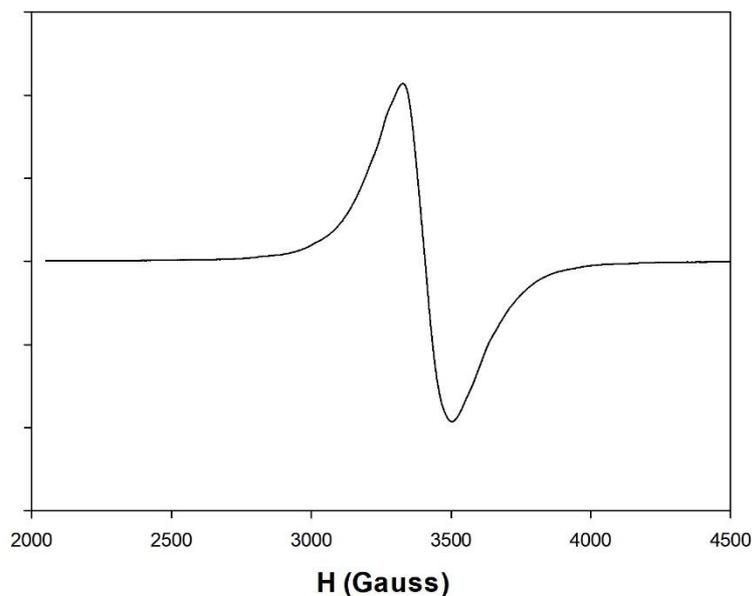


Figura 3-VII. Espectro RPE del polvo de VOcrisFen a 120 K. Condiciones experimentales: modulación de 100 kHz, amplitud de modulación de 4 Gpp, potencia de microondas de 2 mW.

El espectro RPE de la solución de VOcrisFen en DMSO medido a 120 K muestra el patrón típico de ocho líneas para sistemas V(IV) axiales, como se muestra en la Figura 3-VIII. La simulación (ver Figura 3-VIII) predijo que la señal observada es consistente con el ion oxidovanadio(IV) en un campo ligando pseudoaxial. Los parámetros hamiltonianos de espín, factor g- y constante de acoplamiento hiperfina resultaron: $g_{||} = 1,941$; $A_{||} = 162,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; $g_{\perp} = 1,977$; $A_{\perp} = 59,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Estos parámetros se ajustan razonablemente bien en el diagrama $g_{||}$ vs. $A_{||}$ correspondiente a una esfera de coordinación 2N, 2O¹⁵. Debido a que el componente paralelo de la constante de acoplamiento hiperfina es sensible al tipo de átomos donantes en las posiciones ecuatoriales de la esfera de coordinación de un complejo, la relación empírica $A_z = \sum n_i A_{z,i}$ se usa frecuentemente para determinar la identidad de los ligandos ecuatoriales en complejos de V(IV) (n_i , número de ligandos ecuatoriales de tipo i; $A_{z,i}$, contribución al acoplamiento hiperfino paralelo de cada uno de ellos)¹⁵. Considerando las contribuciones a la constante de acoplamiento hiperfina paralela de los diferentes modos de coordinación (CO = $44,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, ArO⁻ = $38,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)¹², y $2 \times \text{N(Fen)} = 2 \times 40,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ¹⁶, el valor calculado para $A_{||}$ de $164,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ concuerda con el valor experimental. De los parámetros de RPE, concluimos que la esfera de coordinación correspondería a un modo de unión de (CO, O⁻, 2N) en el plano ecuatorial. Dados los resultados, se puede concluir que el ion cloruro, que también está unido al centro metálico, estaría ubicado en posición trans. Además, se observa que $g_{||} < g_{\perp} < g_e = 2,0023$ y $|A_{||}| > |A_{\perp}|$, que resulta característico de un sitio octaédrico con compresión

tetragonal con el orbital d_{xy} como el estado basal del ion V^{4+} ($3d^1$). Además, la relación $\Delta g_{\parallel}/\Delta g_{\perp}$ ($[g_{\parallel}-g_e]/[g_{\perp}-g_e]$) resultó ser 2,37, lo que muestra una distorsión tetragonal octaédrica.

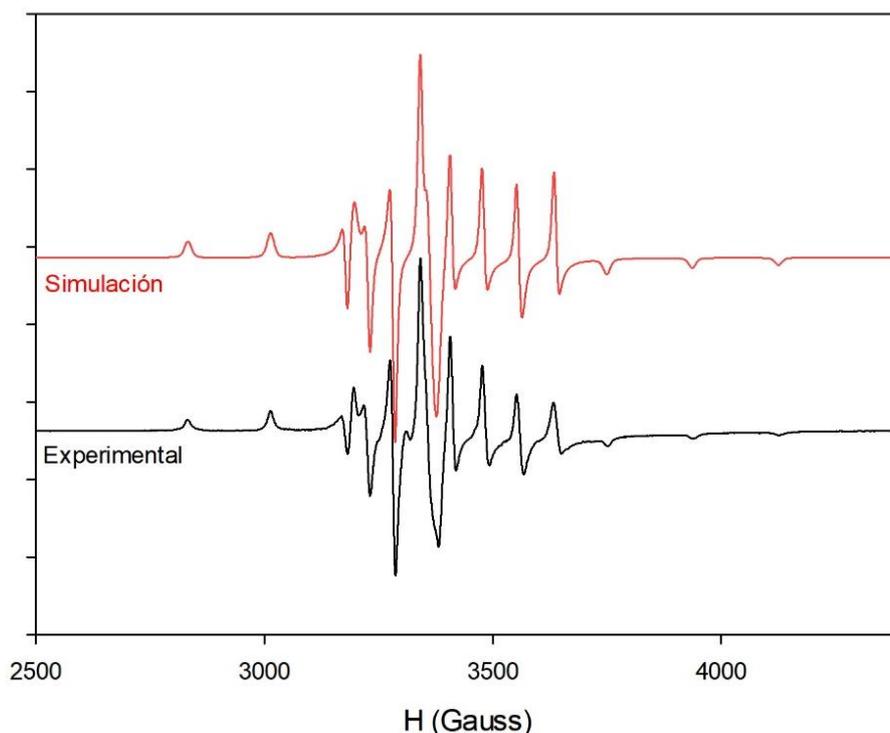


Figura 3-VIII. Espectro RPE de una solución de VOCIrisFen en DMSO a 120 K (negro) y su simulación correspondiente (rojo). Condiciones experimentales: modulación de 100 kHz, amplitud de modulación de 4 Gpp, potencia de microondas de 2 mW.

Estudios en solución

El complejo VOCIrisFen resultó ser muy soluble en DMSO y ligeramente soluble en etanol.

3.2.2.5 Espectroscopía de masas

La espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS; Sección 2.2.11) es útil para hacer determinaciones estructurales, identificaciones y análisis de trazas. Con la finalidad de obtener una mayor información sobre la masa molecular de VOCIrisFen, se realizó el análisis de ESI-MS para el complejo disuelto en una relación 1:2 de DMSO:acetona. El espectro de masa (Figura 3-IX) revela un pico mayoritario de $m/z = 558,02$ correspondiente con el valor calculado de $m/z = 558,01$ para la especie

[VO(Cris)(Fen)Cl-Na]⁺ (C₂₇H₁₇ClN₂NaO₅V). La presencia de esta especie se debe a la contaminación con cationes Na⁺ que se encuentra en la gran mayoría de las muestras analizadas; el catión Na⁺ es el catión metálico más común en la naturaleza, y se encuentra presente en el material de vidrio de laboratorio, solventes y reactivos. Por otra parte, se detectó un pico de m/z = 500,05 que pudo asociarse a la presencia de la especie [VO(CrisFen)]⁺ (C₂₇H₁₇N₂O₅V). Esto puede explicarse porque el ligando cloruro es capaz de disociarse en las condiciones de la técnica ESI-MS, pero los ligandos bidentados permanecen unidos al ion metálico debido al efecto quelato que les confiere mayor estabilidad. De este modo, se confirma la estequiometría propuesta para el complejo VOCrisFen.

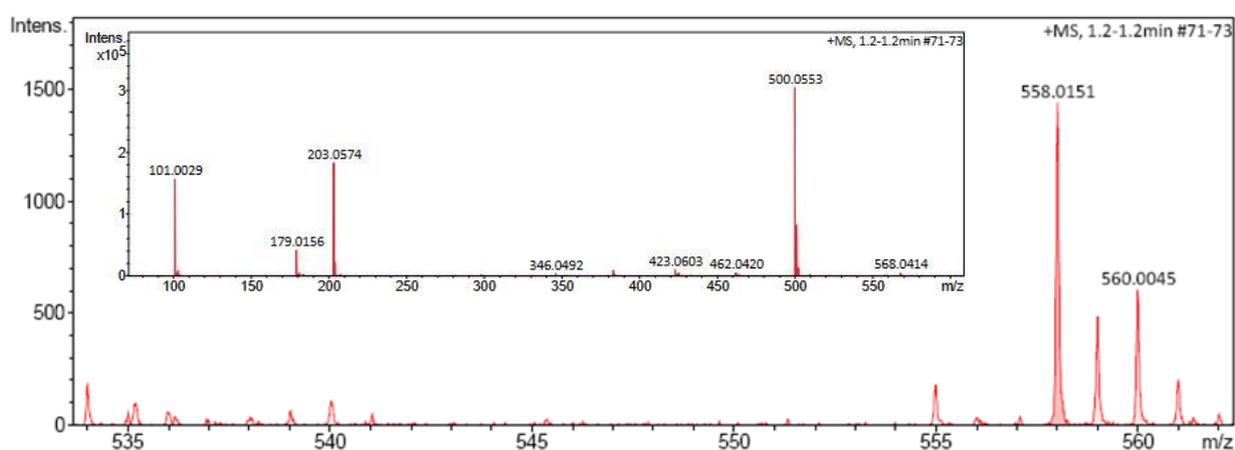


Figura 3-IX. Espectro de masas de VOCrisFen. El espectro de masa exacto se obtuvo usando un espectrómetro de masa Bruker micrOTOF-Q II, equipado con una fuente ESI operando en modo positivo.

3.2.2.6 Medidas de conductividad molar

La conductividad molar (Λ_m) de una solución 10⁻³ M de VOCrisFen en DMSO fue medida durante 4 horas (Tabla 3-II). Se observó un valor constante de $\Lambda_m = 11 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$, por lo que se trataría de un compuesto no-electrolito¹⁷. Este resultado sugiere que la especie en solución se mantiene estable al menos por 4 horas y que el anión Cl⁻ (que confiere electroneutralidad al complejo) se encuentra dentro de la esfera de coordinación y por lo tanto no se disocia durante la solubilización de VOCrisFen.

Tabla 3-II. Variación de la conductividad molar en el tiempo de una solución 10^{-3} M de VOCrisFen en DMSO.

Tiempo (min)	Λ_m ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
0	11
5	12
10	13
15	11
20	11
30	12
60	10
90	10
120	11
180	12
240	13

3.2.2.7 Espectroscopía UV-Vis y medidas de estabilidad en solución

A partir del espectro electrónico de VOCrisFen (Figura 3-X) se calcularon los siguientes coeficientes de extinción molar (ϵ): $105300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (273 nm); $91100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (288 nm); $12341 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (326 nm); $6134 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (392 nm); $68 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (769 nm). La banda del espectro electrónico para la transición d-d de VOCrisFen disuelto en DMSO se desplazó hacia el azul con respecto al complejo precursor VOCris (769 nm y 796 nm, respectivamente), lo que se corresponde con los cambios en la esfera de coordinación que resultan de reemplazar una molécula de crisina por una de fenantrolina (Figura 3-X). La posición de la banda de absorción de VOCrisFen resultó similar a la de complejos de VO(IV) con entorno de fenantrolina, como el compuesto $[\text{VO}(\text{SO}_4)(\text{fen})_2]$ en DMSO (765 nm)¹⁸.

Las medidas de reflectancia difusa de VOCrisFen (Figura 3-XI) mostraron una banda a 773 nm, que se asemeja a la posición de la banda del mismo compuesto en DMSO. Esto indicaría que no hay reemplazos ni disociación de ligandos en VOCrisFen a raíz de su solubilización en DMSO.

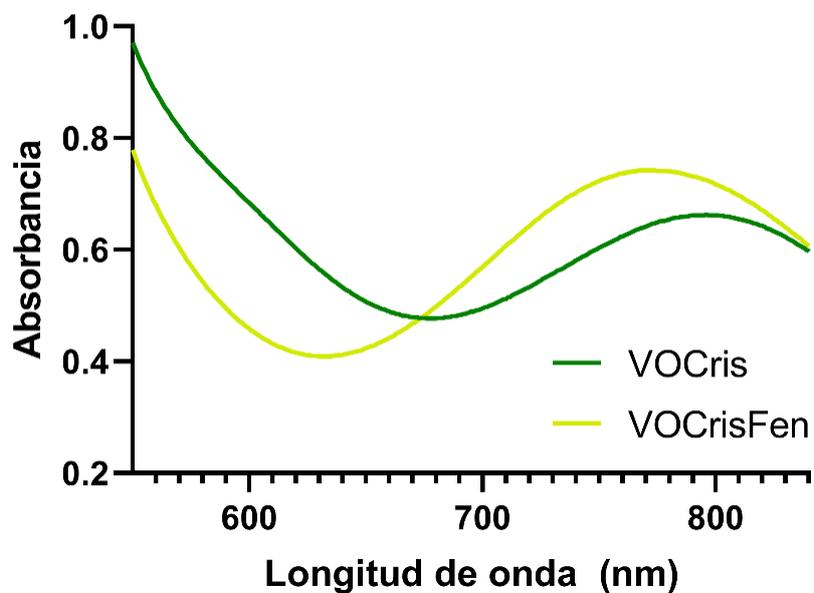


Figura 3-X. Espectros electrónicos UV-Vis de VOCris y VOCrisFen en DMSO (10^{-2} M).

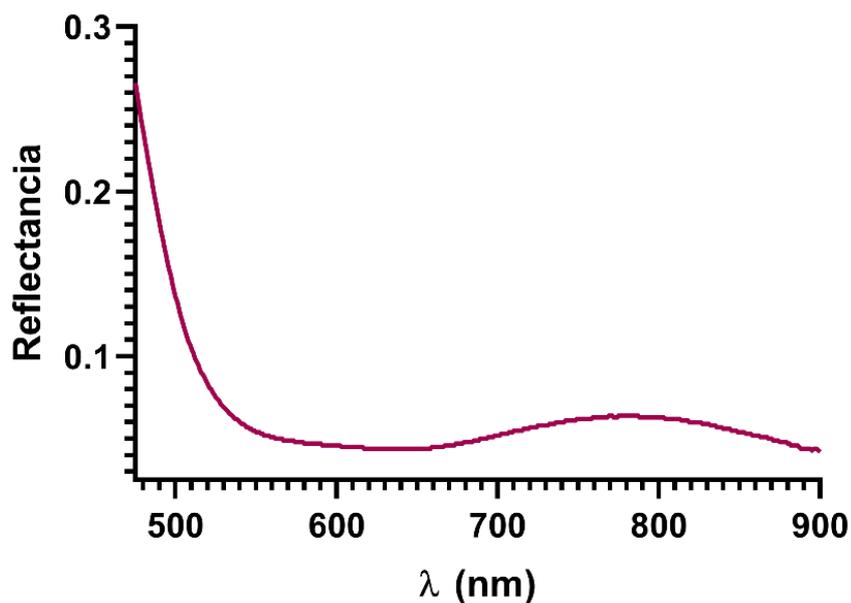


Figura 3-XI. Espectro de reflectancia difusa de VOCrisFen.

Se midió además la estabilidad del complejo VOCrisFen en DMSO (10^{-2} M) por medio de la variación de su espectro UV-Vis en el tiempo. Este no mostró cambios significativos durante 4 horas (Figura 3-XII.A), indicando su alta estabilidad en este solvente. La Figura 3-XII.B muestra los cambios espectrales para una solución del complejo en DMSO/H₂O 1/99 (10^{-2} M) durante 4 h. El complejo resultó menos estable en solución

acuosa, pero al menos durante 15 min (tiempo de manipulación para los estudios celulares) el complejo permaneció estable en ambas soluciones. Se sabe que una vez que el complejo se agrega a las células vivas, podría sufrir varias interacciones químicas con los sistemas celulares oxidantes y antioxidantes, incluida la liberación de ligandos, pero las diferencias en el efecto anticancerígeno entre los ligandos libres y VOCrisFen, las cuales se discutirán en el apartado de actividad antitumoral, demostraron que la eficacia mejorada de este compuesto fue debida a la formación del complejo de coordinación y no a la suma del efecto de los ligandos libres.

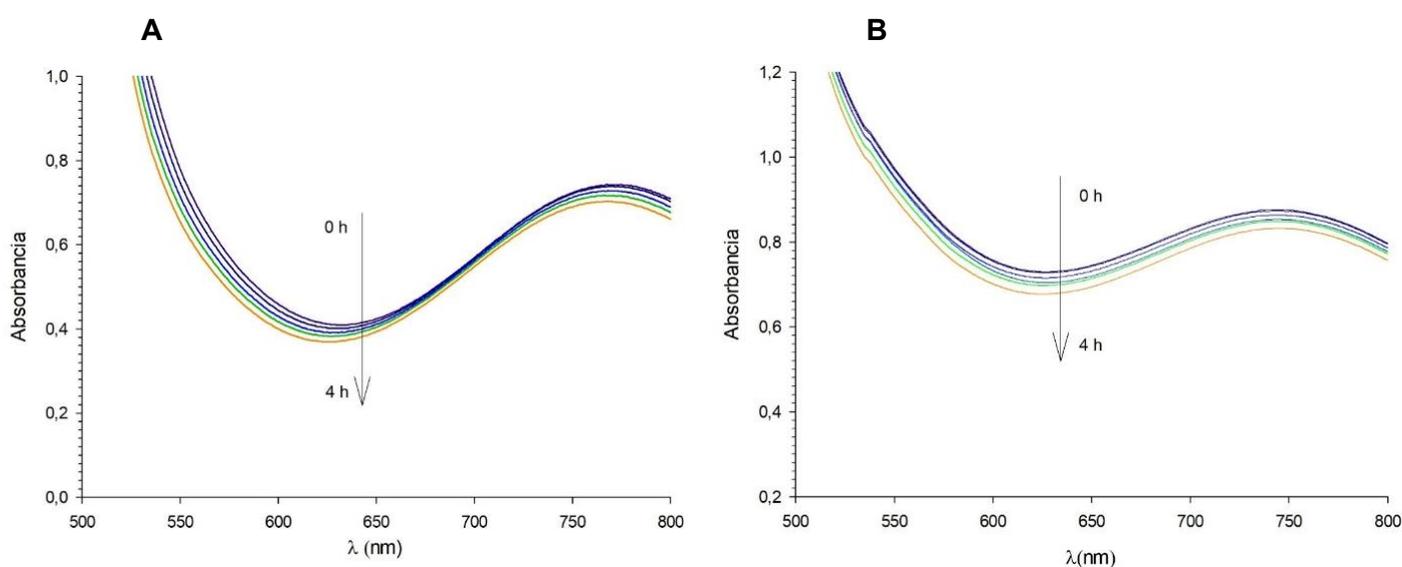


Figura 3-XII. Variación en el tiempo del espectro electrónico de soluciones 10^{-2} M de VOCrisFen en DMSO puro (A) y DMSO/H2O 1/99 (B).

3.2.3 Ensayos de biodisponibilidad

3.2.3.1 Interacción con albúmina sérica bovina

El ensayo de interacción entre VOCrisFen y ASB se realizó con concentraciones finales de VOCrisFen de 0, 2, 5, 10, 20 y 30 μ M. En la Figura 3-XIII se muestran los espectros de *quenching* de fluorescencia obtenidos en dicho ensayo para diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C (298K, 303K, 310K, respectivamente). Los valores máximos de fluorescencia (F) para cada curva fueron corregidos por filtro interno

($F_{corr} = F_{obs} * e^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}}$)¹⁹ para evitar la interferencia de la emisión propia del ligando, y

los valores resultantes fueron utilizados en los cálculos para determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de la interacción.

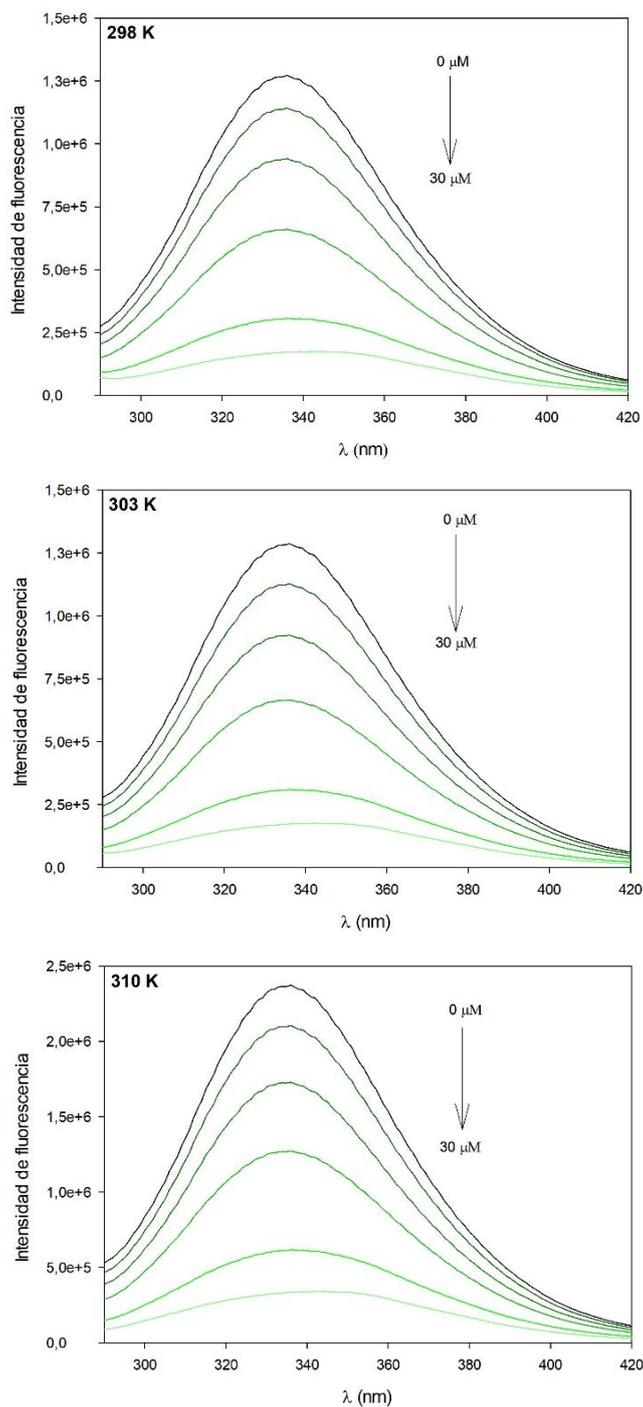


Figura 3-XIII. Gráficos de *quenching* de fluorescencia para una solución de ASB 6 μM incubada por 1 hora con concentraciones crecientes (0, 2, 5, 10, 20, 30 μM) de VOCrisFen a distintas temperaturas (298, 303 y 310 K).

El *quenching* estático y dinámico se pueden diferenciar mediante el análisis de la dependencia del proceso con la temperatura. En la Figura 3-XIV se muestran los

gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$) de la interacción de ASB con VOCrisFen. Los gráficos resultaron lineales en el rango de concentración de trabajo y de la pendiente se obtuvieron las constantes K_{sv} , cuyos valores se muestran en la Tabla 3-III. Los valores de K_{sv} mostraron una disminución al aumentar la temperatura, lo que sugiere un mecanismo de *quenching* estático. Otro criterio para concluir un tipo de *quenching* estático es que el resultado de la constante de *quenching* bimolecular (K_q) debe ser mayor que la constante de *quenching* dinámica máxima para un biopolímero, que se asume igual a $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ de acuerdo a la literatura²⁰. Como se puede observar en la Tabla 3-III, todos los valores de K_q obtenidos fueron mayores que ese valor, reforzando la suposición de que se produce un tipo de interacción de *quenching* estático entre el complejo y la albúmina.

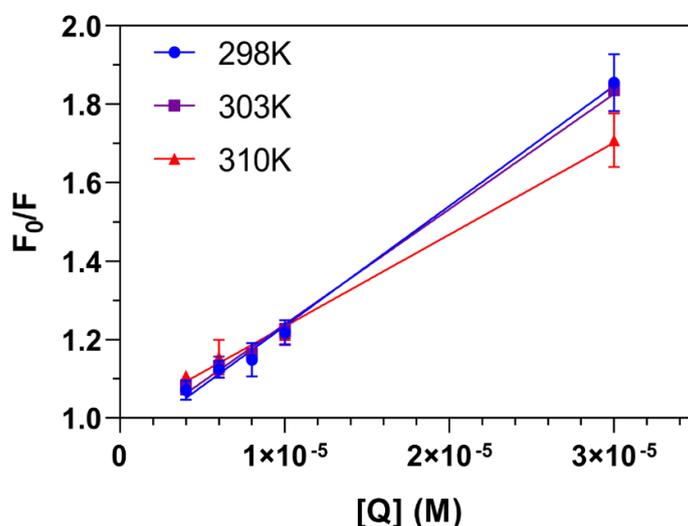


Figura 3-XIV. Gráfico de F_0/F vs $[Q]$ para la interacción ASB - VOCrisFen a diferentes temperaturas (● 298K, ■ 303K, ▲ 310K). Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

El número de sitios de unión y la constante de unión (K_b) de la interacción ASB - VOCrisFen se obtuvieron del gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ (Figura 3-XV). Los valores obtenidos para K_b se hallaron entre $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$, estando dentro del rango óptimo para el transporte de una sustancia en el organismo, y disminuyeron al aumentar la temperatura, sugiriendo una reducción en la estabilidad del complejo ASB - VOCrisFen. Los valores de η fueron cercanos a 1, indicando que hay un solo sitio de unión con la proteína (Tabla 3-III).

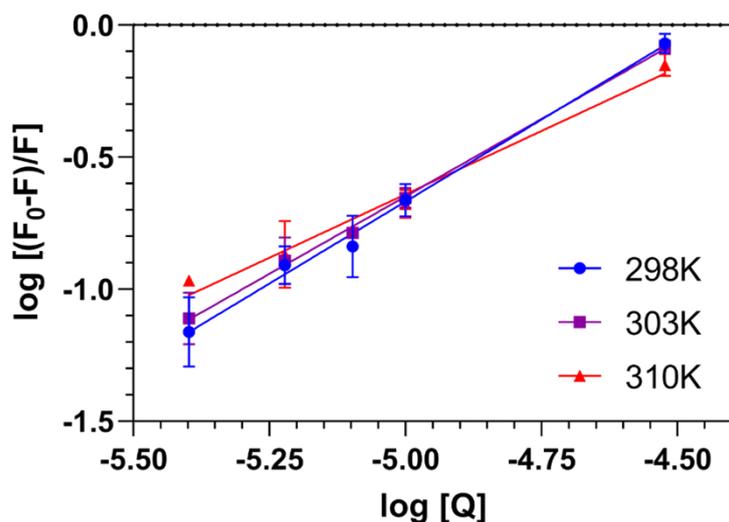


Figura 3-XV. Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ de ASB - VOCrisFen a diferentes temperaturas (● 298K, ■ 303K, ▲ 310K). Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Tabla 3-III. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de *quenching* bimolecular (K_q), constante de unión (K_b) y números de sitio de unión (η) para la interacción entre ASB y VOCrisFen a diferentes temperaturas. Los valores se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

T (K)	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$)	$\log K_b$	K_b ($\times 10^5 M^{-1}$)	η
298	$3,06 \pm 0,11$	$3,06 \pm 0,11$	$5,54 \pm 0,37$	$3,47 \pm 0,23$	$1,24 \pm 0,07$
303	$2,94 \pm 0,07$	$2,94 \pm 0,07$	$5,21 \pm 0,31$	$1,62 \pm 0,10$	$1,17 \pm 0,06$
310	$2,34 \pm 0,10$	$2,34 \pm 0,10$	$4,16 \pm 0,31$	$0,14 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,06$

Los parámetros termodinámicos se determinaron con la ecuación de Van't Hoff. Los valores negativos de ΔH y ΔS indican que la unión ocurre a través de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno²¹, y el valor negativo de ΔG indica que el proceso es espontáneo (Tabla 3-IV).

Tabla 3-IV. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y VOCrisFen a diferentes temperaturas.

ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	T (K)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
-207,80	-0,59	298	-31,98
		303	-29,03
		310	-24,90

3.2.3.2 Estudios de absorción de vanadio intracelular

La técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) permite cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica a nivel de traza. El contenido intracelular de vanadio después de 24 h de tratamiento de los compuestos a una concentración de 28,9 μM (valor de la IC50 de VOCrisFen; concentración que inhibe un 50 % de la viabilidad celular) se determinó mediante ICP-MS y los datos fueron normalizados por contenido de proteínas (Tabla 3-V). La sal acetilacetato de vanadio ($\text{VO}(\text{AcAc})_2$) exhibió casi los mismos niveles de vanadio intracelular que el control sin tratamiento. Los resultados son comparables con los datos informados para las células de cáncer de ovario humano A2780²². Para VOCrisFen, la cantidad total de vanadio captada por las células fue de alrededor de cinco veces mayor que para el complejo binario VOCris. Estos datos sugieren que su mayor citotoxicidad podría estar directamente relacionada con la incorporación de fen a la estructura de complejo, que al aumentar su lipofilicidad podría mejorar el transporte a través de las membranas celulares.

Tabla 3-V. Contenido intracelular de vanadio (determinado por ICP-MS) luego del tratamiento con 28,9 μM del compuesto a 24h. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Compuesto	Contenido de vanadio (nmol V/mg proteína)
Control	4,6 \pm 0,5
$\text{VO}(\text{AcAc})_2$	4,9 \pm 0,2
VOCris	4,7 \pm 0,1
VOCrisFen	23,5 \pm 1,3

3.2.4 Estudios de actividad antitumoral *in vitro*

3.2.4.1 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La línea celular A549 fue tratada con concentraciones crecientes (0 - 100 μM) de VOCrisFen durante 24, 48 y 72 h (Figura 3-XVI). Se observó que la actividad antitumoral del complejo VOCrisFen aumenta con el tiempo de incubación. En comparación con el complejo binario VOCris, VOCrisFen mostró una mayor actividad antitumoral en todos los tiempos, demostrando que esta actividad se vio mejorada gracias al reemplazo de una molécula de crisina por una de fenantrolina. Ambos complejos mostraron mayor actividad antitumoral que sus constituyentes, lo que sugiere que la acción no ocurre en consecuencia de la descomposición de estos (Tabla 3-VI).

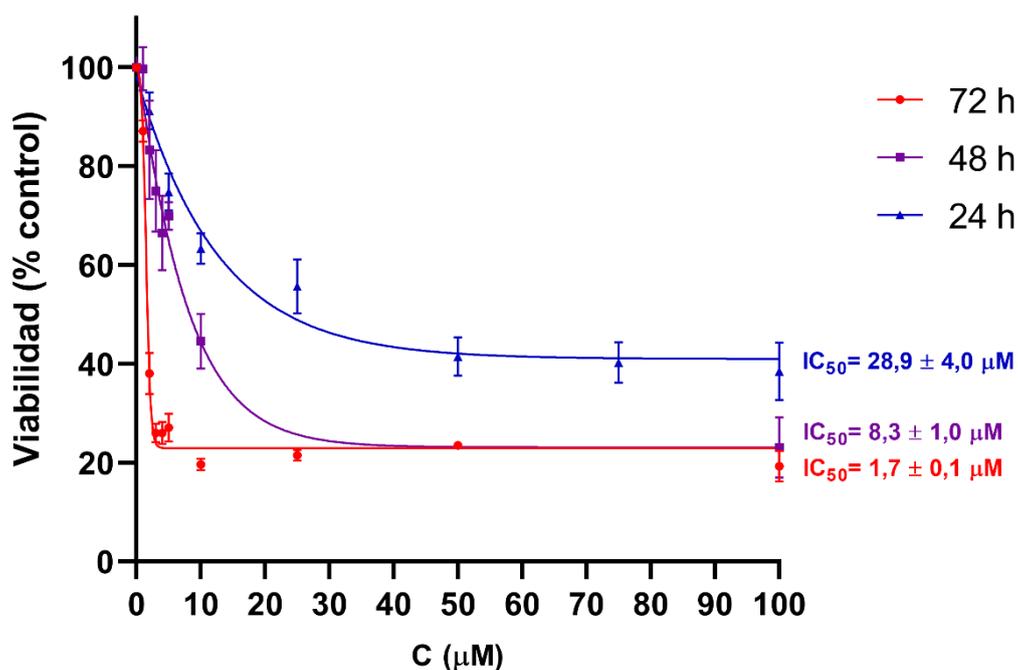


Figura 3-XVI. Viabilidad (MTT) de línea A549 luego de incubación a 24, 48 y 72 horas con concentraciones variables de VOCrisFen. Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Tabla 3-VI. Comparación entre los valores de IC₅₀ del catión oxidovanadio(IV), crisina, fenantrolina, VOCris y VOCrisFen, a 24, 48 y 72 horas. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron a partir de la curva dosis-respuesta generada mediante una regresión logística, y se expresan como la media \pm límites del intervalo de confianza 95%.

	IC ₅₀ (μM)		
	24 h	48 h	72 h
VO⁺²	>100	>100	8,7 \pm 0,6
Crisina	>100	66,4 \pm 4,9	37,3 \pm 3,5
Fenantrolina	66,1 \pm 3,4	23,9 \pm 2,5	1,9 \pm 0,5
VOCris	>100	41,2 \pm 3,9	6,1 \pm 1,2
VOCrisFen	28,9 \pm 4,0	8,3 \pm 1,0	1,7 \pm 0,1

La viabilidad celular de la línea HEK-293 (no tumoral) luego de 24 horas de incubación con VOCrisFen no se vio afectada, por lo que se puede concluir que el complejo actúa de forma selectiva sobre las células tumorales A549 (Figura 3-XVII).

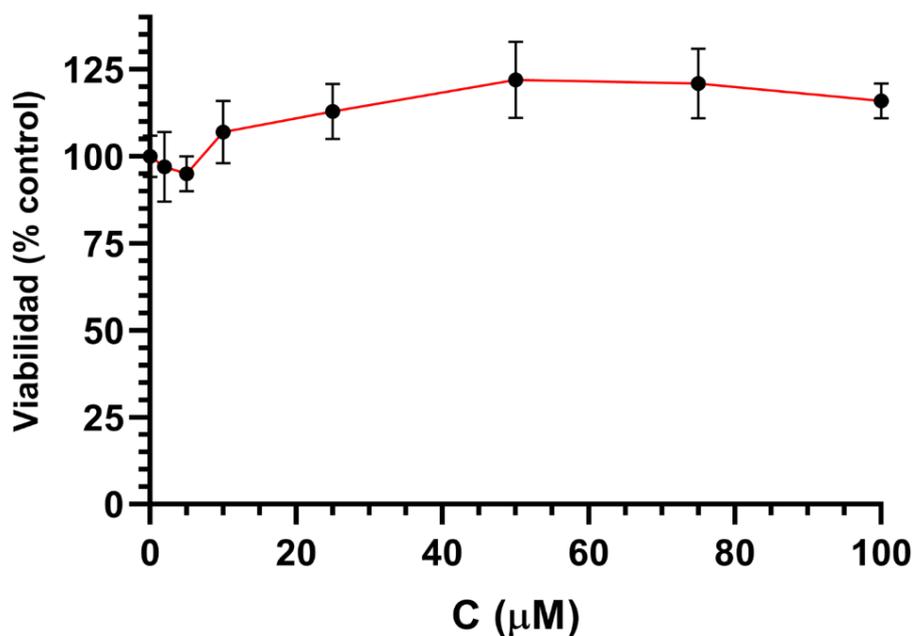


Figura 3-XVII. Viabilidad de la línea no tumoral HEK-293 luego de 24 horas de incubación con VOCrisFen. Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Ninguno de los puntos presentó una diferencia significativa respecto al control sin tratamiento.

3.2.4.2 Medida de especies reactivas de oxígeno

En el ensayo de producción de EROs a 24 horas de incubación se observó que el catión oxidovanadio(IV) no aumentó los niveles de EROs de manera significativa, mientras que el flavonoide crisina generó un pequeño aumento de estos. Se observó también que, en comparación, el complejo ternario presentó una mayor capacidad de generar EROs debido a la presencia de fenantrolina en su esfera de coordinación, la cual mostró ser prooxidante (Figura 3-XVIII).

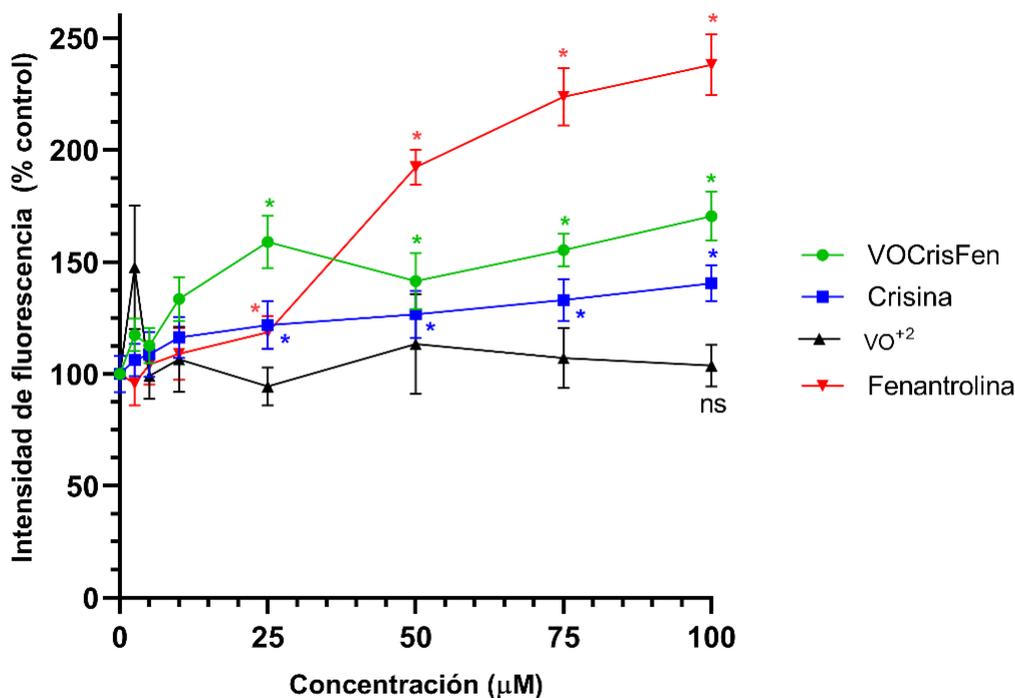


Figura 3-XVIII. Efecto de crisina, VOCrisFen, fenantrolina y catión oxidovanadio (IV) sobre la oxidación de H2DCFDA a DCF. Las células A549 se incubaron a 37 °C en presencia de H2DCFDA 10 µM. Los resultados se expresan como la media ± SEM de tres experimentos independientes. * p < 0,05; ns: no significativo.

3.2.4.3 Determinación de los niveles de glutatión oxidado y reducido

Para ampliar el estudio del estado redox de las células, se midió el contenido de GSH en la línea A549 después de la incubación con VOCrisFen durante 24 horas (Figura 3-XIX.A), viéndose una disminución respecto al nivel basal. Para demostrar que dicha disminución no fue debida a un número menor de células en las concentraciones citotóxicas, se evaluó la acumulación de GSSG y se calculó la relación GSH/GSSG, que resulta independiente del número de células (Figura 3-XIX.B). Se puede concluir que el daño celular en la línea celular A549 se manifestó por niveles elevados de EROs que exceden los mecanismos de defensa que inducen la oxidación de GSH con la consiguiente reducción de GSH celular. Por lo tanto, se podría asumir un mecanismo de estrés oxidativo para la actividad citotóxica de VOCrisFen.

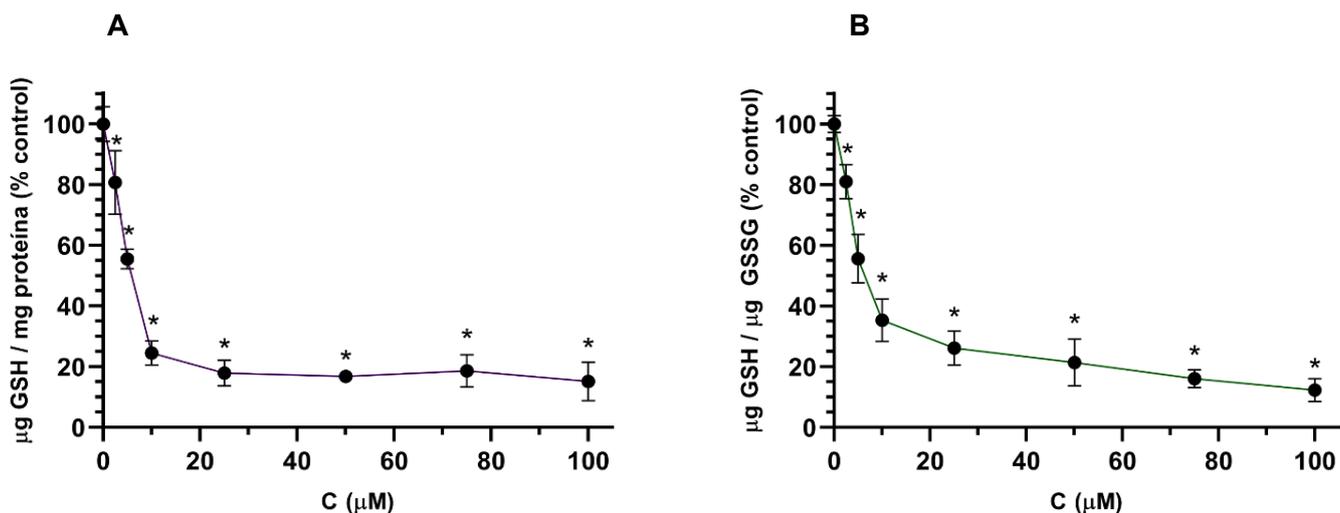


Figura 3-XIX. Efecto de VOCrisFen sobre los niveles de glutatión normalizado por contenido de proteínas (A) y la relación GSH/GSSG (B) en células A549, 24 h de incubación. Los resultados se expresan como la media del porcentaje del control \pm SEM para tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

3.2.4.4 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

La pérdida de la función mitocondrial y la posterior liberación de citocromo C al espacio intracelular son algunos de los mecanismos asociados al proceso de apoptosis²³. Los niveles elevados de EROs intracelulares pueden alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que además provoca una retroalimentación positiva donde hay una mayor liberación de EROs desde el interior de la mitocondria²⁴. Este daño a la membrana se refleja en la pérdida de su potencial, el cual es necesario para cumplir las funciones relacionadas con el metabolismo celular y la generación de ATP, por lo que la despolarización de la membrana puede relacionarse con su pérdida de integridad. Con la finalidad de evaluar estos efectos, se realizaron las determinaciones del potencial de membrana mitocondrial utilizando el método descrito en la sección 2.4.4. La Figura 3-XX muestra la pérdida de potencial de membrana mitocondrial cuando las células A549 fueron tratadas con concentraciones crecientes de VOCrisFen (0 – 100 μM), que concuerda con los niveles de estrés oxidativo antes medidos.

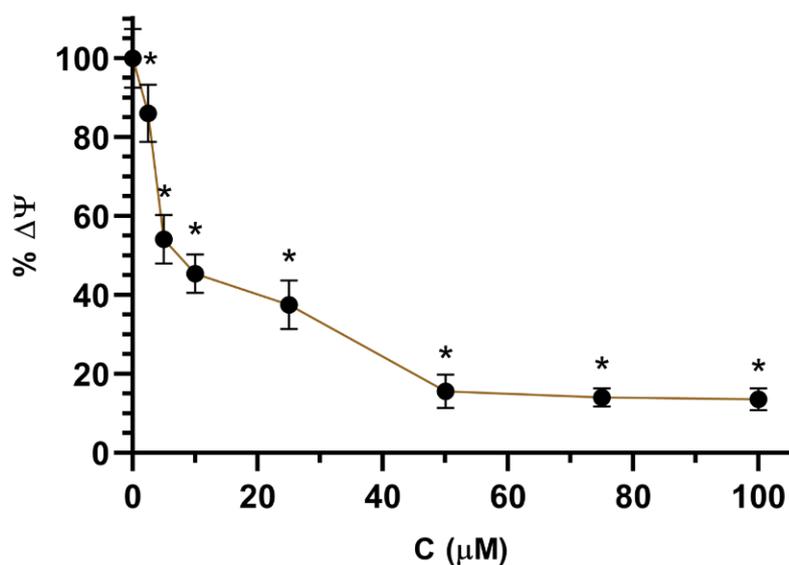


Figura 3-XX. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial (% $\Delta\psi$) en células A549 tratadas con concentraciones crecientes de VOCrisFen (0 – 100 μM) durante 24 h. Cada punto representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

3.3 Discusión

Para mejorar la acción biológica del complejo VOCris, se reemplazó en la esfera de coordinación del metal un ligando crisina por el ligando planar fenantrolina. El nuevo complejo, VOCrisFen, se caracterizó mediante técnicas analíticas habituales. La espectroscopía FTIR indicó que el ion oxidovanadio(IV) interactúa con los grupos C=O y C(5)-O⁻ de crisina y los átomos de N de fenantrolina. Los estudios de conductividad indicaron que el ion cloruro, que contribuye a la electroneutralidad del complejo, está unido al grupo V=O en posición trans (determinaciones de RPE en solución). Las medidas espectrales y de conductividad en DMSO y DMSO/H₂O mostraron que el complejo no produjo especies hidrolíticas durante el tiempo de manipulación requerido para los estudios biológicos. Cabe señalar que, al evaluar la estabilidad para los ensayos en células, también se deberían considerar los componentes celulares (incluidos los compuestos antioxidantes naturales que podrían retrasar la oxidación del complejo). Sin embargo, la determinación de la especiación en solución acuosa del complejo dentro de la célula está fuera del alcance de este estudio.

Existen estudios previos donde los efectos observados en un complejo se relacionan con su descomposición en el medio de cultivo celular, resultando en la liberación de los ligandos y la oxidación del vanadio, como es el caso del compuesto cis-

[V^{IV}O(OSO₃)(fen)₂] a las 72 h de incubación en la línea celular A549²⁵. A partir de los datos de la Tabla 3-VI, podemos descartar que el efecto citotóxico de VOCrisFen se deba a ligandos fenantrolina y/o crisina generados luego de procesos de descomposición al menos hasta las 24 h de incubación, debido a que VOCris y crisina no mostraron efectos deletéreos, mientras que el valor de IC50 para fenantrolina fue 66 μM, correspondiente a más del doble del valor de IC50 del complejo.

Es sabido que la sobreproducción de EROs es la causa del desarrollo de numerosas enfermedades. La acumulación excesiva de EROs y el agotamiento de compuestos antioxidantes naturales como el GSH pueden causar daño celular irreversible e incluso la muerte celular²⁶. Para VOCrisFen, determinamos que el mecanismo involucrado en el proceso de muerte celular es la inducción de estrés oxidativo acompañado de la alteración del potencial de membrana mitocondrial. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial está relacionada con la activación de las vías de apoptosis mitocondrial. Por otro lado, la presencia del ligando lipofílico fenantrolina en la esfera de coordinación del catión oxidovanadio(IV) favoreció la captación celular del vanadio (Tabla 3-V), lo que contribuyó al mayor efecto citotóxico respecto al observado para el complejo binario VOCris.

Finalmente se puede concluir que el nuevo compuesto VOCrisFen sería capaz de unirse a ASB de forma espontánea e impulsada por el cambio de entalpía, con una afinidad adecuada para su transporte y liberación en el organismo (valores de K_b en el rango de 10⁴ a 10⁶ M⁻¹).

3.4 Introducción – Complejo antitumoral de Zn(II)

Como fue mencionado en la sección 2.4.1, la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se caracteriza como triple negativa, es decir, que no sobreexpresa el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y carece de la expresión de los receptores de estrógeno (ER) y de progesterona (PR). Estos receptores son blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama, por lo que las células tumorales triple negativas son difíciles de eliminar y suelen ser altamente invasivas. Esta dificultad ha impulsado el desarrollo de diversas estrategias de tratamiento, incluyendo quimioterapia, inmunoterapia y conjugados de anticuerpo-fármaco²⁶.

Carbidopa (CD, Figura 3-XXI), ácido (2S) - 3 - (3,4 - dihidroxifenil) - 2 - hidrazinil - 2 - metilpropanoico, es un medicamento anti-Parkinsoniano usado en tratamientos sintomáticos que, debido a su acción inhibitoria de la enzima Dopa Descarboxilasa, se coadministra con L-dopa para asegurar que esta última llegue intacta al cerebro y pueda ser convertida en dopamina (ver sección 5.1). Además, debido a su similitud estructural con fenilhidrazina, CD puede funcionar como agonista del receptor nuclear de hidrocarburos aromáticos (AhR). Se ha observado que la activación de este receptor induce la supresión tumoral en algunos cánceres de mama, colon y páncreas²⁷. CD es eficaz para inhibir el crecimiento y proliferación de las líneas celulares de cáncer de próstata y mama AR-positivas (que expresan receptor de andrógenos) LNCaP y MCF-7, respectivamente, pero no afecta a las células de cáncer de próstata AR-independientes DU145 y PC3^{28,29}. Estudios *in vitro* han demostrado que CD inhibe el crecimiento tumoral promoviendo la degradación del receptor de estrógeno (ER) en la línea celular MCF-7 ER α -positiva. *In vivo*, CD suprimió el crecimiento de células de cáncer de mama ER-positivas en modelos de xenoinjertos en ratones^{30,31,32}.

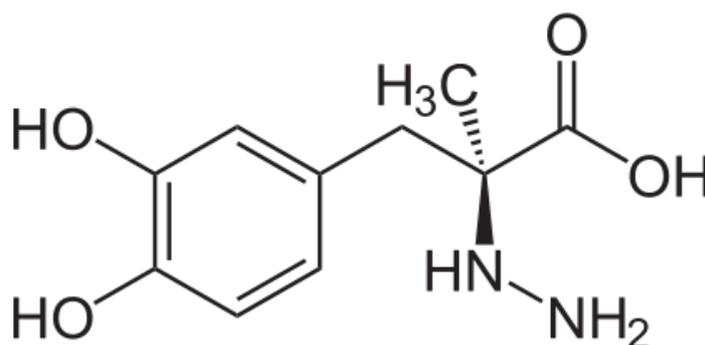


Figura 3-XXI. Estructura de carbidopa.

Como se mencionó en la Sección 1.1.3.2, la deficiencia de Zn puede conducir a un estado de estrés oxidativo que puede desencadenar numerosas enfermedades. Además, como se discutió en la sección 1.2.2, niveles altos de EROs pueden conducir a mutaciones en el ADN que conlleven a la aparición de células neoplásicas. Como un ácido de Lewis fuerte, Zn(II) puede interactuar con bases de Lewis para formar diversos compuestos con diferentes números de coordinación. Se ha informado que los complejos metálicos de Zn(II) poseen potenciales actividades antitumorales, exhibiendo baja toxicidad y efectos secundarios mínimos^{33, 34}.

En este trabajo se propuso mejorar los efectos biológicos de CD modificando su estructura a través de la complejación con Zn(II), logrando así efectos sinérgicos. Se

llevó a cabo la síntesis y caracterización fisicoquímica del complejo $[\text{ZnCD}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ZnCD). Luego, evaluamos sus efectos anticancerígenos, antimetastásicos y su mecanismo de acción sobre la línea MDA-MB-231, y los comparamos con los efectos observados para el ligando precursor CD. Además, examinamos su interacción con ASB para determinar si los compuestos podrían unirse, ser transportados y liberados de manera reversible por la proteína.

3.5 Resultados

3.5.1 Síntesis del complejo $[\text{ZnCD}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ZnCD)

Se preparó una solución de CD disolviendo 0,5 mmol en 40 mL de metanol anhidro. Luego se le incorporó, lentamente y con agitación, 1 mmol de ZnCl_2 en 700 μL de agua. La mezcla se mantuvo con agitación y burbujeo de nitrógeno gaseoso (para evitar la oxidación de CD) durante 4 horas, manteniendo constante el volumen mediante el agregado de metanol cuando fuera necesario. Se obtuvo el complejo ZnCD (Figura 3-XXII) en forma de precipitado blanco que fue filtrado, lavado con metanol y agua, y secado con una corriente de nitrógeno gaseoso.

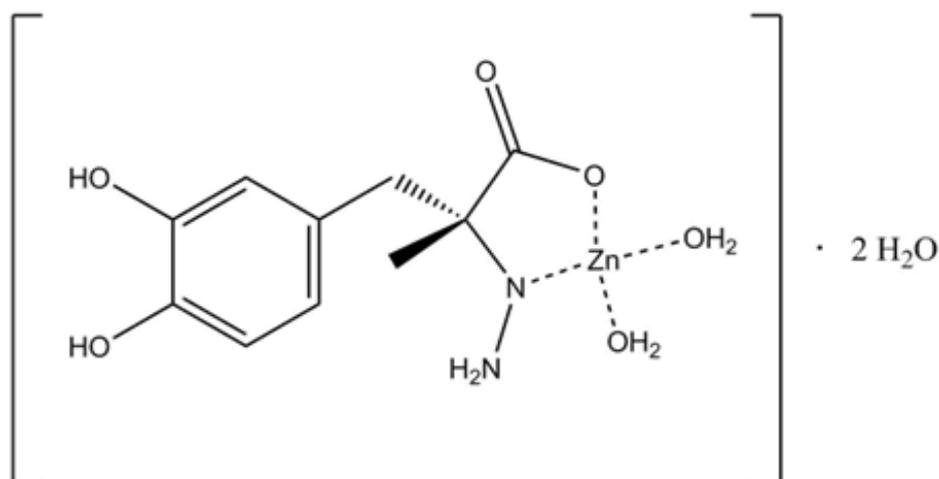


Figura 3-XXII. Estructura del complejo $[\text{ZnCD}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ZnCD).

3.5.2 Caracterización fisicoquímica

Estudios en fase sólida

3.5.2.1 Análisis elemental

El análisis elemental realizado para el compuesto ZnCD mostró porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno consistentes con los porcentajes teóricos esperados para la fórmula $C_{10}H_{20}N_2O_8Zn$ propuesta. El contenido de zinc determinado por el método espectrofotométrico de Zincon (ver sección 2.2.4.1) fue similar al calculado (Tabla 3-VII).

Tabla 3-VII. Porcentajes elementales esperados (de acuerdo a la fórmula $C_{10}H_{20}N_2O_8Zn$) y obtenidos para ZnCD.

Elemento	% Calculado	% Experimental
C	33,2	33,1
N	7,7	7,6
H	5,6	5,5
Zn	18,1	18,2

3.5.2.2 Análisis termogravimétrico

El TGA para ZnCD (Figura 3-XXIII; atmósfera de oxígeno, 50 mL/min) mostró la pérdida de dos moléculas de agua de hidratación (calc. 10,9%; exp. 9,8% hasta 172 °C) y dos moléculas de agua de coordinación (calc. 10,9%; exp. 10,8% hasta 207 °C). El porcentaje del residuo final a 600 °C (22,5%) coincide con el calculado para la formación de ZnO (22,5%). Dicha identidad fue confirmada mediante espectroscopía FTIR (Figura 3-XXIV).

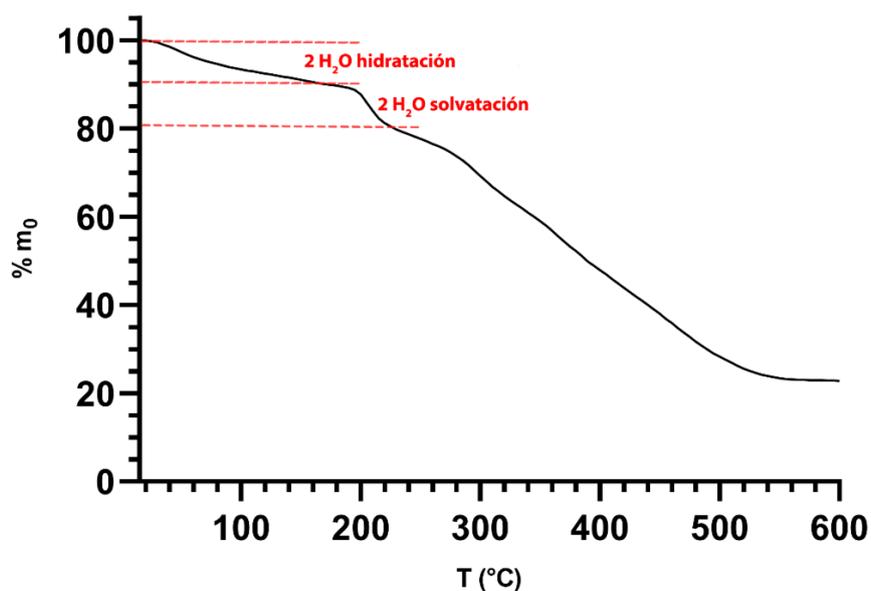


Figura 3-XXIII. Curva del TGA de la descomposición de ZnCD.

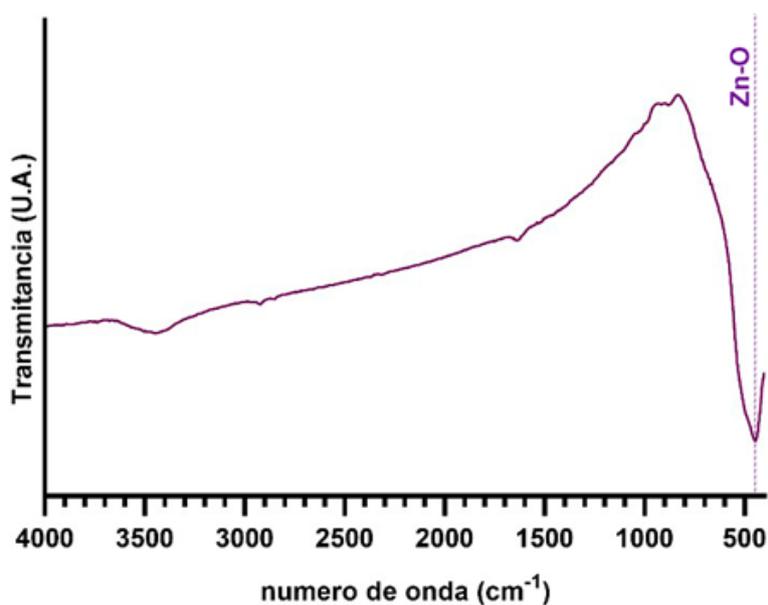


Figura 3-XXIV. FTIR del residuo de la termogravimetría de ZnCD, el cual coincide con el del compuesto ZnO.

3.5.2.3 Espectroscopía FTIR

Los espectros FTIR de CD y ZnCD se muestran en la Figura 3-XXV. El espectro FTIR de CD exhibe bandas fuertes y anchas entre 3000 y 2400 cm⁻¹, que se atribuyen a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos COO···H···NH. La banda intensa

localizada en 3531 cm^{-1} se desplazó a 3432 cm^{-1} al formarse el complejo, mientras que las bandas asociadas con los puentes de hidrógeno intraligando desaparecieron.

Para el compuesto relacionado con CD, L-dopa, el estiramiento $\nu\text{C}=\text{O}$ del grupo COOH aparece a 1656 cm^{-1} (ver sección 5.2.2.3), indicando la presencia de un doble enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo carboxílico³⁵. En CD, sin embargo, esta banda se divide en dos nuevas, localizadas en 1604 cm^{-1} y 1405 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de estiramiento antisimétrico y simétrico del grupo carboxilato. Este desdoblamiento sugiere la desprotonación del ácido y la formación de su anión COO^- , consistente con su estructura zwitteriónica^{36,37}. En el caso de ZnCD , estas bandas se observaron a 1604 cm^{-1} y 1394 cm^{-1} , indicando una coordinación monodentada a través de dicho grupo de acuerdo al valor calculado para $\Delta\nu=199\text{ cm}^{-1}$.

La banda asociada con el movimiento de flexión del grupo C-OH , que se encuentra a 1242 cm^{-1} en CD, se mantuvo en 1236 cm^{-1} después de la formación del complejo, indicando que el grupo catecol no participa en la complejación con Zn .

Las bandas correspondientes a los modos de flexión NH y NH_3^+ en CD (1529 , 1371 y 1100 cm^{-1}) mostraron intensidades reducidas debido a la desprotonación del nitrógeno y su coordinación con el metal. El efecto de esta interacción también se evidencia en los modos de estiramiento $\nu\text{N-N}$ (1017 cm^{-1}) y $\nu\text{C-N}$ (1175 cm^{-1}), cuyas intensidades disminuyen notoriamente en ZnCD ³⁸.

En conjunto, estos datos espectrales sugieren que CD coordina con el ion Zn(II) a través de los grupos carboxilato y NH desprotonado.

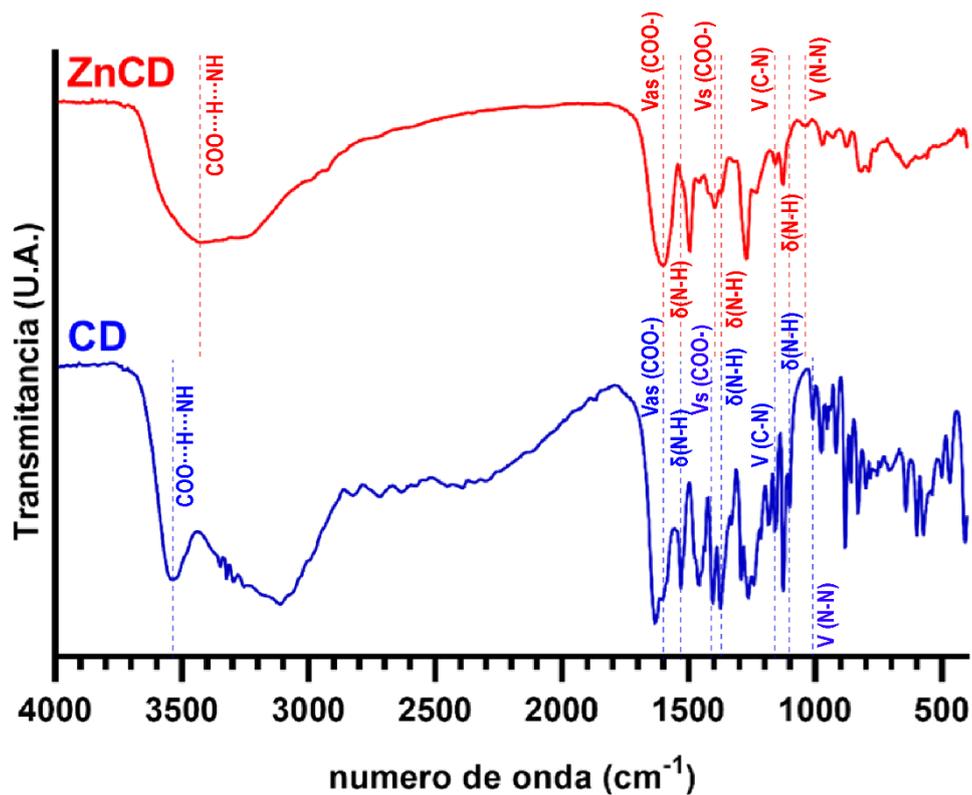


Figura 3-XXV. Espectros FTIR para CD y ZnCD.

Estudios en solución

3.5.2.4 Medidas de conductividad molar

La conductividad molar (Λ_m) de una solución 10^{-3} M de ZnCD en DMSO fue medida durante 4 h (Tabla 3-VIII). Se observó un valor constante de alrededor de $12 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, lo que indica que el complejo ZnCD es eléctricamente neutro y permanece sin disociación durante al menos 4 horas luego de su disolución en DMSO.

Tabla 3-VIII. Conductividad en función del tiempo para una solución 10^{-3} M de ZnCD en DMSO.

Tiempo (min)	Λ_m ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
0	12
10	11
20	13
40	11
120	12
180	12
240	11

3.5.2.5 Espectroscopía UV-Vis y medidas de estabilidad

La coordinación de CD y Zn(II) también se evidenció en el espectro electrónico medido para una solución 10^{-3} M de ZnCD en DMSO. En la región UV-visible, el espectro mostró una banda bien definida localizada en 286 nm, que se asigna a transiciones electrónicas propias del ligando. La solución de CD en DMSO mostró una banda con valor de longitud de onda máxima idéntica a la del complejo, pero un coeficiente de extinción molar menor (3234,6 vs. 3040,1 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

En la Figura 3-XXVI puede observarse la variación del espectro de ZnCD en el tiempo, a lo largo de 4 horas, que se midió para estudiar su estabilidad. Este se mantuvo relativamente estable durante el tiempo de manipulación del compuesto durante la preparación de los ensayos biológicos previstos (aproximadamente 30 minutos).

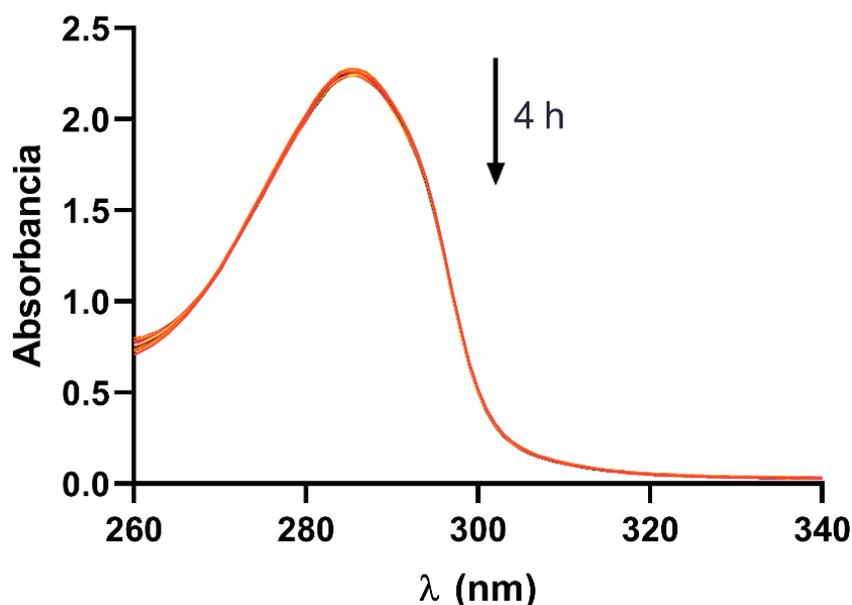


Figura 3-XXVI. Variación del espectro electrónico UV-Visible en el tiempo de una solución 10^{-3} M de ZnCD en DMSO.

3.5.2.6 Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN de ZnCD (cuyas asignaciones pueden verse en las Tabla 3-IX y Tabla 3-X) se compararon con datos publicados para CD^{39,40}. En el espectro ^1H RMN de ZnCD (Figura 3-XXVII) se observan los desplazamientos químicos de los grupos OH (8,67 y 8,86 ppm), sugiriendo que estos permanecieron intactos después de la complejación con el metal. Los desplazamientos químicos de los grupos COOH y NH_2 no pudieron ser determinados, posiblemente debido al intercambio de protones unidos a los átomos de O y N con los átomos de deuterio del solvente (d_6 -DMSO). No obstante, la banda del protón del grupo $(\text{C}_{\text{quiral}})\text{-NH-(NH}_2)$ de CD (5,20 ppm) desaparece al formarse el complejo, lo que indica la desprotonación e interacción de dicho nitrógeno con el Zn.

Los espectros de ^{13}C -RMN de ZnCD (Figura 3-XXVIII) muestran un corrimiento en el desplazamiento químico del grupo COO^- (174,9 ppm para CD y 177,2 ppm para ZnCD, muy débil), indicando una posible coordinación del anión carboxilato con el centro metálico. Además, el desplazamiento químico del átomo C_{quiral} se desplazó de 65,2 ppm (CD) a 66,3 ppm (ZnCD), sugiriendo que el nitrógeno unido a este, $(\text{C}_{\text{quiral}})\text{-NH-(NH}_2)$, interactúa con el centro metálico. Estos resultados concuerdan con los modos de coordinación observados en el análisis FTIR, y que se ilustran en la Figura 3-XXII.

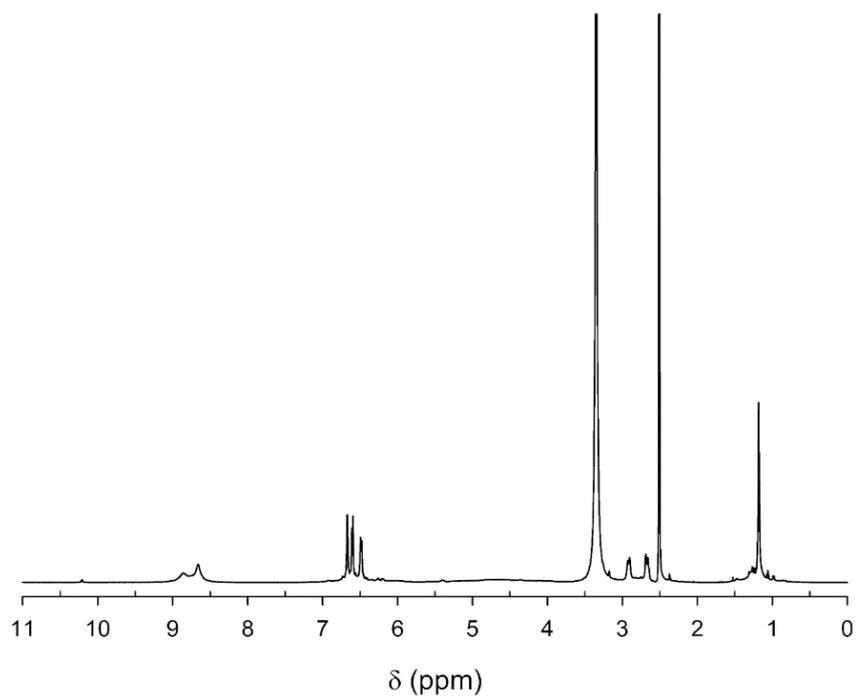


Figura 3-XXVII. Espectro ^1H RMN para ZnCD.

Tabla 3-IX. Asignaciones para las bandas observadas en el espectro ^1H RMN de ZnCD.

Desplazamiento δ (ppm)	Asignación
1,18	s, 3H, CH_3
2,79	dd, 2H, ArCH_2 ; $J_1 = 9$ Hz, $J_2 = 72$ Hz
3,35	s, 8H, H_2O
6,49	d, 1H, arom.; $J = 4.5$ Hz
6,60	d, 1H, arom.; $J = 4.5$ Hz
6,67	s, 1H, arom.
8,67	s, 1H, OH
8,86	s, 1H, OH

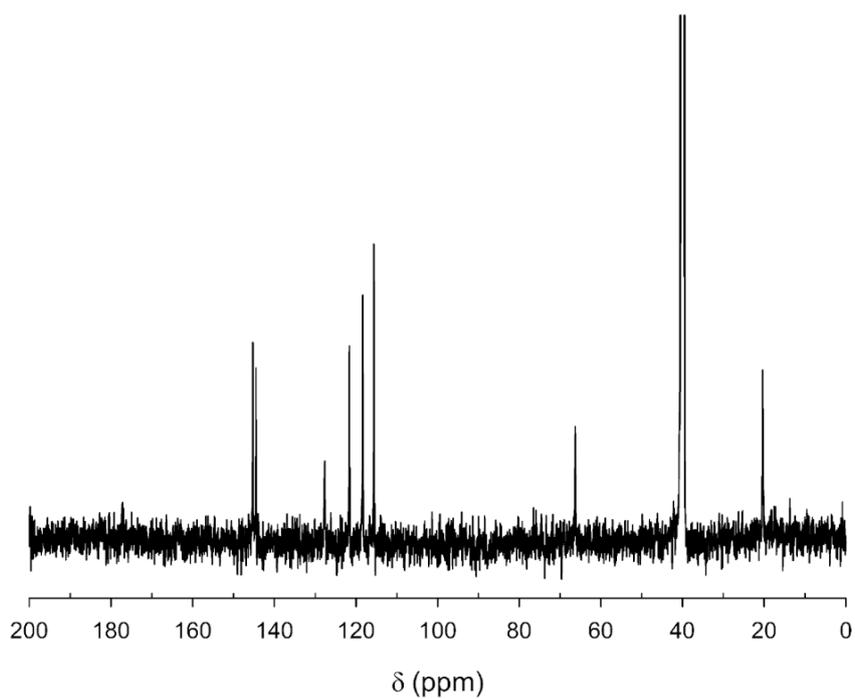


Figura 3-XXVIII. Espectro ^{13}C RMN para ZnCD.

Tabla 3-X. Asignaciones para las bandas observadas en el espectro ^{13}C de ZnCD.

Desplazamiento δ (ppm)	Asignación
20,30	CH_3
40,15	CH_2
66,26	C quiral
115,66	C arom.
118,32	C arom.
121,64	C arom.
127,61	C arom.
144,49	C arom.
145,28	C arom.
177,2	COOH

3.5.3 Ensayos de biodisponibilidad

3.5.3.1 Interacción con albúmina sérica bovina

El ensayo de interacción entre CD/ZnCD y ASB se realizó con concentraciones finales de los compuestos de 0, 30, 40, 50, 75 y 100 μM . En la Figura 3-XXIX se muestran los espectros de *quenching* de fluorescencia de ASB a 25, 30 y 37°C (298K, 303K, 310K, respectivamente). Dichas curvas se obtuvieron a partir de la desconvolución de la curva medida y la subsecuente resta de la contribución del compuesto (debido a que los espectros de ASB y CD/ZnCD se superponen, con máximos en 336 y 315 nm, respectivamente). Los valores máximos de fluorescencia de los espectros de *quenching* de ASB se utilizaron para calcular los parámetros K_{sv} , K_q , K_b y η (Tabla 3-XI) y los parámetros termodinámicos (Tabla 3-XII) de la interacción.

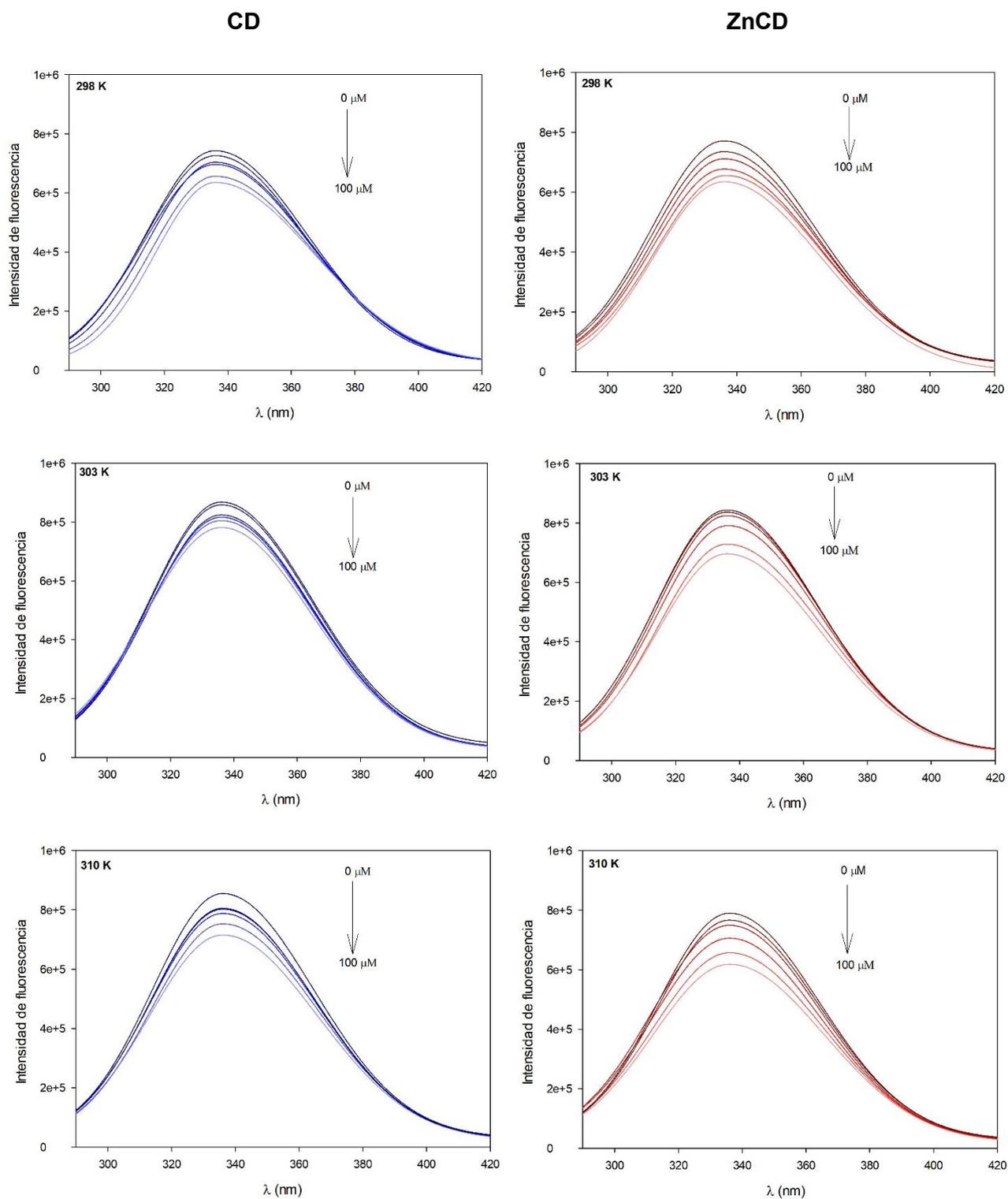


Figura 3-XXIX. Gráficos de *quenching* de fluorescencia para una solución de ASB 6 μM incubada por 1 hora con concentraciones crecientes (0, 30, 40, 50, 75 y 100 μM) de CD (Azul) o ZnCD (Rojo) a distintas temperaturas (298, 303 y 310 K).

A partir de la pendiente de los gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$; Figura 3-XXX) se obtuvieron las constantes K_{sv} y K_q^{41} . La linealidad de dichos gráficos a bajas concentraciones y los valores de K_q mayores a $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, como se discutió para VOCrisFen (Sección 3.2.3.1), son indicativos de que el tipo de *quenching* estático es el más probable para esta interacción.

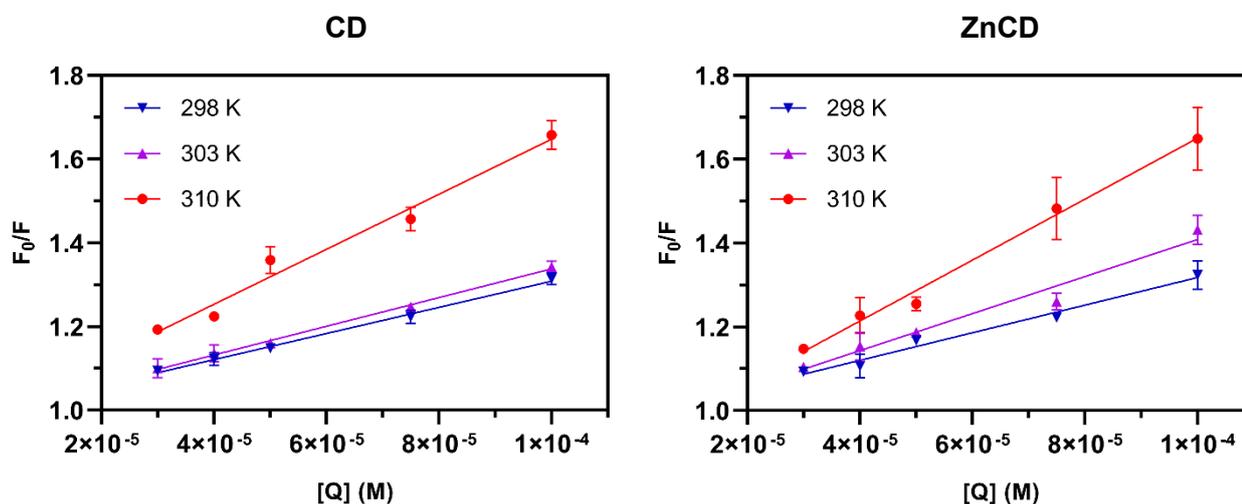


Figura 3-XXX. Gráfico de F_0/F vs $[Q]$ para la interacción ASB y CD/ZnCD a diferentes temperaturas (▼ 298K, ▲ 303K, ● 310K). Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

El número de sitios de unión y la constante de unión (K_b) de la interacción ASB y CD/ZnCD se obtuvieron del gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ (Figura 3-XXXI). Se puede observar que las constantes de unión de ambos compuestos aumentan con el aumento de la temperatura. Además, ZnCD muestra una unión más fuerte con ASB que CD. El número de sitios de unión resultó ser de aproximadamente 1 en ambos casos. Los valores de K_b obtenidos para CD y ZnCD se encuentran dentro del rango de $10^3 - 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que sugiere una afinidad moderada de estos compuestos por ASB, pudiendo así ser almacenados, transportados y liberados de la proteína en el organismo.

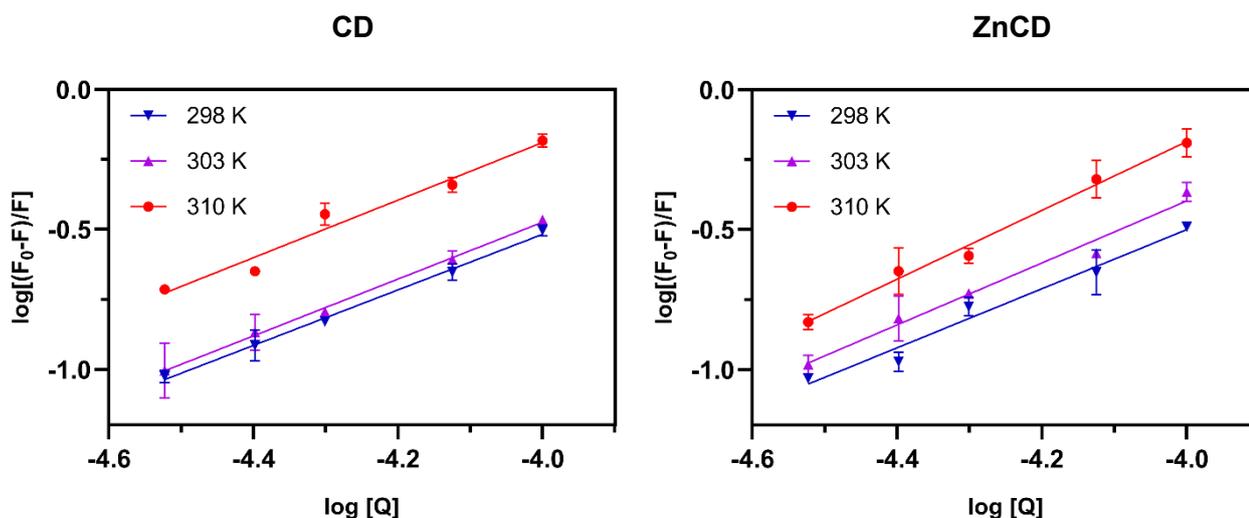


Figura 3-XXXI. Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ de la interacción entre ASB y CD/ZnCD a diferentes temperaturas (∇ 298K, \blacktriangle 303K, \bullet 310K). Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Los parámetros termodinámicos fueron calculados a partir de la ecuación de van't Hoff. Se obtuvieron valores negativos de ΔG para ambos compuestos a las tres temperaturas, por lo que se presenta una interacción espontánea con ASB en todos los casos. Tanto para CD como para ZnCD, los cambios en entalpía y entropía resultaron positivos. Esto concuerda con una asociación hidrofóbica, en la cual se produce una enmascaración parcial de la región no polar de dichos compuestos por interacción con ASB, lo que produce una desestructuración del agua y un consecuente aumento en la entropía del sistema²¹.

Tabla 3-XI. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular de quenching (K_q), constante de unión (K_b) y números de sitio de unión (η) para la interacción entre ASB y CD/ZnCD a diferentes temperaturas.

	T (K)	K_{sv} ($\times 10^3 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{11} M^{-1}s^{-1}$)	$\log K_b$	K_b ($\times 10^3 M^{-1}$)	η
CD	298	$3,12 \pm 0,13$	3,12	$3,46 \pm 0,20$	$2,88 \pm 0,17$	$1,00 \pm 0,05$
	303	$3,44 \pm 0,18$	3,44	$3,61 \pm 0,37$	$4,07 \pm 0,42$	$1,02 \pm 0,09$
	310	$6,58 \pm 0,43$	6,58	$3,93 \pm 0,31$	$8,51 \pm 0,67$	$1,03 \pm 0,07$
ZnCD	298	$3,30 \pm 0,26$	3,30	$3,73 \pm 0,43$	$5,37 \pm 0,62$	$1,06 \pm 0,10$
	303	$4,42 \pm 0,35$	4,42	$4,04 \pm 0,33$	$10,96 \pm 0,90$	$1,11 \pm 0,08$
	310	$7,27 \pm 0,56$	7,27	$4,74 \pm 0,37$	$54,95 \pm 4,29$	$1,23 \pm 0,08$

Tabla 3-XII. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y CD/ZnCD a diferentes temperaturas.

	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	T (K)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
CD	60,43	0,27	298	-19,73
			303	-21,08
			310	-22,96
ZnCD	129,91	0,51	298	-20,95
			303	-23,48
			310	-27,03

3.5.4 Estudios de actividad antitumoral *in vitro*

3.5.4.1 Ensayo de viabilidad (MTT)

Inicialmente, se probaron los efectos de 24 horas de incubación con ZnCD 100 μ M en diferentes líneas celulares (Figura 3-XXXII). El complejo no ejerció efectos deletéreos en células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), células de cáncer de colon humano (HCT116) y células de cáncer de mama murino (LM3). Por el contrario, la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 sufrió una disminución significativa de su viabilidad, por lo que fue elegida para realizar los estudios posteriores.

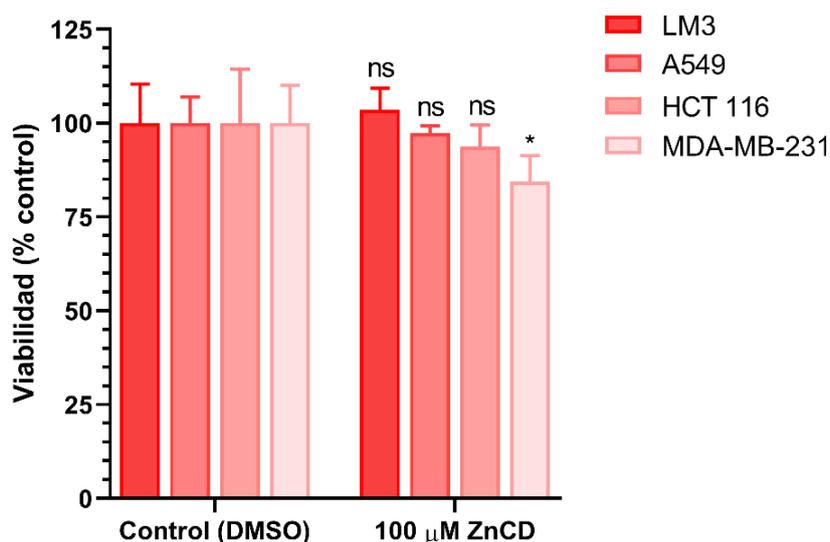


Figura 3-XXXII. Efecto de 24 horas de incubación con ZnCD 100 μ M sobre las líneas tumorales LM3, A549, HCT 116 y MDA-MB-231. Los resultados son expresados como la media del porcentaje de viabilidad respecto al control \pm SEM. *: $p < 0,5$ respecto al control (0,5% DMSO); ns: diferencias no significativas.

Como se mencionó anteriormente, MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama triple negativa que carece de la sobreexpresión del receptor HER2, y de la expresión de los receptores ER y PR, lo cual limita las opciones terapéuticas. Estas células exhiben invasividad *in vitro* y metastatizan a los ganglios linfáticos *in vivo*.

Para evaluar la citotoxicidad tanto del ligando como del complejo en la línea celular MDA-MB-231, se evaluaron los efectos de estos compuestos mediante el ensayo de MTT (Figura 3-XXXIII). La viabilidad celular disminuyó de manera dosis-dependiente, y la complejación con Zn(II) mejoró las propiedades anticancerígenas del ligando; las IC50 resultaron ser $206,28 \pm 3,16 \mu\text{M}$ para CD y $151,48 \pm 2,99 \mu\text{M}$ para ZnCD. Se evaluó también el efecto de ZnCl_2 sobre la viabilidad para asegurar que el aumento en la citotoxicidad de ZnCD no fue debido a la presencia del catión Zn(II). Se observó que dicha especie no presenta efectos deletéreos hasta $300 \mu\text{M}$ (Figura 3-XXXIV).

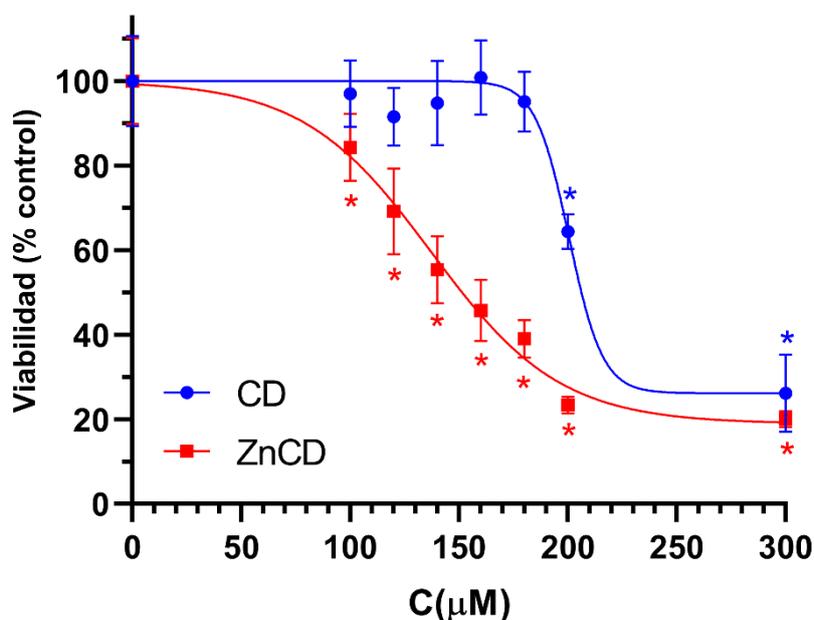


Figura 3-XXXIII. Viabilidad de la línea tumoral MDA-MB231 frente a 24 horas de incubación con concentraciones variables (0 - 300 μM) de CD y ZnCD. *: $p < 0,5$ respecto al control (0,5 % DMSO).

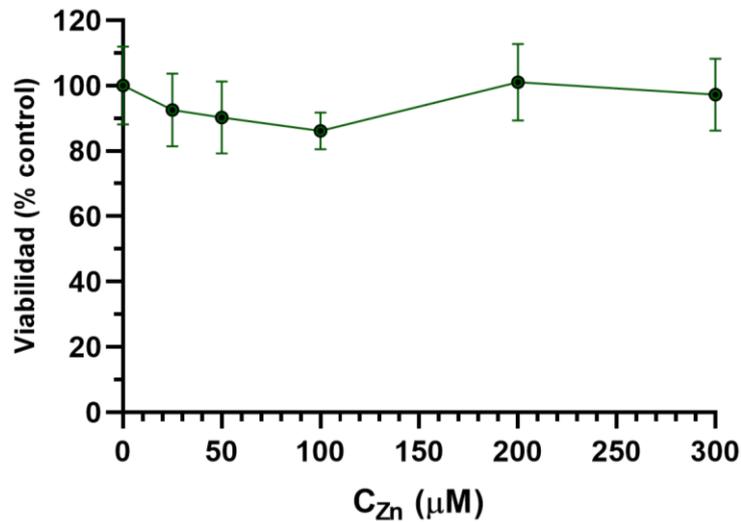


Figura 3-XXXIV. Viabilidad de la línea tumoral MDA-MB231 frente a 24 horas de incubación con concentraciones variables (0 - 300 μM) de $ZnCl_2$. Ningún punto fue significativamente diferente al control.

También se evaluó la acción del complejo ZnCD sobre la línea celular no tumoral HEK293 para determinar si los efectos citotóxicos presentan selectividad para células tumorales. Los resultados (Figura 3-XXXV) mostraron que ZnCD no afecta la viabilidad de la línea normal (hasta 200 μM , concentración mayor a la IC50 en la línea MDA-MB-231).

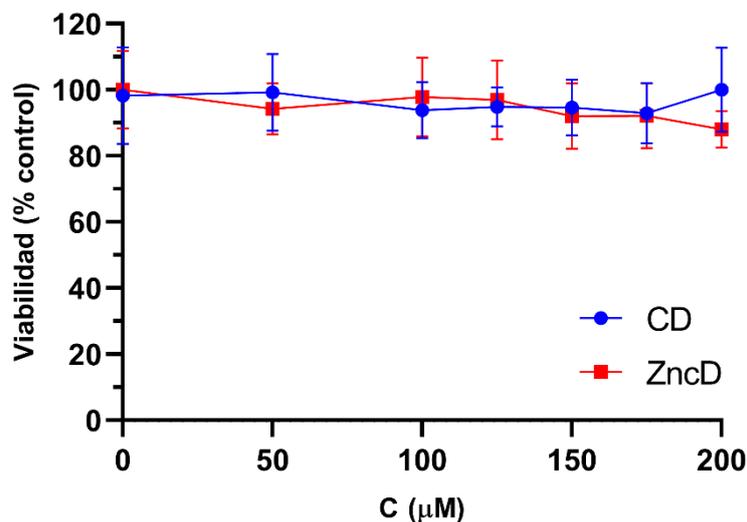


Figura 3-XXXV. Viabilidad de la línea no tumoral HEK293 frente a 24 horas de incubación con concentraciones variables (0 - 200 μM) de ZnCD. Ningún punto fue significativamente diferente al control.

Existe evidencia experimental que vincula al receptor de hidrocarburos de arilo, AhR, con la alteración de diversos procesos celulares como proliferación celular, apoptosis, diferenciación, promoción de tumores, reproducción y respuesta inmune⁴². Un

antagonista competitivo del receptor AhR que crea un complejo ligando-receptor inactivo⁴³ es el compuesto α -naftoflavona (α NF). Resultó interesante comprobar si la acción citotóxica de CD y ZnCD observada sobre MDA-MB-231 era resultado del agonismo del receptor AhR. Para evaluarlo, se realizó un ensayo de MTT coincubando durante 24 horas concentraciones variables de CD/ZnCD y α NF 50 μ M. Los resultados (Figura 3-XXXVI) demostraron que la citotoxicidad no se vio afectada por la presencia de α NF, lo que indicaría que el mecanismo de muerte celular no está relacionado con el agonismo del receptor AhR por parte del ligando ni del complejo.

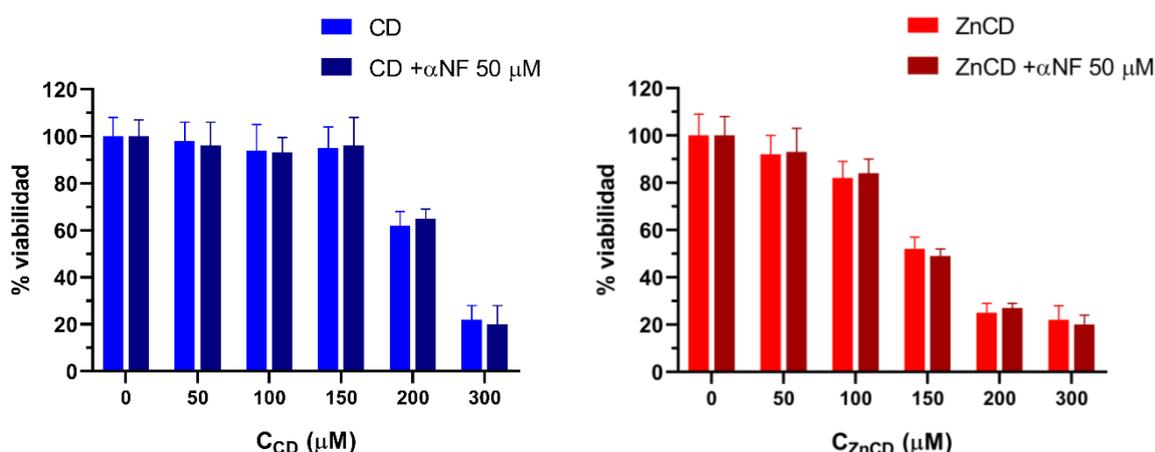


Figura 3-XXXVI. Efecto de la coincubación de concentraciones variables de CD/ZnCD y α NF sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de viabilidad del control \pm SEM para tres experimentos independientes.

No se vieron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de α NF en ningún caso.

Para estudiar más a fondo la posible vía citotóxica, investigamos los efectos de los compuestos en la morfología celular, el estado redox (mediante la medición de los niveles de EROs y GSH/GSSG), la inhibición de la muerte celular inducida por H_2O_2 y la alteración del potencial de membrana mitocondrial.

3.5.4.2 Medidas de especies reactivas de oxígeno

Las propiedades antioxidantes de CD se han documentado en células de neuroblastoma⁴⁶, en linfocitos de sangre periférica, y mediante el ensayo antioxidante Trolox⁴⁴. Se ha demostrado que CD interactúa con la vía intracelular antioxidante, lo que lleva a una regulación positiva de la expresión de enzimas antioxidantes. Hemos encontrado resultados similares al medir los niveles de EROs en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 horas de incubación con CD y ZnCD. Ambos compuestos

provocaron una disminución en los niveles de EROs, como se ilustra en la Figura 3-XXXVII.A, lo que sugiere que la muerte celular puede ocurrir a través de mecanismos de estrés reductivo. De manera consistente, los niveles de EROs se vieron disminuidos luego de la incubación con CD/ZnCD por 4 horas (Figura 3-XXXVII.B).

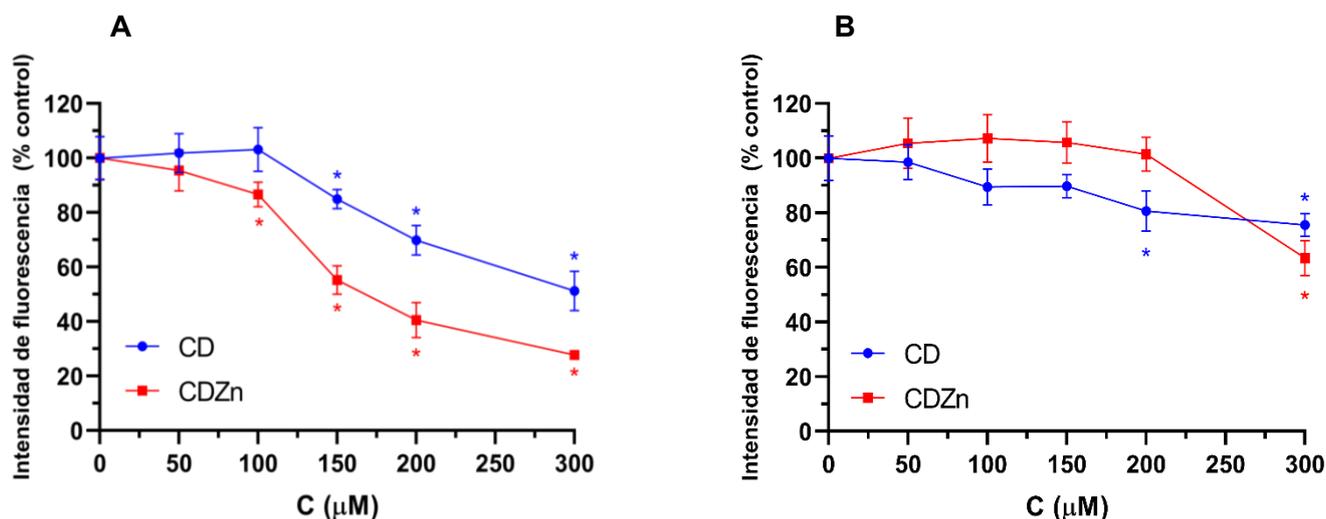


Figura 3-XXXVII. Efectos de la incubación con concentraciones variables (0 – 300 µM) de CD y ZnCD en los niveles de EROs intracelulares. **A**: 24 h de incubación. **B**: 4 h de incubación. *: $p < 0,5$ respecto al control (0,5% DMSO).

3.5.4.3 Determinación de los niveles de glutatión oxidado y reducido

Se midió el contenido de GSH y GSSG en la línea celular MDA-MB-231 después de la incubación con CD y ZnCD durante 24 horas, y se calculó el cociente GSH/GSSG (Figura 3-XXXVIII). Se observó un aumento de dicho cociente, lo que apoya la hipótesis de la muerte celular por estrés reductivo propuesta a partir de la medida de los niveles de EROs. Los efectos observados para ZnCD fueron más pronunciados que para CD, lo cual concuerda con la mayor citotoxicidad del complejo en MDA-MB-231.

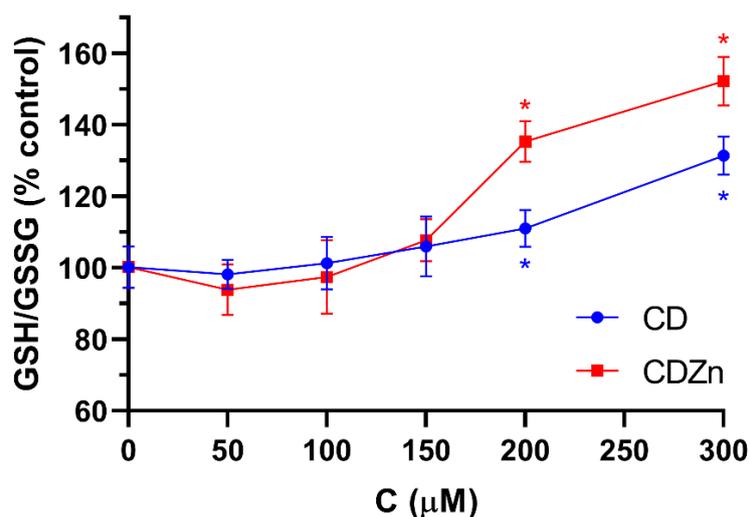


Figura 3-XXXVIII. Efecto de 24 h de incubación con concentraciones variables (0 – 300 μM) de CD y ZnCD sobre el cociente GSH/GSSG en células MDA-MB-231. Los resultados se expresan como la media del porcentaje del control \pm SEM para tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

3.5.4.4 Protección frente a la muerte celular inducida por H_2O_2

Se ha observado con anterioridad que CD presenta efectos antioxidantes⁴⁴. Por otra parte, se ha demostrado que compuestos de estas características son capaces de lograr la muerte celular de líneas tumorales mediante la generación de un estado de estrés reductivo⁴⁵. Decidimos, por lo tanto, evaluar la capacidad del ligando y el complejo para actuar como antioxidante en el interior de las células MDA-MD-231 a través de su capacidad para secuestrar EROs y evitar así la muerte celular inducida por H_2O_2 . Los resultados obtenidos (Figura 3-XXXIX) mostraron que ambos compuestos poseen dicho efecto, siendo más pronunciado en ZnCD que en CD (se necesitó ZnCD 100 μM para revertir de manera significativa la muerte, mientras que el mismo efecto se logró con CD 150 μM).

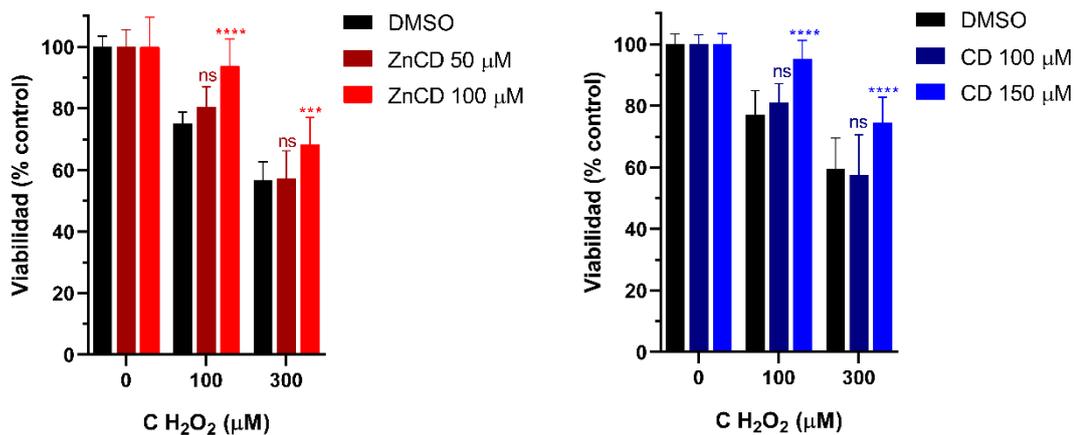


Figura 3-XXXIX. Ensayo de viabilidad celular (MTT) con 24 horas de co-incubación con H₂O₂ y CD/ZnCD en concentraciones variables. Los resultados se expresan mediante el porcentaje de absorbancia respecto al control sin H₂O₂ y sin CD/ZnCD ± SEM para tres experimentos independientes. ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001 (diferencias respecto a la condición sin CD/ZnCD (DMSO) a la concentración de H₂O₂ correspondiente).

3.5.4.5 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Se evaluaron los efectos de 24 horas de incubación con CD y ZnCD sobre el potencial de membrana mitocondrial de células MDA-MB-231. Como se muestra en la Figura 3-XL, tanto el ligando como el complejo indujeron la despolarización mitocondrial, lo que podría conducir al desarrollo de procesos apoptóticos, tal y como se discutió en la Sección 3.3. ZnCD provocó cambios significativos a una concentración menor que CD (150 y 300 μM, respectivamente), lo cual concuerda con los niveles de viabilidad, EROs y GSH/GSSG medidos previamente. Todos estos resultados evidencian la potenciación de CD como compuesto anticancerígeno luego de la complejación con Zn(II).

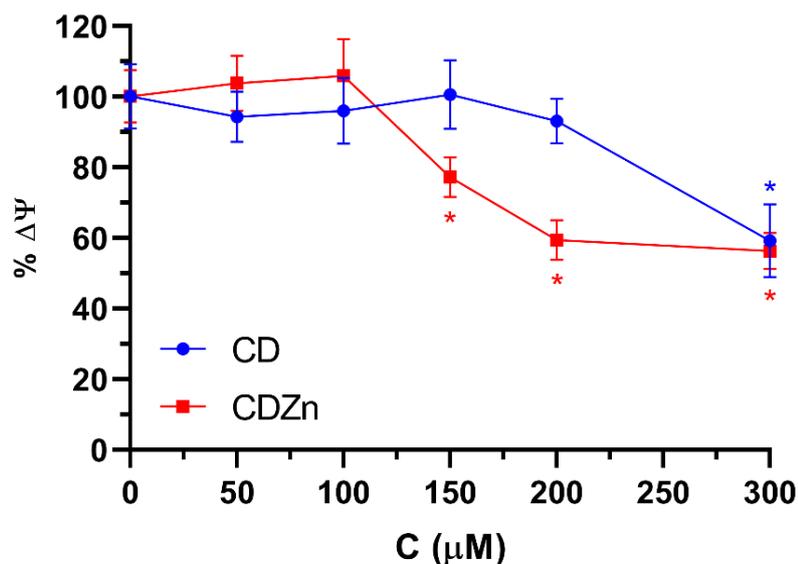


Figura 3-XL. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial (% $\Delta\psi$) en células MDA-MB-231 tratadas con concentraciones variables (0 – 300 μM) de CD y ZnCD durante 24 h.

Cada punto representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *: $p < 0,05$ respecto al control.

3.5.4.6 Análisis de morfología

Los efectos morfológicos de los compuestos estudiados en la línea celular MDA-MB-231 se evaluaron mediante el ensayo de tinción con cristal violeta (ver sección 2.4.2). A partir de las fotografías obtenidas (Figura 3-XLI), puede observarse que las células MDA-MB-231 no tratadas exhiben su morfología epitelial característica y apariencia fusiforme (larga y delgada). En comparación, el tratamiento con CD 151,5 μM no indujo cambios morfológicos apreciables. Sin embargo, después de 24 horas de tratamiento con ZnCD a su valor de IC50 (151,5 μM), hubo una notable reducción en el volumen nuclear celular, presencia de núcleos picnóticos, protrusiones de membrana y una disminución considerable en el número de células. Estas observaciones sugieren la activación de procesos de muerte celular programada, como la apoptosis.

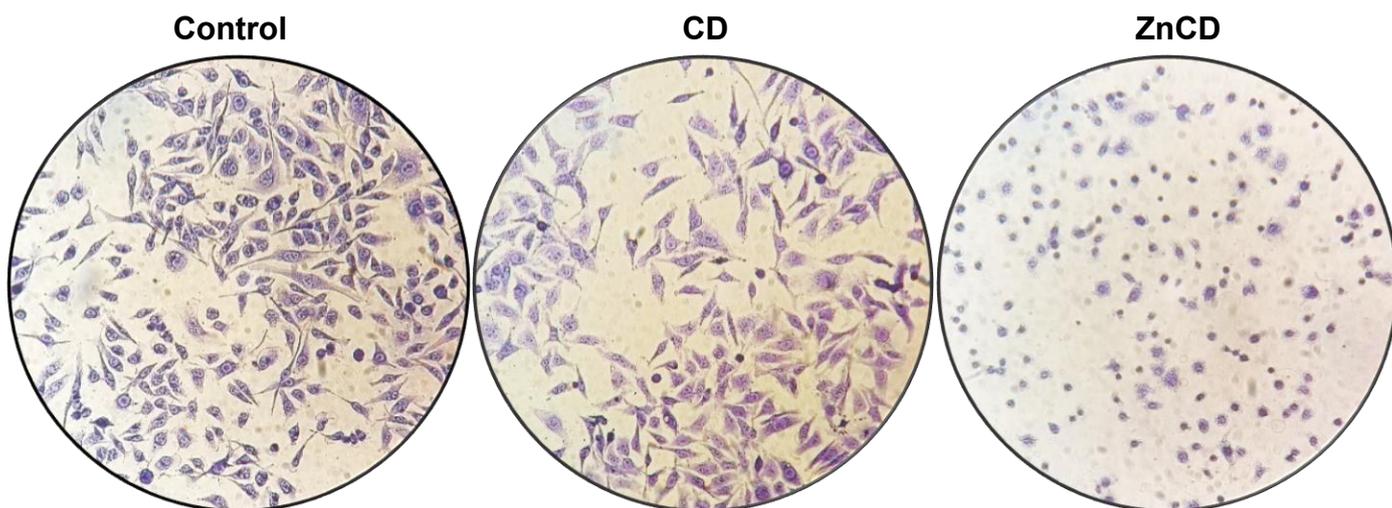


Figura 3-XLI. Micrografías correspondientes al estudio de morfología de células MDA-MB-231 tratadas con 151,5 μM de CD y ZnCD, y 0,5% DMSO (control).

3.5.5 Estudios de actividad antimetastásica

Es interesante que un compuesto antitumoral posea, además de citotoxicidad selectiva por células cancerígenas, capacidad para inhibir la metástasis de estas. Por lo tanto, una vez determinado el mecanismo de acción de los compuestos CD/ZnCD, se evaluó su capacidad de inhibir la migración e invasión (dos procesos cruciales para que ocurra la metástasis de cualquier tumor primario⁴⁷) en células de la línea MDA-MB-231, las cuales se caracterizan por ser altamente invasivas⁴⁸.

3.5.5.1 Ensayo de sanación de herida

La migración celular juega un papel crucial en la metástasis del cáncer. Para simular la migración celular *in vivo* durante la cicatrización de heridas, se aplicó el ensayo de sanación de herida para medir la migración en dos dimensiones. La Figura 3-XLIII presenta imágenes de dicho ensayo para el control (0,5 % DMSO), CD y ZnCD. La monocapa de células MDA-MB-231 fue rasgada con una punta de micropipeta p200 y tratada con 50 μM de CD o ZnCD (concentración no citotóxica para ambos compuestos). Las observaciones microscópicas se registraron en el rasguño inicial y una vez que el control sanó su herida completamente (aproximadamente 48 horas).

Como se muestra en la Figura 3-XLII, tanto CD como ZnCD inhibieron la migración de las células tumorales en comparación al control sin tratamiento. En contraste, otro estudio mostró que el tratamiento con CD no afectó a la migración de la línea celular MDA-MB-231 en el ensayo de sanación de herida³⁰, pero esto pudo deberse a la concentración de CD utilizada (15 μM), que corresponde a menos de la tercera parte de la concentración usada en nuestro trabajo. ZnCD mostró una mayor inhibición de la migración celular que CD, lo cual sugiere que la complejación con Zn(II) potencia los efectos inhibitorios de la migración de CD.

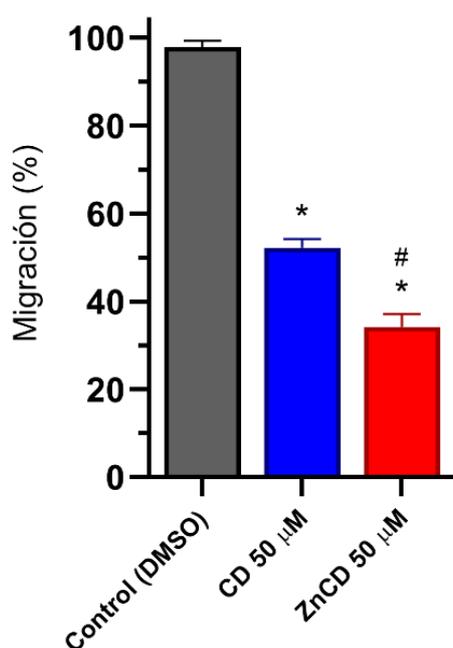
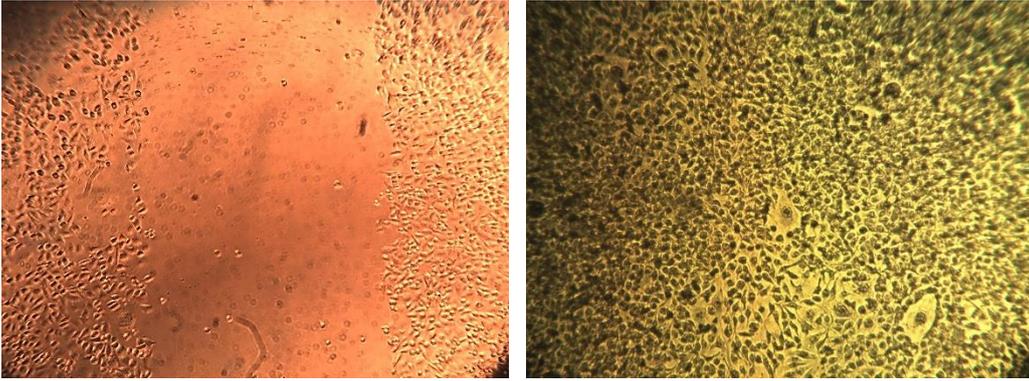
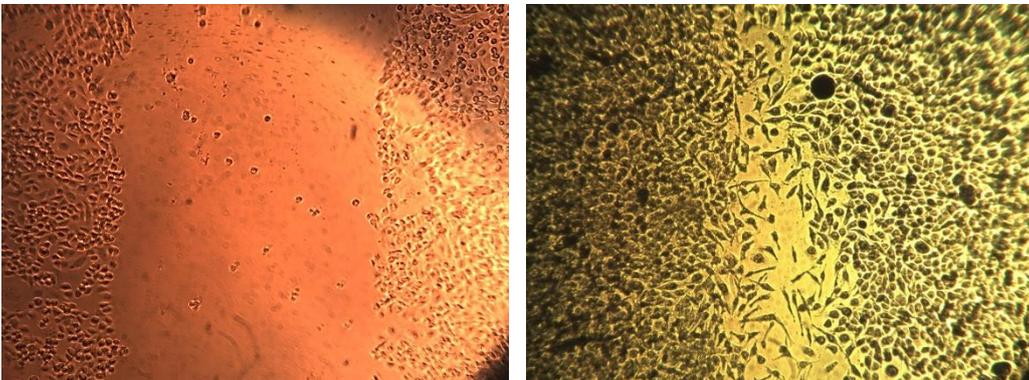


Figura 3-XLII. Niveles de migración en ensayo de sanación de herida para células MDA-MB-231 tratadas con 50 μM de CD y ZnCD, y 0,5% DMSO (control). Los resultados fueron calculados a partir de 20 micrografías por cada tratamiento y están expresados como porcentaje de migración \pm SEM para tres experimentos independientes.

Control



CD



ZnCD

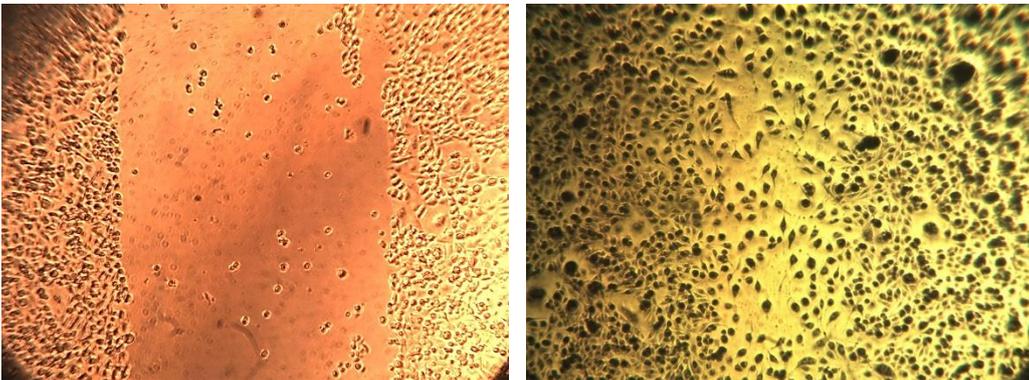


Figura 3-XLIII. Micrografías representativas del ensayo de sanación de herida para células MDA-MB-231 tratadas con 50 μ M de CD y ZnCD, y 0,5% DMSO (control). En las figuras se muestra el estado inicial (izquierda) y el estado final (derecha) de la herida.

3.5.5.2 Ensayo de migración en Transwell

El ensayo de sanación de herida mide la migración celular aleatoria, ya que no crea un gradiente quimioattractor. En contraste, el ensayo de migración en Transwell permite el estudio de la migración direccional al establecer un gradiente quimioattractor utilizando un quimioatrayente (ver sección 2.4.8.2). Se observó que el tratamiento con 50 μM de CD y ZnCD (mismas concentraciones que las utilizadas en el ensayo de sanación de herida) redujo significativamente el número de células MDA-MB-231 que migraron en un 57% y un 71%, respectivamente (Figura 3-XLIV y Figura 3-XLV). Estos resultados confirman el efecto inhibitorio de CD y ZnCD en la migración celular de MDA-MB-231.

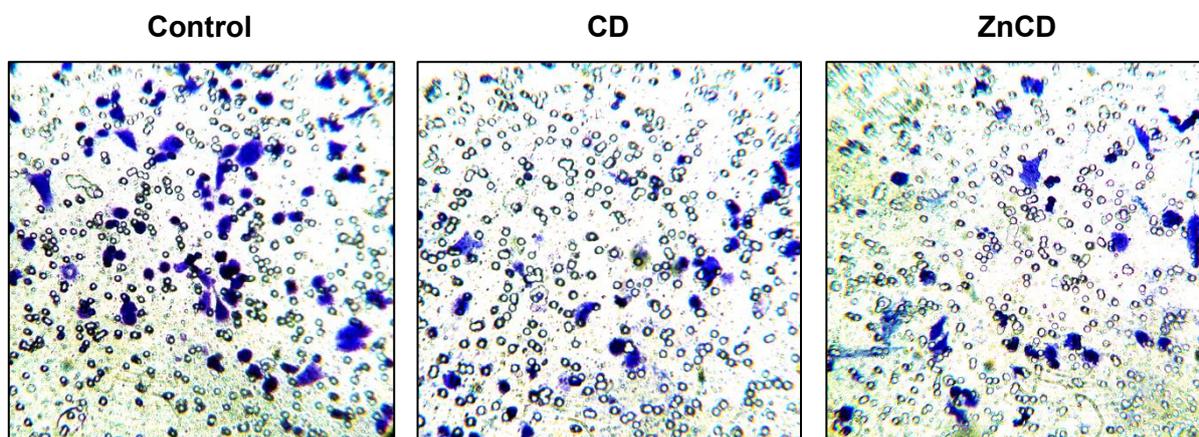


Figura 3-XLIV. Micrografías representativas de la migración de células MDA-MB-231 tratadas con 50 μM de CD y ZnCD, y 0.5% DMSO (control) en el ensayo de migración en Transwell *in vitro*.

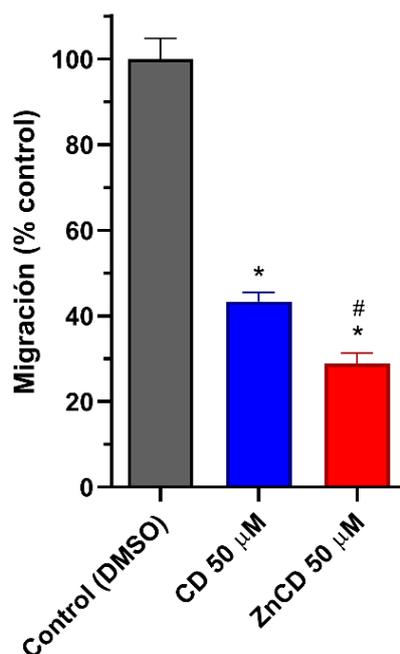


Figura 3-XLV. Análisis de la migración celular de células MDA-MB-231 mediante el ensayo de migración en Transwell *in vitro*. Los conteos celulares se registraron después de 24 h de tratamiento con 50 μ M de CD y ZnCD, y 0.5% DMSO (control), a partir de 20 campos microscópicos aleatorios para cada muestra. Los valores se representan como la media del conteo celular (porcentaje relativo al control) \pm SEM para tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ en comparación con el control y # $P < 0.05$ entre CD y ZnCD.

3.5.5.3 Ensayo de invasión en Transwell

En el ensayo de invasión en Transwell, las células deberán degradar el Matrigel para atravesar la membrana porosa, simulando de esta manera el proceso de metástasis *in vivo* donde se requiere la degradación de la membrana basal (ver MyM). Como se muestra en las Figura 3-XLVI y Figura 3-XLVII, el tratamiento con ZnCD 50 μ M resultó en una reducción del 40% en la invasión celular. En contraste, CD no mostró diferencias significativas en comparación con las células no tratadas. Con estos resultados se puede concluir que la complejación con Zn(II) le confiere a CD propiedades inhibitorias de la invasión que no poseía originalmente.

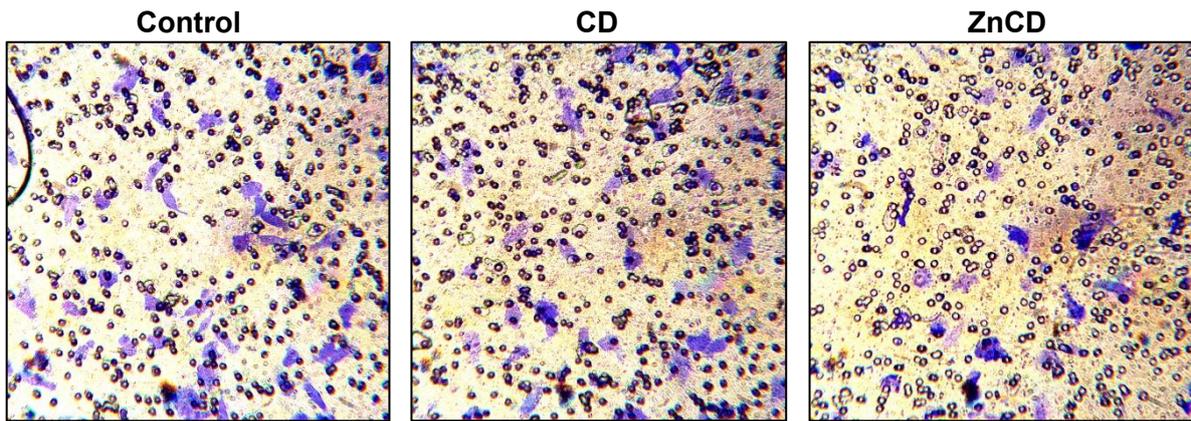


Figura 3-XLVI. Micrografías representativas de la invasión de células MDA-MB-231 tratadas con 50 μM de CD y ZnCD, y 0.5% DMSO (control) en el ensayo de invasión en Transwell *in vitro*.

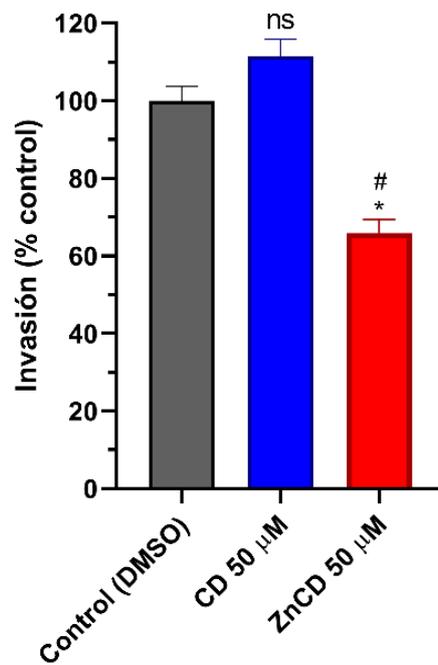


Figura 3-XLVII. Análisis de la invasión celular de células MDA-MB-231 mediante el ensayo de invasión en Transwell *in vitro*. Los conteos celulares se registraron después de 24 h de tratamiento con 50 μM de CD y ZnCD, y 0.5% DMSO (control), a partir de 20 campos microscópicos aleatorios para cada muestra. Los valores se representan como la media del conteo celular (porcentaje relativo al control) \pm SEM para tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ en comparación con el control y # $P < 0.05$ entre CD y ZnCD.

3.6 Discusión

Un equilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes es crucial para mantener la homeostasis redox celular y el metabolismo, previniendo así daños oxidativos o reductivos. El estrés reductivo ocurre cuando hay un exceso de especies reductoras, tales como NADPH, que son cruciales para generar poder reductor (capacidad para actuar como donadoras de electrones o receptoras de protones en reacciones metabólicas de reducción-oxidación). Al igual que el estrés oxidativo, el estrés reductivo es perjudicial, pudiendo evolucionar en disfunción mitocondrial y muerte celular⁴⁹. Esto se debe a que las células requieren de la presencia de EROs para cumplir funciones de señalización y mantener el equilibrio redox. Se ha demostrado que las sustancias que inducen estrés reductivo, al igual que las que inducen estrés oxidativo, pueden causar de manera efectiva la muerte celular en células tumorales^{45,50,51}.

En el presente estudio, demostramos que CD exhibe efectos antioxidantes en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, y que estos efectos se potencian cuando CD está coordinada con Zn(II). El estrés reductivo inducido por el complejo metálico resultó en una muerte celular a dosis más bajas respecto a su ligando precursor, y en una mayor alteración del potencial de membrana mitocondrial. Además, ambos compuestos mostraron la capacidad de mejorar la supervivencia celular a la apoptosis inducida por H₂O₂ (la cual produce estrés oxidativo) mediante la eliminación de radicales libres. Nuevamente, este efecto fue más pronunciado en el complejo ZnCD.

El proceso de metástasis involucra varios pasos, incluyendo la invasión de la célula tumoral, la migración hacia el torrente sanguíneo, la extravasación y la proliferación en sitios metastásicos. Entre estos, la invasión y la migración se consideran cruciales para la metástasis del tumor primario⁴⁷. En este estudio, demostramos que ZnCD redujo significativamente tanto la migración como la invasión de las células cancerosas MDA-MB-231, altamente agresivas, invasivas y poco diferenciadas. Estos efectos fueron observados a concentraciones no deletéreas, lo que sugiere que no se deben a la citotoxicidad del complejo.

Por último, se realizaron estudios de interacción entre ZnCD y ASB a través de experimentos de *quenching* de fluorescencia. Los constantes de unión obtenidas se hallaron en el rango de 10³ a 10⁴ M⁻¹, indicando una afinidad del complejo por ASB adecuada. Los resultados revelaron un *quenching* de tipo estático y una unión dominada por interacciones hidrofóbicas. Además, los estudios sugieren la presencia de un solo sitio de unión para el complejo en la molécula de ASB.

3.7 Conclusión

Se sintetizó y caracterizó un nuevo complejo metálico de oxidovanadio (IV) con el flavonoide crisina y fenantrolina. Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* mostraron que el compuesto exhibe una citotoxicidad significativa y selectiva hacia la línea celular A549 en diferentes tiempos de incubación, lo que indica que el compuesto tendría la capacidad de actuar como un fármaco anticancerígeno eficaz. La inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares, la perturbación del potencial de membrana mitocondrial, el agotamiento de GSH y la caída en la relación GSH/GSSG sugirieron la capacidad del complejo para inducir la muerte celular mediante estrés oxidativo. Se puede observar que, mientras la complejación del antioxidante natural crisina con el catión oxidovanadio (IV) aumentó el efecto anticancerígeno del flavonoide, la adición de fenantrolina en la esfera de coordinación produjo un mayor efecto citotóxico y una mejor captación celular de vanadio. Se pudo descartar que estos efectos se deban a una descomposición total del complejo seguida de la liberación de sus ligandos libres (siendo sólo uno de ellos, fenantrolina, biológicamente activo, pero con baja citotoxicidad) a 24 h de incubación. Adicionalmente, los estudios de interacción con ASB sugirieron que podría unirse a albúmina y ser transportado eficazmente en el organismo.

Por otro lado, este estudio demostró que la complejación de CD con el metal esencial Zn mejoró su eficacia anticancerígena contra la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, logrando la muerte celular a concentraciones menores. El aumento del cociente GSH/GSSG, la disminución de los niveles de EROs y la protección contra el daño celular inducido por H₂O₂ sugieren un mecanismo de citotoxicidad por estrés reductivo. Los cambios morfológicos y la alteración de la membrana mitocondrial indican que la apoptosis podría ser un mecanismo clave de acción. Se observó también que ZnCD redujo significativamente la invasión y migración de las células MDA-MB-231, procesos necesarios en la metástasis. Los estudios de unión con ASB indican, además, que el complejo podría ser transportado y distribuido en el organismo por la albúmina.

El mecanismo de acción de los complejos VOCrisFen y ZnCD deja en evidencia la importancia del equilibrio redox celular, dado que se logró un efecto citotóxico tanto a través de la sobreproducción de especies oxidantes como a través de la sobreproducción de especies reductoras. Además, la selectividad de estos compuestos por líneas celulares tumorales frente a líneas normales también demuestra la mayor susceptibilidad de las células neoplásicas al cambio en su estado redox. Las células normales poseen menor cantidad de EROs y agentes antioxidantes comparados con las

células tumorales y emplean diversos mecanismos para mantener la homeostasis redox y evitar el daño sobre sus estructuras. Por el contrario, las células tumorales presentan un metabolismo acelerado y niveles elevados de EROs, debido a un desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes, que son necesarios tanto para la progresión del cáncer (gracias a la inestabilidad genética causada por el daño al ADN) como para varios procesos de señalización propios de la enfermedad que confieren una mayor proliferación celular y supervivencia⁵². La alteración de los niveles de EROs en las líneas tumorales (ya sea por su excesiva generación o depleción) puede inducir a la muerte celular, resultando ser una estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer.

3.8 Bibliografía

- (1) Stompor-Gorący, M.; Bajek-Bil, A.; Machaczka, M. Chrysin: Perspectives on Contemporary Status and Future Possibilities as Pro-Health Agent. *Nutrients* **2021**, *13* (6), 2038. <https://doi.org/10.3390/nu13062038>.
- (2) Naso, L.; Ferrer, E. G.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S. B.; Williams, P. Role of Oxidative Stress in the Antitumoral Action of a New Vanadyl(IV) Complex with the Flavonoid Chrysin in Two Osteoblast Cell Lines: Relationship with the Radical Scavenger Activity. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15* (6), 889–902. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0652-z>.
- (3) Naso, L.; Valcarcel, M.; Villacé, P.; Roura-Ferrer, M.; Salado, C.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Specific Antitumor Activities of Natural and Oxovanadium(IV) Complexed Flavonoids in Human Breast Cancer Cells. *New J. Chem.* **2014**, *38* (6), 2414. <https://doi.org/10.1039/c3nj01649h>.
- (4) Naso, L. G.; Martínez Medina, J. J.; Okulik, N. B.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Study on the Cytotoxic, Antimetastatic and Albumin Binding Properties of the Oxidovanadium(IV) Chrysin Complex. Structural Elucidation by Computational Methodologies. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *351*, 109750. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109750>.
- (5) Naso, L. G.; Martínez Medina, J. J.; D'Alessandro, F.; Rey, M.; Rizzi, A.; Piro, O. E.; Echeverría, G. A.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Ternary Copper(II) Complex of 5-Hydroxytryptophan and 1,10-Phenanthroline with Several Pharmacological Properties and an Adequate Safety Profile. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *204*, 110933. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110933>.
- (6) Halevas, E.; Mavroidi, B.; Antonoglou, O.; Hatzidimitriou, A.; Sagnou, M.; Pantazaki, A. A.; Litsardakis, G.; Pelecanou, M. Structurally Characterized Gallium–Chrysin Complexes with Anticancer Potential. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (8), 2734–2746. <https://doi.org/10.1039/C9DT04540F>.
- (7) Halevas, E.; Mitrakas, A.; Mavroidi, B.; Athanasiou, D.; Gkika, P.; Antoniou, K.; Samaras, G.; Lialiaris, E.; Hatzidimitriou, A.; Pantazaki, A.; Koukourakis, M.; Sagnou, M.; Pelecanou, M.; Lialiaris, T. Structurally Characterized Copper-Chrysin Complexes Display Genotoxic and Cytotoxic Activity in Human Cells. *Inorganica Chim. Acta* **2021**, *515*, 120062. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120062>.

- (8) Zahirović, A.; Kahrović, E.; Cindrić, M.; Kraljević Pavelić, S.; Hukić, M.; Harej, A.; Turkušić, E. Heteroleptic Ruthenium Bioflavonoid Complexes: From Synthesis to *in Vitro* Biological Activity. *J. Coord. Chem.* **2017**, *70* (24), 4030–4053. <https://doi.org/10.1080/00958972.2017.1409893>.
- (9) Wu, Y.; Gao, G.; Wu, G. Self-Assembled Three-Dimensional Hierarchical Porous V₂O₅/Graphene Hybrid Aerogels for Supercapacitors with High Energy Density and Long Cycle Life. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3* (5), 1828–1832. <https://doi.org/10.1039/C4TA05537C>.
- (10) Islas, M. S.; Martínez Medina, J. J.; Piro, O. E.; Echeverría, G. A.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Comparisons of the Spectroscopic and Microbiological Activities among Coumarin-3-Carboxylate, o-Phenanthroline and Zinc(II) Complexes. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *198*, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.003>.
- (11) Rizzi, A. C.; Neuman, N. I.; González, P. J.; Brondino, C. D. EPR as a Tool for Study of Isolated and Coupled Paramagnetic Centers in Coordination Compounds and Macromolecules of Biological Interest. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (2), 192–207. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501111>.
- (12) Ferrer, E. G.; Salinas, M. V.; Correa, M. J.; Naso, L.; Barrio, D. A.; Etcheverry, S. B.; Lezama, L.; Rojo, T.; Williams, P. A. M. Synthesis, Characterization, Antitumoral and Osteogenic Activities of Quercetin Vanadyl(IV) Complexes. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11* (6), 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0122-9>.
- (13) Martínez Medina, J. J.; Naso, L. G.; Pérez, A. L.; Rizzi, A.; Okulik, N. B.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Apigenin Oxidovanadium(IV) Cation Interactions. Synthesis, Spectral, Bovine Serum Albumin Binding, Antioxidant and Anticancer Studies. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2017**, *344*, 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.05.007>.
- (14) Islas, M. S.; Naso, L. G.; Lezama, L.; Valcarcel, M.; Salado, C.; Roura-Ferrer, M.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Insights into the Mechanisms Underlying the Antitumor Activity of an Oxidovanadium(IV) Compound with the Antioxidant Naringenin. Albumin Binding Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *149*, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.04.011>.
- (15) Chasteen, N. D. Vanadyl(IV) EPR Spin Probes Inorganic and Biochemical Aspects. In *Biological Magnetic Resonance*; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1981; pp 53–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3201-5_2.
- (16) Benítez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. Vanadium Polypyridyl Compounds as Potential Antiparasitic and Antitumoral Agents: New Achievements. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.001>.
- (17) Ali, I.; Wani, W. A.; Saleem, K. Empirical Formulae to Molecular Structures of Metal Complexes by Molar Conductance. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.* **2013**, *43* (9), 1162–1170. <https://doi.org/10.1080/15533174.2012.756898>.
- (18) Nunes, P.; Correia, I.; Cavaco, I.; Marques, F.; Pinheiro, T.; Avecilla, F.; Pessoa, J. C. Therapeutic Potential of Vanadium Complexes with 1,10-Phenanthroline Ligands, Quo Vadis? Fate of Complexes in Cell Media and Cancer Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *217*, 111350. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111350>.
- (19) Peng, S.-H.; Lv, B.-B.; Ali, A.; Wang, J.-M.; Ying, X.; Wang, H.; Liu, J.-B.; Ji, L.-N.; Liu, H.-Y. The Magnetic Properties, DNA/HSA Binding and Nuclease Activity of

- Manganese *N*-Confused Porphyrin. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, *20* (05), 624–638. <https://doi.org/10.1142/S1088424616500449>.
- (20) Crouse, H. F.; Petrunak, E. M.; Donovan, A. M.; Merkle, A. C.; Swartz, B. L.; Basu, S. Static and Dynamic Quenching of Tryptophan Fluorescence in Various Proteins by a Chromium (III) Complex. *Spectrosc. Lett.* **2011**, *44* (5), 369–374. <https://doi.org/10.1080/00387010.2010.546470>.
- (21) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- (22) Correia, I.; Chorna, I.; Cavaco, I.; Roy, S.; Kuznetsov, M. L.; Ribeiro, N.; Justino, G.; Marques, F.; Santos-Silva, T.; Santos, M. F. A.; Santos, H. M.; Capelo, J. L.; Douch, J.; Pessoa, J. C. Interaction of [V^{IV}O(Acac)₂] with Human Serum Transferrin and Albumin. *Chem. – Asian J.* **2017**, *12* (16), 2062–2084. <https://doi.org/10.1002/asia.201700469>.
- (23) Matsuyama, S.; Reed, J. C. Mitochondria-Dependent Apoptosis and Cellular pH Regulation. *Cell Death Differ.* **2000**, *7* (12), 1155–1165. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400779>.
- (24) Park, J.; Lee, J.; Choi, C. Mitochondrial Network Determines Intracellular ROS Dynamics and Sensitivity to Oxidative Stress through Switching Inter-Mitochondrial Messengers. *PLoS ONE* **2011**, *6* (8), e23211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023211>.
- (25) Le, M.; Rathje, O.; Levina, A.; Lay, P. A. High Cytotoxicity of Vanadium(IV) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Related Ligands Is Due to Decomposition in Cell Culture Medium. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22* (5), 663–672. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1453-4>.
- (26) Shan, F.; Shao, Z.; Jiang, S.; Cheng, Z. Erlotinib Induces the Human Non–Small-cell Lung Cancer Cells Apoptosis via Activating ROS -dependent JNK Pathways. *Cancer Med.* **2016**, *5* (11), 3166–3175. <https://doi.org/10.1002/cam4.881>.
- (27) Ogura, J.; Miyauchi, S.; Shimono, K.; Yang, S.; Gonchigar, S.; Ganapathy, V.; Bhutia, Y. D. Carbidopa Is an Activator of Aryl Hydrocarbon Receptor with Potential for Cancer Therapy. *Biochem. J.* **2017**, *474* (20), 3391–3402. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170583>.
- (28) Chen, Z.; Cai, A.; Zheng, H.; Huang, H.; Sun, R.; Cui, X.; Ye, W.; Yao, Q.; Chen, R.; Kou, L. Carbidopa Suppresses Prostate Cancer via Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Ubiquitination and Degradation of Androgen Receptor. *Oncogenesis* **2020**, *9* (5), 49. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-0236-x>.
- (29) Korac, K.; Rajasekaran, D.; Sniegowski, T.; Schniers, B. K.; Ibrahim, A. F.; Bhutia, Y. D. Carbidopa, an Activator of Aryl Hydrocarbon Receptor, Suppresses IDO1 Expression in Pancreatic Cancer and Decreases Tumor Growth. *Biochem. J.* **2022**, *479* (17), 1807–1824. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210851>.
- (30) Chen, Z.; Xia, X.; Chen, H.; Huang, H.; An, X.; Sun, M.; Yao, Q.; Kim, K.; Zhang, H.; Chu, M.; Chen, R.; Bhutia, Y. D.; Ganapathy, V.; Kou, L. Carbidopa Suppresses Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer via AhR-Mediated Proteasomal Degradation of ER α . *Invest. New Drugs* **2022**, *40* (6), 1216–1230. <https://doi.org/10.1007/s10637-022-01289-5>.
- (31) Gilbert, J. A.; Frederick, L. M.; Ames, M. M. The Aromatic-I-Amino Acid Decarboxylase Inhibitor Carbidopa Is Selectively Cytotoxic to Human Pulmonary Carcinoid and Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* **2000**, *6* (11), 4365–4372.

- (32) Hanieh, H.; Bani Ismail, M.; Alfwuaires, M. A.; Ibrahim, H.-I. M.; Farhan, M. Aryl Hydrocarbon Receptor as an Anticancer Target: An Overview of Ten Years Odyssey. *Molecules* **2023**, *28* (10), 3978. <https://doi.org/10.3390/molecules28103978>.
- (33) Gao, C.-Y.; Qiao, X.; Ma, Z.-Y.; Wang, Z.-G.; Lu, J.; Tian, J.-L.; Xu, J.-Y.; Yan, S.-P. Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cleavage, BSA Interaction and Anticancer Activity of Dinuclear Zinc Complexes. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (39), 12220. <https://doi.org/10.1039/c2dt31306e>.
- (34) Tan, J.; Wang, B.; Zhu, L. DNA Binding, Cytotoxicity, Apoptotic Inducing Activity, and Molecular Modeling Study of Quercetin Zinc(II) Complex. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (2), 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.11.063>.
- (35) Edwin, B.; Hubert Joe, I. Vibrational Spectral Analysis of Anti-Neurodegenerative Drug Levodopa: A DFT Study. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1034*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.004>.
- (36) Chowdhry, B. Z.; Dines, T. J.; Jabeen, S.; Withnall, R. Vibrational Spectra of α -Amino Acids in the Zwitterionic State in Aqueous Solution and the Solid State: DFT Calculations and the Influence of Hydrogen Bonding. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (41), 10333–10347. <https://doi.org/10.1021/jp8037945>.
- (37) Sukker, G. M.; Wazzan, N.; Hilal, R. Towards Understanding Mode of Action of L-Dopa and Carbidopa: DFT/TD-DFT Analyses of Their Electronic and Vibration Spectra. *Indian J. Chem-A* **2015**, *54A*, 1378–1386.
- (38) Frazão, N. F.; Albuquerque, E. L.; Fulco, U. L.; Mauriz, P. W.; Azevedo, D. L. Optoelectronics and Vibrational Properties of Carbidopa from Quantum Chemistry Computations. *Indian Ocean Rev. Sci. Technol.* **2013**, *3* (1), 1–12.
- (39) Pericas, À.; Shafir, A.; Vallribera, A. Asymmetric Synthesis of L-Carbidopa Based on a Highly Enantioselective α -Amination. *Org. Lett.* **2013**, *15* (7), 1448–1451. <https://doi.org/10.1021/ol400136y>.
- (40) Talebpour, Z.; Haghgoo, S.; Shamsipur, M. ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Analysis for Simultaneous Determination of Levodopa, Carbidopa and Methyldopa in Human Serum and Pharmaceutical Formulations. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506* (1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.081>.
- (41) Gehlen, M. H. The Centenary of the Stern-Volmer Equation of Fluorescence Quenching: From the Single Line Plot to the SV Quenching Map. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2020**, *42*, 100338. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100338>.
- (42) Vázquez-Gómez, G.; Rubio-Lightbourn, J.; Espinosa-Aguirre, J. J. Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. *TIP* **2016**, *19* (1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.02.006>.
- (43) Gasiewicz, T.; Rucci, G. A-Naphthoflavone Acts as an Antagonist of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin by Forming an Inactive Complex with the Ah Receptor. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40* (5), 607–612.
- (44) Colamartino, M.; Santoro, M.; Duranti, G.; Sabatini, S.; Ceci, R.; Testa, A.; Padua, L.; Cozzi, R. Evaluation of Levodopa and Carbidopa Antioxidant Activity in Normal Human Lymphocytes In Vitro: Implication for Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* **2015**, *27* (2), 106–117. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9495-7>.
- (45) Krakowiak, A.; Pietrasik, S. New Insights into Oxidative and Reductive Stress Responses and Their Relation to the Anticancer Activity of Selenium-Containing Compounds as Hydrogen Selenide Donors. *Biology* **2023**, *12* (6), 875. <https://doi.org/10.3390/biology12060875>.

- (46) Colamartino, M.; Padua, L.; Meneghini, C.; Leone, S.; Cornetta, T.; Testa, A.; Cozzi, R. Protective Effects of L-Dopa and Carbidopa Combined Treatments on Human Catecholaminergic Cells. *DNA Cell Biol.* **2012**, *31* (11), 1572–1579. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1546>.
- (47) Efferth. Molecular Principles of Cancer Invasion and Metastasis (Review). *Int. J. Oncol.* **2009**, *34* (4). https://doi.org/10.3892/ijo_00000214.
- (48) Salesse, S.; Odoul, L.; Chazée, L.; Garbar, C.; Duca, L.; Martiny, L.; Mahmoudi, R.; Debelle, L. Elastin Molecular Aging Promotes MDA - MB -231 Breast Cancer Cell Invasiveness. *FEBS Open Bio* **2018**, *8* (9), 1395–1404. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12455>.
- (49) Ma, W.-X.; Li, C.-Y.; Tao, R.; Wang, X.-P.; Yan, L.-J. Reductive Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Cardiomyopathy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/5136957>.
- (50) Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16* (10), 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013>.
- (51) Zitka, O.; Skalickova, S.; Gumulec, J.; Masarik, M.; Adam, V.; Hubalek, J.; Trnkova, L.; Kruseova, J.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Redox Status Expressed as GSH:GSSG Ratio as a Marker for Oxidative Stress in Paediatric Tumour Patients. *Oncol. Lett.* **2012**, *4* (6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>.
- (52) Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.

Capítulo 4

Hipertensión

**Complejo de Zn(II) y el fármaco
antihipertensivo α -metildopa**

4.1 Introducción

La molécula α -metildopa (MD) (Figura 4-1) actúa principalmente dentro del sistema nervioso central como un agonista α -2 adrenérgico. Es captado por neuronas adrenérgicas y sufre descarboxilación e hidroxilación para formar el falso transmisor α -metilnoradrenalina. Sin embargo, en comparación con la noradrenalina, es menos activa sobre los receptores α y, por lo tanto, menos eficaz para provocar vasoconstricción¹. Para lograr un efecto hipotensor con MD, normalmente se requieren dosis altas². Estas dosis elevadas pueden provocar efectos adversos sobre el sistema nervioso, incluidos síntomas como mareos, somnolencia, cansancio, sequedad de boca, dolor de cabeza y depresión³. A pesar de estos posibles efectos secundarios, MD todavía se usa ampliamente para controlar los trastornos hipertensivos durante el embarazo, como la hipertensión gestacional y la preeclampsia, y se destaca por no causar ningún efecto teratogénico⁴. En este trabajo se buscó modificar su estructura química mediante complejación con un metal para mejorar sus efectos beneficiosos y lograr así una administración en concentraciones más bajas.

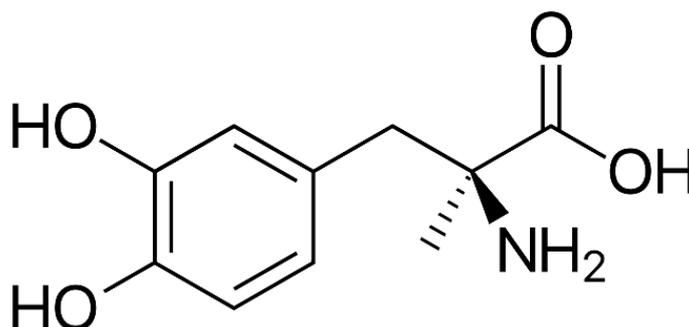


Figura 4-1. Estructura de la molécula α -metildopa.

En la literatura se encuentran ejemplos de complejos de coordinación formados entre biometales y ciertos fármacos antihipertensivos. Sin embargo, los efectos biológicos de estos complejos sólo se han estudiado en un número limitado de casos^{5,6,7}. Hasta donde sabemos, no hay informes disponibles sobre los efectos biológicos de complejos de coordinación sólidos que involucran α -2 agonistas como ligandos. Por lo tanto, la realización de dichos estudios podría proporcionar una vía alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas familias de compuestos antihipertensivos.

Como ya se mencionó en la sección 1.1.3.2, el zinc es el segundo metal traza más abundante en el cuerpo humano y cumple múltiples funciones esenciales, incluidas

funciones catalíticas, estructurales y reguladoras. Estas funciones son cruciales para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos⁸. Además, estudios han demostrado que la carencia de zinc en la dieta puede aumentar la susceptibilidad celular al estrés oxidativo, alterando así diversas funciones fisiológicas y metabólicas. En consecuencia, muchas enfermedades se han asociado con la deficiencia de zinc⁹. La coordinación del Zn(II) a un determinado ligando tiene el potencial de alterar sus propiedades biológicas al influir en su conformación, la cual se verá afectada dependiendo de la geometría de coordinación específica y los grupos funcionales involucrados (que usualmente contienen átomos de azufre (S), nitrógeno (N) u oxígeno (O))¹⁰. Debido a esto, se seleccionó este metal para su complejación con MD.

En la Figura 4-I puede verse que MD posee varios sitios de coordinación capaces de coordinar con iones metálicos: grupo carboxilato (COO^-), amino (NH_2) e hidroxilo (OH). Los estudios en solución que involucran cationes Cu(II) y MD, realizados mediante técnicas potenciométricas, han descrito diferentes modos de coordinación en diferentes condiciones experimentales. Estos modos incluyen la coordinación N,O que involucra a los grupos NH_2 y COO^- , así como la coordinación O,O que involucra el grupo catecol¹¹. Resultados similares se han observado en estudios que utilizaron mediciones termodinámicas en soluciones acuosas de Cu(II) y ligandos entre los cuales se encuentran MD, catecol y metiltirosina¹². Para el caso del catión Zn(II), se ha observado que el compuesto L-Dopa (3-(3,4-Dihidroxifenil)-L-alanina), emparentado con MD, coordina a través de los grupos amino y carboxilato dentro de un rango de pH de 6–9¹³. Por lo tanto, se puede concluir que la coordinación N,O se produce a valores de pH bajos, mientras que en soluciones alcalinas el grupo catecol de MD es el que participa en la coordinación con el ion metálico. Si bien el fármaco puede sufrir inestabilidad en un ambiente alcalino debido a la presencia del sistema catecol, es posible prevenir este tipo de descomposición trabajando bajo una atmósfera de nitrógeno, incluso a altas temperaturas¹⁴.

En este trabajo sintetizamos y caracterizamos un complejo sólido de Zn/MD a pH 6,4 con fórmula $[\text{Zn}(\text{MD})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ZnMD) que mostró una estequiometría 1:1 y coordinación a través del grupo carboxilato. Con el fin de simular la interacción con seroalbúmina humana, se estudió la interacción de ASB con MD y el nuevo complejo mediante determinaciones fluorométricas. Los efectos biológicos de ZnMD se evaluaron en ratas SHR para evaluar sus propiedades antihipertensivas. Además, evaluamos la mejora de la función cardíaca mediante la disminución de la hipertrofia, la fibrosis y el estrés oxidativo.

4.2 Resultados

4.2.1 Síntesis del complejo ZnMD

El complejo ZnMD (Figura 4-II) se sintetizó añadiendo 0,2 mmol de MD en 10 mL de metanol y 0,2 mmol de ZnCl₂ en 0,4 mL de metanol. Ambas soluciones se combinaron y se llevaron a agitación por 10 minutos bajo burbujeo de N₂ para prevenir la oxidación de MD. Se añadió, gota a gota, una solución acuosa 1M de KOH hasta alcanzar pH 6,4. El precipitado obtenido se filtró, se lavó con metanol y se secó bajo corriente de N₂ gaseoso.

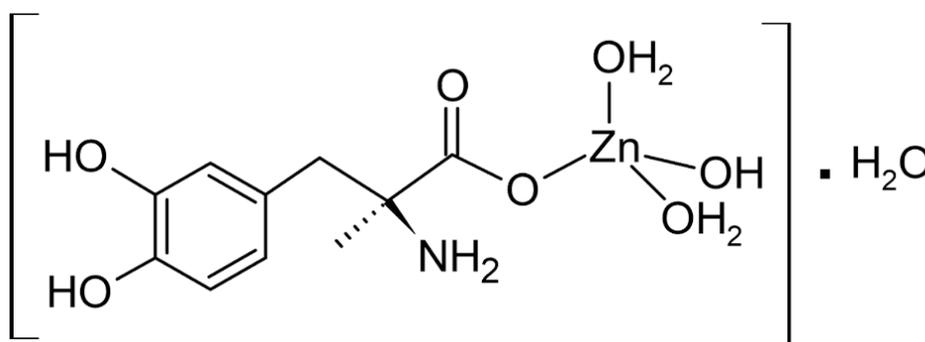


Figura 4-II. Estructura del complejo [Zn(MD)(OH)(H₂O)₂].H₂O (ZnMD).

4.2.2 Caracterización fisicoquímica

Estudios en fase sólida

4.2.2.1 Análisis elemental

El análisis elemental realizado para el compuesto ZnMD mostró porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno consistentes con los porcentajes teóricos esperados para la fórmula C₁₀H₁₉O₈NZn propuesta. El contenido de Zinc determinado en nuestro laboratorio por el método espectrofotométrico de Zincon también fue similar al calculado (Tabla 3-I).

Tabla 4-I. Porcentajes elementales esperados (de acuerdo a la fórmula $C_{10}H_{19}O_8NZn$) y obtenidos para ZnMD.

Elemento	% Calculado	% Experimental
C	34,6	34,4
N	4,0	3,9
H	5,5	5,4
Zn	18,9	19,0

Debido a que ZnMD se sintetizó utilizando $ZnCl_2$, existía la posibilidad de que un anión Cl^- formara parte de la estructura del complejo (en lugar del anión OH^- propuesto). Para evaluarlo, se llevó a cabo la determinación de aniones cloruro utilizando el método de Mohr. Se obtuvo instantáneamente el precipitado de Ag_2CrO_4 correspondiente al punto final, lo cual es indicativo de que no hubo una reacción previa de precipitación entre Ag^+ y Cl^- . Por lo tanto, se pudo concluir que no hay presencia de cloruros en la estructura de ZnMD.

4.2.2.2 Espectroscopía FTIR

En la Figura 4-III se muestran los espectros FTIR de MD y ZnMD, y en la Tabla 4-II se muestran las asignaciones correspondientes. En el espectro FTIR de MD se destaca la ausencia de la banda de estiramiento de $\nu_{C=O}$ a 1657 cm^{-1} (que aparece en el compuesto emparentado L-dopa), lo que indica que MD se encuentra en forma zwitteriónica. Las bandas asociadas con el grupo carboxilato en MD, como $\nu_{as}(COO^-)$ y $\nu_s(COO^-)$ en 1617 cm^{-1} y 1442 cm^{-1} , respectivamente ($\Delta = 177\text{ cm}^{-1}$), cambiaron a 1584 cm^{-1} y 1419 cm^{-1} ($\Delta = 165\text{ cm}^{-1}$) tras la interacción del metal. Los valores de delta sugieren una coordinación monodentada del grupo carboxilato. Fue difícil hacer comparaciones directas de los modos vibratorios NH entre MD y ZnMD, debido a la protonación del grupo NH_2 en el ligando y la desprotonación del mismo en el complejo. Sin embargo, las bandas asignadas a la vibración de estiramiento que involucra ν_{C-NH} para MD a 1289 cm^{-1} y 1257 cm^{-1} se fusionaron en el complejo metálico mostrando una banda ancha centrada en 1269 cm^{-1} , lo que indica la interacción del Zn con el grupo amino. Las bandas relacionadas con las vibraciones de los grupos OH (catecol) en 1492 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} , 1376 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} y 1128 cm^{-1} (ver asignaciones en Tabla 4-II) no se desplazaron durante la coordinación, lo que sugiere que estos grupos no estuvieron involucrados en la interacción con el centro metálico¹⁵. Además, la ausencia de bandas a aproximadamente 1700 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento de $\nu_{C=O}$) indica que no se produjo la oxidación de los grupos catecol a quinona¹⁶. Los modos vibracionales por debajo de 1300 cm^{-1} se deben principalmente a combinaciones

de vibraciones de flexión dentro de la molécula. El modo de balanceo del grupo NH_3^+ puede asignarse a la banda ubicada a 1219 cm^{-1} , que está ausente en el complejo metálico. El modo vibracional $\nu\text{Zn-O}$ se ubicó en 616 cm^{-1} ¹⁷.

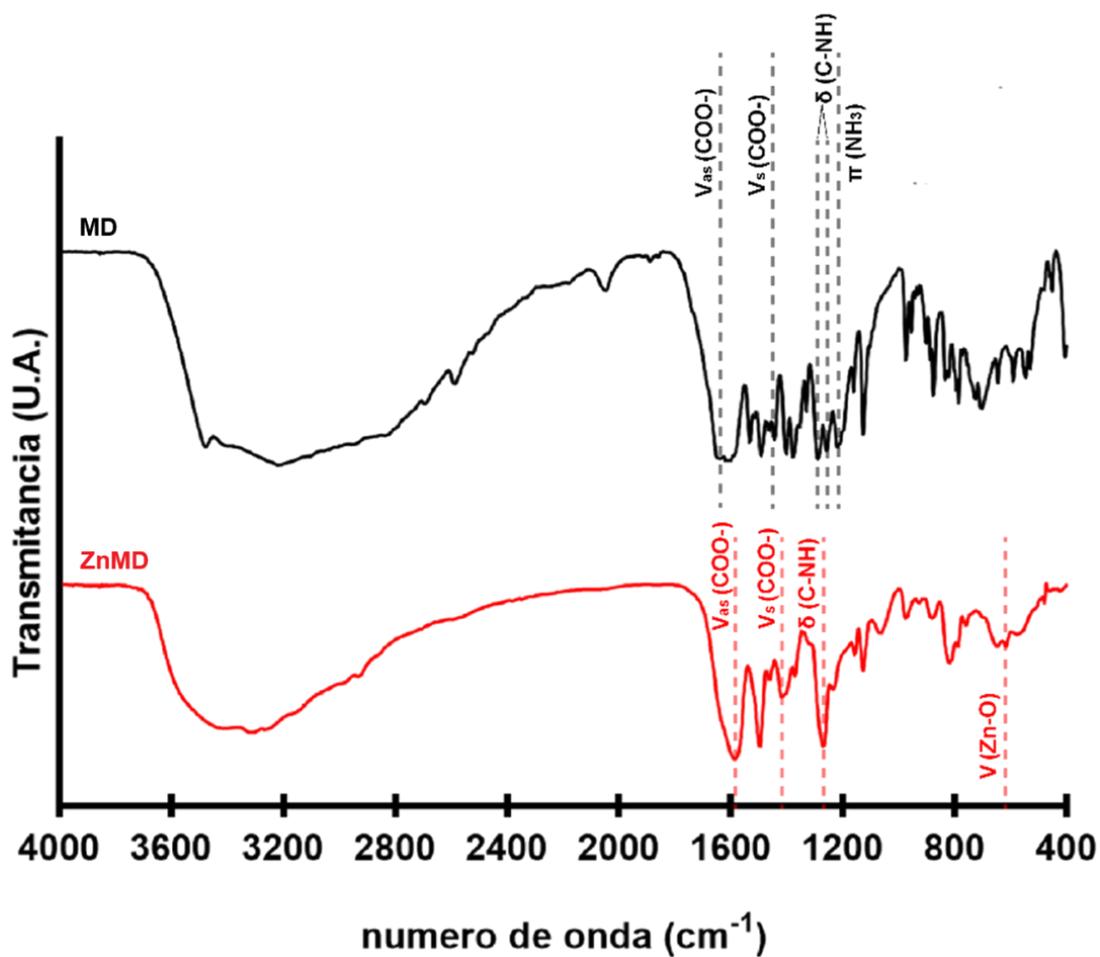


Figura 4-III. Espectros FTIR de los compuestos MD y ZnMD.

Tabla 4-II. Asignaciones para las bandas obtenidas en los espectros FTIR de MD y ZnMD. Abreviaturas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, media; d, débil; a, ancha; h, hombro; ep, en plano; fp, fuera del plano; arom, aromático; as, asimétrico; s, simétrico.

MD	ZnMD	Asignación
-	3316 f	$\nu_{as}(\text{NH}_2)$
-	3256 f	$\nu_s(\text{NH}_2)$
3100	-	$\nu_{as}(\text{NH}_3^+)$
3046	-	$\nu_s(\text{NH}_3^+)$
1617 f	1584 mf	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$
1604 mf, 1586 h	-	$\delta(\text{NH}_3^+)$
1492 f	1496 f	$\delta_{ep}(\text{C}_{anillo} \text{OH})$
1462 m	1462 m	$\delta(\text{COH}), \nu(\text{CO})$
1442 m	1419 m	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1402 f, 1376 f	1403 m, 1372 m	$\delta_{ep}(\text{CH}_{anillo}), \delta_{ep}(\text{C}_{anillo}\text{OH}), \delta(\text{CCH})$
1289 mf, 1257 f	1269 mf, a	$\delta(\text{CNH}), \delta_{ep}(\text{CH}_{anillo}), \nu(\text{C}_{anillo}\text{O})$
1219 f	-	$\nu(\text{C-OH}) + \rho(\text{NH}_3^+)$
1160 d, 1126 m	1158 d, 1128 m	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CN}) + \nu(\text{C-OH})_{\text{fenol}}$
-	616 m	$\nu(\text{Zn-O})$

4.2.2.3 Análisis termogravimétrico

El TGA para ZnMD (Figura 4-IV) (atmósfera de oxígeno, 50 mL/min) mostró una pérdida de masa de 15,5% en el rango de temperatura de 40 a 160°C, lo que se corresponde con el 15,6% de las tres moléculas de agua que componen la estructura propuesta (dos moléculas de coordinación y una de hidratación). La molécula de agua de hidratación se perdió a los 60 °C. Se alcanzó un peso constante de 24,0% a 800 °C, similar al valor esperado de 23,5% para el residuo ZnO, cuya identidad fue confirmada a través de espectroscopia FTIR (ver Sección 3.5.2.2).

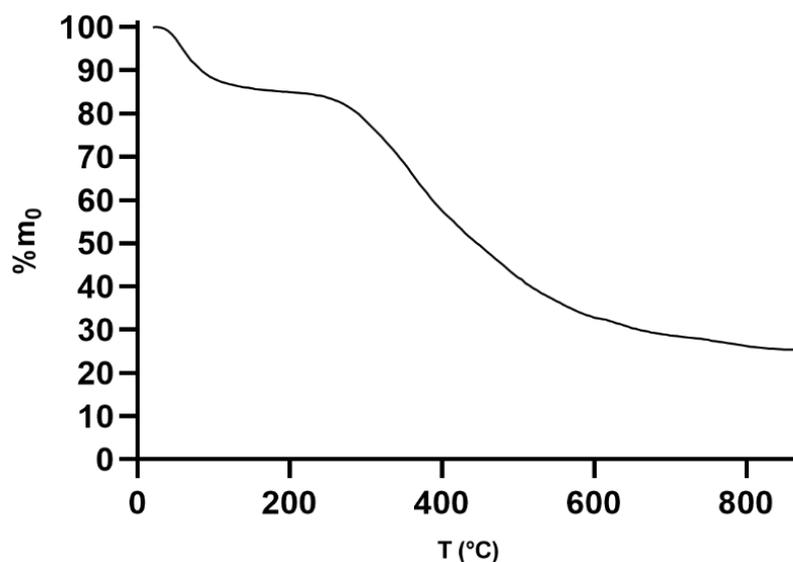


Figura 4-IV. Curva del TGA de la descomposición de ZnMD.

Estudios en solución

El compuesto ZnMD presentó una solubilidad baja en la mayoría de los solventes probados (agua, metanol, etanol, isopropanol, acetona, éter etílico, dimetilformamida, acetonitrilo), siendo moderadamente soluble sólo en DMSO.

4.2.2.4 Medidas de conductividad molar

La conductividad molar (Λ_m) de una solución 10^{-3} M de ZnMD en DMSO fue medida durante 4 h (Tabla 4-III). Se observó un valor constante de alrededor de $11 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, por lo que ZnMD sería un compuesto no-electrolito que no genera especies cargadas en DMSO durante al menos 4 horas.

Tabla 4-III. Conductividad en función del tiempo para una solución 10^{-3} M de ZnMD en DMSO.

Tiempo (min)	Λ_m ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
0	12
10	10
30	11
60	13
120	11
180	12
240	10

4.2.2.5 Espectroscopía UV-Visible y medidas de estabilidad

El espectro electrónico de una solución 10^{-4} M de ZnMD en DMSO en la región UV-visible mostró una banda bien definida a 284 nm originada por transiciones electrónicas propias del ligando. En la Figura 4-V puede observarse la variación de dicho espectro en el tiempo, a lo largo de 4 horas. El espectro se mantuvo relativamente estable durante el tiempo de manipulación de la droga en la preparación de los ensayos biológicos previstos (aproximadamente 30 minutos).

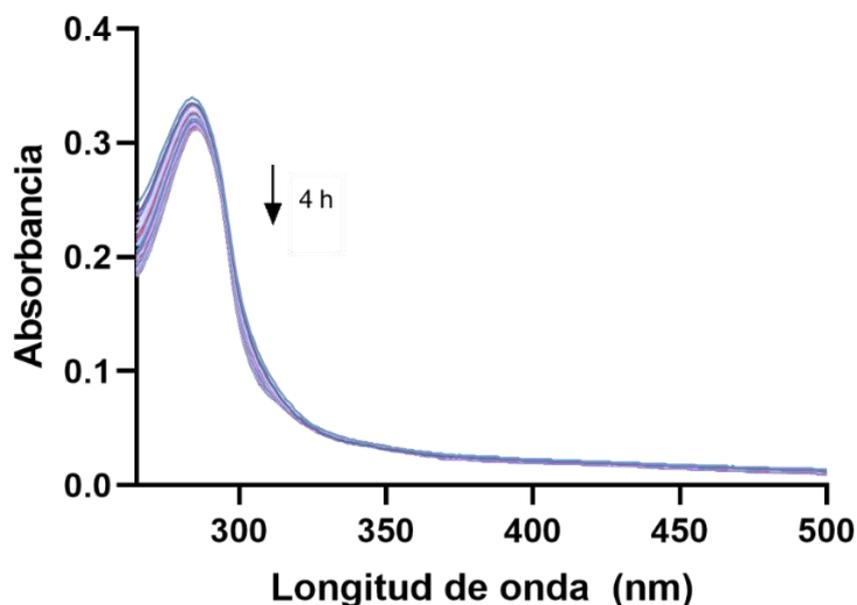


Figura 4-V. Variación del espectro electrónico UV-Visible en el tiempo de una solución 10^{-4} M de ZnMD en DMSO.

4.2.2.6 Resonancia magnética nuclear

Debido a la baja solubilidad de ZnMD, sólo pudo medirse el espectro ^1H RMN en DMSO- d_6 (Figura 4-VI). En la Tabla 4-IV pueden observarse las asignaciones realizadas

para ZnMD y las obtenidas para MD a partir de predicciones y de la literatura¹⁸. Puede observarse que el complejo conserva los picos correspondientes a los hidrógenos del grupo catecol (8,36 y 8,84 ppm), lo que indica que dicho grupo no se ve desprotonado y por tanto no interactúa en la coordinación con el metal. El anillo aromático de MD tampoco interviene, por lo que los valores del desplazamiento químico de dichos hidrógenos resultan prácticamente inalterados. Dado que los protones ácidos de las moléculas son capaces de intercambiarse con los ²H del solvente deuterado, los picos de los ácidos carboxílicos no suelen detectarse en las medidas de ¹H RMN. El pico correspondiente al grupo CH₂ no pudo apreciarse en el espectro de ZnMD por estar superpuesto con el pico del DMSO (alrededor de 2,60 ppm). Por último, no se halló un valor experimental de desplazamiento químico para el grupo NH₂ de MD en la literatura, sin embargo, se encontró un pico a 4,22 ppm en el espectro de ZnMD que se asemeja al predicho para MD en DMSO-d₆ con el software MestreNova (4,05 ppm; ver Tabla 4-IV).

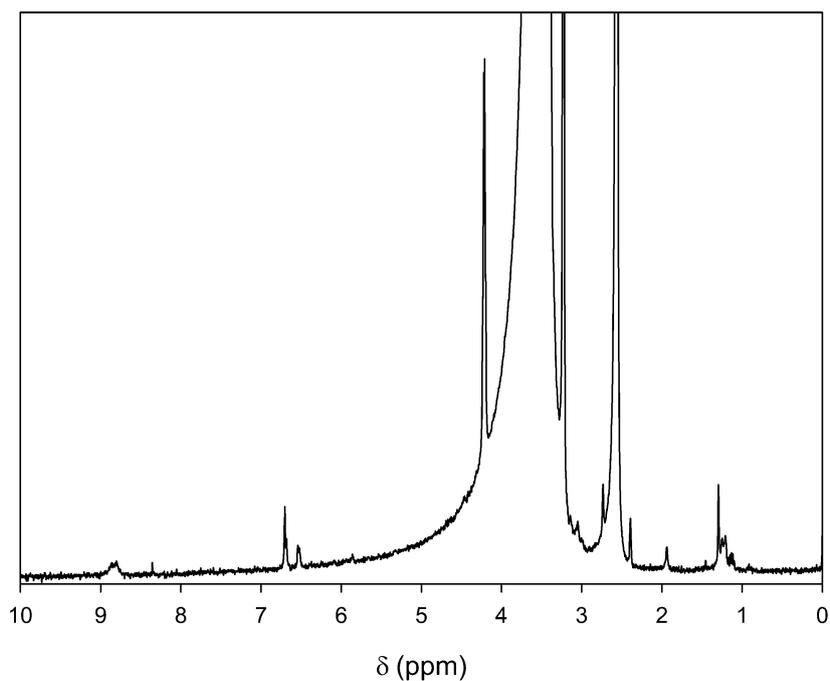


Figura 4-VI. Espectro ¹H RMN de ZnMD en DMSO-d₆.

Tabla 4-IV. Asignaciones de los desplazamientos químicos en ¹H RMN predichos en el software MestreNova y obtenidos de literatura para MD, y medidos para ZnMD. En todos los casos se utilizó DMSO-d₆ como solvente.

Grupo	MD predicción	MD experimental	ZnMD experimental
CH ₃	1,20	1,314	1,25
CH ₂	2,72	2,939; 2,698	~2,60
NH ₂	4,05	-	4,22
C arom.	6,51 - 6,64 - 6,68	6,505 - 6,633 - 6,722	6,53 - 6,69 - 6,70
OH	8,08 – 8,91		8,36 – 8,84

4.2.3 Ensayos de biodisponibilidad

4.2.3.1 Interacción con albúmina sérica bovina

El ensayo de interacción entre MD/ZnMD y ASB se realizó con concentraciones finales de los compuestos de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μM . En la Figura 4-VII se muestran los espectros de *quenching* de fluorescencia de ASB a diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C (298K, 303K, 310K, respectivamente). Dichas curvas se obtuvieron a partir de la desconvolución de la curva medida (debido a que los espectros de ASB y MD/ZnMD se superponen, con máximos en 336 y 312 nm, respectivamente). Los valores máximos de fluorescencia de los espectros de *quenching* de ASB se utilizaron para calcular los parámetros K_{sv} , K_q , K_b y η (Tabla 4-V) y los parámetros termodinámicos (Tabla 4-VI) de la interacción.

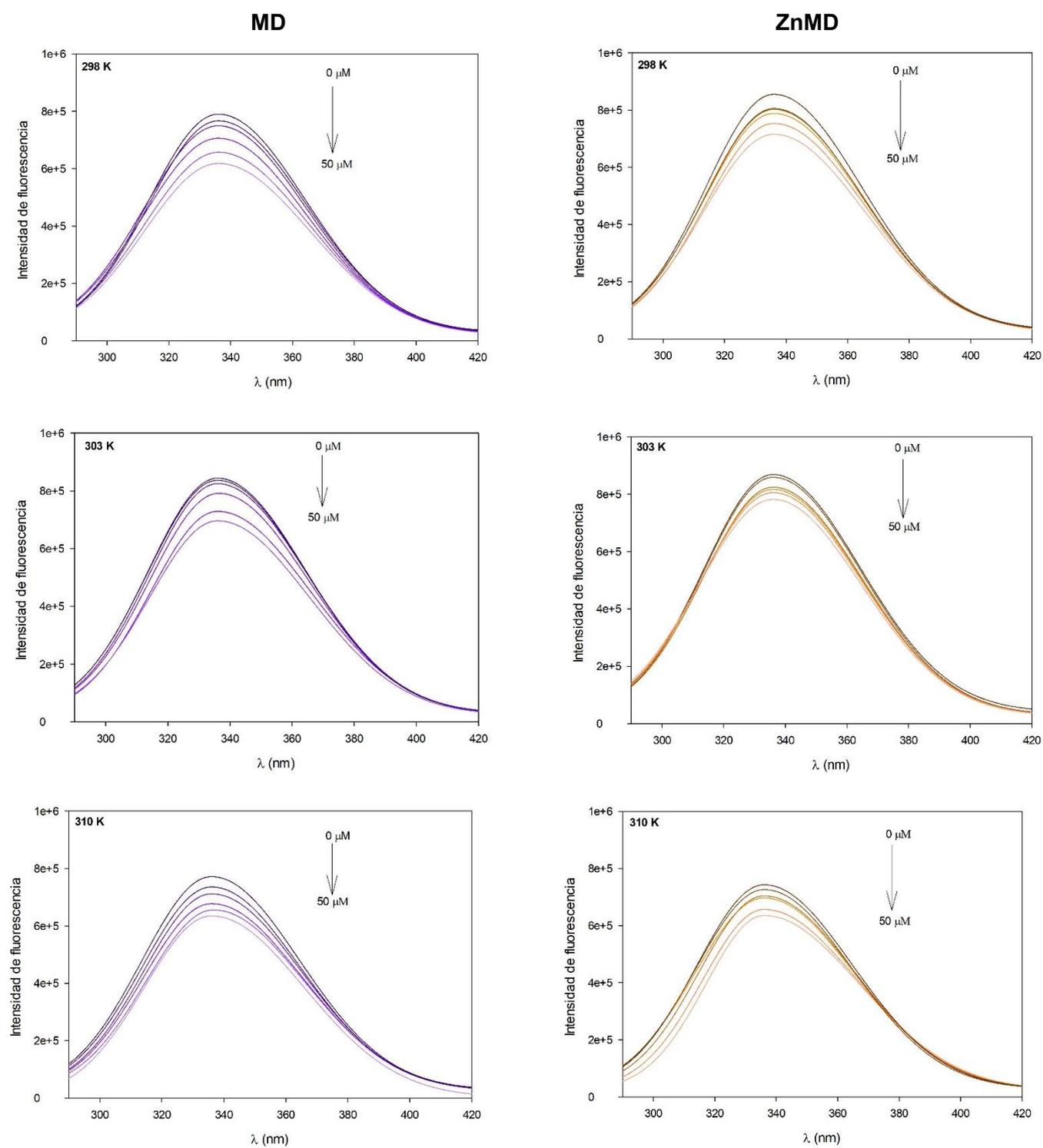


Figura 4-VII. Gráficos de *quenching* de fluorescencia para una solución de ASB 6 μM incubada por 1 hora con concentraciones crecientes (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM) de MD (violeta) o ZnMD (naranja) a distintas temperaturas (298, 303 y 310 K).

A partir de la pendiente de los gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$) (Figura 4-VIII) se obtuvieron las constantes K_{sv} , que se vieron disminuidas al aumentar la temperatura, indicativo de un mecanismo de *quenching* estático. Los valores de K_q fueron mayores a $2 \cdot 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo que también sugiere un mecanismo estático, tal y como se discutió en la sección 3.2.3.1.

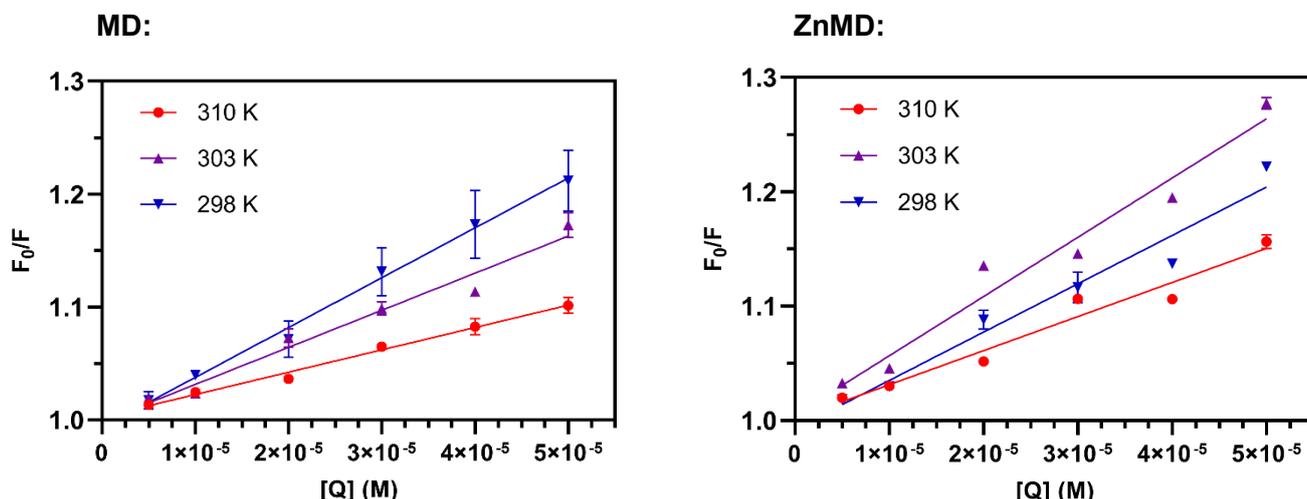


Figura 4-VIII. Gráfico de F_0/F vs $[Q]$ para la interacción ASB y MD/ZnMD a diferentes temperaturas (∇ 298K, \blacktriangle 303K, \bullet 310K). Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

El número de sitios de unión y la constante de unión (K_b) de la interacción ASB y MD/ZnMD se obtuvieron del gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ (Figura 4-IX). Las constantes de estabilidad disminuyeron al aumentar la temperatura, lo que es consistente con la disminución de la estabilidad de los complejos ASB-compuesto. Los valores de n fueron aproximadamente 1, lo que indica que los compuestos interactuaron con sólo un sitio de unión de ASB. Los valores de K_b obtenidos para MD y ZnMD se encuentran dentro del rango de $10^3 - 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, lo que sugiere una afinidad moderada de estos compuestos por ASB, pudiendo así ser almacenados, transportados y liberados de la proteína en el organismo.

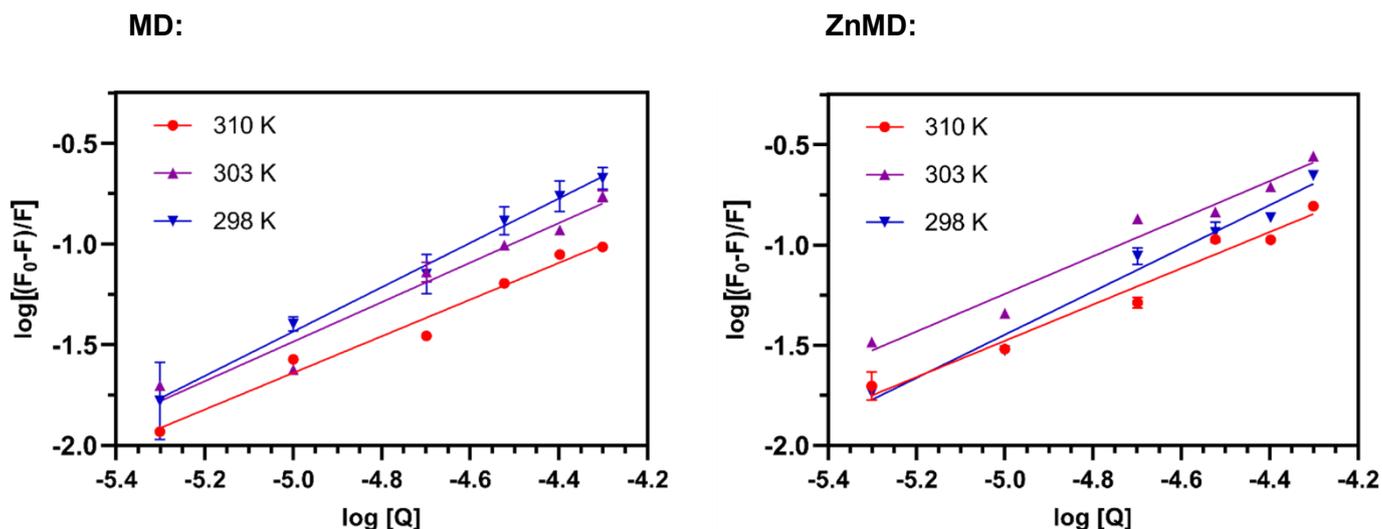


Figura 4-IX. Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ de la interacción entre ASB y MD/ZnMD a diferentes temperaturas (∇ 298K, \blacktriangle 303K, \bullet 310K). Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Los parámetros termodinámicos fueron calculados a partir de la ecuación de Van't Hoff. Se obtuvieron valores negativos de ΔG para ambos compuestos a las tres temperaturas, por lo que se presenta una interacción espontánea con ASB en todos los casos. Los valores de ΔH y ΔS fueron negativos, lo que es característico de una interacción con ASB impulsada por entalpía, y primada por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno¹⁹.

Tabla 4-V. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular de quenching (K_q), constante de unión (K_b) y números de sitio de unión (η) para la interacción entre ASB y MD/ZnMD a diferentes temperaturas.

	T (K)	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$)	$\log K_b$	K_b ($\times 10^3 M^{-1}$)	η
MD	298	$4,41 \pm 0,66$	$4,41 \pm 0,66$	$4,07 \pm 0,73$	$11,86 \pm 2,12$	$1,10 \pm 0,15$
	303	$3,28 \pm 0,45$	$3,28 \pm 0,45$	$3,42 \pm 0,70$	$2,64 \pm 0,54$	$0,98 \pm 0,15$
	310	$1,98 \pm 0,18$	$1,98 \pm 0,18$	$2,91 \pm 0,47$	$0,81 \pm 0,13$	$0,91 \pm 0,10$
ZnMD	298	$4,22 \pm 0,63$	$4,22 \pm 0,63$	$3,94 \pm 0,54$	$8,73 \pm 1,20$	$1,08 \pm 0,11$
	303	$5,18 \pm 0,71$	$5,18 \pm 0,71$	$3,45 \pm 0,59$	$2,80 \pm 0,48$	$0,94 \pm 0,12$
	310	$2,98 \pm 0,45$	$2,98 \pm 0,45$	$3,05 \pm 0,58$	$1,11 \pm 0,21$	$0,90 \pm 0,12$

Tabla 4-VI. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y MD/ZnMD a diferentes temperaturas.

	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	T (K)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
MD	-169,31	-0,49	298	-22,92
			303	-20,46
			310	-17,02
ZnMD	-130,08	-0,36	298	-22,25
			303	-20,44
			310	-17,91

4.2.4 Estudios de actividad biológica *in vivo*

4.2.4.1 Determinación de presión arterial sistólica en ratas SHR

El número de ratas SHR utilizado en cada grupo, y las dosis de ZnCl₂, MD y ZnMD administradas se seleccionaron en base a lo discutido en la sección 2.5.1. Al comienzo del experimento, los valores de presión arterial sistólica (PAS) de las ratas SHR oscilaban entre 189 y 210 mmHg. Una vez comenzada la administración diaria de los compuestos, la presión arterial fue medida semanalmente durante el período de 8 semanas (Figura 4-X). Luego de este período, los niveles de PAS del grupo tratado con ZnCl₂ se vieron inalterados respecto al grupo control sin tratamiento. Tanto el grupo tratado con MD como el tratado con ZnMD mostraron un descenso en la PAS. El grupo al cual se le administró el ligando mostró un valor medio de PAS de 144,2 ± 4,3 mmHg (descenso de 28,4% respecto al control), mientras que el grupo al cual se le administró el complejo tuvo un valor medio de PAS de 123,8 ± 6,3 mmHg (descenso de 38,6% respecto al control). Esto demostró que la complejación con Zn(II) presenta un efecto de potenciación, mejorando al menos un 10% la actividad antihipertensiva de MD.

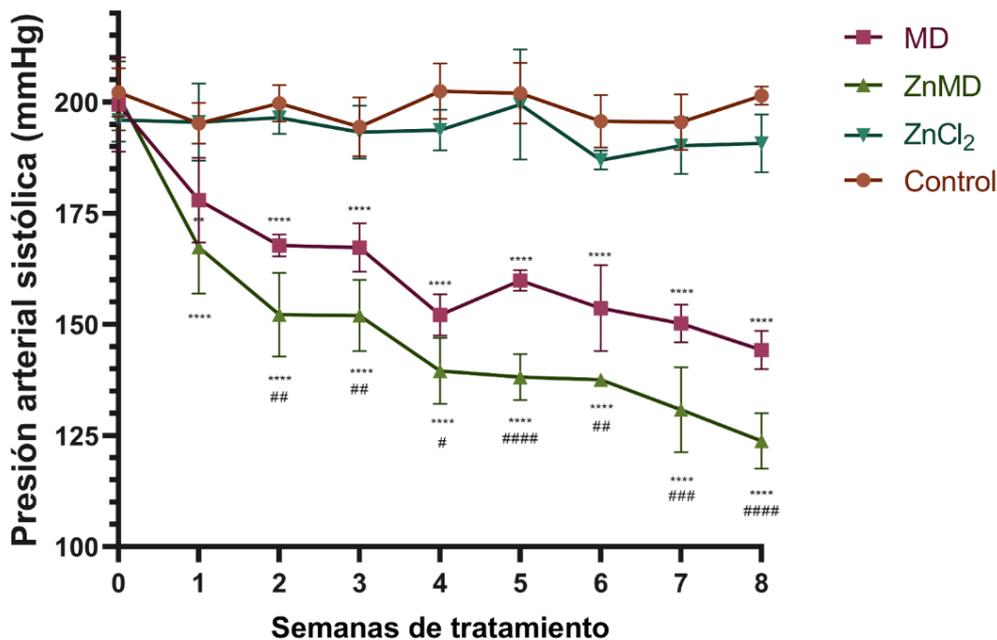


Figura 4-X. Variación de la presión arterial sistólica en función del tiempo en ratas SHR no tratadas (control) y tratadas con MD, ZnMD y ZnCl₂ (dosis de 100, 164,12 y 64,52 mg/kg/día, respectivamente).

*: P ≤ 0.05, **: P ≤ 0.01, ***: P ≤ 0.001,****: P ≤ 0.0001 (vs control).

#: P ≤ 0.05, ##: P ≤ 0.01, ###: P ≤ 0.001, ####: P ≤ 0.0001 (MD vs ZnMD).

4.2.4.2 Medida de parámetros de hipertrofia a través de ecografía

Dado que, frente a una condición de hipertensión arterial, normalmente se desarrolla hipertrófia cardíaca, resultó relevante realizar un monitoreo mediante ecografía para evaluar la misma en las ratas SHR. Las mediciones incluyeron el cambio en el grosor de la pared posterior del corazón en diástole (Δ GPPd) antes y después del tratamiento con los compuestos, el IMVI normalizado por longitud de tibia al final del tratamiento y el porcentaje de la fracción de acortamiento (%) al final del tratamiento (Figura 4-XI).

Se observó que la pared del corazón se engrosó debido a la hipertrofia provocada por la hipertensión en el grupo no tratado y en los tratados con MD y ZnCl₂. Para el grupo tratado con ZnMD no se observó este engrosamiento, por el contrario, se observó una disminución del grosor luego del tratamiento (Figura 4-XI.A). Esto sugiere que el complejo no sólo previno el desarrollo de la hipertrofia durante las 8 semanas, sino que esta se redujo respecto al estado inicial. Por otro lado, se observó una disminución del IMVI normalizado por longitud de tibia para las ratas tratadas con ZnMD que no ocurrió en el resto de los grupos (Figura 4-XI.B). Este resultado también demuestra la capacidad del complejo para prevenir la hipertrofia cardíaca. La fracción de acortamiento se ve

umentada en el tratamiento con el complejo, lo que refleja una mejor contractilidad y funcionamiento cardíaco (Figura 4-XI.C).

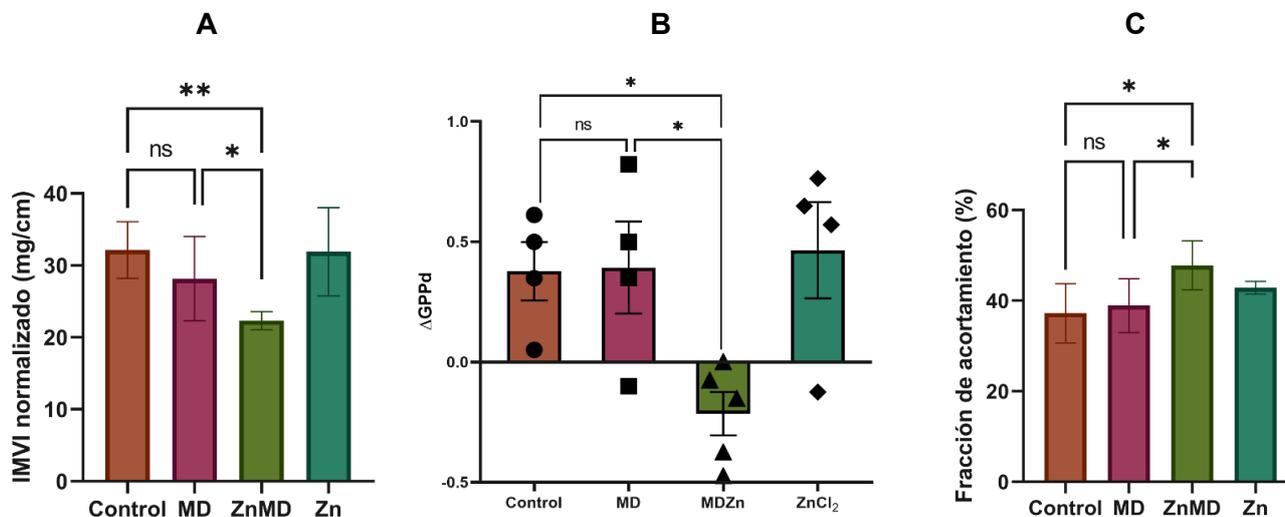


Figura 4-XI. A: Diferencia del grosor de la pared posterior del corazón durante la diástole antes y después del tratamiento de 8 semanas con MD, ZnMD y ZnCl₂ para ratas SHR. B: Índice de masa ventricular izquierda normalizado por longitud de tibia para ratas SHR luego del tratamiento de 8 semanas con MD, ZnMD y ZnCl₂. C: fracción de acortamiento del corazón de ratas SHR luego del tratamiento de 8 semanas con MD, ZnMD y ZnCl₂ (dosis de 100, 164, 12 y 64,52 mg/kg/día, respectivamente).

*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ns: diferencia no significativa.

4.2.5 Estudios de actividad biológica *ex vivo*

4.2.5.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido cardíaco de ratas SHR

El estrés oxidativo puede provocar varias alteraciones cardíacas, incluyendo la disfunción mitocondrial, donde las EROs interrumpen la cadena respiratoria y activan múltiples proteínas quinasas y factores de transcripción implicados en la señalización hipertrófica²⁰.

Las medidas en el tejido cardíaco mostraron que el tratamiento con ZnMD disminuye los niveles de EROs, a diferencia del tratamiento con MD que no produjo cambios significativos respecto al control. El tratamiento con ZnCl₂ tampoco tuvo efecto sobre los niveles basales de EROs (Figura 4-XII). Esto demuestra que la coordinación entre MD y Zn(II) confiere el efecto antioxidante observado en este ensayo.

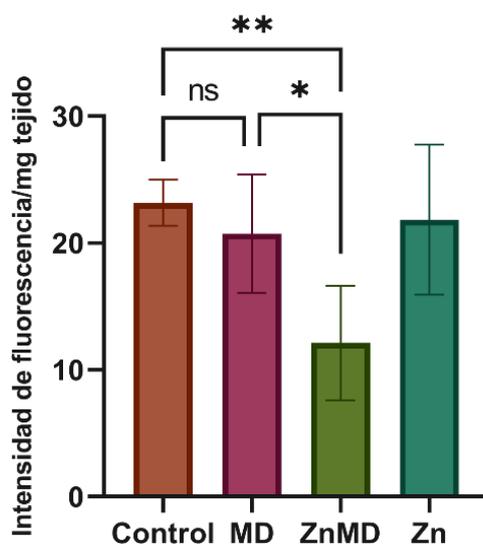


Figura 4-XII. Niveles de especies reactivas de oxígeno en tejido cardíaco de ratas SHR luego del tratamiento durante 8 semanas con MD, ZnMD y ZnCl₂ (dosis de 100, 164, 12 y 64,52 mg/kg/día, respectivamente).

*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ns: diferencia no significativa.

4.2.5.2 Medida de peroxidación lipídica en tejido cardíaco de ratas SHR

Para continuar los estudios de estrés oxidativo, se midieron los niveles de peroxidación lipídica en tejido cardíaco, que es un indicativo del daño provocado por los niveles elevados de EROs. En este ensayo se observó que el tratamiento con ZnMD provocó un descenso significativo de peroxidación lipídica respecto al control, mientras que el tratamiento con MD no mostró mejorías (Figura 4-XIII). Este resultado es consecuente con el observado para la determinación de EROs en tejido cardíaco y a partir de ellos se puede concluir que la complejación con Zn(II) conduce a la aparición de actividades antioxidantes y cardioprotectoras que el ligando no posee por sí mismo.

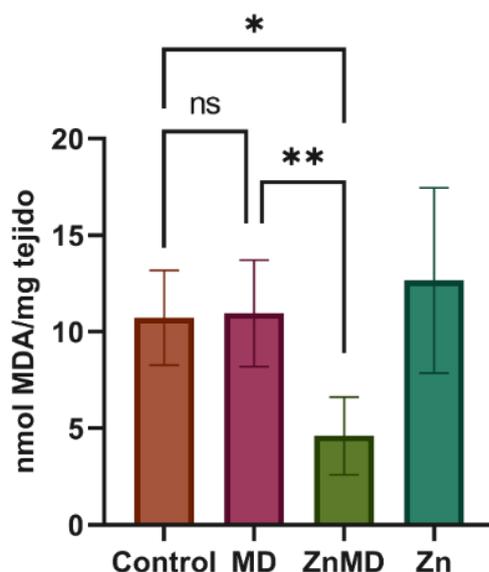


Figura 4-XIII. Niveles de MDA normalizados por mg de proteína en tejido cardíaco de ratas tratadas durante 8 semanas con MD, ZnMD y ZnCl₂ (dosis de 100, 164,12 y 64,52 mg/kg/día, respectivamente). *: P ≤ 0.05, **: P ≤ 0.01, ns: diferencia no significativa.

4.2.5.3 Producción de óxido nítrico en tejido cardíaco de ratas SHR

El óxido nítrico (NO) es producido por los cardiomiocitos gracias a la enzima Óxido Nítrico Sintasa (ONS) y actúa como un potente vasodilatador, ejerciendo un efecto relajante sobre el miocardio²¹. Las EROs, al hallarse en exceso, pueden reaccionar con las moléculas de NO disminuyendo su biodisponibilidad y provocando disfunción cardíaca e hipertensión. Además, dentro de las posibles especies generadas en estas reacciones se encuentra el anión peroxinitrito (ONO₂⁻), el cual es un poderoso oxidante capaz de generar daño en los componentes celulares y alterar el funcionamiento de la ONS²⁰.

Se midieron entonces los niveles de NO en el tejido cardíaco de las ratas SHR para investigar si los efectos benéficos de ZnMD sobre la función cardíaca estaban relacionados con el aumento en la biodisponibilidad de NO. Se observó un aumento en dichos niveles para los grupos tratados con MD y ZnMD, siendo los valores de este último significativamente mayores a los obtenidos con el ligando precursor (Figura 4-XIV). Estos resultados indican que el aumento de los niveles de NO estarían relacionados con la disminución de las EROs, y a su vez sería uno de los responsables de los efectos antihipertensivos y antihipertróficos hallados en ZnMD.

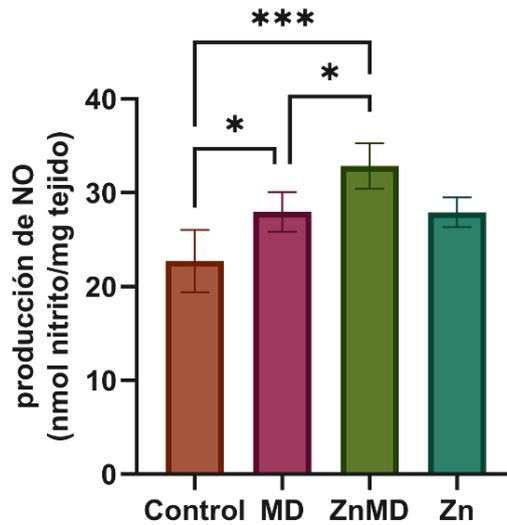


Figura 4-XIV. Niveles de óxido nítrico en homogenatos de tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas con MD, ZnMD y $ZnCl_2$ (dosis de 100, 164, 12 y 64,52 mg/kg/día, respectivamente).

*: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$, ns: diferencia no significativa.

4.2.5.4 Estudios de expresión proteica por western blot

Para investigar el mecanismo por el cual ZnMD disminuye el nivel intracelular de EROs, se midió mediante Western Blot, en homogenatos cardíacos de ratas SHR, la expresión de las subunidades gp91^{phox} catalítica y p47^{phox} citoplasmática de la enzima NADPH Oxidasa 2 (NOX2), la cual genera EROs durante su funcionamiento, y la expresión de la enzima antioxidante SOD1 (Figura 4-XV). Los resultados mostraron que el complejo ZnMD ejerció un efecto inhibitor sobre la expresión de gp91^{phox} y p47^{phox} mientras que aumentó los niveles de expresión de SOD1. Por el contrario, MD no mostró ningún efecto significativo sobre la expresión de SOD1, lo que concuerda con informes anteriores²². Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de EROs podría deberse en parte a los cambios en la expresión de estas proteínas, las cuales están relacionadas con el estado redox celular.

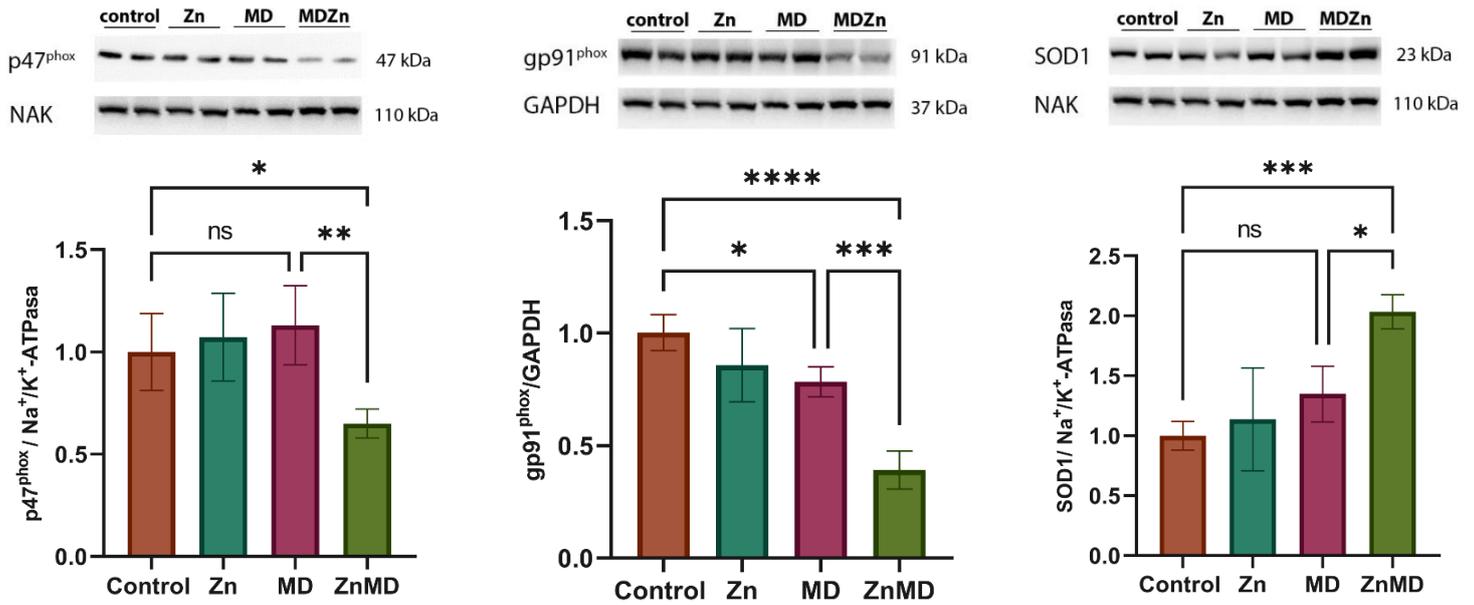


Figura 4-XV. Bandas representativas y gráficos de intensidad de banda de Western Blot para las subunidades gp91^{phox} y p47^{phox}, y la enzima SOD1. Los datos se expresan como media \pm SEM.
*: p < 0,05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; ****: p < 0.0001, ns: diferencia no significativa.

4.2.6 Estudios histológicos *ex vivo*

4.2.6.1 Determinación de colágeno tipo I y tipo III en tejido cardíaco de ratas SHR

Cuando la hipertrofia cardíaca asociada a la hipertensión ocurre, se observa un proceso denominado fibrosis, donde hay una alteración en la matriz extracelular con un incremento en los niveles de colágeno, lo cual dificulta la contracción y relajación de los miocitos²³. El colágeno puede clasificarse en diversos subtipos, entre los cuales se destacan el colágeno tipo I, asociado a rigidez, y el colágeno tipo III, asociado a una mayor flexibilidad²⁴. En base a esto, se decidió investigar la proporción de colágeno tipo I y tipo III en el tejido cardíaco de las ratas SHR luego del tratamiento con los compuestos antihipertensivos. Para medirlas, se utilizó una tinción con el colorante Picrosirius Red (Figura 4-XVI). Se observó que MD no provocó cambios respecto al control sin tratamiento, mientras que ZnMD provocó un descenso en la proporción de colágeno tipo I y un aumento en la proporción de colágeno tipo III (Figura 4-XVII). Esto indicaría que el tratamiento con ZnMD contribuiría a un menor aumento de rigidez de la

matriz extracelular debida a la fibrosis, y por tanto a una mejor contractibilidad de los cardiomiocitos.

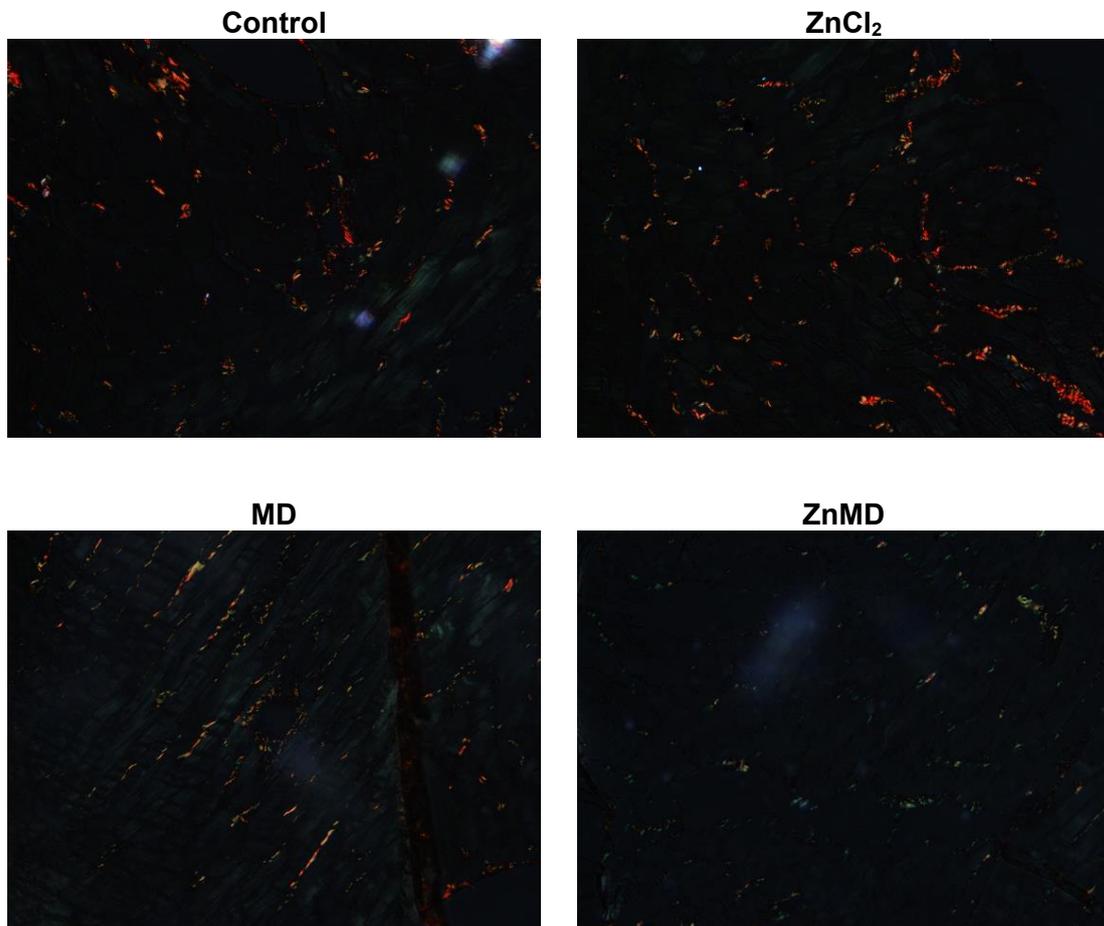


Figura 4-XVI. Imágenes representativas de la tinción de colágeno con Picrosirius Red en tejido cardíaco de ratas SHR. El colágeno tipo I aparece en color rojo-amarillo brillante, mientras que el colágeno tipo III aparece en color verde.

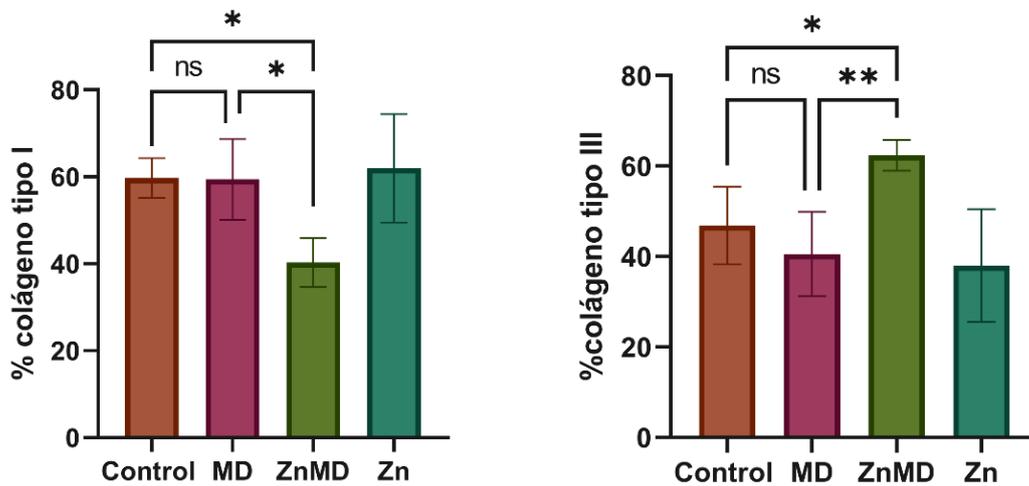


Figura 4-XVII. Porcentajes de colágeno tipo I y III en tejido de ratas SHR tratadas con $ZnCl_2$, MD y ZnMD (dosis de 64,52, 100 y 164,12 y mg/kg/día, respectivamente).

Los valores se expresan como la media \pm SEM (n = 4-5).

(*) Valores estadísticamente diferentes entre MD, ZnMD y control (*p < 0,05; **p < 0,01; ns: diferencia no significativa).

4.2.6.2 Determinación del área de sección transversal para cardiomiocitos de tejido cardíaco de ratas SHR

La hipertrofia cardíaca provoca un agrandamiento en el tamaño de los cardiomiocitos, el cual puede medirse a través de la determinación del área de sección transversal de estas células en micrografías del ventrículo izquierdo del corazón (Figura 4-XVIII). Se observó que sólo las ratas tratadas con ZnMD mostraron un área de sección transversal menor que las ratas SHR sin tratamiento, lo cual refuerza la hipótesis de que la complejación entre MD y Zn(II) confiere efectos anti-hipertróficos ausentes en los constituyentes del complejo (Figura 4-XIX).

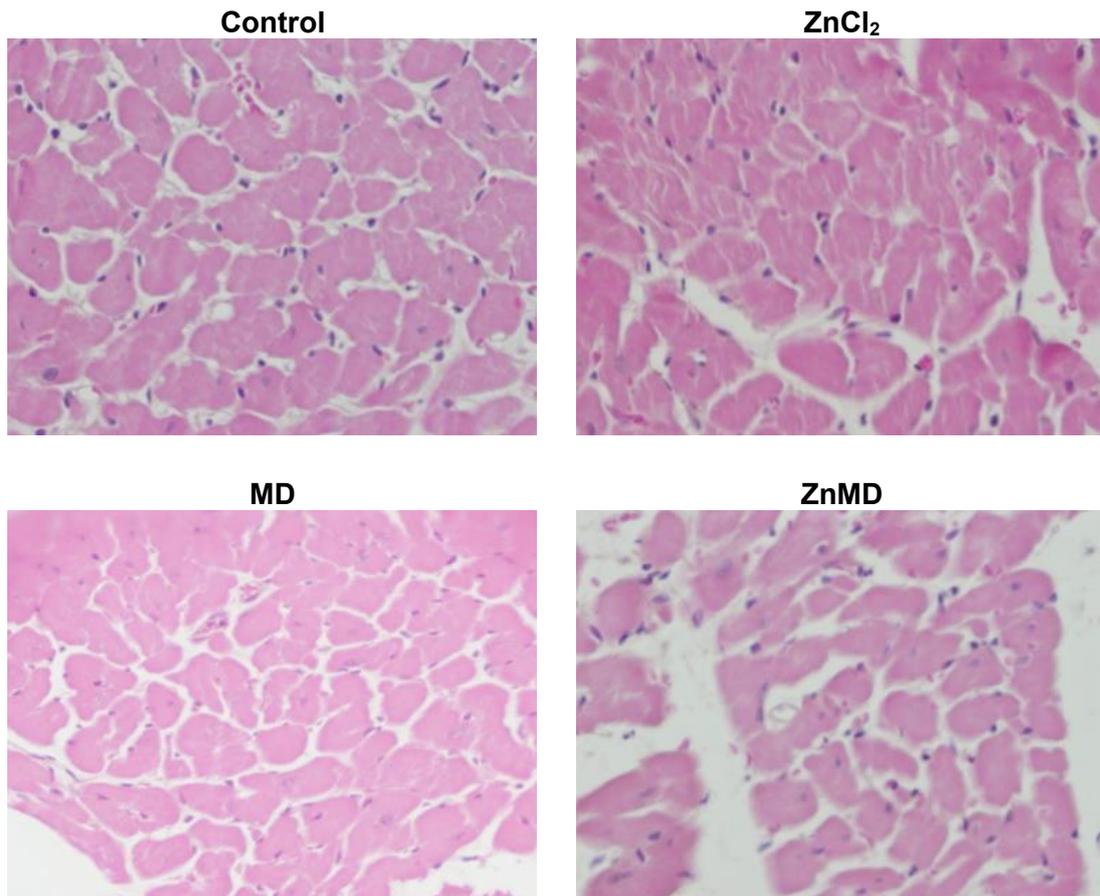


Figura 4-XVIII. Micrografías de cortes transversales de músculo cardíaco perteneciente al ventrículo izquierdo de corazón de ratas SHR tratadas con $ZnCl_2$, MD y ZnMD (dosis de 64,52, 100 y 164,12 y mg/kg/día, respectivamente), y no tratadas (ctrl).

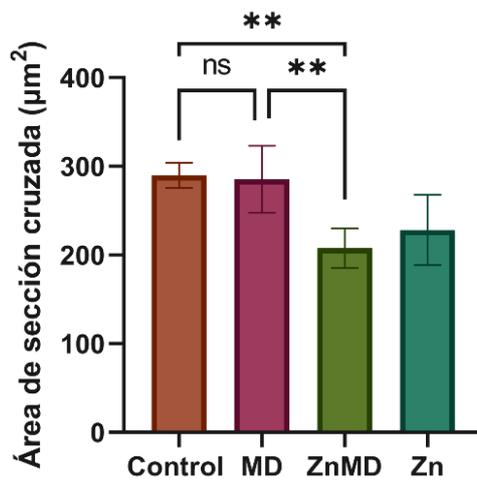


Figura 4-XIX. Área de sección transversal de cardiomiocitos de ventrículo izquierdo perteneciente a corazón de ratas SHR tratadas con $ZnCl_2$, MD y ZnMD (dosis de 64,52, 100 y 164,12 y mg/kg/día, respectivamente), y no tratadas (ctrl).

** $p < 0,01$; ns: diferencia no significativa.

4.3 Discusión

Se ha sintetizado un nuevo complejo de Zn(II) con el fármaco antihipertensivo MD y se ha caracterizado mediante espectroscopias de RMN, FTIR y UV-Vis, análisis elemental y determinaciones termogravimétricas y de conductividad molar. La interacción entre MD y ZnMD con ASB ocurre como un proceso de unión espontáneo y reversible, exhibiendo constantes K_b similares. Al determinar los parámetros termodinámicos se observa que el proceso de unión está impulsado por la entalpía, lo que implica la formación de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Se puede concluir que el complejo tiene potencial para ser transportado de forma reversible por la albúmina en el organismo.

Anteriormente se reportó la reducción de la presión arterial y la disminución de la masa del ventrículo izquierdo después de la administración prolongada de MD a ratas espontáneamente hipertensas²⁵. Los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos son parte de la familia de receptores acoplados a proteína G y funcionan como inhibidores de retroalimentación negativa de la liberación de norepinefrina en las neuronas adrenérgicas²⁶. Desempeñan un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo al inducir constricción/relajación en la pared del músculo liso de las arterias principales, influyendo así en la fisiología cardíaca. Estos receptores se expresan en la terminal nerviosa simpática presináptica cardíaca, así como en el riñón, los vasos sanguíneos y el corazón. La disfunción de estos receptores puede provocar un aumento de la liberación de norepinefrina en el corazón, o de su secreción en la glándula suprarrenal, lo que resulta en presión arterial elevada, estrés oxidativo e hipertrofia de cardiomiocitos en el tejido ventricular izquierdo^{27,28,29}. Varios fármacos agonistas, como MD, clonidina, brimonidina y moxonidina pueden activar estos receptores, previniendo así la hipertensión, la hipertrofia cardíaca y la fibrosis^{30,31}. En resumen, los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos tienen un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y su activación adecuada mediante fármacos específicos puede ser beneficiosa para prevenir las complicaciones cardíacas asociadas con la hipertensión y la hipertrofia.

La hipertensión arterial conduce al agrandamiento de las células del músculo cardíaco y a la remodelación cardíaca como mecanismo compensatorio en respuesta al estrés de las paredes cardíacas, la presión hemodinámica y la carga volumétrica. Esta hipertrofia patológica puede ser perjudicial para la función cardíaca²³. Se ha descubierto que un mejor agonismo del receptor $\alpha 2$ -adrenérgico presináptico cardíaco y vascular puede restaurar la presión arterial al rango normal, hacer retroceder la hipertrofia

cardíaca y mitigar el daño^{29,32}. En este estudio, el efecto antihipertensivo obtenido con ZnMD fue superior al logrado con el tratamiento con MD. Curiosamente, y a diferencia de ZnMD, la acción hipotensora de MD no resultó en una reducción de la hipertrofia cardíaca, la fibrosis o el estrés oxidativo (al menos con la dosis testeada en este trabajo; se hallaron reportes de reversión de hipertrofia en humanos pero utilizando dosis de 5 a 7 veces mayores³³). Estos hallazgos sugieren que ZnMD podría exhibir una mayor afinidad de unión al receptor α 2-adrenérgico en comparación con MD. Una posible explicación para esta mejora en la interacción es la existencia de un residuo de fenilalanina (F7.39) que actúa como “tapa” en el sitio de unión al receptor (Figura 4-XX), reteniendo al agonista en dicha posición a través de interacciones π - π o catión- π ³⁴. La presencia del catión zinc en ZnMD puede dar como resultado una unión más fuerte al residuo F7.39 y por tanto al bolsillo del receptor. Además, según los hallazgos de Chen y colaboradores sobre la activación del receptor α 2-adrenérgico, se puede sugerir que los grupos hidroxilo y las moléculas de agua de ZnMD pueden formar enlaces de hidrógeno con el dominio transmembrana 5 (TM5), provocando una modificación estructural en el dominio transmembrana 4 (TM4) que induciría un cambio en el segundo bucle extracelular, el cual participa directamente en la unión del agonista y en la activación del receptor α 2-adrenérgico³⁵. Estas modificaciones podrían explicar los efectos superiores de ZnMD, en comparación con MD, para reducir la presión arterial y mejorar la hipertrofia cardíaca y el estrés oxidativo.

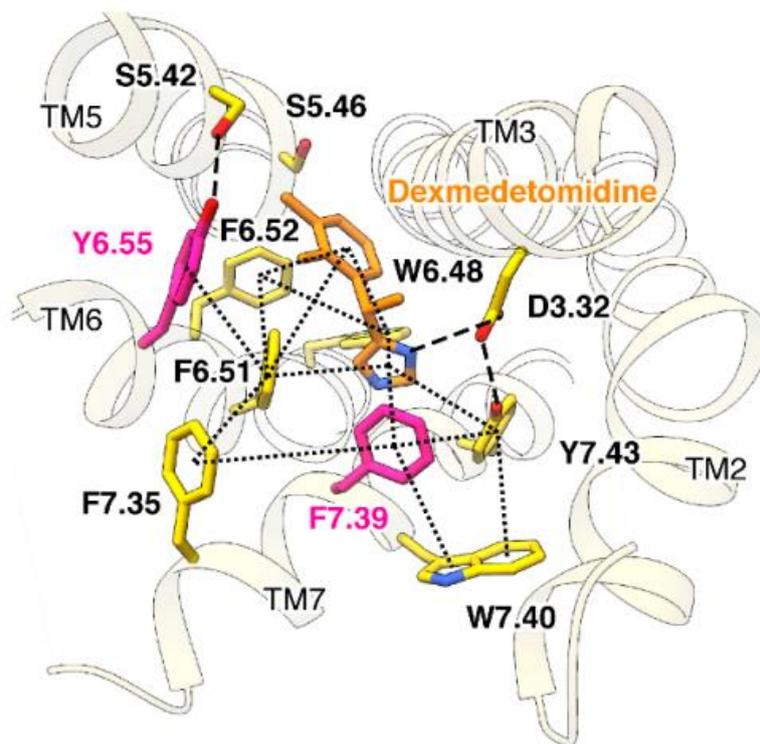


Figura 4-XX. Esquema del sitio de unión al receptor α_2 -adrenérgico. En la imagen se ilustra la interacción entre dicho sitio y la molécula dexmedetomidina (un agonista α_2 -adrenérgico). Fuente: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.112>.

Los efectos antihipertensivos y antihipertróficos observados en ZnMD se pueden atribuir también a su capacidad para disminuir la producción de EROs cardíaca al reducir la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa (gp91^{phox} y p47^{phox}) y aumentar la expresión de SOD1 en el ventrículo izquierdo. Como resultado, se produce un aumento de la biodisponibilidad de NO y una mejora de la función cardíaca. Además, al actuar como un agonista α_2 -adrenérgico más potente que su precursor, inhibiría en mayor medida la liberación de norepinefrina, la cual es capaz de disminuir los niveles de NO³⁶.

En un trabajo anterior, que utilizó ratas macho Sprague-Dawley que pesaban entre 180 y 210 g, se observó que una dieta con niveles altos de Zn (11 mg Zn/día y 44 mg de Zn/día) incrementó la PAS y los niveles de EROs³⁷. En nuestros experimentos trabajamos con ratas macho SHR que pesaban entre 200 y 300 g y que recibieron en promedio 7,7 mg Zn/día. Esta cantidad, en base a lo observado para el grupo tratado con ZnCl₂, no afectó la PAS ni los niveles de EROs.

Por último, debido a su mayor eficacia, ZnMD requerirá dosis más bajas para lograr el mismo efecto antihipertensivo que MD, lo que probablemente reducirá los efectos adversos observados anteriormente para los tratamientos con dicha droga³. Cabe destacar que, además, ZnMD tendría el beneficio adicional de prevenir la hipertrofia

cardíaca, mejorar la contractibilidad de los cardiomiocitos y disminuir los niveles de EROs en el tejido cardíaco, efectos ausentes en la droga original. Estos hallazgos proporcionan evidencia que sugiere que este complejo podría ser un fármaco terapéutico útil en el tratamiento de la hipertensión, la hipertrofia cardíaca y la disfunción cardíaca. Las nuevas propiedades de ZnMD lo convierten en un candidato prometedor para futuras investigaciones como posible opción de tratamiento en enfermedades cardiovasculares.

4.4 Conclusión

El nuevo complejo metálico sintetizado a partir del elemento esencial Zn y el fármaco antihipertensivo α -metildopa, ZnMD, presentó propiedades biológicas mejoradas respecto al fármaco original. El tratamiento con ZnMD tuvo un efecto protector contra el estrés oxidativo en el corazón, mientras que MD por sí solo no proporcionó el mismo nivel de protección. Los hallazgos sugieren que el tratamiento con el fármaco modificado estructuralmente mediante complejación con Zn(II) puede desempeñar un papel importante en la modulación de la expresión de proteínas claves en la generación y eliminación de EROs, contribuyendo a la reducción observada en los niveles de estas especies. Los mecanismos específicos que subyacen a los efectos diferenciales de ZnMD y MD en la expresión de NOX2 y SOD1 requieren una mayor exploración. Adicionalmente, los hallazgos sugieren que el tratamiento con ZnMD puede promover un equilibrio favorable entre los niveles de NO y EROs, lo que podría contribuir a los efectos antihipertróficos y antifibróticos observados, acompañados de una mejora en la función cardíaca en las ratas tratadas.

4.5 Bibliografía

- (1) Brody, T. M., Ed. Human Pharmacology: Molecular to Clinical, 2nd ed.; Mosby: St. Louis, **1994**.
- (2) Henning, M.; Rubenson, A. Evidence That the Hypotensive Action of Metyldopa Is Mediated by Central Actions of Methylnoradrenaline. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *23* (6), 407–411. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1971.tb08671.x>.
- (3) Fouladgar, M.; Ahmadzadeh, S. Application of a Nanostructured Sensor Based on NiO Nanoparticles Modified Carbon Paste Electrode for Determination of Metyldopa in the Presence of Folic Acid. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *379*, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.04.026>.

- (4) Van De Vusse, D.; Mian, P.; Schoenmakers, S.; Flint, R. B.; Visser, W.; Allegaert, K.; Versmissen, J. Pharmacokinetics of the Most Commonly Used Antihypertensive Drugs throughout Pregnancy Methyldopa, Labetalol, and Nifedipine: A Systematic Review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2022**, *78* (11), 1763–1776. <https://doi.org/10.1007/s00228-022-03382-3>.
- (5) Martínez, V. R.; Aguirre, M. V.; Todaro, J. S.; Lima, A. M.; Stergiopulos, N.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. Zinc Complexation Improves Angiotensin II Receptor Type 1 Blockade and *In Vivo* Antihypertensive Activity of Telmisartan. *Future Med. Chem.* **2021**, *13* (1), 13–23. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0093>.
- (6) Martinez, V. R.; Martins Lima, A.; Stergiopulos, N.; Velez Rueda, J. O.; Islas, M. S.; Griera, M.; Calleros, L.; Rodriguez Puyol, M.; Jaquenod De Giusti, C.; Portiansky, E. L.; Ferrer, E. G.; De Giusti, V.; Williams, P. A. M. Effect of the Structural Modification of Candesartan with Zinc on Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *946*, 175654. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175654>.
- (7) Restrepo Guerrero, A. G.; Martinez, V. R.; Velez Rueda, J. O.; Portiansky, E. L.; De Giusti, V.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Complexation of the Antihypertensive Drug Olmesartan with Zn: *In Vivo* Antihypertensive and Cardiac Effects. *Biol. Trace Elem. Res.* **2024**, *202* (1), 246–257. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03670-8>.
- (8) Vallee, B. L.; Falchuk, K. H. The Biochemical Basis of Zinc Physiology. *Physiol. Rev.* **1993**, *73* (1), 79–118. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.1.79>.
- (9) Zhang, Q.; Xue, Y.; Fu, Y.; Bao, B.; Guo, M. Zinc Deficiency Aggravates Oxidative Stress Leading to Inflammation and Fibrosis in Lung of Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **2022**, *200* (9), 4045–4057. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03011-7>.
- (10) Lu, J.; Stewart, A. J.; Sleep, D.; Sadler, P. J.; Pinheiro, T. J. T.; Blindauer, C. A. A Molecular Mechanism for Modulating Plasma Zn Speciation by Fatty Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (3), 1454–1457. <https://doi.org/10.1021/ja210496n>.
- (11) Fazakerley, G. V.; Linder, P. W.; Torrington, R. G.; Wright, M. R. W. Potentiometric and Spectrophotometric Studies of the Copper(II) Complexes of Methyldopa, Methyltyrosine, and Catechol in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1979**, No. 12, 1872. <https://doi.org/10.1039/dt9790001872>.
- (12) Peckham, A.; Gavin, D.; McNaught, I. J.; Hutton. Thermodynamic Studies on Metal-Ligand Complexes: Copper (II) Complexes of Alanine, Phenylalanine and Catechol. *South African Journal of Chemistry* **1998**.
- (13) Rajan, K. S.; Manian, A. A.; Davis, J. M.; Dekirmenjian, H. Metal Chelates of L-DOPA for Improved Replenishment of Dopaminergic Pools. *Brain Res.* **1976**, *107* (2), 317–331. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90229-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90229-8).
- (14) Slates, H. L.; Taub, D.; Kuo, C. H.; Wendler, N. L. Degradation of α -Methyl-3,4-Dihydroxyphenylalanine (α -MethylDOPA). *J. Org. Chem.* **1964**, *29* (6), 1424–1429. <https://doi.org/10.1021/jo01029a039>.
- (15) Öhrström, L.; Michaud-Soret, I. Fe–Catecholate and Fe–Oxalate Vibrations and Isotopic Substitution Shifts from DFT Quantum Chemistry. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103* (2), 256–264. <https://doi.org/10.1021/jp981508f>.
- (16) Makuraza, J. Vibrational and Electronic Spectra of Natural Dyes Constituents for Solar Cell Application: DFT and TDDFT Study. *Int. J. Mater. Sci. Appl.* **2015**, *4* (5), 314. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.16>.
- (17) Valerio, T. L.; Maia, G. A. R.; Gonçalves, L. F.; Viomar, A.; Banczek, E. D. P.; Rodrigues, P. R. P. Study of the Nb₂O₅ Insertion in ZnO to Dye-Sensitized Solar Cells. *Mater. Res.* **2019**, *22* (suppl 1), e20180864. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2018-0864>.

- (18) Talebpour, Z.; Haghgoo, S.; Shamsipur, M. ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Analysis for Simultaneous Determination of Levodopa, Carbidopa and Methyldopa in Human Serum and Pharmaceutical Formulations. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506* (1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.081>.
- (19) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- (20) Dubois-Deruy, E.; Peugnet, V.; Turkieh, A.; Pinet, F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* **2020**, *9* (9), 864. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>.
- (21) Ahmad, A.; Dempsey, S. K.; Daneva, Z.; Azam, M.; Li, N.; Li, P.-L.; Ritter, J. K. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (9), 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>.
- (22) Chen, G.; Wilson, R.; Cumming, G.; Smith, W. E.; Fraser, W. D.; Walker, J. J.; Mckillop, J. H. Effects of Atenolol, Labetalol and Methyldopa on Endogenous Antioxidants In-Vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *47* (1), 42–45. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb05731.x>.
- (23) Saheera, S.; Krishnamurthy, P. Cardiovascular Changes Associated with Hypertensive Heart Disease and Aging. *Cell Transplant.* **2020**, *29*, 096368972092083. <https://doi.org/10.1177/0963689720920830>.
- (24) Singh, D.; Rai, V.; Agrawal, D. K. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol. Cardiovasc. Med.* **2023**, *7* (1), 5–16. <https://doi.org/10.26502/fccm.92920302>.
- (25) Tomanek, R. J. Selective Effects of Alpha-Methyldopa on Myocardial Cell Components Independent of Cell Size in Normotensive and Genetically Hypertensive Rats. *Hypertension* **1982**, *4* (4), 499–506. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.4.4.499>.
- (26) Giovannitti, J. A.; Thoms, S. M.; Crawford, J. J. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesth. Prog.* **2015**, *62* (1), 31–38. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-62.1.31>.
- (27) Lympelopoulos, A.; Rengo, G.; Koch, W. J. Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy. *Circ. Res.* **2013**, *113* (6), 739–753. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300308>.
- (28) Cotecchia, S.; Del Vesco, C. D.; Colella, M.; Caso, S.; Diviani, D. The Alpha1-Adrenergic Receptors in Cardiac Hypertrophy: Signaling Mechanisms and Functional Implications. *Cell. Signal.* **2015**, *27* (10), 1984–1993. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.06.009>.
- (29) Weng, X.; Liu, H.; Zhang, X.; Sun, Q.; Li, C.; Gu, M.; Xu, Y.; Li, S.; Li, W.; Du, J. An α_2 -Adrenoceptor Agonist: Dexmedetomidine Induces Protective Cardiomyocyte Hypertrophy through Mitochondrial-AMPK Pathway. *Int. J. Med. Sci.* **2020**, *17* (16), 2454–2467. <https://doi.org/10.7150/ijms.47598>.
- (30) Gilsbach, R.; Schneider, J.; Lothar, A.; Schickinger, S.; Leemhuis, J.; Hein, L. Sympathetic 2-Adrenoceptors Prevent Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Mice at Baseline but Not after Chronic Pressure Overload. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *86* (3), 432–442. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq014>.
- (31) Motiejunaite, J.; Amar, L.; Vidal-Petiot, E. Adrenergic Receptors and Cardiovascular Effects of Catecholamines. *Ann. Endocrinol.* **2021**, *82* (3–4), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2020.03.012>.

- (32) Gavras, I. Role of A2-Adrenergic Receptors in Hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2001**, *14* (11), S171–S177. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(01\)02085-4](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(01)02085-4).
- (33) Fouad, F. M.; Nakashima, Y.; Tarazi, R. C.; Salcedo, E. E. Reversal of Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients Treated with Methyldopa. *Am. J. Cardiol.* **1982**, *49* (4), 795–801. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(82\)91961-0](https://doi.org/10.1016/0002-9149(82)91961-0).
- (34) Wu, Y.; Zeng, L.; Zhao, S. Ligands of Adrenergic Receptors: A Structural Point of View. *Biomolecules* **2021**, *11* (7), 936. <https://doi.org/10.3390/biom11070936>.
- (35) Chen, X.; Xu, Y.; Qu, L.; Wu, L.; Han, G. W.; Guo, Y.; Wu, Y.; Zhou, Q.; Sun, Q.; Chu, C.; Yang, J.; Yang, L.; Wang, Q.; Yuan, S.; Wang, L.; Hu, T.; Tao, H.; Sun, Y.; Song, Y.; Hu, L.; Liu, Z.-J.; Stevens, R. C.; Zhao, S.; Wu, D.; Zhong, G. Molecular Mechanism for Ligand Recognition and Subtype Selectivity of α_2C Adrenergic Receptor. *Cell Rep.* **2019**, *29* (10), 2936–2943.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.112>.
- (36) Thandapilly, S. J.; Louis, X. L.; Yang, T.; Stringer, D. M.; Yu, L.; Zhang, S.; Wigle, J.; Kardami, E.; Zahradka, P.; Taylor, C.; Anderson, H. D.; Netticadan, T. Resveratrol Prevents Norepinephrine Induced Hypertrophy in Adult Rat Cardiomyocytes, by Activating NO-AMPK Pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *668* (1–2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.042>.
- (37) Yanagisawa, H.; Miyazaki, T.; Nodera, M.; Miyajima, Y.; Suzuki, T.; Kido, T.; Suka, M. Zinc-Excess Intake Causes the Deterioration of Renal Function Accompanied by an Elevation in Systemic Blood Pressure Primarily Through Superoxide Radical-Induced Oxidative Stress. *Int. J. Toxicol.* **2014**, *33* (4), 288–296. <https://doi.org/10.1177/1091581814532958>.

Capítulo 5

Neuroprotección

Compuesto neuroprotector de L-Dopa y Zn(II)

5.1 Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es una afección cerebral que produce trastornos mentales y del sueño, y afecta los movimientos generando temblores y rigidez. Empeora con el tiempo y suele ocurrir en personas mayores. En 2019, había 8.5 millones de personas con EP¹. La EP se caracteriza por una deficiencia del neurotransmisor dopamina, como consecuencia de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la Sustancia Negra. Aunque no hay cura para la EP, los síntomas pueden reducirse con la administración conjunta de L-Dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina; LD) y carbidopa (ácido (2S)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidrazino-2-metilpropanoico; CD), que aumenta los niveles de dopamina en el cerebro². LD es un aminoácido que puede transformarse en dopamina mediante su descarboxilación catalizada por la enzima Dopa Descarboxilasa. CD actúa como inhibidor competitivo de dicha enzima en la sangre periférica, maximizando así la cantidad de LD que llegará intacta al cerebro. La capacidad de LD para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), y la incapacidad de CD para atravesarla, es la clave para que este tratamiento funcione (Figura 5-I). Cabe mencionar que, en caso de generarse dopamina en la sangre periférica, esta no podría cruzar la BHE y causaría efectos secundarios como náuseas, vómitos, hipotensión y arritmias cardíacas³.

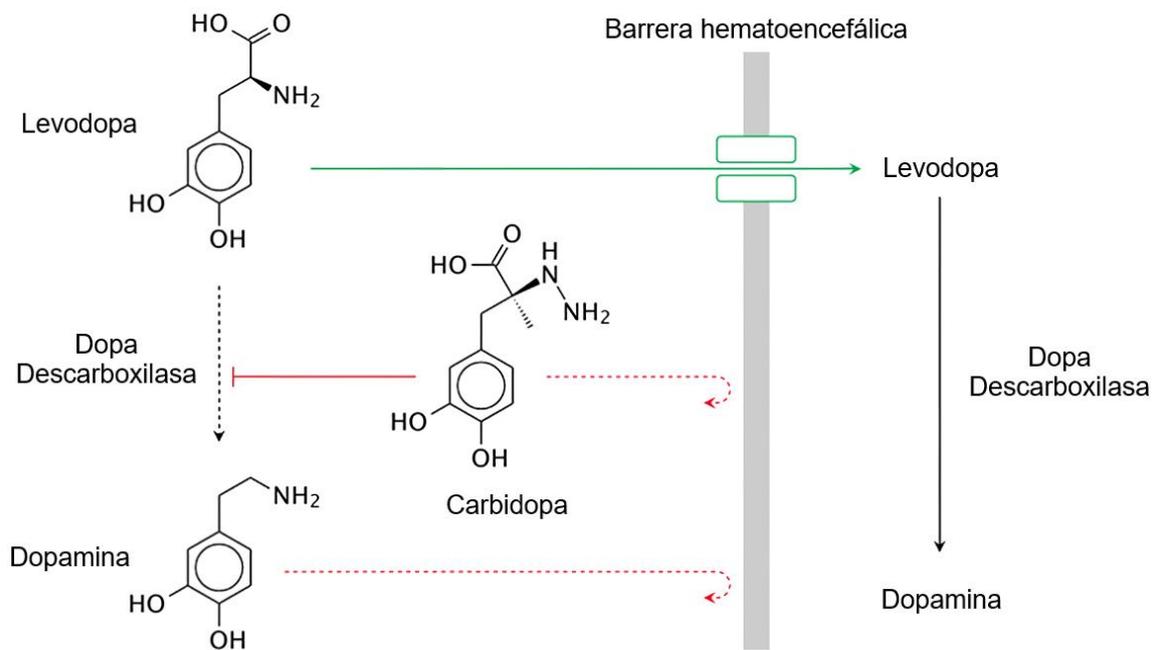


Figura 5-I. Esquema del funcionamiento del tratamiento para el Parkinson con levodopa + carbidopa.

En cultivos neuronales *in vitro* se ha observado que la administración de LD conduce a un aumento en niveles de dopamina, con el efecto adverso de generación de EROs⁴, cuyo exceso está asociado con la muerte neuronal en condiciones tales como EP, Alzheimer, autismo, depresión, esquizofrenia, entre otras⁵. Sin embargo, también se ha observado que la coadministración de LD + CD es capaz de reducir el daño en el ADN producido por EROs⁶, probablemente debido a que la actividad antioxidante de CD (comprobada experimentalmente en la sección 3.5.4) fue suficiente para contrarrestar la generación de EROs generados tanto en el metabolismo de LD como en otros procesos celulares. Por otro lado, a pesar del aumento en los niveles de EROs, existen estudios que demuestran que LD es capaz de actuar como agente neuroprotector, promoviendo el crecimiento y diferenciación de neuronas dopaminérgicas⁷.

El zinc es esencial para la señalización neuronal. Modula la plasticidad neuronal y la actividad sináptica tanto en las etapas neonatales como en las adultas. También regula la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las neuronas, y su deficiencia está relacionada con la aparición de enfermedades neurodegenerativas y con la disfunción neurocognitiva y de memoria. Además, se ha observado que una deficiencia temprana de Zn puede provocar un deterioro cognitivo a largo plazo que no puede ser corregido con la suplementación posterior⁸.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar un complejo de coordinación entre el fármaco LD y Zn(II) con el objetivo de modificar su estructura para mejorar su capacidad neuroprotectora. Anteriormente, se reportó la síntesis (en fase sólida) de un complejo con estructura $[Zn(LD)_2]$ a partir de acetato de Zinc y LD en relación 2:1⁹. En nuestro caso, debido a las diferentes condiciones de síntesis, se logró obtener un compuesto con estructura $[Zn(LD)(H_2O)OH] \cdot 3H_2O$ (ZnLD).

La capacidad neuroprotectora de LD y ZnLD fue evaluada, en cultivos primarios de neuronas de embriones de ratas Sprague-Dawley de 18 días de edad, a través de la reversión del daño generado por niveles excesivos del agente excitotóxico glutamato (medido a través de los parámetros de viabilidad celular, longitud de neuritas, activación de caspasas 3/7 e integridad de la membrana celular).

5.2 Resultados

5.2.1 Síntesis del complejo ZnLD ($[\text{Zn}(\text{LD})(\text{H}_2\text{O})\text{OH}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

Para sintetizar ZnLD (Figura 5-II) se preparó una solución 0,5 mM de LD en 100 mL de agua. Luego, se añadieron lentamente 0,5 mM de ZnCl_2 disueltos en 1 mL de HCl 0,1 M. La mezcla resultante fue agitada durante 30 minutos bajo burbujeo de nitrógeno (para prevenir la oxidación de LD). Posteriormente, se agregó gota a gota una solución de KOH 1M hasta alcanzar pH 6,5. El precipitado obtenido fue filtrado, lavado con agua y etanol y secado bajo corriente de nitrógeno gaseoso.

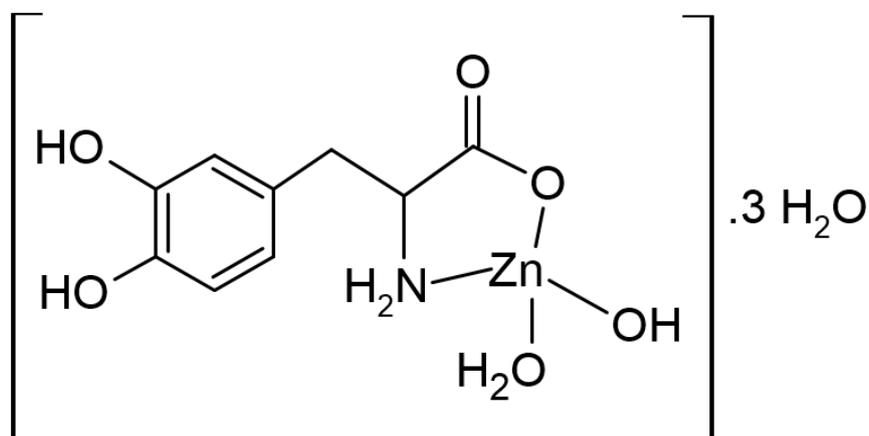


Figura 5-II. Estructura del complejo ZnLD.

5.2.2 Caracterización fisicoquímica

Estudios en fase sólida

5.2.2.1 Análisis elemental

El análisis elemental realizado para el compuesto ZnLD mostró porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno consistentes con los porcentajes teóricos esperados para la fórmula $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_9\text{NZn}$ propuesta. El contenido de Zinc determinado en nuestro laboratorio por el método espectrofotométrico de Zincon también fue similar al calculado (Tabla 5-I).

Tabla 5-I. Porcentajes elementales esperados (de acuerdo a la fórmula $C_9H_{19}O_9NZn$) y obtenidos para ZnLD.

Elemento	% Calculado	% Experimental
C	30,8	30,8
N	4,0	3,9
H	5,4	5,2
Zn	18,6	18,8

De igual manera que para ZnMD (sección 4.2.2.1), se evaluó si la estructura de ZnLD contenía iones cloruro a través del método de Mohr. Los resultados indicaron que dichos iones no formaban parte de la composición del complejo, por lo que se concluyó que su electroneutralidad se alcanzó mediante la coordinación del centro metálico con un anión OH^- .

5.2.2.2 Análisis termogravimétrico

El TGA para ZnLD (Figura 5-III) (atmósfera de oxígeno, 50 mL/min) mostró una primera pérdida de peso correspondiente a 3 moléculas de H_2O de hidratación (15,4 % calculado y 15,0 % experimental, hasta 100 °C), y una segunda pérdida correspondiente a una molécula de H_2O coordinada (5,0 % calculado y 4,7 % experimental, entre 100 y 230 °C). Se alcanzó un peso constante de 23,0% a partir de los 650 °C, similar al valor esperado de 23,2% para el residuo ZnO, el cual fue identificado por FTIR (ver Sección 3.2.2.2).

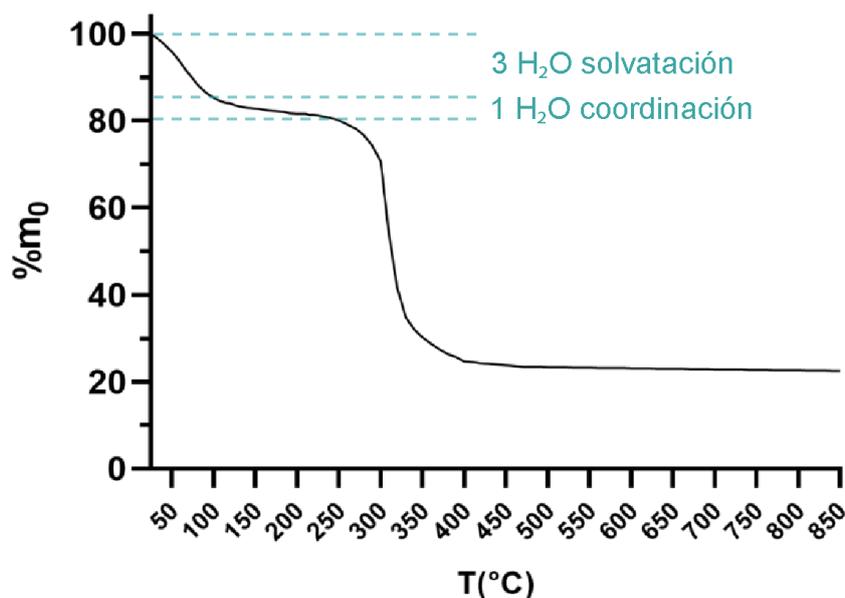


Figura 5-III. Curva del TGA de la descomposición de ZnLD.

5.2.2.3 Espectroscopía FTIR

La Tabla 5-II muestra las asignaciones obtenidas para las bandas de los espectros FTIR de LD y ZnLD. Las asignaciones de LD fueron realizadas en base a los datos reportados en trabajos anteriores¹⁰.

El espectro FTIR de ZnLD mostró bandas de estiramiento OH correspondientes a la presencia de agua e hidroxilos en 3429 cm^{-1} . Las bandas de OH (catecol) en LD aparecieron a 3382 cm^{-1} (νOH), 1407 cm^{-1} ($\delta_{\text{ep}}\text{C}_{\text{arom}}\text{OH}$) y 1065 cm^{-1} ($\delta_{\text{fp}}\text{C}_{\text{arom}}\text{OH}$), y no se vieron modificadas en gran medida para ZnLD, lo que indica que estos grupos no interaccionaron con el ion metálico y que el ligando no sufrió procesos de oxidación (Figura 5-IV). La banda de estiramiento simétrico $\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ localizada en 3210 cm^{-1} cambió su posición desplazándose a mayor número de onda y disminuyó su intensidad al coordinarse, lo que indica que este grupo interactuó con el zinc. La banda de torsión en plano de este grupo asignada en 1634 cm^{-1} quedó enmascarada por una banda ancha en el complejo, centrada en 1589 cm^{-1} . La banda a 1256 cm^{-1} , correspondiente a la torsión CNH, también se desplazó a 1266 cm^{-1} , indicando la implicación de este grupo en la coordinación con el metal.

Se observó que la banda del modo de estiramiento $\nu\text{C}=\text{O}$ a 1657 cm^{-1} ($-\text{COOH}$) presente en LD desapareció en el complejo, y aparecieron dos nuevas bandas ubicadas en 1589 cm^{-1} y 1421 cm^{-1} que fueron asignadas a los correspondientes modos de vibración $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ y $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ del grupo carboxilato, respectivamente. La diferencia de posición entre estas dos bandas es indicativa de la coordinación monodentada de este grupo con el metal. Las bandas relacionadas con el modo de estiramiento $\nu\text{C}-\text{O}$ y las torsiones δCOH del grupo carboxílico (1460 cm^{-1} , 1443 cm^{-1} , 1138 cm^{-1})¹⁰ disminuyeron su intensidad en el espectro FTIR del complejo.

Todos estos datos sugieren una coordinación a través de los grupos amino y carboxilato. Este tipo de coordinación también ha sido reportada en estudios anteriores mediante titulación potenciométrica en soluciones acuosas¹¹.

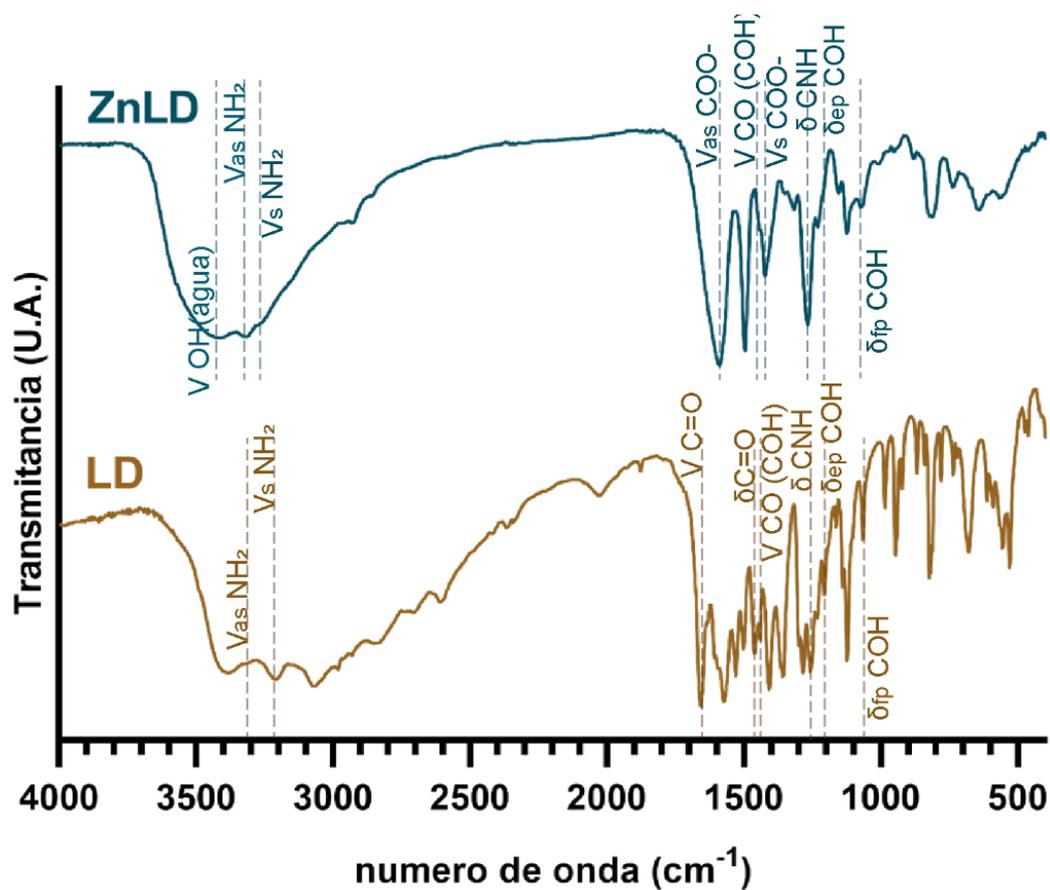


Figura 5-IV. Espectros FTIR de LD y ZnLD.

Tabla 5-II. Asignaciones para las bandas de los espectros FTIR de LD y ZnLD. Abreviaturas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, media; d, débil; a, ancha; h, hombro; ep, en plano; fp, fuera del plano; arom, aromático; as, asimétrico; s, simétrico.

Asignaciones	LD	ZnLD
ν OH (agua)	-	3429 mf, a
ν OH (catecol)	3382 mf	3390 mf
ν_{as} NH ₂	3315 mf	3317 mf
ν_s NH ₂	3210 mf	3254 h
ν C=O	1657 mf	-
ν_{as} COO ⁻	-	1589 mf, a
δ COH	1460 f	-
ν CO (COH)	1443 f	1440 h
ν_s COO ⁻	-	1421 m
$\delta_{ep}C_{arom}OH$	1407 f	1397 h
δ CNH	1256 f	1266 f
$\delta_{ep}COH$	1205 d	1209 h
ν CO (COH)	1138 m	1153 d
$\delta_{fp}C_{arom}OH$	1065 m	1071 d

Estudios en solución

El compuesto ZnLD presentó una solubilidad baja en la mayoría de los solventes probados (agua, metanol, etanol, isopropanol, acetona, éter etílico, dimetilformamida, acetonitrilo), siendo moderadamente soluble sólo en DMSO.

5.2.2.4 Conductividad

La conductividad molar (Λ_m) de una solución 10^{-3} M de ZnLD en DMSO fue medida durante 4 h (Tabla 5-III). Se observó un valor constante de alrededor de $12 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, por lo que ZnLD sería un compuesto no-electrolito que no genera especies cargadas en DMSO durante al menos 4 horas.

Tabla 5-III. Conductividad en función del tiempo para una solución 10^{-3} M de ZnLD en DMSO.

Tiempo (min)	$\Lambda_m (\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1})$
0	13
10	12
20	10
30	10
60	11
120	12
240	13

5.2.2.5 Espectroscopía UV-Visible y medidas de estabilidad

El espectro UV-Visible de LD en agua ($\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$, $\epsilon = 1840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) experimentó la aparición de un hombro a 301 nm luego de la complejación con Zn(II) ($\epsilon_{301} = 720 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El espectro de LD no mostró cambios apreciables luego de 4 horas, mientras que el de ZnLD sufrió ligeros cambios en dicho periodo de tiempo (Figura 5-V). Sin embargo, estos cambios no son de una magnitud importante, por lo que consideramos que el compuesto puede ser utilizado en los ensayos subsecuentes, en donde los tiempos de manipulación son mucho menores que 4 horas.

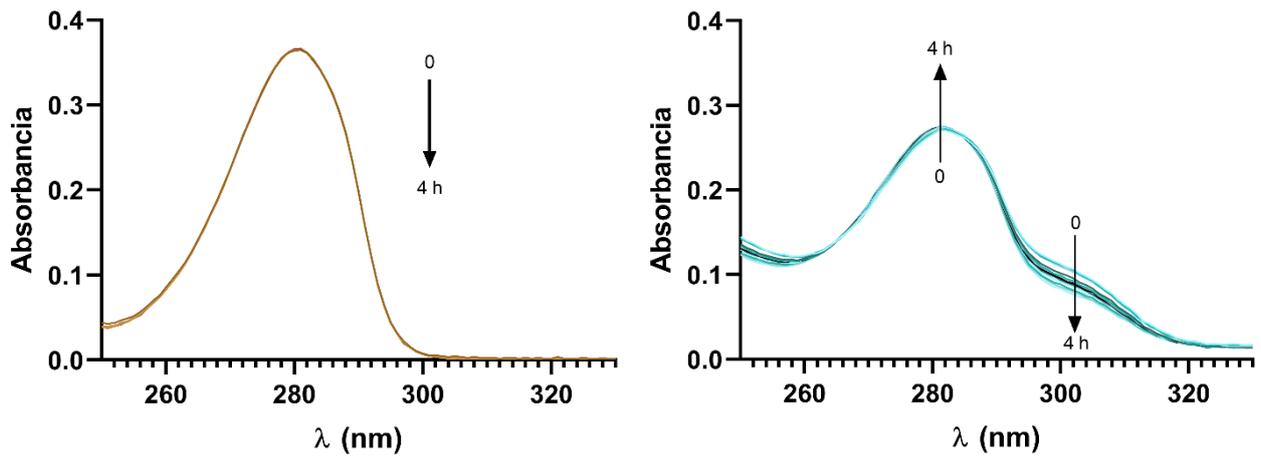


Figura 5-V. Variación en el tiempo del espectro UV-Visible de una solución acuosa 2×10^{-4} M de LD (izquierda) y de una solución acuosa $1,5 \times 10^{-4}$ M de ZnLD (derecha).

5.2.3 Estudios de biodisponibilidad

5.2.3.1 Ensayo de reparto y predicciones computacionales

Se realizaron medidas de coeficiente de reparto, para estimar la capacidad de LD y ZnLD de atravesar la BHE, en un sistema agua/octanol mediante el método del frasco agitado (ver Sección 2.3.2). Las concentraciones de LD y ZnLD se midieron en la fase acuosa antes y después del reparto mediante espectroscopía UV-Vis (Figura 5-VI).

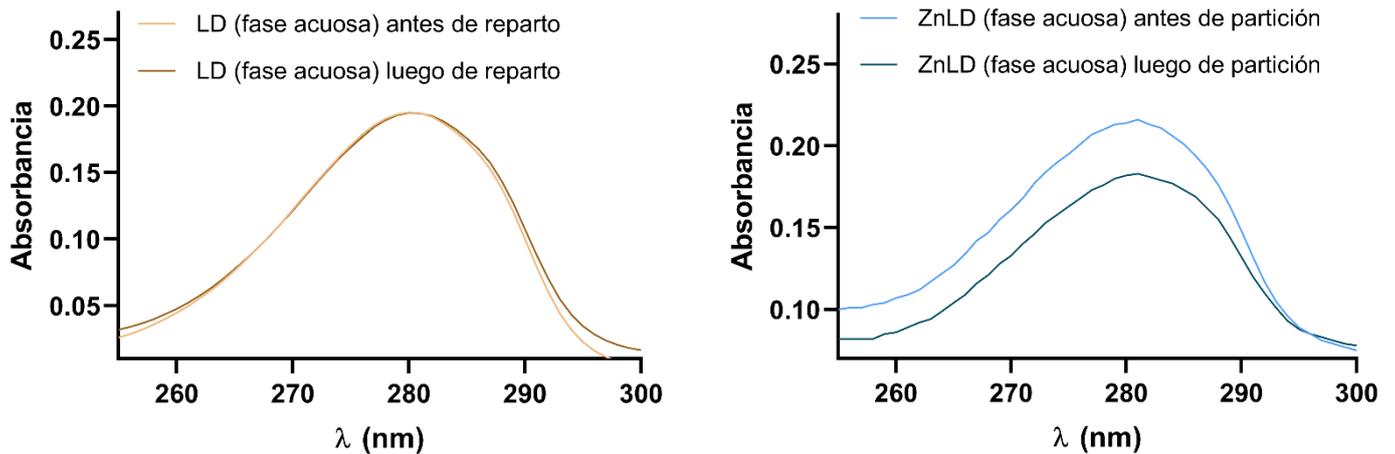


Figura 5-VI. Espectros UV-Visible para LD (izquierda) y ZnLD (derecha) en fase acuosa, antes y después del reparto en n-octanol. Se utilizaron concentraciones iniciales de 10^{-4} M.

Las concentraciones medidas se utilizaron para calcular el valor de P_{ow} de cada compuesto. Los cálculos para LD resultaron en un valor de P_{ow} de 0,0076 ($\log P = -2,12$):

$$Pow (LD) = \frac{Coct}{Cw} = \frac{Cw(i) - Cw(f)}{Cw(f)} = \frac{1 \cdot 10^{-4} M - 9,92 \cdot 10^{-5} M}{9,92 \cdot 10^{-5} M} = 0,0076$$

Por otro lado, el valor de P_{ow} de ZnLD fue de 0,18 ($\log P = -0,74$):

$$Pow (ZnLD) = \frac{Coct}{Cw} = \frac{Cw(i) - Cw(f)}{Cw(f)} = \frac{1 \cdot 10^{-4} M - 8,47 \cdot 10^{-5} M}{8,47 \cdot 10^{-5} M} = 0,18$$

Con el fin de comparar los valores experimentales, se realizaron cálculos de predicciones de las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas empleando el simulador *Swiss ADME*, siendo la sigla ADME: absorción, distribución, metabolización y eliminación (Tabla 5-IV). Los valores experimentales de $\log P$ se asemejan a los obtenidos mediante predicción farmacocinética en la web¹² (-2,26 para LD y -0,86 para ZnLD) calculados mediante el método MLOGP diseñado por Muriguchi y colaboradores en 1992¹³. Este método fue diseñado en base a una regresión lineal múltiple, donde se correlacionó el valor de $\log P$ de 1230 compuestos con varias de sus características, tales como el número total de átomos de oxígeno y nitrógeno, número de insaturaciones, presencia de anillos aromáticos, nitrógenos cuaternarios o grupos nitro, etc.

Tabla 5-IV. Parámetros obtenidos en la simulación computacional *Swiss ADME* para LD y ZnLD.

Parámetro	LD	ZnLD
Peso molecular (g/mol)	197,19	281,57
Número de átomos pesados	14	16
Número de enlaces rotatorios	3	5
Número de aceptores de puente de hidrógeno	5	6
Número de dadores de puente de hidrógeno	4	4
TPSA	103,78	96,22
Log Pow	-2,26	-0,86

La comparación entre los valores de P_{ow} de LD y ZnLD demuestra que ZnLD posee mayor afinidad por la fase orgánica que LD, lo cual supondría una mayor capacidad del complejo para atravesar la BHE de manera pasiva respecto al ligando.

Adicionalmente, se realizaron tests de “compuesto tipo droga” para ZnLD (test de Lipinski¹⁴, Ghose¹⁵, Veber¹⁶, Egan¹⁷ y Muegge¹⁸). Estos test predicen si un compuesto es candidato a utilizarse como droga en base a su biodisponibilidad, la cual se estima con modelos computacionales que tienen en cuenta distintas características como peso molecular, logP, número de grupos donores y aceptores de puentes de hidrógeno, número de enlaces rotables y rígidos, número de ciclos aromáticos, área de superficie polar (PSA) y presencia de ciertos grupos funcionales (como aminas terciarias alifáticas, grupos alcohol y carboxamidas). El complejo obtuvo resultados positivos en todos los test utilizados (Tabla 5-V). El puntaje en biodisponibilidad resultó favorable, dado que cualquier compuesto con una puntuación de biodisponibilidad de $\geq 0,55$ se considera ideal y se absorbe muy bien por el cuerpo.

Tabla 5-V. Resultados obtenidos para LD y ZnLD en los tests de “compuesto tipo droga”.

Test	LD	ZnLD
Lipinski	Sí; sin violaciones	Sí; sin violaciones
Ghose	Sí	Sí
Veber	Sí	Sí
Egan	Sí	Sí
Muegg	No; 2 violaciones (PM<200; Log P<-2)	Sí
Puntaje de biodisponibilidad	0,55	0,55

Asimismo, se encontró que el complejo fue positivo para el test de PAINS (*pan-assay interference compounds*)¹⁹, es decir, que posee regiones que podrían interaccionar de manera no específica con ciertos *targets* biológicos, lo que podría interferir con algunos ensayos de detección (*screening*). En el test de Brenk²⁰ se reconocieron al grupo catecol y al Zn como regiones inestables o reactivas, que pueden contribuir a la toxicidad (Tabla 5-VI). Por otra parte, se determinó que el complejo tendría suficiente potencial para progresar hacia un programa completo de desarrollo de fármacos (compuesto líder). En el estudio de descubrimiento de fármacos se puede evaluar la facilidad de síntesis (accesibilidad sintética). El puntaje asignado va desde 1 (fácil de sintetizar) hasta 10 (muy difícil para sintetizar). En la predicción, el complejo obtuvo un buen puntaje (2,00), por lo que sería útil para ser comparado en un *screening* virtual de posibles candidatos a drogas.

Tabla 5-VI. Tests de química medicinal realizados para LD y ZnLD.

Tests de Química Medicinal	LD	ZnLD
PAINS (<i>pan-assay interference compounds</i>)	1 alerta: catecol	1 alerta: catecol
Brenk (posible toxicidad)	1 alerta: catecol	2 alertas: catecol y metal pesado
Características de compuesto líder	No: 1 violación PM<250	Sí
Puntaje de accesibilidad sintética	1,81	2,00

5.2.4 Evaluación de los efectos neuroprotectores *in vitro*

Como se detalló en la sección 2.7.2, estos ensayos se basan en la generación de neurotoxicidad por medio de L-glutamato. De esta manera, las neuronas primarias de ratas se tratan con los compuestos de interés antes del agregado de glutamato con la finalidad de evaluar sus efectos protectores frente a la excitotoxicidad.

5.2.4.1 Determinación de viabilidad de neuronas

La incubación de 24 horas con glutamato 100 μM produjo una disminución del 26% en la viabilidad de las neuronas. Pudo observarse que la preincubación de una hora con LD 10 μM y ZnLD 10 μM fue capaz de prevenir de manera significativa la muerte inducida por glutamato (Figura 5-VII). En el ensayo se incluyó el efecto producido por la incubación con dizocilpina, MK-801, que es un antagonista no competitivo del receptor de glutamato. Se observó que este control positivo pudo revertir la mortalidad de manera similar a LD/ZnLD.

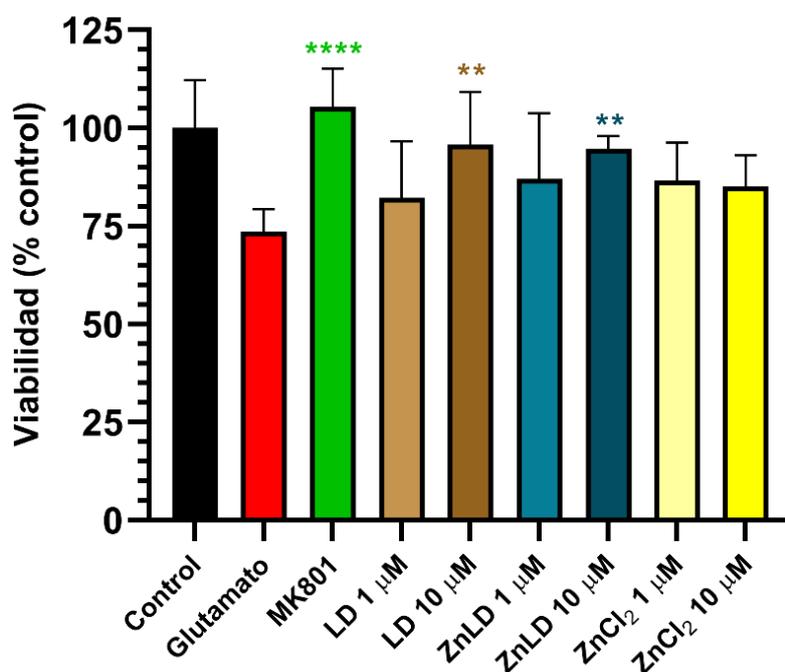


Figura 5-VII. Viabilidad de neuronas determinada mediante tinción de ácidos nucleicos con Hoechst 33342. Antes de la determinación, las células fueron pretratadas durante una hora con los compuestos indicados y luego incubadas con glutamato (agente excitotóxico) durante 24 horas. Los datos se representan como el porcentaje medio del número de células respecto al control sin glutamato \pm desviación estándar para cada condición. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ diferencia respecto al control positivo de toxicidad (Glutamato).

5.2.4.2 Determinación de longitud de neuritas

Se evaluó la extensión de las neuritas como otro parámetro de excitotoxicidad. La incubación de las neuronas por 24 horas con glutamato 100 μ M redujo la extensión de sus neuritas en un 32%, mientras que el pretratamiento con el control positivo MK-801 reestableció totalmente dicha extensión, alcanzando valores similares al grupo sin glutamato. El pretratamiento con ZnLD, a diferencia de LD, fue capaz de impedir significativamente el efecto negativo del agente excitotóxico sobre las neuritas de manera dosis dependiente (Figura 5-VIII).

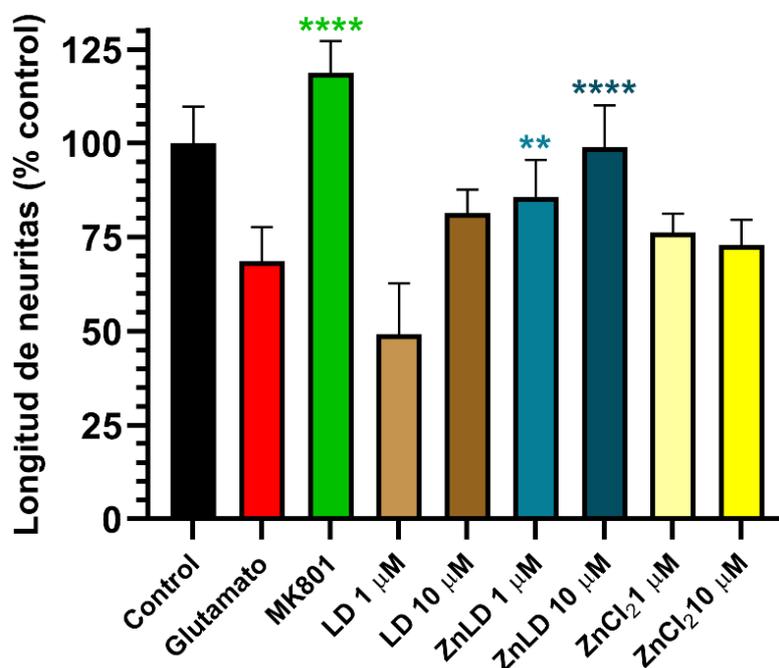


Figura 5-VIII. Longitud de neuritas determinado mediante tinción de beta tubulina III. Antes de la determinación, las células fueron pretratadas durante una hora con los compuestos indicados y luego incubadas con glutamato (agente excitotóxico) durante 24 horas. Los datos se representan como el porcentaje de longitud de las neuritas (respecto al control sin glutamato) \pm desviación estándar para cada condición. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ diferencia respecto al control positivo de toxicidad (Glutamato).

5.2.4.3 Determinación de integridad de membrana mediante medición de actividad Lactato Deshidrogenasa

LDH es una enzima soluble que se encuentra en el citosol. La enzima se libera al medio de cultivo circundante cuando se produce daño celular o lisis, procesos que ocurren tanto durante la apoptosis como durante la necrosis. La actividad de LDH en el medio de cultivo permite utilizarla como indicador de la integridad de la membrana celular y para la medición de la citotoxicidad. Para evaluar los efectos del glutamato sobre la integridad de la membrana plasmática, se empleó la cuantificación de LDH en sobrenadantes de las células tratadas. La incubación de 24 horas con glutamato 100 μM provocó un aumento de 250% en los niveles de actividad LDH en el medio de cultivo respecto al control sin exposición a glutamato, lo que indica una clara disminución en la integridad de la membrana celular de las neuronas. Estos efectos se vieron disminuidos cuando se realizó una preincubación con LD 10 μM (Figura 5-IX), de forma similar a la preincubación con el control positivo MK-801. El complejo ZnLD, por otra parte, logró disminuir los efectos tóxicos de glutamato a concentraciones menores (1 μM), lo cual

vuelve a evidenciar la potenciación de los efectos neuroprotectores de LD a través de la complejación con Zn(II), logrando un aumento en la supervivencia de las neuronas.

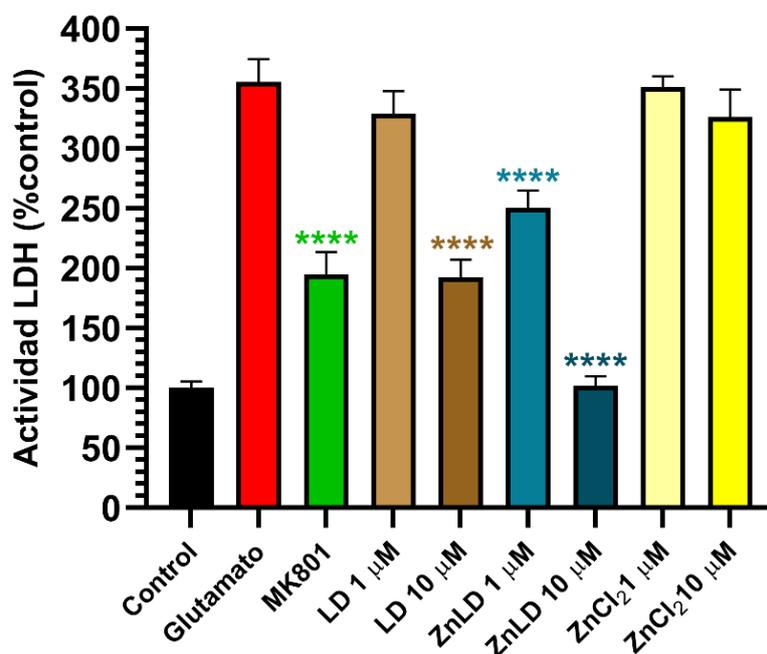


Figura 5-IX. Actividad Lactato Deshidrogenasa cuantificada con el "kit de detección de citotoxicidad (LDH)" (Roche). Antes de la determinación, las células fueron pretratadas durante una hora con los compuestos indicados y luego incubadas con glutamato (agente excitotóxico) durante 24 horas. Los datos se representan como el porcentaje de actividad respecto al control \pm desviación estándar para cada condición. ****: $p < 0,0001$ diferencia respecto al control positivo de toxicidad (Glutamato).

5.2.4.4 Medida de actividad de caspasas 3/7

Las caspasas (cisteín-proteasas que actúan sobre residuos aspartato) desempeñan papeles clave en la señalización de la apoptosis y en algunos procesos de maduración proteica. En particular, las caspasas 3/7 son caspasas que degradan proteolíticamente una serie de proteínas intracelulares para llevar a cabo el programa de muerte celular. En este trabajo se midió la activación de dichas proteasas como indicador del proceso de apoptosis. La Figura 5-X muestra el porcentaje de células apoptóticas determinado a través del reactivo de detección de actividad de caspasas 3/7 CellEvent® en células preincubadas con los compuestos de interés e incubadas con el agente excitotóxico glutamato. Pudo observarse que el grupo sin exposición a glutamato presentó un porcentaje de células apoptóticas de 3%, mientras que la incubación con glutamato 100 μ M aumentó el porcentaje de células en apoptosis a 12,5%. El control positivo (preincubación con MK-801) mostró niveles de apoptosis similares al grupo sin glutamato. Respecto a los compuestos de interés, la apoptosis sólo pudo evitarse de forma significativa mediante la preincubación con ZnLD 1 μ M (8,6%) y ZnLD 10 μ M (4%).

La preincubación con el ligando LD no mostró disminución sobre el porcentaje de células apoptóticas. Este resultado demuestra que la complejación con Zn(II) le confirió a LD un efecto neuroprotector mejorado, capaz de aumentar la supervivencia de las neuronas al evitar que estas entren en apoptosis frente a un agente excitotóxico.

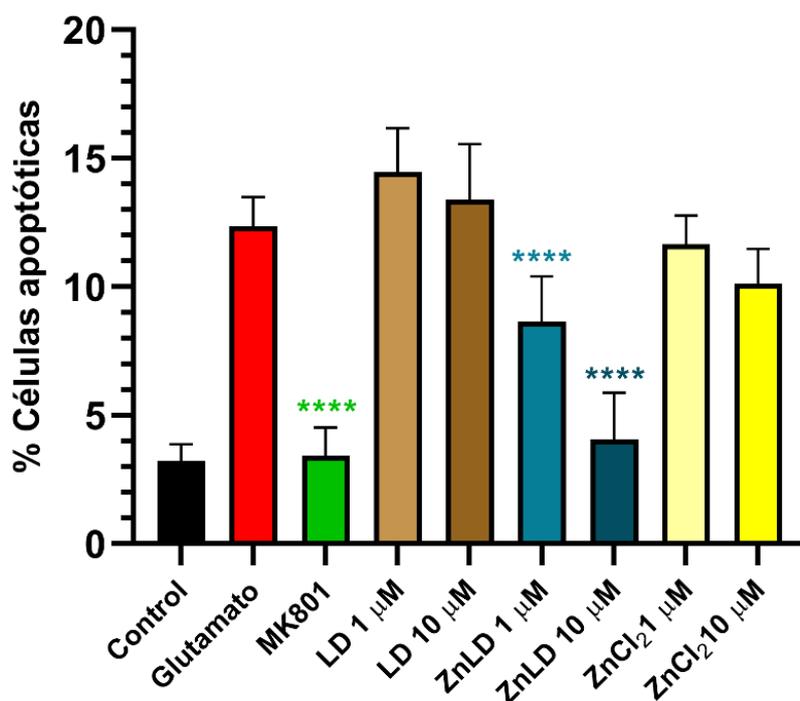


Figura 5-X. Porcentaje de células apoptóticas determinado a través del reactivo de detección de actividad de caspasas 3/7 CellEvent®. Antes de la determinación, las células fueron pretratadas durante una hora con los compuestos indicados y luego incubadas con glutamato (agente excitotóxico) durante 24 horas. Los datos se representan como el porcentaje de células con actividad de caspasas 3/7 respecto al número total de células \pm desviación estándar para cada condición. ****: $p < 0,0001$ diferencia respecto al control positivo de toxicidad (Glutamato).

5.3 Discusión

Se logró con éxito la síntesis del complejo ZnLD a partir de Zn(II) y el fármaco levodopa, utilizado comúnmente para el tratamiento de la EP. La estructura de dicho compuesto fue elucidada mediante técnicas de caracterización fisicoquímica, entre las cuales se encuentran la espectroscopía FTIR y UV-VIS, análisis elemental, determinaciones termogravimétricas y determinaciones de conductividad molar.

Dado que ZnLD fue diseñado con el propósito de mejorar las propiedades neuroprotectoras de LD, resultó necesario comprobar si el complejo sería capaz de

atravesar la BHE y actuar sobre las neuronas. Para esto se utilizó un ensayo *in vitro* de reparto en agua/octanol, el cual se ha utilizado en trabajos anteriores para simular la interfaz sangre/cerebro de un organismo vivo²¹⁻²⁴. Los resultados obtenidos indicaron que ZnLD tendría una mayor capacidad de atravesar la BHE de forma pasiva que LD. Sin embargo, es importante recalcar que LD es capaz de atravesar la BHE a través de canales transportadores de aminoácidos de carga. Se requieren estudios más exhaustivos para determinar si ZnLD también es capaz de atravesar estos canales. Afortunadamente, existen trabajos previos que demuestran que la forma quelada de levodopa con Zn(II) es capaz de llegar al cerebro de manera más eficaz que en su forma libre²⁵, por lo que es esperable que ZnLD sea capaz de atravesar la BHE con éxito. Para comprobar esta hipótesis deberían realizarse estudios *in vivo* donde se evidencie la actividad neuroprotectora del complejo, o donde se mida su concentración en el tejido cerebral. Por otra parte, ZnLD tuvo resultados positivos en todos los test de compuesto "tipo droga", por lo que se esperaría que tenga una buena biodisponibilidad en el organismo. LD tuvo resultados positivos en todos los test, con excepción del test de Muegge. Ambos compuestos mostraron alguna posible interferencia o toxicidad en los test de PAINS y Brenk, mientras que sólo ZnLD presentó características de compuesto líder.

La evaluación de la actividad neuroprotectora se realizó sobre un cultivo primario de neuronas embrionarias de ratas Sprague-Dawley de 18 días de edad. Se utilizó un modelo de excitotoxicidad generada por glutamato y se evaluó la capacidad de los compuestos para impedir el daño generado por este compuesto. El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios en el sistema nervioso central, pero se ha demostrado que su acumulación en el espacio sináptico resulta perjudicial. Esto provoca un aumento desmedido en los niveles de iones Ca^{+2} intracelulares, lo cual desencadena una cascada de transducción de señales que resulta en la activación de calpaínas (proteasas dependientes de calcio), de DAPK1 (una quinasa asociada a la muerte celular programada) y de la enzima Óxido Nítrico Sintasa neuronal (que genera EROs durante su funcionamiento). Estos procesos impactan sobre la integridad de varias estructuras celulares y conducen a la inducción de apoptosis²⁶. En este trabajo en particular se midieron cuatro marcadores cuya alteración está asociada al daño neuronal: viabilidad, integridad de membrana plasmática, longitud de neuronas y actividad de caspasas 3/7. Todos estos marcadores se vieron mejorados de manera dosis dependiente con la preincubación con ZnLD, siendo su efecto significativamente superior al de LD libre. En particular, la activación de las caspasas 3/7 y el acortamiento de neuritas inducido por la incubación con glutamato pudo ser evitada con la

preincubación con ZnLD pero no con LD (se observó una respuesta dosis dependiente con LD que no alcanzó a ser estadísticamente significativa para las concentraciones probadas en este trabajo).

5.4 Conclusiones

El complejo metálico ZnLD, sintetizado a partir de LD y Zn(II), mostró actividad neuroprotectora mejorada respecto al ligando libre, lo que demuestra una vez más que la complejación con iones metálicos es una estrategia útil para generar nuevos compuestos de interés farmacológico. Además, los estudios realizados sugieren que el complejo sería capaz de cruzar la BHE y tendría una biodisponibilidad adecuada en el organismo. La mayor capacidad de neuroprotección de ZnLD frente a LD, sumada a su probable aumento de biodisponibilidad, hacen a este complejo un candidato de interés para evaluarlo como posible fármaco.

En el futuro, resultará interesante evaluar el desempeño de ZnLD en un modelo *in vivo* para comprobar si los efectos neuroprotectores se asemejan a los *observados in vitro*, y para asegurar que su biodisponibilidad es adecuada. Además, podría proponerse el estudio de ZnLD en un modelo *in vivo* de EP y comparar su acción sobre los síntomas motores de esta enfermedad con la acción de la terapia tradicional (LD + CD). Existe un modelo de EP en moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) que podría ser un buen candidato para estos ensayos²⁷. Por último, se requerirán estudios adicionales para entender el mecanismo de acción por el cual la complejación con Zn(II) es capaz de potenciar el carácter neuroprotector de LD.

5.5 Bibliografía

- (1) World Health Organization. *Parkinson disease*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>.
- (2) Jankovic, J. Parkinson's Disease: Clinical Features and Diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2008**, *79* (4), 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>.
- (3) Marsden, C. D.; Parkes, J. D.; Rees, J. E. A year's comparison of treatment of patients with parkinson's disease with levodopa combined with carbidopa versus treatment with levodopa alone. *The Lancet* **1973**, *302* (7844), 1459–1462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92729-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92729-3).

- (4) Stansley, B. J.; Yamamoto, B. K. L-Dopa-Induced Dopamine Synthesis and Oxidative Stress in Serotonergic Cells. *Neuropharmacology* **2013**, *67*, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.010>.
- (5) Popa-Wagner, A.; Mitran, S.; Sivanesan, S.; Chang, E.; Buga, A.-M. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/963520>.
- (6) Colamartino, M.; Padua, L.; Meneghini, C.; Leone, S.; Cornetta, T.; Testa, A.; Cozzi, R. Protective Effects of L-Dopa and Carbidopa Combined Treatments on Human Catecholaminergic Cells. *DNA Cell Biol.* **2012**, *31* (11), 1572–1579. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1546>.
- (7) Kostrzewa, R. M.; Kostrzewa, J. P.; Brus, R. Neuroprotective and Neurotoxic Roles of Levodopa (L-DOPA) in Neurodegenerative Disorders Relating to Parkinson's Disease. *Amino Acids* **2002**, *23* (1–3), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s00726-001-0110-x>.
- (8) Kumar, V.; Kumar, A.; Singh, K.; Avasthi, K.; Kim, J.-J. Neurobiology of Zinc and Its Role in Neurogenesis. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60* (1), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02454-3>.
- (9) Mandal, S.; Das, G.; Askari, H. Amino Acid-Type Interactions of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine with Transition Metal Ions: An Experimental and Theoretical Investigation. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1100*, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.06.063>.
- (10) Edwin, B.; Hubert Joe, I. Vibrational Spectral Analysis of Anti-Neurodegenerative Drug Levodopa: A DFT Study. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1034*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.004>.
- (11) Hamada, Y. Z.; Rogers, C. Interaction of Hydroxyphenylalanin (L-DOPA) as a Coordinating Ligand with a Series of Metal Ions; Reaction of L-DOPA. *J. Coord. Chem.* **2007**, *60* (20), 2149–2163. <https://doi.org/10.1080/00958970701256634>.
- (12) *SwissADME*. <http://www.swissadme.ch>.
- (13) Moriguchi, I.; Hirono, S.; Liu, Q.; Nakagome, I.; Matsushita, Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1992**, *40* (1), 127–130. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.127>.
- (14) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings 1PII of Original Article: S0169-409X(96)00423-1. The Article Was Originally Published in *Advanced Drug Delivery Reviews* *23* (1997) 3–25. 1. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46* (1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- (15) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- (16) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- (17) Egan, W. J.; Merz, K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (21), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.

- (18) Muegge, I.; Heald, S. L.; Brittelli, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>.
- (19) Baell, J. B.; Nissink, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (1), 36–44. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00903>.
- (20) Brenk, R.; Schipani, A.; James, D.; Krasowski, A.; Gilbert, I. H.; Frearson, J.; Wyatt, P. G. Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. *ChemMedChem* **2008**, *3* (3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>.
- (21) Levin, V. A. Relationship of Octanol/Water Partition Coefficient and Molecular Weight to Rat Brain Capillary Permeability. *J. Med. Chem.* **1980**, *23* (6), 682–684. <https://doi.org/10.1021/jm00180a022>.
- (22) Seydel, J. K. Octanol-Water Partitioning versus Partitioning into Membranes. In *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Seydel, J. K., Wiese, M., Eds.; Wiley, 2002; Vol. 15, pp 35–50. <https://doi.org/10.1002/3527600639.ch2>.
- (23) Lohmann, C.; Hüwel, S.; Galla, H.-J. Predicting Blood-Brain Barrier Permeability of Drugs: Evaluation of Different In Vitro Assays. *J. Drug Target.* **2002**, *10* (4), 263–276. <https://doi.org/10.1080/10611860290031903>.
- (24) Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Oldendorf, W. H.; Hill, M. A. Comparison of Lipid-Mediated Blood-Brain-Barrier Penetrability in Neonates and Adults. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **1982**, *243* (3), C161–C168. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1982.243.3.C161>.
- (25) Rajan, K. S.; Manian, A. A.; Davis, J. M.; Dekirmenjian, H. Metal Chelates of L-DOPA for Improved Replenishment of Dopaminergic Pools. *Brain Res.* **1976**, *107* (2), 317–331. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90229-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90229-8).
- (26) Nicosia, N.; Giovenzana, M.; Misztak, P.; Mingardi, J.; Musazzi, L. Glutamate-Mediated Excitotoxicity in the Pathogenesis and Treatment of Neurodevelopmental and Adult Mental Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (12), 6521.
- (27) Meulener, M.; Whitworth, A. J.; Armstrong-Gold, C. E.; Rizzu, P.; Heutink, P.; Wes, P. D.; Pallanck, L. J.; Bonini, N. M. Drosophila DJ-1 Mutants Are Selectively Sensitive to Environmental Toxins Associated with Parkinson's Disease. *Curr. Biol.* **2005**, *15* (17), 1572–1577. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.064>.

Conclusiones finales

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la hipótesis inicial de que la complejación de fármacos con metales de transición puede potenciar su actividad biológica. Se demostró que esta estrategia influye en la biodisponibilidad, interacción con blancos celulares y mecanismos de acción, evidenciando el impacto tanto de la estructura conformacional modificada de los compuestos como de los efectos intrínsecos del metal utilizado.

En relación con el objetivo general, se logró la síntesis y caracterización de nuevos complejos de coordinación de vanadio y zinc con ligandos de interés terapéutico, y la evaluación de la actividad biológica (efectos antitumorales, antimetastásicos, antihipertensivos, neuroprotectores, etc.) en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. En cuanto a los objetivos específicos, se alcanzaron los siguientes avances:

- **Síntesis y caracterización de complejos de coordinación:** Se obtuvieron y caracterizaron con éxito complejos de V(IV) y Zn(II) con ligandos de naturaleza antitumoral, antihipertensiva y neuroprotectora, que se listan en la tabla a continuación. La caracterización en fase sólida y en solución mediante técnicas analíticas y espectroscópicas confirmó la estructura y estabilidad de los compuestos obtenidos.

Fórmula mínima	Abreviatura
[VO(Crisina)(Fenantrolina)Cl]	VOCrisFen
[Zn(Carbidopa)(H ₂ O) ₂].2H ₂ O	ZnCD
[Zn(Metildopa)(H ₂ O) ₂ (OH)].H ₂ O	ZnMD
[Zn(L-Dopa)(H ₂ O)(OH)].3H ₂ O	ZnLD

- **Interacción con albúmina sérica bovina (ASB):** Se determinó que los complejos sintetizados pueden interactuar con ASB de manera reversible, lo que sugiere que podrían ser transportados de manera eficiente en el organismo.
- **Evaluación de la actividad biológica de compuestos con actividad antitumoral:** El complejo de oxidovanadio(IV) con crisina y fenantrolina (VOCrisFen) mostró una citotoxicidad significativa y selectiva hacia células de cáncer de pulmón A549, induciendo muerte celular por estrés oxidativo. Se evidenció que la presencia de fenantrolina en la esfera de coordinación (de estructura planar y características lipofílicas) mejoró la captación celular y la eficacia del compuesto. Además, la selectividad hacia células tumorales resalta

su potencial terapéutico. Por otra parte, el complejo de Zn(II) y carbidopa (ZnCD) demostró una actividad antitumoral selectiva por células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y mejorada respecto al compuesto original, pero su mecanismo de acción involucró la generación de estrés reductivo. Estos hallazgos destacan la importancia del equilibrio redox celular en la actividad biológica de los complejos sintetizados. Para ambos compuestos se observó alteración en el potencial de membrana mitocondrial, lo cual sugiere un proceso de muerte celular por la vía intrínseca de apoptosis.

- **Evaluación de la actividad biológica de compuestos con actividad antihipertensiva:** Se confirmó que la complejación del fármaco antihipertensivo α -metildopa con Zn(II) (ZnMD) incrementó su eficacia en la reducción de la presión arterial en modelos *in vivo*, además de mostrar efectos beneficiosos adicionales como la reversión de la hipertrofia cardíaca y la fibrosis. Se sugiere que la mejor interacción de ZnMD con el receptor α_2 -adrenérgico, facilitada por la presencia del ion Zn(II), podría ser responsable de su mayor actividad farmacológica. Además, se observó un aumento en los niveles del vasodilatador NO en tejido cardíaco luego del tratamiento con ZnMD; esto podría deberse a la capacidad antioxidante de ZnMD, que evitaría la degradación de NO por parte de las especies reactivas de oxígeno.
- **Evaluación de la actividad biológica de compuestos con actividad neuroprotectora:** El complejo sintetizado a partir de L-Dopa y Zn(II) (ZnLD) mostró una mayor capacidad neuroprotectora, frente al tratamiento con glutamato, en comparación con el ligando libre. Se obtuvieron además evidencias experimentales e informáticas que sugieren su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica. Se propone evaluar este compuesto en modelos *in vivo* para estudiar más exhaustivamente su potencial como fármaco neuroprotector.

Anexo: Publicaciones

A partir de este trabajo de tesis doctoral, se publicaron los siguientes trabajos en revistas científicas:

- Actis Dato, A.; Naso, L. G.; Rey, M.; Gonzalez, P. J.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Phenanthroline Complexation Enhances the Cytotoxic Activity of the VO-Chrysin System. *Inorganics* **2021**, *10*(1), 4. <https://doi.org/10.3390/inorganics10010004>.
- Actis Dato, A. B.; Martinez, V. R.; Velez Rueda, J. O.; Portiansky, E. L.; De Giusti, V.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Improvement of the Cardiovascular Effect of Methyldopa by Complexation with Zn(II): Synthesis, Characterization and Mechanism of Action. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2024**, *81*, 127327. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127327>.
- Actis Dato, A. B.; Naso, L. G.; Martínez, V. R.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Carbidopa and ZnCarbidopa Induce Reductive Stress in MDA-MB-231 Cells. *ChemPlusChem* **2025**. <https://doi.org/10.1002/cplu.202400596>.

Asimismo, se presentaron comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

- 12th International Vanadium Symposium. 3 al 5 de noviembre de 2021, Chipre (encuentro virtual). Exposición oral “Phenanthroline complexation enhances the cytotoxic activity of the VOchrysin system”.
- V jornadas de Química Inorgánica Prof. Aymonino. 17 y 18 de octubre de 2022, La Plata, Argentina. Presentación oral “Estudios de biodisponibilidad del complejo Zn(II)-Carbidopa”.
- PANAM Physiological Sciences 2023. 24 al 30 de noviembre de 2023, Puerto Varas, Chile. Presentación del póster “Improvement of the cardiovascular effect of methyldopa by complexation with Zn(II): synthesis, characterization and mechanism of action”.

- XXIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. 11 al 14 de abril de 2023, El Calafate, Argentina. Presentación del póster “Mejora de la actividad antihipertensiva de metildopa mediante su complejación con Zn(II).
- I Jornadas Rioplatenses de Química Medicinal. 11 y 12 de abril de 2024, La Plata, Argentina. Presentación del póster “Síntesis del complejo L-Dopa-Zn. Caracterización de su actividad neuroprotectora sobre cultivos neuronales *in vitro*.
- VI jornadas de Química Inorgánica Prof. Aymonino. 17 y 18 de octubre de 2024, La Plata, Argentina. Presentación del póster “Determinación del mecanismo citotóxico y la actividad antimetastásica de un complejo metálico de Zn(II)”.