UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Búsqueda de nuevos fármacos antitumorales y antihipertensivos. Modificación estructural de fármacos antihipertensivos por complejación con Zn(II).

Bioq. Valeria Romina Martínez

Directora: Patricia A.M. Williams

Directora: Evelina G. Ferrer

Año: 2019

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) de Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Prof. Dra. Patricia A. M. Williams y de la Prof. Dra. Evelina G. Ferrer.

Año 2019

Agradecimientos

A los organismos e instituciones que suministraron los fondos y/o espacios físicos para hacer posible el presente trabajo: CONICET, ANPCyT, CEQUINOR, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y CICPBA.

En especial, a todas las personas que me han acompañado durante esta formación:

A Patricia Williams, por haber puesto tanta dedicación en mi instrucción científica, por la confianza puesta en mí y por enseñarme una forma de trabajo, por alentarme en todas las propuestas y por sobre todo, su calidez humana.

A Evelina Ferrer, por su ayuda constante y su predisposición, por transmitirme su experticia y sus consejos valiosos.

A Luciana, por su dedicación, su paciencia, su sinceridad y por sobre todo su amistad. Por enseñarme tantas cosas y por comprenderme tanto. Por considerarme como un par en el trabajo.

A Sole, porque me ha enseñado desde la lógica y a explayarme en una forma fácil, por nuestros brainstorming, los viajes realizados y por la gran conexión.

A los que han integrado el grupo y a los que aún pertenecen, como Helen y sus alientos, a Nancy, Juliana, Juan José, y a mis nuevos compañeros de oficina, Gonzalo y Agustín, quienes me han tolerado en las últimas etapas de tesis. En especial a Nadir, quien me ha hecho pasar una gran estadía en Suiza.

A los becarios y al personal de apoyo del CEQUINOR compartir risas, almuerzos, discusiones y trabajo; por los lindos momentos compartidos en el centro y fuera de él. En especial, a Caro y Juan, siempre dispuestos a brindarme su ayuda. A la “vecindad (Yani, Euge, Luciana)”. A los investigadores, Betty, Bea, Anita, Eli, Sonia, Carlitos, Martin y Jorge, porque siempre se preocuparon por mí.

Al LIBIM, Dra. Victoria Aguirre, Juan Todaro, Tania Stoyanoff, Juan Pablo Rodriguez, Juan Pablo Melana Colavita y el personal técnico. Por recibirme siempre con los brazos abiertos al laboratorio y por su significativa contribución en los experimentos presentados.

Al LHTC (Laboratoire d'hémodynamique et de technologie cardiovasculaire), al profesor Nikos, Augusto, Rodrigo, Natalia, Stamatia, Vicky, Costas, Adam, Sebastien, Lidya y Jorge por haberme recibido cálidamente, no solo contribuyeron en mi formación, sino que han

aportado inmensamente a esta tesis. Por esas “short beers” en la EPFL y días de “hiking” por las montañas de Suiza.

A mis compañeros de vete. Por los gratos momentos compartidos y porque con ellos, cambio el aire.

A mi papá Oscar, quien me da su apoyo ciegamente, sin vos nada de esto hubiera sido posible. A mi mamá Patricia, quien le pone buena onda a todo.

A mis abuelos Lito y Ñata, quienes me lo dan todo incondicionalmente.

A mi familia, Mariana, Manu, Emi, Lina, Norbert, Vane, Moni, Fede, quienes siempre supieron entenderme.

A círculo íntimo correntino, Silvia, Cris, Ana, Yohana.

A mi equipo de fútbol, que me salva cada día.

Y por supuesto, a Miguel, mi compañero de vida, siempre apoyándome en todas las decisiones, ayudándome y haciéndolo todo más fácil en la vida cotidiana. .

Contenido

Agradecimientos	2
Contenido.....	4
OBJETIVOS	2
Introducción.....	2
Sistemas a estudiar.....	3
Objetivos	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	4
Referencias	5
CAPÍTULO I.....	6
Aspectos generales de los metales en los sistemas biológicos	7
Propiedades de los complejos metálicos para ser usados como drogas basadas en metales	8
El zinc	11
Química del zinc	11
Aspectos biológicos del zinc	11
Zinc como antioxidante	14
Zinc y apoptosis	14
Otras funciones importantes del zinc	15
Presión Arterial.....	16
Mecanismos de control de la presión sanguínea.....	16
Sistema renina-angiotensina.....	17
Componentes del sistema renina-angiotensina.....	17
Receptores de la Angiotensina II.....	20
Otros componentes del Sistema Renina Angiotensina.....	20
Hipertensión arterial	21

Hipertensión y estrés oxidativo	23
Deficiencia de zinc y su relación con la presión arterial	24
Tratamiento antihipertensivo	25
Tratamiento no farmacológico	25
Tratamiento farmacológico	25
Antagonistas o bloqueadores del receptor AT1 de la angiotensina II	27
Modos de unión de los diferentes sartanes al receptor AT1	29
Farmacocinética de los sartanes	32
Cáncer	34
Proceso de carcinogénesis	36
Estrés oxidativo y cáncer	38
Bases moleculares de la apoptosis	40
Apoptosis y carcinogénesis	43
Fármacos bloqueadores del receptor de Ang II y cáncer	44
Zn y Cáncer	44
Referencias	46
CAPÍTULO II	55
<i>Introducción</i>	56
<i>Complejo de Zn(II) y Losartán</i>	56
Losartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico	56
Síntesis de $[Zn(Lo)_2] \cdot 3H_2O$	57
Síntesis de $[Zn(Lo)Cl]$	57
Estudios en fase sólida	58
Estudios en solución	65
Complejo de Zn(II) y Candesartán	69
Candesartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico	69
Síntesis de $[ZnCand(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ (ZnCand)	70

<i>Estudios en fase sólida</i>	70
Estudios en solución	74
<i>Complejo de Zn(II) con Valsartán</i>	81
Valsartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico.....	81
Síntesis de $[ZnVals(H_2O)_2](ZnVals)$	81
Estudios en fase sólida	82
FTIR.....	82
Estudios en solución	84
<i>Complejo de Zn(II) y Telmisartán</i>	92
Telmisartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico	92
Síntesis de $[Zn(Telm)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ (ZnTelm).....	92
Estudios en fase sólida	93
<i>Estudios en solución</i>	96
<i>Complejo de Zn(II) y Azilsartán</i>	103
Azilsartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico	103
Síntesis de $[Zn_2(Azil)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ (ZnAzil)	103
<i>Obtención de cristales de ZnAzil</i>	104
<i>Estudios en fase sólida</i>	105
<i>Estudios en solución</i>	110
Conclusión	113
Referencias	115
CAPÍTULO III.....	118
Introducción.....	119
Ensayo de viabilidad celular: Ensayo de MTT	119
Efectos del $ZnSO_4$	119
Complejo de Zn (II) con Losartán (ZnLos).....	119
Complejo de Zn(II) con Candesartán (ZnCand).....	120

Complejo de Zn(II) con Valsartán (ZnVals)	121
Complejo de Zn(II) con Telmisartán (ZnTelm)	122
Complejo de Zn(II) con Azilsartan (ZnAzil)	123
Conclusiones sobre el ensayo de viabilidad celular	124
Mecanismo de acción	125
Estrés oxidativo	126
Apoptosis	126
Mecanismo de acción del complejo ZnLos	126
Generación de especies reactivas del oxígeno	126
Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)	127
Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio	129
Western blot de proteínas apoptóticas	130
Mecanismo de acción del complejo ZnCand	132
Generación de especies reactivas del oxígeno	132
Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)	133
Medición de potencial de membrana mitocondrial	133
Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio	135
<i>Western blot de proteínas apoptóticas</i>	136
<i>Mecanismo de acción del complejo ZnVals</i>	137
Generación de especies reactivas del oxígeno	137
Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)	138
Medición de potencial de membrana mitocondrial	139
Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio	140
Western blot de proteínas apoptóticas	142
Mecanismo de acción del complejo ZnTelm	143
Generación de especies reactivas del oxígeno	143
Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)	144

Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio	145
Western blot de proteínas apoptóticas	147
Mecanismo de acción del complejo ZnAzil	148
Generación de especies reactivas del oxígeno	148
<i>Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)</i>	149
<i>Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio</i>	150
Western blot de proteínas apoptóticas	152
Conclusiones sobre la actividad antitumoral.....	153
<i>Referencias</i>	155
CAPÍTULO IV	159
Evaluación del antagonismo del receptor de angiotensina II	160
Receptor de Angiotensina II tipo 1. Mecanismo de unión y señalización	160
Ensayo de unión competitiva al receptor AT1.....	162
Ensayo de unión para controles y ZnSO ₄	162
Ensayo de unión al AT1R de losartán y el complejo ZnLos.....	164
Ensayo de unión al AT1R de candesartán y el complejo ZnCand	165
Ensayo de unión al AT1R de valsartán y el complejo ZnVals.....	166
Ensayo de unión al AT1R de telmisartán y el complejo ZnTelm	167
Ensayo de unión al AT1R de azilsartán y el complejo ZnAzil	168
Efecto de los compuestos sobre el estrés oxidativo inducido por Ang II	169
Efecto de losartán y ZnLos sobre los niveles de EROs	169
Efecto de candesartán y ZnCand sobre los niveles de EROs	170
Efecto de valsartán y ZnVals sobre los niveles de EROs	171
Efecto de Telmisartán y ZnTelm sobre los niveles de EROs	172
Efecto de azilsartán y ZnAzil sobre los niveles de EROs.....	173
Influencia de los compuestos en la liberación de calcio intracelular provocada por Ang II	174

Efecto del ZnSO ₄ sobre [Ca ²⁺] _i	175
Efecto de losartán y ZnLos sobre [Ca ²⁺] _i	175
Efecto de candesartán y ZnCand sobre [Ca ²⁺] _i	176
Efecto de valsartán y ZnVals sobre [Ca ²⁺] _i	177
Efecto de telmisartán y ZnTelm sobre [Ca ²⁺] _i	177
Efecto de azilsartán y ZnAzil sobre [Ca ²⁺] _i	178
Resumen sobre las acciones de los compuestos sobre el receptor de AT1	179
Conclusiones sobre las acciones de los compuestos sobre el receptor de AT1	180
Referencias	183
CAPÍTULO V	185
Introducción	186
Modelos animales en hipertensión	186
Modelo de hipertensión L-NAME	187
Diseño experimental	189
Análisis histológicos ex vivo	191
Efecto del ZnTelm sobre la presión arterial sistólica	191
Efecto de ZnTelm sobre la morfometría aórtica	192
Efecto de ZnTelm sobre el colágeno aórtico	194
Conclusiones sobre la evaluación antihipertensiva de ZnTelm	195
Referencias	196
CAPÍTULO VI	198
Interacción con Albúmina	199
Interacción de losartán y el complejo ZnLos con ASB	202
Interacción de candesartán y el complejo ZnCand con ASB	205
Interacción de valsartán y el complejo ZnVals con ASB	209
Interacción de telmisartán y el complejo ZnTelm con ASB	212
Interacción de azilsartán y el complejo ZnAzil con ASB	215

Conclusiones sobre la evaluación de la biodisponibilidad.....	220
Referencias	221
CAPÍTULO VII	222
Caracterización Fisicoquímica.....	223
Espectros Infrarrojos	223
Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).....	223
Análisis elemental	223
Determinación de contenido de Zinc	223
Espectros electrónicos UV	224
Conductancia molar	224
Resonancia magnética nuclear	225
Espectroscopía de fluorescencia.....	225
Determinación de estructuras cristalinas.....	225
Actividad antitumoral	226
Líneas celulares.....	226
Cultivo celular	226
Ensayo de viabilidad celular: Ensayo de MTT	227
Medida de las especies reactivas de oxígeno (EROs).....	228
Determinación de niveles de GSH y relación GSH/GSSG.....	228
Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	229
Estudio de apoptosis por microscopía de fluorescencia	229
Evaluación de apoptosis por Western Blot	230
Evaluación de la unión al receptor AT1	231
Células embrionarias de riñón humano: línea HEK-293	231
Recuperación y purificación de ADN plasmídico	231
Transfección transiente	231
Ensayo de unión a receptor AT1	232

Determinación de EROs en HEK-293T	234
Determinación de flujo de Calcio.....	234
Experimentos “in vivo”	235
Análisis histológicos ex vivo	236
Interacción con albúmina.....	237
Análisis estadístico.....	237
Referencias	238
Conclusiones finales	240
Anexo: Publicaciones	243

INDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Principales metalofármacos derivado del platino.	10
Figura I-2. Balance corporal de zinc.....	12
Figura I-3. Cascada enzimática de la formación de angiotensina II.....	18
Figura I-4. Mecanismo vasoconstrictor del sistema renina-angiotensina.....	19
Figura I-5. Prevalencia de hipertensión arterial en Argentina.....	23
Figura I-6. Fármacos utilizados por pacientes hipertensos en Argentina.....	27
Figura I-7. Estructura química de los sartanes.....	28
Figura I-8. Comparación química entre losartán y angiotensina II.....	29
Figura I-9. Principales interacciones entre sartanes y el receptor AT1.....	32
Figura I-10: Porcentajes de nuevos casos y casos de muertes por cáncer.....	35
Figura I-11. Etapas de la carcinogénesis.....	38
Figura I-12. Factores que contribuyen a aumentar los niveles de EROs a las células.....	40
Figura I-13. Características del proceso de muerte celular apoptótica y necrótica.....	41
Figura I-14. Representación esquemática de los eventos apoptóticos.....	43
Figura II-1. Estructuras químicas de losartán y losartán potásico.....	57
Figura II-2. Procedimiento para la difusión en gel.....	58
Figura II-3. Espectros infrarrojos de losartán, $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$	60
Figura II-4. Estructura cristalina del complejo clorolosartanzinc.....	63
Figura II-5. Espectros de reflectancia difusa de $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$	64
Figura II-6. Espectros UV de losartán y del complejo ZnLos.....	65
Figura II-7. Determinación de la estabilidad del complejo ZnLos.....	66
Figura II-8. Espectros de fluorescencia de ZnLos y losartán.....	68
Figura II-9. Estructura propuesta para ZnLos.....	68
Figura II-10. Estructuras químicas de candesartán y candesartán cilexetilo.....	69
Figura II-11. Espectros FTIR de candesartán y su complejo ZnCand.....	72
Figura II-12. Espectros UV de candesartán y el complejo ZnCand.....	74
Figura II-13. Determinación de la estabilidad del complejo ZnCand.....	75
Figura II-14. Espectros de fluorescencia de candesartán y ZnCand.....	77
Figura II-15. Espectro simulado de RMN de ^1H de candesartán.....	78
Figura II-16. Espectro experimental de RMN de ^1H de ZnCand.....	78
Figura II-17. Espectro simulado de RMN de ^{13}C de candesartán.....	79
Figura II-18. Espectro experimental de RMN de ^{13}C de ZnCand.....	79
Figura II-19. Estructura propuesta para ZnCand.....	80

Figura II-20. Estructura de valsartán	81
Figura II-21. Espectros FTIR de valsartán y su complejo ZnVals.	83
Figura II-22. Espectros UV de valsartán y el complejo ZnVals	85
Figura II-23. Determinación de la estabilidad del complejo ZnVals	86
Figura II-24. Espectros de fluorescencia de valsartán y Znvals.....	87
Figura II-25. Espectro simulado de ¹ H-RMN de valsartán	88
Figura II-26. Espectro experimental de ¹ H-RMN de ZnVals	88
Figura II-27. Espectro simulado de ¹³ C-RMN de valsartán	89
Figura II-28. Espectro experimental de ¹³ C-RMN de ZnVals	89
Figura II-29. Estructura propuesta para ZnVals.....	91
Figura II-30. Estructura molecular de telmisartán.....	92
Figura II-31. Espectros FTIR de telmisartán y su complejo ZnTelm.	94
Figura II-32. Espectros UV de telmisartán y el complejo ZnTelm	96
Figura II-33. Determinación de la estabilidad del complejo ZnTelm	97
Figura II-34. Espectros de fluorescencia de telmisartán y ZnTelm	98
Figura II-35. Espectro simulado de ¹ H-RMN de telmisartán	99
Figura II-36. Espectro experimental de ¹ H-RMN de ZnTelm	100
Figura II-37. Espectro simulado de ¹³ C-RMN de telmisartán	100
Figura II-38. Espectro experimental de ¹³ C-RMN de ZnTelm.	100
Figura II-39. Estructura propuesta para ZnTelm.....	102
Figura II-40. Estructuras químicas de azilsartán y azilsartán medoxomil.....	103
Figura II-41. Esquema de la difusión en gel para obtención de cristales de ZnAzil.	105
Figura II-42. Espectros FTIR de azilsartán y su complejo ZnAzil	106
Figura II-43. Estructura cristalina del complejo ZnAzil	109
Figura II-44. Espectros UV de azilsartán y el complejo ZnAzil.	110
Figura II-45. Determinación de la estabilidad del complejo ZnAzil.....	111
Figura II-46. Espectros de fluorescencia de azilsartán y ZnAzil	112
Figura II-47. Estructura del complejo ZnAzil.....	113
Figura III-1. Efecto de ZnSO ₄ losartán y ZnLos sobre la viabilidad celular de la línea A549 y MRC-5.	120
Figura III-2. Efecto de ZnSO ₄ , candesartán y ZnCand sobre la viabilidad celular de la línea A549 y MRC-5..	121
Figura III-3. Efecto de ZnSO ₄ valsartán y ZnVals sobre la viabilidad celular de la línea A549 y MRC-5..	122

Figura III-4. Efecto de ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm sobre la viabilidad celular de la línea A549 y MRC-5.	123
Figura III-5. Efecto de ZnSO ₄ , azilsartán y ZnAzil sobre la viabilidad celular de la línea A549 y MRC-5.	124
Figura III-6. Efecto de ZnSO ₄ , losartán y ZnLos sobre la producción de EROs.	127
Figura III-7. Comparación de los efectos producidos por ZnSO ₄ sobre la viabilidad celular, la generación de EROS y la relación GSH/GSSG.	128
Figura III-8. Efecto de ZnSO ₄ , losartán y ZnLos sobre GSH y GSH/GSSG.	128
Figura III-9. Tinción AO/BE de células tratadas con ZnSO ₄ , losartán y ZnLos.	130
Figura III-10. Western blot de Bax y Bcl-xL de células tratadas con ZnSO ₄ , losartán y ZnLos.	131
Figura III-11. Efecto de ZnSO ₄ , candesartán y ZnCand sobre la producción de EROs. .	132
Figura III-12. Efecto de ZnSO ₄ , candesartán y ZnCand sobre GSH y GSH/GSSG.	133
Figura III-13. Variación del potencial de membrana mitocondrial (%Δψ) en células A549 tratadas con ZnSO ₄ , candesartán y ZnCand.	134
Figura III-14. Tinción AO/BE de células tratadas con ZnSO ₄ , candesartán y ZnCand.	135
Figura III-15. Western blot de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 de células tratadas con ZnSO ₄ , candesartán y ZnCand.	137
Figura III-16. Efecto de ZnSO ₄ , valsartán y ZnVals sobre la producción de EROs.	138
Figura III-17. Efecto de ZnSO ₄ , valsartán y ZnVals sobre GSH y GSH/GSSG.	139
Figura III-18. Variación del potencial de membrana mitocondrial (%Δψ) en las células A549 tratadas con ZnSO ₄ , valsartán y ZnVals.	140
Figura III-19. Tinción AO/BE de células tratadas con ZnSO ₄ , valsartán y ZnVals.	141
Figura III-20. Western blot de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 de células tratadas con ZnSO ₄ , valsartán y ZnVals.	143
Figura III-21. Efecto de ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm sobre la producción de EROs.	144
Figura III-22. Efecto de ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm sobre GSH y GSH/GSSG.	145
Figura III-23. Tinción AO/BE de células tratadas con ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm.	146
Figura III-24. Western blot de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 de células tratadas con ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm.	148
Figura III-25. Efecto de ZnSO ₄ , azilsartán y ZnAzil sobre la producción de EROs.	149
Figura III-26. Efecto de ZnSO ₄ , azilsartán y ZnAzil sobre GSH y GSH/GSSG (a) Contenido de glutatión reducido (GSH) (b) relación GSH/GSSG.	150
Figura III-27. Tinción AO/BE de células tratadas con ZnSO ₄ , azilsartán y Znazil.	151

Figura III-28. Western blot de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 de células tratadas con ZnSO ₄ , azilsartán y ZnAzil.....	153
Figura III-29. Mecanismos de acción propuestos para ZnLos, ZnTelm, ZnAzil, ZnCand y ZnVals.	154
Figura IV-1. Señalización mediada por Ang II cuando se une al receptor AT1.....	161
Figura IV-2. Imágenes confocales de unión total y uniones no específicas en células HEK 293 sobreexpresando el receptor AT1.	163
Figura IV-3. Imágenes confocales de HEK-293T luego del tratamiento de ZnSO ₄ co-incubado con Tamra-AII.....	163
Figura IV-4. Imágenes confocales de HEK-293T luego del tratamiento de losartán y ZnLos co-incubados con TAMRA-AII.....	164
Figura IV-5. Imágenes confocales de HEK-293T luego del tratamiento de candesartán y ZnCand co-incubados con TAMRA-AII	165
Figura IV-6. Imágenes confocales de HEK-293T luego del tratamiento de valsartán y ZnVals co-incubados con TAMRA-AII.....	166
Figura IV-7. Imágenes confocales de HEK-293T luego del tratamiento de telmisartán y ZnTelm co-incubados con TAMRA-AII	167
Figura IV-8. Imágenes confocales de HEK-293T luego del tratamiento de azilsartán y ZnAzil co-incubados con TAMRA-AII (rojo).....	168
Figura IV-9. Determinación de EROs en las células HEK-293T co-incubadas con Ang II y losartán o ZnLos.	170
Figura IV-10. Determinación de EROs en las células HEK-293T co-incubadas con Ang II y candesartán o ZnCand	171
Figura IV-11. Determinación de EROs en las células HEK-293T co-incubadas con Ang II y valsartán o ZnVals	172
Figura IV-12. Determinación de EROs en las células HEK-293T co-incubadas con Ang II y telmisartán o ZnTelm.	173
Figura IV-13. Determinación de EROs en las células HEK-293T co-incubadas con Ang II y azilsartán o ZnAzil	174
Figura IV-14. Efecto de ZnSO ₄ sobre el calcio intracelular libre en células HEK-293T...	175
Figura IV-15. Efecto de losartán y ZnLos sobre el calcio intracelular libre en células HEK-293T.	176
Figura IV-16. Efecto de candesartán y ZnCand sobre el calcio intracelular libre en células HEK-293T.....	176

Figura IV-17. Efecto de valsartán y ZnVals sobre el calcio intracelular libre en células HEK-293T.	177
Figura IV-18. Efecto de telmisartán y ZnTelm sobre el calcio intracelular libre en células HEK-293T.	178
Figura IV-19. Efecto de azilsartán y ZnAzil sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T.	178
Figura IV-20. Comparación de las actividades sobre el receptor AT1, la regulación de EROs y calcio intracelular ejercidas por los ligandos y los complejos.	180
Figura V-1. Mecanismo de relajación de musculo liso mediante la acción del NO	188
Figura V-2. Esquema de la técnica de registro de presión arterial en la rata.	190
Figura V-3. Medida representativa de la presión arterial y las señales de pulso usando un pletismógrafo de cola.	191
Figura V-4. Evaluación del efecto de ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm sobre la presión arterial sistólica en ratas Wistar con hipertensión inducida por L-NAME.	192
Figura V-5. Imágenes de las secciones de aorta torácica teñidas con H-E	193
Figura V-6. Efecto de ZnSO ₄ , telmisartán y ZnTelm sobre la deposición de colágeno en la aorta torácica.	194
Figura VI-1. Espectro de fluorescencia de ASB con losartán y ZnLos.	203
Figura VI-2. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de la interacción de ASB con losartán y ZnLos.	203
Figura VI-3. Gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ vs. $\log [Q]$ de ASB con losartán y ZnLos.	204
Figura VI-4. Espectro de fluorescencia de ASB y candesartán.	206
Figura VI-5. Espectro de fluorescencia de ASB y ZnCand.	206
Figura VI-6. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de ASB con candesartán y ZnCand	207
Figura VI-7. Gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ de ASB con candesartán y ZnCand. ..	207
Figura VI-8. Espectro de fluorescencia de ASB y valsartán y Znvals	209
Figura VI-9. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de ASB con valsartán y ZnVals.	210
Figura VI-10. Gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ de ASB con valsartán y ZnVals.	211
Figura VI-11. Espectro de fluorescencia de ASB con telmisartán y ZnTelm.	213
Figura VI-12. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de ASB con telmisartán y ZnTelm.	213
Figura VI-13. Gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ de ASB con telmisartán y ZnTelm. ..	214
Figura VI-14. Espectro de fluorescencia de ASB con azilsartán y ZnAzil.	216
Figura VI-15. Desconvolución del espectro de emisión de ASB con azilsartán y ZnAzil.	216
Figura VI-16. Fluorescencia de ASB con azilsartán y ZnAzil luego de desconvolución. ..	217
Figura VI-17. Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$) para ASB con azilsartán y ZnAzil.	217

Figura VI-18. Gráficos de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB con azilsartán y ZnAzil ...	218
Figura VII-1. Reacción de reducción de MTT a formazán	227
Figura VII-2. Esquema de la determinación de GSH y GSSG celular	229
Figura VII-3. Esquema de la transfección transiente del receptor AT1	232
Figura VII-4. Ensayo para evaluar la interacción del metal, los ligandos y complejos con el receptor AT1	234
Figura 0-1. Estructuras propuestas para los complejos de sartanes con Zn	240

INDICE DE TABLAS

Tabla I-1. Interacciones entre los residuos de Ang II y los residuos del receptor AT1	30
Tabla I-2. Interacciones entre los sartanes y los residuos del receptor AT1	31
Tabla I-3. Características farmacológicas de los sartanes	33
Tabla I-4. Distribución (%) de casos de incidencia de cáncer en Argentina en el 2018. ..	36
Tabla I-5. Distribución (%) de casos de mortalidad por cáncer en Argentina en el 2018 ..	36
Tabla II-1. Asignaciones de los modos vibracionales de FTIR y Raman (itálica) de los espectros de losartán, $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$	61
Tabla II-2. Datos del cristal para el $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$	63
Tabla II-3. Longitudes de enlace y ángulos en el complejo clorolosartanzinc.....	64
Tabla II-4. Conductancia molar de $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	67
Tabla II-5. Asignación de las bandas del espectro FTIR de candesartán y ZnCand.....	73
Tabla II-6. Conductancia molar de ZnCand.....	76
Tabla II-7. Desplazamiento químico en el RMN de ^1H de candesartán y ZnCand	79
Tabla II-8. Desplazamiento químico en el RMN de ^{13}C de candesartán y Zncand.	80
Tabla II-9. Asignación de las bandas del espectro FTIR de valsartán, Znvals y Na_2vals ..	84
Tabla II-10. Conductancia molar de ZnVals	86
Tabla II-11.Desplazamiento químico en el ^1H -RMN de valsartán y Znvals	90
Tabla II-12. Desplazamiento químico en el ^{13}C -RMN de valsartán y Znvals.....	90
Tabla II-13. Asignación de las bandas del espectro FTIR de telmisartán y ZnTelm.	95
Tabla II-14. Conductancia molar de ZnTelm	98
Tabla II-15. Desplazamiento químico en el RMN de ^1H de telmisartán y ZnTelm.....	101
Tabla II-16. Desplazamiento químico en el ^{13}C -RMN de telmisartán y ZnTelm	101
Tabla II-17. Asignación de las bandas del espectro FTIR de azilsartán y ZnAzil.....	107
Tabla II-18. Datos del cristal para ZnAzil.....	108
Tabla II-19. Longitud de enlace y ángulos en complejo ZnAzil	109
Tabla II-20. Distancias de enlace de hidrógeno y ángulos para el complejo ZnAzil.....	110
Tabla II-21. Conductancia molar de ZnAzil	112
Tabla III-1. Tabla comparativa con los valores IC_{50} de los ligandos, sus complejos y la sal de ZnSO_4 evaluada sobre la línea celular A549 durante 24hs.....	124
Tabla III-2. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO_4 , losartán y ZnLos.....	130
Tabla III-3. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO_4 , candesartán y ZnCand..	136
Tabla III-4. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO_4 , valsartán y ZnVals.....	141
Tabla III-5. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO_4 , telmisartán y ZnTelm.....	147

Tabla III-6. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO ₄ , azilsartán y ZnAzil	151
Tabla IV-1. Tabla comparativa de los porcentajes de unión TAMRA-AII.	181
Tabla IV-2. Porcentajes de EROs generadas por la co-incubación de Ang II más los compuestos	182
Tabla V-1. Resumen de algunos de los modelos murinos usados en hipertensión	187
Tabla V-2. Efecto del ZnSO ₄ , telmisartán and ZnTelm sobre los cambios morfológicos de la aorta torácica.	193
Tabla VI-1. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con losartán y ZnLos.	204
Tabla VI-2. Parámetros termodinámicos de la interacción de ASB y losartán y ZnLos...	205
Tabla VI-3. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con candesartán y ZnCand.....	208
Tabla VI-4. Parámetros termodinámicos de la interacción de ASB y candesartán y ZnCand.	208
Tabla VI-5. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con valsartán y ZnVals.	211
Tabla VI-6. Parámetros termodinámicos de la interacción de ASB y Valsartán y ZnVals	212
Tabla VI-7. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con telmisartán y ZnTelm.	214
Tabla VI-8. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y Telmisartán y ZnTelm.	215
Tabla VI-9. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de azilsartán y ZnAzil con ASB (6 μ M).....	219
Tabla VI-10. Parámetros termodinámicos de la interacción de ASB con Azilsartán y ZnAzil	219
Tabla VII-1. Esquema del proceso para el ensayo de unión a receptor AT1	233

OBJETIVOS

Introducción

La química bioinorgánica es una ciencia interdisciplinaria entre la Química y las Ciencias Biológicas y tiene por objetivo elucidar mecanismos biológicos en donde estén implicados iones metálicos (usualmente metales de transición)¹. Trata de correlacionar la actividad biológica de un sistema inorgánico con sus características estructurales, electrónicas y químicas empleando métodos físico-químicos (fundamentalmente técnicas espectroscópicas) así como modelos teóricos².

Los compuestos de coordinación exhiben una amplia gama de actividades biológicas y representan un área de investigación en rápida evolución. Consisten en un átomo o ion central (metálico) rodeado por moléculas, átomos o iones conocidos como ligandos³. El zinc es un elemento esencial para todas las formas de vida y es el segundo metal de transición más abundante en humanos⁴. Tiene un rol protagónico en la química bioinorgánica ya que tiene el orbital 5d completo dándole flexibilidad en la coordinación debido a la falta de estabilización del campo de ligando. Las proteínas son los principales ligandos para este ion a través de los donantes N, O y S de las cadenas laterales de los grupos de histidina, glutamato, aspartato y/o cisteína⁵. De este modo, forma parte de más de 3000 biomoléculas, estando involucrado en el crecimiento, la reproducción y el sistema inmunológico y regulando numerosas funciones celulares, entre ellas, formando parte del sistema enzimático antioxidante y estabilizando la estructura del ADN por medio de los dedos de zinc⁶.

La síntesis, caracterización y aplicación de los complejos metálicos en medicina ha proporcionado una gran variedad de fármacos y en las últimas décadas, ha tomado importancia tanto en el tratamiento de diversas enfermedades como neoplasias, artritis etc., así como en el diagnóstico clínico. Tal es el caso de los complejos derivados de platino, que han sido establecidos como los medicamentos más exitosos contra el cáncer, pero su aplicación clínica está limitada por la toxicidad y la aparición de resistencia tumoral⁷. En el intento de minimizar estos efectos colaterales, se ha planteado la posibilidad de usar complejos de coordinación sintetizados a partir de biometales y sustancias con propiedades farmacológicas conocidas, de manera de mejorar su farmacodinamia, optimizar la biodisponibilidad y disminuir la toxicidad. Además, podrían cumplir otros propósitos como la introducción de iones metálicos al organismo que se encuentren en deficiencia, inhibir o potenciar beneficiosamente sistemas enzimáticos y hasta ofrecer antídotos frente a intoxicación con metales pesados⁸.

El cáncer y la hipertensión se encuentran dentro del grupo de enfermedades crónicas no transmisibles y constituyen en la actualidad uno de los mayores retos que enfrentan los sistemas de salud a nivel mundial debido a que afectan a todos los grupos de edad y a todos los países. Además, son las principales causas de muerte a nivel mundial⁹.

Uno de los tratamientos para la hipertensión consiste en el empleo de los llamados bloqueadores o antagonistas de Angiotensina II o simplemente sartanes que se unen a los receptores de angiotensina II (AT1) impidiendo la vasoconstricción. Estos fármacos también han demostrado atenuar el crecimiento y la diseminación tumoral¹⁰. La estructura de este grupo de compuestos sigue en continuo desarrollo para potenciar su actividad y que produzcan una unión rápida, reversible, saturable y de alta afinidad al receptor.

Sistemas a estudiar

De lo anteriormente expuesto, se pretende obtener nuevos compuestos de coordinación entre fármacos antihipertensivos pertenecientes al grupo de sartanes y el biometal Zn(II). Se propone usar como ligandos a losartán, candesartán, valsartán, telmisartán y azilsartán. Como es sabido, la complejación de diversos metales de transición hacia diferentes ligandos farmacológicamente activos pueden modificarles no sólo su estructura tridimensional sino también atribuirles solubilidad suficiente para que alcancen el blanco celular y de este modo podrían mejorar sus propiedades aumentando la biodisponibilidad y disminuyendo efectos secundarios.

El cáncer puede transcurrir con un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad antioxidante de las células, por lo tanto, como estrategia terapéutica, se apunta a inducir un desbalance redox con el objetivo de causar la muerte celular. Es por ello, que se espera que estos compuestos tengan tal efecto, además de la buscada mejora en las propiedades antihipertensivas del ligando precursor.

Objetivos

Objetivo general

Los estudios propuestos están orientados a desarrollar nuevos complejos de coordinación entre los fármacos antihipertensivos bloqueadores de angiotensina II y Zn(II) para ser utilizados como agentes terapéuticos en hipertensión y cáncer.

Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar complejos con ligandos antihipertensivos (losartán, candesartán, valsartán, telmisartán y azilsartán) y el ion metálico Zn(II).
- ✓ Caracterizar estructuralmente dichos compuestos en fase sólida por análisis elemental, estudios de descomposición térmica y espectroscopías FTIR, Raman, y en solución por espectroscopías UV, fluorescencia y RMN.
- ✓ Determinar su comportamiento en solución fundamentalmente en condiciones fisiológicas (formación, disociación, estabilidad) por espectroscopías UV y medidas de conductividad.
- ✓ Evaluar y comparar los efectos citotóxicos "*in vitro*" de los ligandos, complejos y metal sobre la línea de carcinoma pulmonar A549 y comparar con una línea pulmonar normal MRC-5.
- ✓ Determinar la capacidad de estos sistemas para generar desbalance redox en las células A549 por medio de la generación o disminución de las especies reactivas del oxígeno (EROs), modificación del par GSH/GSSG y alteración del potencial de membrana mitocondrial. Así como también, investigar el tipo de muerte celular (apoptosis, necrosis, etc).
- ✓ Estudiar la interacción de estos complejos con el receptor tipo 1 de Angiotensina II (ATR1) y evaluar sus mecanismos de acción "*in vitro*" como inhibición de EROs y regulación de calcio intracelular.
- ✓ Seleccionar aquel complejo que haya producido mejores efectos citotóxicos a menores concentraciones y mayor interacción con el receptor ATR1 y evaluar su posible acción antihipertensiva "*in vivo*".
- ✓ Realizar estudios de biodisponibilidad mediante la interacción de estos compuestos con albúmina sérica bovina y determinar las constantes de afinidad y los mecanismos de interacción.

Referencias

1. Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev.* 2014;114:4540-4558. doi:10.1021/cr400460s
2. Halpern J, Raymond KN. At the interface of inorganic chemistry and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3562-3566. doi:10.1073/pnas.0831034100
3. Kettle SFA. Physical inorganic chemistry: a coordination chemistry approach. *Phys Inorg Chem.* 2013;11:1-46.
4. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res.* 2006;5(1):196-201. doi:10.1021/pr050361j
5. Krężel A, Maret W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch Biochem Biophys.* 2016;611:3-19. doi:10.1016/j.abb.2016.04.010
6. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(9):399-411. doi:10.1016/S0753-3322(03)00081-7
7. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):148-158. doi:10.2478/raon-2019-0018
8. Ronconi L, Sadler PJ. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord Chem Rev.* 2007;251(13-14 SPEC. ISS.):1633-1648. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.017
9. Serra M., M. V. Las enfermedades crónicas no transmisibles: magnitud actual y tendencias futuras. *Rev Finlay.* 2018;8:1-9.
10. Pinter M, Jain RK. Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy. *Sci Transl Med.* 2017;9(410):1-11. doi:10.1126/scitranslmed.aan5616

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de los metales en los sistemas biológicos

Los metales son componentes esenciales de una variedad de sistemas biológicos. Bajo condiciones fisiológicas, la mayoría de los metales pueden existir en múltiples estados de valencia y, por lo tanto, resultan atractivos para su inclusión en sistemas biológicos¹.

El papel de los iones metálicos dentro de la biología fue investigado en campos diferentes donde se pretendía definir qué elementos eran esenciales para vida, cuáles poseían efectos adversos sobre la salud o tenían posibles efectos terapéuticos. En el intento de integrar las disciplinas surge el campo de la química bioinorgánica cuyo nombre puede permutar entre bioquímica inorgánica, química biológica inorgánica, y biología química inorgánica. El enfoque principal de este campo es la química de coordinación de los metales de transición en las biomoléculas².

La abundancia de los metales dentro del organismo genera su función relativa. De este modo, varían desde cantidades en kilogramos, (como el Ca, que se encuentra en los huesos), a miligramos como el Na (transmisión nerviosa), K (contracción muscular), Fe (transporte de oxígeno en la hemoglobina, entre otras), Mg, Zn (sitio activo de enzimas) o a microgramos como Cu, Mn, Mo. Es decir, hay una correlación entre la cantidad de un elemento esencial y el número de funciones involucradas. Por otra parte, su distribución es desigual en los tejidos biológicos por ejemplo la mayor parte del calcio se concentra en el hueso y el 90% de hierro en la sangre, por el contrario, el zinc es un ion intracelular. Esto es realizado por la homeostasis celular, que mantiene las concentraciones de iones metálicos en un rango estrecho para que sus funciones no se superpongan con la de otros metales³.

Estos elementos pueden dividirse en tres grupos de acuerdo a la composición en los sistemas biológicos. El 98% del peso del cuerpo humano está constituido por el grupo mayoritario de los elementos que comprenden el C, H, O y N a los que se le suman los llamado macrominerales como Na, K, Mg, Ca, Cl, S y P. Luego les sigue un segundo grupo que incluye los elementos traza donde se encuentran los metales de transición Fe, Cu y Zn. Y finalmente en el tercer grupo, están los elementos ultra micro traza como Mo, I, Co, Cr, Ni, As, V, B, Br, Li, Cd, S. El normal funcionamiento del organismo requiere un balance adecuado de estos elementos, por lo cual, se los considera esenciales y pueden pasar a ser tóxicos si sobrepasan ciertas concentraciones o puede haber una deficiencia que también genera enfermedades cuando no se adquiere la cantidad necesaria⁴.

El papel preciso de los biometales en la modulación metabólica no se ha descubierto por completo, pero los datos disponibles apoyan que la deficiencia de estos oligoelementos favorece el desarrollo de ciertos cuadros patológicos como anemia, retardo en el crecimiento y desarrollo, disfunción endotelial acompañada de la consecuente hipertensión y de los procesos aterogénicos, resistencia a la insulina y el estrés oxidativo^{5,6}.

Propiedades de los complejos metálicos para ser usados como drogas basadas en metales

Los metales han sido considerados por tener valores medicinales, históricamente han sido usados en pociones farmacéuticas en las antiguas civilizaciones de Mesopotamia, Egipto, India y China⁷.

Con el avance de la medicina moderna, un gran abanico de metales de transición ha demostrado tener actividad contra una variedad de enfermedades y con ello se han desarrollado medicamentos a base de metales, los cuales han demostrado ser altamente efectivos en la clínica.

Los metales de transición son elementos miembros del bloque "d" y se incluyen dentro de los grupos 3-12 de la tabla periódica. Poseen propiedades únicas que incluyen:

- ✓ *Variación de la carga:* en solución acuosa, los iones metálicos existen como especies cargadas positivamente. Dependiendo del entorno de coordinación existente, la carga puede modificarse para generar especies que pueden ser catiónicas, aniónicas o neutras. La importancia de formar iones cargados positivamente en solución acuosa radica en su posibilidad de unión a moléculas biológicas cargadas negativamente como las proteínas.
- ✓ *Estructura y unión:* a diferencia de las moléculas orgánicas, los complejos metálicos pueden adquirir una amplia gama de geometrías de coordinación que les dan formas únicas. La longitud de unión, el ángulo de unión y el sitio de coordinación varían según el metal y su estado de oxidación. Además, los metales pueden modificar tanto la configuración tridimensional de distintas especies moleculares, así como las propiedades cinéticas, lo que no se puede lograr con los compuestos orgánicos convencionales.
- ✓ *Interacción metal-ligando:* Los complejos metálicos tienen propiedades termodinámicas y cinéticas variadas lo cual les da ventajas a la hora de formar un compuesto de coordinación entre un metal y moléculas biológicas.

- ✓ *Propiedades como ácidos de Lewis*: la mayoría de los iones metálicos pueden polarizar fácilmente los grupos a los que están coordinados, facilitando así su solubilidad.
- ✓ *Actividad redox*: muchos metales de transición tienen una tendencia a sufrir reacciones de oxidación y reducción. Esta propiedad les sirve para participar en sitios redox activos en enzimas involucradas en procesos de óxido-reducción⁸.

En medicina los compuestos metálicos están siendo muy usados en el tratamiento de diversas patologías como el antimonio (anti-protozoario), bismuto (anti-ulceroso), oro (anti-artrítico), hierro (anti-malárico), plata (anti-microbiano) y platino (anti-cancerígeno)⁹, siendo este último, el protagonista del inicio de las investigaciones relacionadas al uso de metalofármacos.

El *cis*-diclorodiaminoplatino(II), comúnmente llamado *cis*-platino, $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, es una de las herramientas más potentes usada en el tratamiento contra el cáncer y su utilización produjo un cambio sustancial en la supervivencia de los pacientes afectados por esta enfermedad. Posteriormente, se orientó la búsqueda de nuevas drogas antitumorales basadas en platino con el objetivo de minimizar los efectos tóxicos colaterales, además de intentar lograr mayor hidrosolubilidad para permitir la administración oral y ampliar el espectro de acción. Esto dio origen a los denominados complejos antitumorales de platino de segunda generación, entre ellos el 1,1 ciclobutanodicarboxilatodiamino platino(II) (Carboplatino) cuyas estructuras se muestran en la Figura I-1¹⁰.

El mecanismo de acción antitumoral más importante de los compuestos de platino es formar un aducto con el ADN, es decir, el Pt forma un complejo de coordinación con los fosfatos cargados negativamente y/o con los átomos de N y O de las bases nucleicas o bien, se produce un entrecruzamiento inter e intracatenario, de esta forma, la estructura del ADN se distorsiona y se inhibe la replicación y la transducción induciendo la muerte celular¹¹.

Figura I-1. Principales metalofármacos derivado del platino aprobados mundialmente.

Estos compuestos están principalmente indicados en el tratamiento de cánceres de cuello uterino, ovario, testicular, cabeza y cuello, mama, vejiga, estómago, próstata y pulmón. Sus actividades anticancerígenas también se extienden al linfoma de Hodgkin y al no Hodgkin, al neuroblastoma, al sarcoma, al melanoma y al mieloma múltiple¹².

La eficiencia de estos compuestos viene acompañada de efectos secundarios tóxicos y resistencia tumoral. El *cis*-platino ataca a células que se encuentran en constante división celular como los folículos capilares (causando alopecia), las células del sistema gastrointestinal (provocando emesis) y la médula ósea produciendo una disminución en la producción de células sanguíneas (mielosupresión) y disminución en la respuesta inmunológica (inmunosupresión)¹². Además, es nefrotóxico por causar daño en los túbulos renales¹³ y es neurotóxico porque afecta los axones, la vaina de mielina, los cuerpos neuronales y las estructuras gliales de la neuronas¹⁴.

La administración sostenida de estos fármacos contribuye al desarrollo de quimiorresistencia, las células optimizan su mecanismo de detoxificación y logran una mejor tolerancia reduciendo la apoptosis¹⁵.

Con el objetivo de sortear estas complicaciones, se desencadenó el interés por drogas que contengan otros metales como potenciales agentes antitumorales. Los complejos de metales de transición pueden unirse al ADN para formar compuestos de coordinación con las bases, produciendo un cambio en la topología del mismo y, al igual que los compuestos

de Pt(II), pueden bloquear o inhibir los procesos de replicación y transcripción, lo que previene la proliferación celular e induce apoptosis. Los complejos con rutenio, oro y hierro han demostrado tener efectos antiproliferativos deseados sobre células cancerosas¹⁶.

El zinc

Química del zinc

El zinc es un metal de transición que pertenece al grupo 12 de la tabla periódica. Se caracteriza por presentar un único estado de oxidación estable, como Zn(II) (configuración electrónica $3d^{10}$), de manera que no puede participar de procesos redox. Dicha configuración electrónica, hace que su efecto polarizante sea isotrópico, generando una gran flexibilidad para coordinar, adoptando números de coordinación cuatro, cinco y seis, lo que facilita su reactividad y la cinética de los procesos que cataliza cuando forma sistemas enzimáticos. Además, tanto el H_2O como el OH^- , pueden ingresar y egresar fácilmente de su esfera de coordinación, lo que también beneficia las velocidades de reacción. Cuando se encuentra formando parte de una enzima, el papel del zinc es el de polarizar el enlace de un sustrato específico favoreciendo las reacciones subsiguientes¹⁷.

Aspectos biológicos del zinc

El zinc es un elemento indispensable biológicamente debido a las siguientes razones:

- ✓ Está ampliamente disponible en el entorno.
- ✓ El ion zinc es un ácido de Lewis fuerte y funciona como ácido de Lewis en las enzimas.
- ✓ Cuando se encuentra dentro del sitio activo de las enzimas, el zinc prefiere geometrías tetraédricas. También están disponibles geometrías con número de coordinación cinco y seis, hecho que hace posible la existencia de estados de transición con estos números de coordinación
- ✓ Al tener configuración d^{10} , no existe energía de estabilización de campo cristalino asociada con geometrías exactas, (como en el caso de los metales de transición), por lo que se puede deformar el ambiente en torno al zinc respecto al tetraedro para permitir la existencia de los ángulos de enlace precisos que necesita para su función.
- ✓ El ion zinc, es resistente a los diferentes cambios producidos de tipo redox, por consiguiente, los cambios de potenciales redox biológicos del organismo no pueden afectar de ninguna manera a su función. De hecho, su participación en las oxido-

reductasas, es el de posicionar adecuadamente el sustrato sin estar involucrado en el proceso de óxido-reducción en sí¹⁸.

- ✓ Las proteínas son los principales ligandos para este ion a través de sus donantes N, O y S las cadenas laterales de histidina, glutamato, aspartato y/o cisteína¹⁹.

El zinc es un oligoelemento ubicuo y es uno de los metales de transición más importantes del organismo. Es indispensable tanto para el crecimiento como el desarrollo y se encuentra en todos los tejidos y fluidos del cuerpo. En general, el requerimiento diario recomendado en la dieta se estima entre 10 y 15 mg/día (150 μ mol/día 230 μ mol/día) y la ingesta máxima tolerable de zinc es de 25 mg/día (380 μ mol/día)²⁰. Los requisitos mínimos de zinc en los seres humanos dependen del crecimiento y del estado fisiológico o patológico. El zinc dietario se absorbe principalmente en el intestino delgado²¹ por medio de unos transportadores saturables llamados ZnT que se encuentran sobre las vellosidades de los enterocitos y sobre el borde apical para el pasaje hacia el plasma²². En el plasma, el 90 % se transporta unido a albúmina y un 10% unido a α -macroglobulina²³. Un 85 % de las reservas de zinc corporal se encuentra en músculo y hueso, el 11 % en piel e hígado y el resto en los demás tejidos²⁴. La cantidad promedio de zinc en el adulto es de aproximadamente 3 g/kg de peso²⁵. A nivel celular, 30 a 40 % de zinc se localiza en el núcleo, 50 % en el citosol y la parte restante se asocia a membranas²⁶. La excreción principal es por vía fecal y urinaria (Figura I-2)²⁷.

Figura I-2. Balance corporal de zinc

El zinc no se almacena en el cuerpo y el consumo excesivo produce una absorción reducida y una mayor excreción. En concentraciones adecuadas, no es carcinógeno, ni mutagénico o ni teratogénico²⁸.

El zinc desempeña tres funciones biológicas principales en el organismo: actúa como catalizador y como ion estructural y regulador. En su rol catalítico, se encuentra en más de 300 enzimas y está coordinando en el sitio catalítico con los aminoácidos de la enzima y moléculas de agua. Las enzimas pueden tener dos o más átomos de Zn y/o Mg adyacentes entre sí²⁹.

En su rol estructural y funcional, se encuentra unido a varias proteínas involucradas en la replicación del ADN y la transcripción inversa, y es fundamental para la función de varias metaloproteínas. Es esencial en la estructura de ciertas enzimas como la fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, carboxipeptidasas y ADN y ARN polimerasas³⁰. Los iones de zinc son hidrófilos y no atraviesan las membranas celulares por difusión pasiva²⁰.

El zinc forma parte de los “dedos de zinc”, que son motivos estructurales cuyos pliegues son estabilizados por la unión de este metal a restos de cisteína e histidina. Normalmente, estos dedos de zinc, están implicados en la regulación transcripcional ya que interaccionan con el ADN o ARN³¹.

En su papel regulatorio, al formar parte de enzimas, el zinc regula tanto su actividad como la estabilidad, por lo tanto puede ser un ion activador o inhibidor enzimático³². También modula procesos de señalización celular³³.

Las metalotioneínas son proteínas de unión a metales de bajo peso molecular y debido a su alta afinidad por los metales, desempeñan funciones en la homeostasis celular de zinc y cobre. De este modo, juegan un rol en la captación, distribución, almacenamiento y liberación de zinc. Cuando el zinc entra a la célula, puede ser capturado por metalotioneínas y ser transportado a otra parte del citosol, donde es cedido a otra proteína u organela para la formación de enzimas antioxidantes³⁴. Otra función de las metalotioneínas es la de capturar radicales oxidantes por lo que participan del control oxidativo. Esta reacción ocurre en las cisteínas unidas al zinc, quien se libera al medio en el proceso. También la presencia de zinc activa la síntesis de estas proteínas³⁵.

Zinc como antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son radicales, iones o moléculas que tienen un solo electrón no apareado en su capa más externa. Por esta razón las EROs son altamente reactivas. Las EROs pueden clasificarse en dos grupos: radicales libres de oxígeno y EROs no radicales. Los radicales libres de oxígeno incluyen superóxido ($O_2^{\bullet}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), radicales peroxilo ($ROO^{\bullet}$), radicales alcoxilo ($RO^{\bullet}$), radical sulfonilo ($ROS^{\bullet}$) y radicales tiil peroxilo ($RSOO^{\bullet}$). Las EROs no radicales incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ozono (O_3), hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$), ácido hipocloroso ($HOCl$), peroxinitrito ($ONO^{\bullet}$), anión nitrosoperoxicarbonato ($O=NOOCO^{2-}$), anión nitrocarbonato (O_2NOCO^{2-}), dióxido de dinitrógeno (N_2O_2), nitronio (NO_2^+) y compuestos de carbonilo derivados de lípidos o carbohidratos altamente reactivos. Entre ellos, los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo son las EROs mejor estudiadas en cáncer³⁶.

Estos radicales se producen continuamente como subproductos del metabolismo y si no son eliminados rápidamente, pueden dañar las membranas celulares. Las células han desarrollado sistemas enzimáticos como defensas antioxidantes para prevenir la oxidación de biomoléculas con la consecuente muerte celular y daño tisular, como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa³⁷.

El zinc al no tener química redox, no impide la producción de radicales libres, sino que ejerce sus efectos de manera indirecta contribuyendo a la estructura de la superóxido dismutasa (SOD) dependiente de Cu y Zn y manteniendo las concentraciones celulares de las metalotioneínas. La SOD es una enzima citoplasmática que cataliza la transformación del anión superóxido ($O_2^{\bullet}$) en oxígeno y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y este último, luego es removido por la catalasa³⁸. Por lo tanto, el mantenimiento adecuado de las concentraciones de zinc dentro de los compartimientos celulares es esencial para el funcionamiento apropiado del sistema de defensa antioxidante³⁹.

Zinc y apoptosis

Otro proceso celular fundamental que puede estar regulado por el zinc, es el proceso de apoptosis o muerte celular programada.

El zinc estabiliza la estructura del ADN, específicamente en donde se encuentra el gen p53 que es quien desencadena la activación de la familia de las caspasas en la apoptosis⁴⁰.

El zinc tiene acciones opuestas y dependen del tipo de célula. Por un lado, induce apoptosis en células de próstata, neuronas y células gliales, células epiteliales de ovario, esofágicas, de coriocarcinoma, de hepatoma. Por el contrario, en células de mama, de pulmón, renales, macrófagos, linfocitos, timocitos, acinares pancreáticas, HeLa y otras, ejerce efectos antiapoptóticos⁴¹. Además, en algunas células, la depleción de zinc induce apoptosis ya que se activan las caspasas-3 y -6 y se produce la fragmentación de ADN⁴², mientras que la exposición a altos niveles inhibe la apoptosis porque puede actuar como un inhibidor de la caspasa-3^{43,44}. En otros tipos celulares, si su concentración extracelular supera la capacidad del sistema homeostático puede resultar citotóxico activando el mecanismo apoptótico⁴⁵.

Otras funciones importantes del zinc

El zinc está involucrado en el desarrollo del sistema inmune. Es esencial para el desarrollo de las células que median la inmunidad innata como los neutrófilos, los macrófagos y las células natural killers (NK); interviene en el crecimiento y función las células T y B, en la producción de citocinas y en la fagocitosis. Además, tiene un papel importante en la prevención de lesiones inducidas por radicales libres durante los procesos inflamatorios^{46,47}.

El zinc es un elemento importante en el ciclo reproductivo, es necesario para la formación y maduración de espermatozoides, para la ovulación y la fertilización⁴⁸. Durante el embarazo, participa de la madurez fetal e inclusive modula la presión arterial y una deficiencia en zinc aumenta el riesgo de preclamsia⁴⁹. Sobre el crecimiento, estimula la síntesis de ADN y ARN, la replicación celular y diferenciación de condrocitos, osteoblastos y fibroblastos, síntesis de somatomedina-C, fosfatasa alcalina, colágeno y osteocalcina, mediando la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento. También interactúa con otras hormonas relacionadas con el crecimiento óseo, como la testosterona, las hormonas tiroideas, la insulina y la vitamina D₃⁵⁰.

La piel es el tercer tejido más abundante en zinc y la epidermis contiene mayor cantidad que la dermis. Como el zinc está asociado al desarrollo, la diferenciación y el crecimiento celular, estas células, que se encuentran en continua proliferación, necesitan tener una adecuada concentración de este metal y además cada célula expresa grandes cantidades de transportadores de zinc⁵¹.

Por lo expuesto anteriormente, el zinc es un ion multifuncional. Su desregulación puede afectar gravemente la supervivencia celular.

Presión Arterial

La función de la circulación sanguínea consiste en el transporte de nutrientes hacia los tejidos así como de los productos de desecho para ser posteriormente eliminados, el transporte de sustancias como las hormonas de una parte del organismo a otra y, en general, mantener un entorno apropiado en todos los líquidos tisulares del organismo para lograr la supervivencia y una funcionalidad óptima de las células⁵².

En el sistema cardiovascular, el corazón y los vasos sanguíneos proporcionan el gasto cardíaco y la presión arterial para garantizar el flujo sanguíneo necesario para perfundir correctamente los órganos.

La presión sanguínea es la fuerza ejercida por la sangre sobre las paredes vasculares en una unidad de superficie. Depende, fundamentalmente, del flujo sanguíneo que equivale al gasto cardíaco y de las resistencias periféricas que se oponen a este. Muchos mecanismos complejos están involucrados en mantener constantes los valores de presión, sobre todo cuando ocurren variaciones en diversas situaciones fisiológicas, como por ejemplo, desde el reposo a la realización de ejercicio físico o el estrés⁵³.

Cuando se habla de “presión sanguínea” de un individuo, se refiere a la presión medida dentro de grandes arterias en la circulación sistémica. Este valor comprende la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica. En general, la presión arterial se mide mediante la auscultación con un esfigmomanómetro de tubo de mercurio. Se mide en milímetros de mercurio (mmHg) y se expresa en términos de presión sistólica sobre presión diastólica. La presión sistólica se refiere a la presión máxima dentro de las grandes arterias cuando el músculo cardíaco se contrae durante la sístole para impulsar la sangre a través del cuerpo. La presión diastólica describe la presión más baja dentro de las arterias grandes durante la relajación del músculo cardíaco en la diástole⁵⁴.

Mecanismos de control de la presión sanguínea

El organismo cuenta con sistemas de control que regulan la presión arterial ante las alteraciones hemodinámicas. Estos sistemas de control están determinados por la acción del sistema nervioso autónomo y los centros de regulación cardiovascular del sistema nervioso central (SNC) y por hormonas.

La regulación nerviosa se caracteriza por una rápida respuesta. El sistema nervioso simpático estimula todas las funciones vasoconstrictoras y cardioaceleradoras mientras que

el parasimpático produce el efecto opuesto. Además, en el control participan los receptores de estiramiento llamados “barorreceptores” que están situados en puntos específicos de las paredes de varias arterias sistémicas de gran tamaño. El aumento de la presión arterial estira los barorreceptores, se transmiten las señales al SNC y la respuesta viaja a través del sistema autónomo hacia la circulación para modificar la presión arterial hasta el nivel normal⁵⁵.

El control humoral se da por hormonas y éstas pueden actuar localmente o volcarse a la circulación. Dentro de las sustancias vasoconstrictoras más importantes, se encuentran la adrenalina y noradrenalina que son liberadas en terminaciones nerviosas simpáticas y su acción sobre el corazón consiste en aumentar la frecuencia cardíaca e incrementar el gasto cardíaco, mientras que sobre las arterias, estimula la vasoconstricción⁵⁶; y la angiotensina II, un potente agente vasoconstrictor que aumenta la resistencia periférica total y reduce la excreción de sodio y agua en los riñones, también actúa como factor de crecimiento sobre las células del músculo liso vascular causando proliferación e hipertrofia vascular⁵⁷. Dentro del grupo de las sustancias vasoactivas, se encuentran la bradisinina y la histamina que provocan una dilatación arteriolar potente y aumentan la permeabilidad capilar⁵⁸.

Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los principales sistemas de control para la presión arterial y el balance de líquidos. La principal hormona biológicamente activa generada por este sistema, la angiotensina II (Ang II), se produce por escisión secuencial de péptidos derivados del angiotensinógeno.

Componentes del sistema renina-angiotensina

La renina se sintetiza y almacena en una forma inactiva conocida como prorrenina en las células yuxtaglomerulares (células YG) de los riñones. Cuando desciende la presión arterial, evento detectado por los riñones, se produce escisión de moléculas de prorrenina en las células YG y la posterior liberación de renina, la cual entra en la circulación sanguínea renal. La propia renina es una enzima y no una sustancia vasoactiva.

La renina actúa enzimáticamente sobre otra proteína plasmática, una globulina denominada angiotensinógeno, para liberar un péptido de 10 aminoácidos, la angiotensina I, que tiene propiedades vasoconstrictoras discretas, no suficientes para provocar cambios en la función circulatoria. La renina persiste en la sangre durante 30 min hasta 1 h y continúa

formando más angiotensina I durante todo este tiempo. Unos segundos o minutos después de la formación de angiotensina I se escinden otros dos aminoácidos para formar el péptido de ocho aminoácidos angiotensina II (Ang II) (Figura I-3). Esta conversión se produce en gran medida en los pulmones, cuando el flujo sanguíneo atraviesa los pequeños vasos de ese territorio, catalizada por una enzima denominada enzima convertidora de la angiotensina (ECA), que está presente en el endotelio de los vasos pulmonares. Otros tejidos, como los riñones y los vasos sanguíneos, también contienen ECA y, por tanto, forman angiotensina II localmente.

La Ang II es metabolizada a Ang III gracias a la aminopeptidasa A, la cual a su vez es metabolizada por la aminopeptidasa N para formar Ang IV.

Figura I-3. Cascada enzimática de la formación de angiotensina II a partir del precursor angiotensinógeno

La angiotensina II es una sustancia vasoconstrictora muy potente, no obstante, persiste en sangre solo durante 1-2 min porque se inactiva rápidamente por enzimas tisulares y sanguíneas conocidas como angiotensinasas.

La angiotensina II tiene dos efectos principales que pueden elevar la presión arterial. El primero de ellos, la rápida vasoconstricción en diversas zonas del organismo. La vasoconstricción es muy intensa en las arteriolas y mucho menor en las venas. La

constricción de las arteriolas aumenta la resistencia periférica total, con lo que aumenta la presión arterial. Además, la constricción leve de las venas favorece el incremento del retorno de sangre venosa hacia el corazón, con lo que se facilita la función de bomba cardíaca contra una presión en aumento.

La segunda forma de acción de Ang II es el descenso de la excreción tanto de sal como de agua por los riñones. Esta acción aumenta lentamente el volumen del líquido extracelular, lo que después aumenta la presión arterial durante las horas y días sucesivos. Este efecto a largo plazo, que actúa a través del mecanismo de volumen del líquido extracelular, es incluso más potente que el mecanismo vasoconstrictor agudo a la hora de aumentar finalmente la presión arterial. El mecanismo se resume en la Figura I-4.

Figura I-4. Mecanismo vasoconstrictor del sistema renina-angiotensina para el control de la presión arterial. ECA: enzima convertidora de angiotensina II

La angiotensina II es uno de los factores estimulantes de la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales. Por tanto, la velocidad de secreción de aldosterona aumenta también cuando se activa el SRA.

Una de las funciones de la aldosterona consiste en lograr un aumento de la reabsorción de sodio en los túbulos renales, con lo que aumenta el sodio en el líquido extracelular. Este aumento de sodio provoca, a su vez, la retención hídrica, aumentando el volumen de líquido

extracelular y provocando secundariamente una elevación de la presión arterial aún a más largo plazo.

En consecuencia, tanto el efecto directo de la angiotensina sobre el riñón como su acción a través de la aldosterona son importantes en el control a largo plazo de la presión arterial⁵⁹.

Receptores de la Angiotensina II

El octapéptido Ang II ejerce sus efectos a través de la unión a dos tipos distintos de receptores de membrana, el AT1 y el AT2, ambos de gran afinidad con Ang II. Son receptores que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs: G protein-coupled receptors).

Los AT1s están acoplados a múltiples mecanismos de transducción de la señal que resultan en las principales acciones de la Ang II, tanto fisiológicas (regulación de la presión arterial y el balance hidrosalino) como fisiopatológicas (hipertensión, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, etcétera).

Estos mecanismos tienen distintas fases y características temporales: 1) inmediatas que ocurren en segundos y 2) tardías en horas.

Respuesta inmediata: cuando la Ang II se une al receptor en las células de músculo liso vascular, se produce la fosforilación de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la formación de inositoltrifosfato (IP3) en segundos. El IP3 se une a sus receptores presentes en el retículo sarcoplasmático abriendo canales de Ca^{2+} que permiten el incremento de sus niveles intracelulares, desencadenando el mecanismo de contracción del músculo liso vascular⁶⁰.

Respuesta tardía: La Ang II estimula la formación de EROs por activación de la NADPH oxidasa (NOX), que desencadena la formación del anión superóxido y H_2O_2 ⁶¹. Estos mediadores participan en la regulación de tirosina kinasas y fosfatasa, en la expresión de genes que codifican para mediadores inflamatorios, en la función endotelial, en el crecimiento de las células del músculo liso vascular y formación de la matriz extracelular, generando la modificación de características estructurales y funcionales de los vasos que conducen a la patología vascular⁶².

Otros componentes del Sistema Renina Angiotensina

La identificación de nuevos componentes de SRA ha abierto nuevas investigaciones para comprender su papel fisiológico. La Ang III a nivel central, por estimulación de los AT1,

ejerce efectos presores equivalentes a los inducidos por la Ang II, mientras que a nivel renal produce natriuresis y diuresis por estimulación de los AT2 a través de la generación de óxido nítrico. La Ang IV, estimulando a los receptores AT4, aumenta el flujo sanguíneo cerebral, estimula la angiogénesis y juega un rol en la memoria y en el aprendizaje. Otro componente bioactivo del SRA es la Ang-(1-9), que ejerce efectos hipotensores, y disminuye el remodelado cardíaco y vascular, por estimulación de los AT2. La Ang-(1-9) se forma a partir de la Ang II por la actividad catalítica de la ECA 2, y es degradada por la ECA para generar Ang-(1-7). La Ang-(1-7) interacciona con el receptor Mas ejerciendo efectos hipotensores, vasodilatadores, natriuréticos, diuréticos y disminuyendo la hipertrofia celular y la fibrosis inducida por la Ang II. La Ang A es un agente vasopresor generado a partir de la descarboxilación de la Ang II, aunque es menos potente que esta. Finalmente, la Alamandina, generada por descarboxilación de la Ang-(1-7) por un mecanismo enzimático aún desconocido, ejerce efectos similares a la Ang-(1-7). La alamandina estimula al receptor MrgD (Mas-related G protein). Por lo tanto el SRA es un sistema formado por dos ejes, uno presor, representado por la Ang II, ECA y el receptor AT1, y otro depresor o protector, representado por la ANG-(1-7), ECA 2 y el receptor Mas¹⁶¹.

Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad frecuente que se produce por el aumento de la fuerza de presión que ejerce la sangre sobre las arterias de forma sostenida. La manera de detectar la hipertensión es a través de la medición de la presión arterial. Se considera hipertensión cuando la presión arterial sistólica (PAS) es mayor o igual a 140 mmHg y la presión arterial diastólica (PAD) es mayor a 90 mmHg, con una presión arterial media mayor de 110 mmHg.

La HTA es una enfermedad de etiología multifactorial, controlable, que disminuye la calidad y expectativa de vida. La presión arterial (PA) se relaciona en forma positiva, lineal y continua con el riesgo cardiovascular (RCV). No obstante, el riesgo es continuo, aunque menor, desde valores más bajos y el riesgo global es mayor cuando la HTA se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular (FRCV)⁶³.

Cuando la presión arterial está muy elevada, es decir, con una presión arterial media un 50 % o más por encima de lo normal, se producen efectos letales principalmente de tres formas:

1. Aumentando la carga de trabajo sobre el corazón que produce insuficiencia cardíaca precoz y cardiopatía coronaria, provocando la muerte como consecuencia de un ataque cardíaco.
2. Dañando algún vaso sanguíneo mayor del cerebro, con lo que mueren porciones importantes de ese órgano; este suceso se denomina infarto cerebral. Clínicamente, es un «ictus». Dependiendo de la parte del cerebro afectada, el ictus puede ser mortal o provocar parálisis, demencia, ceguera o muchos otros trastornos cerebrales graves.
3. Provocando lesiones en los riñones conduciendo a insuficiencia renal⁵⁹.

Se considera que existen dos tipos de hipertensión:

Hipertensión primaria, o esencial: se da en el 90-95 % de las personas con esta patología y la hipertensión es de origen desconocido. Los factores que aumentan la PA son obesidad, resistencia a la insulina, alto consumo de alcohol, alto consumo de sal (en pacientes sensibles a la sal), envejecimiento y estilo de vida sedentario, estrés, bajo consumo de potasio y bajo consumo de calcio⁶⁴.

Hipertensión secundaria: afecta al 5-10 % restante de los casos, y se da por causas conocidas, como enfermedad renal, causas endócrinas de hipertensión (feocromocitoma, síndromes de exceso de mineralocorticoides, síndromes de exceso de glucocorticoides), apnea del sueño, etcétera⁶⁵.

Estadística en Argentina

La HTA sigue siendo la principal causa de muerte en el mundo. En nuestro país representa el 40% de las causas de muerte. Es el principal factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (ECV). Su prevalencia va en aumento y, sin embargo, el grado de conocimiento y control de la HTA en la Argentina, permanece estancado en los últimos 10 años.

El RENATA-2 (Registro Nacional De Hipertensión Arterial) es un registro de prevalencia, conocimiento y control de la HTA en la Argentina. Fue el último relevamiento nacional llevado a cabo (2015-2016, Figura I-5) y arrojó que la prevalencia de HTA es de 36,3 %, el porcentaje de pacientes que desconoce que padece esta patología es 38,8 % y la cantidad de hipertensos que tienen controlada su enfermedad es de 24,2 %. La prevalencia actual de HTA aumenta con la edad y es significativamente mayor en hombres (43,67 %) que en mujeres (30,39 %). El 38,8 % de los hipertensos (casi 4 de cada 10) desconocen su

enfermedad, siendo este desconocimiento significativamente mayor en hombres (47,1 %) que en mujeres (29,3 %), y fundamentalmente en jóvenes. El 55,5 % de los hipertensos están tratados farmacológicamente. El 24,2 % del total de los pacientes hipertensos (conocidos y no conocidos) tiene la PA controlada, significativamente más las mujeres (33,0 %) que los hombres (16,6 %). El 50,4 % de los hipertensos cumplen con el tratamiento y el buen cumplimiento lo cual se asocia a un mayor grado de control⁶⁶.

Figura 1-5. Prevalencia de hipertensión arterial en Argentina (izquierda) y según sexo (derecha)

Hipertensión y estrés oxidativo

La hipertensión se asocia a una elevación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y con frecuencia, a un deterioro de los mecanismos antioxidantes endógenos. Los agentes hipertensivos, como la vasopresina, la endotelina, la renina, angiotensina II o aldosterona estimulan las NAD(P)H oxidasas de las células endoteliales (EC) y de las células del músculo liso vascular (VSMC), para producir anión superóxido. El superóxido reacciona con óxido nítrico (NO) (generado por la NO sintetasa) generando peroxinitritos (ONOO^-), un metabolito nocivo. El superóxido y los peroxinitritos pueden inducir vasoconstricción, hipertrofia vascular y miocárdica, disminuir la función renal y aumentar la actividad simpática del sistema nervioso central. Todos estos efectos contribuyen al desarrollo de la hipertensión⁶⁷. Estudios previos mostraron la reversión de estos efectos mediante el tratamiento con uno de bloqueadores del receptor de angiotensina II como en candesartán⁶⁸.

Deficiencia de zinc y su relación con la presión arterial

Como se comentó anteriormente, el zinc contribuye a la prevención de la generación de estrés oxidativo, apoptosis y los procesos de inflamación en los tejidos pero su deficiencia contribuye al desarrollo de varias enfermedades crónicas como la aterosclerosis y enfermedades vasculares como insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria, enfermedad cardíaca, insuficiencia renal, hipertensión, diabetes mellitus, cáncer, trastornos inmunológicos y neurodegeneración⁶⁹. De este modo, el zinc puede tener un rol importante en la regulación de la presión sanguínea. Poblaciones con dieta deficiente en zinc tienen alta prevalencia de hipertensión⁷⁰ mientras que en pacientes que padecen hipertensión esencial y diabetes mellitus tipo 2⁷¹ las concentraciones séricas de zinc se encuentran por debajo de los valores normales. Se sabe que la desregulación en la homeostasis de zinc incrementa la actividad de la renina y de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)⁷².

De las enzimas que contienen zinc como cofactor, algunas de ellas son las óxido nítrico sintasas (NOS) producida por las células endoteliales y constituyen una familia de metaloenzimas involucradas en la regulación de la presión arterial y en las funciones cardiovasculares y renales ya que se encargan de producir óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador. En modelos experimentales con ratas hipertensas espontáneas (SHR), se vio que la hipertensión iba acompañada de una deficiencia en los niveles de Zn, Cu y Mg, así como de la disminución en la expresión de las NOS⁷³ y de una reducción en la actividad de la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa, Cu/Zn-SOD, con una mayor formación del anión radical superóxido⁷⁴.

Por otra parte, se ha demostrado que la deficiencia severa de zinc en ratas adultas induce una disminución en la tasa de filtración glomerular y flujo sanguíneo renal y aumento de la resistencia vascular renal, eventos que alteran la hemodinamia e incrementan la liberación de los vasoconstrictores angiotensina II y endotelina^{75,76}

Así mismo, se ha propuesto que la deficiencia de zinc puede alterar el sabor de la sal. Por lo tanto, las personas con deficiencia de zinc tienden a aumentar la ingesta de sal, lo que puede llevar a un aumento de la presión arterial⁷⁷.

De este modo, la deficiencia de zinc contribuiría al desarrollo de hipertensión arterial ya que se deteriora la acción relajante tónica basal en la vasculatura sistémica por disminución de la actividad de la NOS, se inhibe la Cu/Zn-SOD, potencia el estrés oxidativo y se modifica

la función renal alterando los parámetros hemodinámicos y consecuentemente, se incrementa la acción del SRA.

Tratamiento antihipertensivo

El objetivo fundamental del tratamiento antihipertensivo consiste en disminuir la morbimortalidad CV, cerebral y renal a través del descenso de la PA. Debe iniciarse en todo paciente con valores de HTA superior a 140 y/o 90 mmHg.

Tratamiento no farmacológico

Los cambios en el estilo de vida constituyen un pilar fundamental del tratamiento del paciente hipertenso. Es recomendable comenzar el tratamiento de la HTA con bajo RCV antes de iniciar tratamiento farmacológico, como la disminución de la ingesta de sodio, aumento de la ingesta de potasio, cambio de patrones alimentarios, disminución de la ingesta de alcohol, realización de actividad física y mantenimiento de un peso corporal adecuado⁷⁸.

Las medidas higiénico-dietéticas deben ser implementadas en el tratamiento de todos los pacientes hipertensos, por ser de bajo costo, no generar efectos colaterales indeseables y potenciar la medicación antihipertensiva. El efecto hipotensor de los cambios en el estilo de vida sólo se sostiene si las medidas se mantienen a largo plazo. Su suspensión se acompaña de un rápido incremento de la PA.

Tratamiento farmacológico

En la actualidad, el conjunto terapéutico de los fármacos antihipertensivos es muy amplio y comprende diferentes familias de fármacos con diversos mecanismos de acción. Las seis familias de fármacos que la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad Internacional de Hipertensión consideran como de primera línea son los diuréticos, bloqueadores beta-adrenérgicos, antagonistas del calcio, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina, bloqueadores alfa y antagonistas de los receptores de la angiotensina II. La elección en la medicación depende de varios parámetros, tales como el coste, presencia de enfermedades asociadas, efectividad, efectos secundarios, tolerancia o impacto sobre la calidad de vida⁷⁹.

Diuréticos. Tienen la ventaja de su fácil manejo y bajo coste. Tienen efecto sinérgico cuando se combinan con otros agentes antihipertensivos y contrarrestan la retención de sodio y

fluidos que causan algunos otros agentes. Existen tres subgrupos diferentes de diuréticos: las tiazidas y derivados, los diuréticos del asa de Henle y los ahorradores de potasio. Las tiazidas actúan en la porción proximal del túbulo contorneado distal, inhibiendo el cotransporte $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ y aumentando la excreción urinaria de estos iones. Los diuréticos del asa de Henle ejercen su función en la zona medular de la rama ascendente del asa de Henle. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición del cotransporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$, con lo que se bloquea la reabsorción activa de sodio. El tercer grupo de diuréticos lo constituyen la espironolactona y la amilorida. La espironolactona es un antagonista de los receptores de la aldosterona, por lo que inhibe la reabsorción de sodio en el túbulo distal. Tiene propiedades antifibróticas y antiproliferativas cardíaco y vascular.

Además, los diuréticos constituyen una buena terapia de asociación, especialmente con bloqueadores betaadrenérgicos, inhibidores de la enzima conversiva de la angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II), al presentar mecanismos de acción complementarios y disminuir la incidencia de efectos secundarios⁸⁰.

Bloqueadores beta-adrenérgicos. Tienen propiedades antiarrítmicas, antiisquémicas y antihipertensivas. Son cardiosselectivos, con actividad simpaticomimética intrínseca y tienen gran heterogeneidad. Estos fármacos están especialmente indicados en la hipertensión que cursa con renina elevada, gasto cardíaco elevado, taquiarritmias, cardiopatía isquémica, miocardiopatía hipertrófica. El primer antagonista de receptores beta-adrenérgico con uso clínico fue el propanolol. Otros ejemplos incluyen atenolol, metoprolol, etc.

Bloqueadores de los canales calcio (BCC). El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en la inhibición de los canales del calcio dependientes del potencial de membrana y en el consecuente bloqueo de la entrada de calcio al interior de la célula. El descenso de la concentración de calcio libre citosólico en las células musculares lisas arteriolares condiciona la disminución del tono contráctil, de la resistencia vascular y de las cifras de PA. Ejemplos de este tipo de fármacos son nisoldipino, nitrendipino, nifedipino, entre otros.

Inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina. Estos fármacos (como enalapril, captopril, ramipril, etc) inhiben a la ECA y por ende la formación de Ang II a partir de la angiotensina I.

Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. Producen, un bloqueo del sistema renina-angiotensina, mediante el antagonismo específico del receptor AT1 de la Ang II. Estos fármacos se detallarán en la siguiente sección.

En Argentina, de los hipertensos que reciben medicación, el 42,5 % son tratados con los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), el 35,6 % con antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II), el 20,1 % con beta-bloqueantes (BB) y el 12,7 % con bloqueadores de los canales de calcio (BCC) y las menos utilizadas fueron los diuréticos (11,4 %) y los antialdosterónicos (0,5 %) (Figura I-6)⁶⁶.

Figura I-6. Familia de fármacos utilizados por pacientes hipertensos en Argentina. IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II. BB: beta-bloqueantes. BCC: bloqueadores de los canales de calcio

Antagonistas o bloqueadores del receptor AT1 de la angiotensina II

Los antagonistas o bloqueadores de los receptores de la Ang II (ARA II o ARB, respectivamente), también conocidos como sartanes, son un grupo de fármacos indicados principalmente en el tratamiento de hipertensión leve a moderada, en fallas cardíacas crónicas y en la prevención de infartos secundarios. Son los fármacos de elección en la nefropatía diabética. Su mecanismo de acción es la de bloquear específicamente el receptor de angiotensina II y de esta manera, previene la vasoconstricción, la liberación de aldosterona y catecolaminas con ello disminuye la presión arterial⁸¹ así mismo, se impide la liberación de hormona antidiurética y la respuesta hipertrófica⁸².

Los 8 sartanes aprobados por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos) y disponibles actualmente para su uso clínico, son compuestos no peptídicos que se caracterizan por tener grupos bifenilo, tetrazol y/o benzimidazol (Figura I-7). En la Figura I-7 se incluye el fimasartán, que se encuentra actualmente en la etapa de ensayos clínicos y no ha sido aprobado aún por la FDA⁸³ candesartán, olmesartán, irbesartán, losartán, fimasartán y valsartán tienen una estructura común de bifenil-tetrazol, azilsartán y

telmisartán tienen un grupo común de benzimidazol, y el eprosartán tiene una estructura química sin bifenilo ni tetrazol. Con la excepción de irbesartán, losartán y fimasartán, todos los sartanes activos tienen un grupo ácido carboxílico libre. Por otro lado, azilsartán es estructuralmente similar al candesartán, excepto que tiene 5-oxo-1,2,4-oxadiazol en lugar del anillo de tetrazol⁸⁴.

Figura I-7. Estructura química de los fármacos bloqueadores del receptor de angiotensina II o sartanes.

La estructura de los sartanes imita el segmento C-terminal y N-terminal de la Ang II, por ejemplo, el anillo imidazol y el grupo alquilo imitan las cadenas laterales histidina e isoleucina respectivamente^{85,86}, el anillo de tetrazol con carga negativa mimetiza con los residuos de aspartato y tirosina en el extremo N-terminal⁸⁷ (Figura I-8). El agregado de los grupos bifenilos a estas estructuras, incrementa la afinidad por el receptor AT1 así como la lipofilia, dándole una mayor estabilidad metabólica y una mejor biodisponibilidad⁸⁸.

Figura I-8. Comparación química entre losartán y angiotensina II.

Modos de unión de los diferentes sartanes al receptor AT1

El receptor AT1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. Consta de siete dominios transmembrana α -hélice, de los cuales los dominios 1 y 4 son los que participan de la formación del bolsillo de unión mientras que los dominios 3, 5, 6 y 7 participan del proceso de activación^{89,90}. La Ang II se inserta en el receptor en forma vertical y su extremo N-terminal interacciona con las hélices extracelulares mientras que el C-terminal interacciona con los aminoácidos de los dominios transmembrana⁹¹. En la Tabla

I-1 se resumen las principales interacciones entre el octapéptido Ang II y los residuos del receptor AT1.

Tabla I-1. Principales interacciones entre los residuos de Ang II y los residuos del receptor AT1⁹². IP3: inositol trifosfato; MAPK; Proteína quinasas activadas por mitógeno

Residuo de Ang II	Residuo de AT1	Interacción
Arg2	Asp281 Asp278	Asp281 posiciona a la Ang II mientras que Asp278 estabiliza la unión
Tyr4	Asn111, Ser105	Activa el receptor y se produce la generación de IP3
His6,	Phe259, Thr260, Asp263	Permiten el acoplamiento en el sitio de unión
Phe8	His256, Phe259, Lys199, Trp253, His183	Activa el receptor. Se produce la fosforilación y la generación de IP3. Se activa la vía MAPK. Lys199 forma un puente con Phe8

La función de la Ang II cuando activa el receptor ya se ha descrito en la sección anterior. Si bien los sartanes comparten algunos grupos químicos, presentan diferencias en su estructura molecular y la naturaleza de las interacciones con los residuos del receptor puede ser diferente⁹³. La unión de antagonistas no peptídicos depende críticamente de los residuos de Tyr113, Lys199, His256, Gln257 y Asn295 para inducir el antagonismo. El grupo oxhidrilo de Tyr113 forma un enlace puente de hidrógeno con el nitrógeno del imidazol de los sartanes y el grupo ε-amino de Lys199 está implicado en la unión del resto carboxilato, tetrazol aniónico, bifenilo o benzimidazol de todos los compuestos⁹⁴. Por otro lado, la Arg167 interacciona con los grupos bifenil-tetrazol. Las interacciones se mencionan en la Tabla I-2 y se muestran algunos ejemplos en la Figura I-9.

Tabla I-2. Descripción de las principales interacciones entre los sartanes y los residuos del receptor AT₁^{93,95-98}

Sartán	Tipo de interacción con los residuos en el receptor AT₁
Losartán	Interacción de Van der Waals entre Val108 y el grupo fenilo, enlace puente de hidrógeno entre Tyr113 y el anillo de imidazol, enlace de hidrógeno entre Tyr184 y el anillo de tetrazol, enlace iónico entre el grupo Lys199 y OH en el anillo de imidazol, fuerte unión entre el anión cloruro y la bolsa hidrofóbica formada por Leu112, Tyr113, Phe204, His256 y Gln257
Candesartán	El grupo carboxilato forma una interacción iónica con Lys199, el anillo tetrazol forma un enlace puente de H con Gln257, hay interacción de Van der Waals entre el grupo bifenilo con Tyr113. Se une a una bolsa lipofílica delimitada por Ser105, Trp253, His256, Ile288 y Tyr292.
Valsartán	Presenta tres interacciones fuertes: Lys199 se une al grupo tetrazol por un enlace iónico y al grupo fenilo por interacción catión- π , Ser105 se une al grupo carboxilato y Ser109 se une al núcleo de fenilo por interacción OH- π
Telmisartán	Los benzimidazoles distales se unen a un bolsillo lipofílico formado por Val116, Phe204, Phe208 y Trp253. El imidazol se une a Tyr113, Phe171, Phe182 y Lys199. El ácido bifenil carboxílico interactúa con Tyr184 y His256
Azilsartán	El oxadiazol forma enlace puente de hidrógeno con Gln257, el grupo bifenilo por la interacción de van der Waals, con Tyr113, el grupo carboxilato forma una interacción iónica con Lys199
Olmesartán	Los grupos carboxilato e hidroxilo en el resto imidazol interactúan con Lys199/His256 y Tyr113, respectivamente mientras que el grupo tetrazol interactúa con Gln257
Eprosartán	El grupo carboxifenilo interactúa con His256, el grupo carboxilato se une a Lys199, el fenilo/imidazol se une a Asn295

Figura I-9. Esquema de algunas de las principales interacciones entre los sartanes y los residuos del receptor AT₁⁹⁹

Farmacocinética de los sartanes

La Tabla I-3 enumera las características farmacocinéticas de los 8 sartanes disponibles, que incluyen la vida media, el T máx (tiempo que transcurre hasta la concentración plasmática máxima), la biodisponibilidad, la ruta de eliminación y la interacción farmacológica⁸⁴.

El losartán se metaboliza en primer lugar en el hígado, a través del sistema del citocromo P450 (CYP) para formar su metabolito activo EXP3174, que es 10 a 40 veces más potente que el losartán cuando se administra por vía intravenosa¹⁰⁰. Los alimentos pueden retrasar su absorción y reducir su concentración plasmática máxima (C_{máx}), sin embargo, no es clínicamente significativo. El fluconazol aumenta la vida media de EXP-3174, pero reduce su transformación biológica a partir de losartán. La rifampicina disminuye la actividad del losartán y EXP-3174 en un 35 % y 40 %, respectivamente.

Tres de los sartanes (candesartán cilexetil, olmesartán medoxomil, azilsartán medoxomil) son profármacos y requieren activación en el tracto gastrointestinal y en el hígado a sus formas activas. Mientras que eprosartán, irbesartán, telmisartán y valsartán son los fármacos activos. De todos los sartanes, irbesartán tiene la biodisponibilidad más alta. Telmisartán tiene acción más prolongada con una vida media de 24 horas y tiene inicio de acción rápida de aproximadamente 0,5 a 1,0 horas. La biodisponibilidad de valsartán es mayor en su formulación de solución que en forma de cápsula.

Tabla I-3. Características farmacológicas de los sartanes

Sartanes	Vida media (h)	T _{máx} (h)	Biodisponibilidad	Vía de eliminación: renal (R) biliar / fecal (B)	Interacción con alimentos	Interacciones con drogas
Losartán	2	1–1.5	33%	35% R; 60% B	Si	Rifampina, fluconazol
Candesartán	9	2–5	42%	33% R; 67% B	No	Ninguna
Eprosartán	5-9	1-3	63%	7% R; 90% B	Si	Ninguna
Irbesartán	11-15	1,3–3	60–80%	20% R; 80% B	No	
Telmisartán	24	0.5–1	43%	<1% R; > 97% B	No	Digoxina
Valsartán	6	2–4	23% (cápsula) 50% (solución)	13% R; 83% B	Si	Ninguna
Olmesartán	12–14	1.7–2.5	26%	35–50% R; 50–65% B	No	Ninguna
Azilsartán	12	1.5–3	60%	42% R; 55% B	No	Ninguna

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas que se produce por la proliferación celular no regulada. En lugar de responder adecuadamente a las señales que vigilan el comportamiento celular normal, las células cancerosas crecen y se dividen de manera incontrolada, invadiendo tejidos y órganos normales y eventualmente extendiéndose por todo el cuerpo. Puede afectar a cualquiera de los diferentes tipos de células, por lo que hay más de cien tipos distintos de cáncer y pueden variar sustancialmente su comportamiento y respuesta al tratamiento¹⁰¹.

Una célula normal lesionada o mutada, normalmente muere, por el contrario, una célula cancerosa, presenta un funcionamiento anormal de la regulación del ciclo celular, por lo que progresan a través de este, acumulando mutaciones. Las mutaciones se producen principalmente en los protooncogenes y en los genes supresores de tumores. Los protooncogenes son genes que codifican y promueven el crecimiento y la división celular pero pueden promover el crecimiento tumoral cuando mutan¹⁰⁵. Los genes supresores de tumores representan genes guardianes que juegan un papel importante en los puntos de control del ciclo celular e inducen la apoptosis en las células normales¹⁰², su mutación dificultaría la inhibición de la progresión del ciclo celular, lo que facilitaría el crecimiento anormal¹⁰⁶.

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015, el cáncer es la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), entidad perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres en todo el mundo desarrollarán cáncer a lo largo de su vida, y que uno de cada ocho hombres y uno de cada once las mujeres morirán de esa enfermedad. Según las estimaciones de GLOBOCAN, una base de datos que provee la incidencia y mortalidad de cáncer, hay 18,1 millones de casos nuevos de cáncer y 9,6 millones de muertes por cáncer en el último año. En ambos sexos, el cáncer de pulmón es el más comúnmente diagnosticado (11,6 % del total de casos) y la principal causa de muerte por cáncer (18,4 % del total de muertes por cáncer), la incidencia es seguida por el cáncer de mama (11,6 %), el cáncer colorrectal (10,2 %), el cáncer de próstata (7,1 %) y cáncer de estómago (5,7 %). El cáncer de pulmón es el cáncer más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer entre los hombres, seguido por el cáncer colorrectal y el cáncer de hígado y estómago. Entre las mujeres, el cáncer de mama es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de

muerte, seguido del colorrectal y de pulmón; el cáncer cervical ocupa el cuarto lugar tanto en incidencia como en mortalidad¹⁰⁵ (Figura I-10).

Figura I-10: porcentajes de nuevos casos de cáncer (izquierda) y casos de muertes por cáncer (derecha) mundialmente en el 2018. Fuente: IARC-OMS

Argentina presenta una tasa de incidencia de 212 casos por 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción de piel no melanoma), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta. El cáncer de mama es el de mayor magnitud en cuanto a ocurrencia para 2018: representa el 17 % de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres femeninos. El cáncer colorrectal en ambos sexos concentra el 13 % del total de tumores. En los varones, la mayor incidencia está dada por el cáncer de próstata, que representan el 20 % de todos los tumores malignos en varones y 9 % de la totalidad de cánceres del país (Tabla I-4).

Tabla I-4 Distribución (%) de casos de incidencia de cáncer en Argentina en el 2018. Fuente: SIVER-Ca, INC, Ministerio de Salud de la Nación. Argentina

Sitio	Varones (%)	Mujeres (%)	Ambos sexos (%)
Mama	-	32,6	17,2
Colon-recto	14,5	10,8	12,6
Próstata	19,7	-	9,3
Pulmón	12,1	6,8	9,3
Riñón	5,4	2,6	3,9

Con respecto a la tasa de mortalidad, la muerte por cáncer representa el 19 % del total de defunciones. El cáncer de pulmón determinó el mayor número de muertes por cáncer con un 15 %, seguido del cáncer colorrectal (12 %). En mujeres, predomina la muerte por cáncer de mama (9 %), mientras que el de próstata en varones, representa un 6 % (Tabla I-5)¹⁰⁶

Tabla I-5 Distribución (%) de casos de mortalidad por cáncer en Argentina en el 2018

Sitio	Varones (%)	Mujeres (%)	Ambos sexos (%)
Pulmón	19,5	10,5	15,1
Colon-recto	12,6	11,3	12
Mama	0,2	20	9,2
Páncreas	6,4	7,4	6,9
Próstata	11,6	-	6

Proceso de carcinogénesis

El desarrollo del cáncer es un proceso en el que las células se convierten en malignas gradualmente a través de una serie progresiva de alteraciones. Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica se requieren varias mutaciones en varios genes y esto puede ocurrir durante mucho tiempo, a veces en años^{107,108}.

La carcinogénesis puede darse en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura I-11).

Etapas de iniciación. Ocurre a nivel del genoma y es el resultado de una o una combinación de lesiones químicas, físicas, biológicas y genéticas sobre las células individuales¹⁰⁹. Los

agentes que actúan pueden ser físicos, químicos o virales. Los carcinógenos físicos están constituidos por las radiaciones (como la radiación ultravioleta, radiación ionizante, etc.) que actúan ionizando las bases, causando daño irreversible en el ADN, entre ellos, deprimiendo el gen supresor de tumor p53 y generando aberraciones cromosómicas¹¹⁰. Estas radiaciones también pueden generar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que pueden oxidar a las bases y azúcares del ADN¹¹¹. Los carcinógenos químicos provocan un ataque electrofílico sobre los nucleófilos, por lo tanto, tienen como blanco al nitrógeno de la guanina¹¹² y producen mutaciones irreversibles. Se encuentran dentro de este grupo agentes alquilantes, aminas aromáticas, nitrosaminas etc. Los carcinógenos virales o virus oncogénicos, actúan introduciendo sus propios genes virales al genoma celular y modulan las vías de transducción de señales que controlan el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia¹¹³.

Etapas de promoción. Representa la etapa de crecimiento tisular, proporciona las condiciones para la expansión clonal y la consecuente formación del tumor. Las propias células tumorales liberan factores de crecimiento que actúan como mitogénicos y sobreestimuladores de las rutas metabólicas¹¹⁴. Las células entran en una fase de rápido crecimiento y requieren de mayor aporte de oxígeno, ante la necesidad de un soporte vascular, se liberan activadores angiogénicos que degradan de las matrices extracelulares y producen neovascularización¹¹⁵. Algunas hormonas también actúan como factores de crecimiento como los estrógenos y progesterona induciendo proliferación sobre las células del epitelio mamario¹¹⁶.

Etapas de progresión. Con la necesidad de buscar nutrientes y oxígeno, las células invaden tejidos vecinos o a distancia, proceso llamado metástasis. En este estadio, las células degradan proteínas del borde epitelial por medio de las metaloproteinasas, expresan moléculas de adhesión y migran a través del torrente sanguíneo¹¹⁷. Además, adquieren capacidad para modular el sistema inmune para prevenir el ataque citotóxico¹¹⁸. Las células también usan el sistema linfático para propagarse, hecho que justifica las metástasis en los ganglios linfáticos¹¹⁹. Finalmente, escapan de la circulación adhiriéndose al sitio metastásico por medio de moléculas de adhesión, degradan la matriz extracelular, y forman nuevos vasos¹²⁰.

Figura I-11. Etapas de la carcinogénesis

Estrés oxidativo y cáncer

Bajo condiciones normales fisiológicas, los niveles de EROs se mantienen constantes, la desintoxicación de EROs es facilitada por moléculas no enzimáticas (glutación, vitaminas A, C y E, etc.) o por medio de enzimas antioxidantes que eliminan específicamente diferentes tipos de EROs como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, el sistema del glutatión que incluyen a la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa. La SOD, como se mencionó anteriormente, cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno¹²¹; la catalasa facilita la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno¹²². El glutatión protege a las células del estrés oxidativo al actuar como donante de electrones sobre las especies inestables. Durante este proceso, el glutatión se vuelve reactivo, pero se combina rápidamente con otra molécula de glutatión para formar glutatión disulfuro (GSSG). Las glutatión peroxidasas (GP_x) que contienen Se en el centro activo, catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos. La glutatión reductasa reduce el GSSG y regenera los depósitos de GSH. Bajo condiciones fisiológicas, el glutatión existe casi exclusivamente en su forma reducida debido a una actividad constitutiva de la glutatión reductasa en las células¹²³. La glutatión-S-transferasas son enzimas de desintoxicación que catalizan la conjunción de GSH con metabolitos oxidativos exógenos y endógenos¹²⁴.

En las células pre-neoplásicas, los factores ambientales e internos aumentan los niveles de EROs (como los rayos UV durante exposiciones prolongadas al sol, tabaquismo, etc.) lo

que produce la pérdida del equilibrio pro-oxidante/antioxidante, generando estrés oxidativo que daña las moléculas intracelulares, como el ADN, el ARN, los lípidos y las proteínas. Estas especies reactivas causan roturas en el ADN y fallas en el mecanismo de reparación. La oxidación del ADN por los radicales libres genera frecuentemente 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, que tiene un potencial altamente mutagénico y al no poder ser reparado, se acumula y promueve la carcinogénesis¹²⁵. Otra acción de las EROs es la de activar los oncogenes, como Cmyc, Kras y BRCA1 e inactivar los genes supresores de tumores, como el p53¹²⁶. Como la proliferación y muerte celular se encuentran desreguladas, la continua expansión de clones celulares incrementa la tasa metabólica, especialmente la glucólisis y la función mitocondrial, aumentando aún más la producción de EROs. En consecuencia se genera un microambiente con oxígeno disminuido y las células cancerosas se adaptan a las condiciones hipóxicas expresando factores inducibles por hipoxia (HIFs) que se encargarán también de estimular el crecimiento celular¹²⁷. Todos estos eventos contribuyen además a la resistencia al estrés oxidativo, siendo una de las principales ventajas adaptativas que permiten a las células cancerosas escapar del daño de los radicales libres. Conforme progresa la evolución tumoral y ante la necesidad de oxígeno, se generan nuevos vasos sanguíneos, por lo tanto, las EROs promueve la angiogénesis¹²⁸

En la quimioterapia, se pretende estimular a las células cancerosas a aumentar los niveles de EROs por encima de un umbral para inducir la muerte celular (Figura I-12). Agentes como la doxorubicina, los complejos de coordinación de platino y los agentes alquilantes generan los niveles más altos de EROs celulares. La producción elevada de estas especies, agota los sistemas antioxidantes e induce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que conduce a la interrupción de la cadena de transporte de electrones y a la fuga electrónica. Esto contribuye a la apoptosis y la autofagia en las células cancerosas^{129,130}.

Figura I-12. Factores que contribuyen a aumentar los niveles de EROs a las células y conferirles adaptabilidad y supervivencia. La quimioterapia impulsa a generar niveles de EROs por encima de un umbral crítico induciendo muerte celular.

Bases moleculares de la apoptosis

La apoptosis es un proceso altamente selectivo importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Las alteraciones morfológicas de la muerte celular apoptótica afectan tanto al núcleo como al citoplasma. Las características en el núcleo son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, que están acompañadas por el redondeo de la célula con reducción del volumen celular (pícnosis) (Figura I-13). La condensación de la cromatina comienza en la periferia de la membrana nuclear, formando una estructura de media luna o en forma de anillo. La cromatina se condensa hasta que se rompe dentro de la célula con una membrana intacta. La membrana plasmática permanece intacta durante todo el proceso. En la etapa posterior de la apoptosis, algunas de las características morfológicas incluyen la formación de ampollas en la membrana y la pérdida de la integridad de la misma. Por lo general, las células fagocíticas engullen las células apoptóticas antes

de que se produzcan los cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos se observan *in vitro* en condiciones especiales. Si los restos de células apoptóticas no son fagocitados, como en el caso de un entorno de cultivo de celular, sufrirán una degradación que se asemeja a una necrosis y la condición se denomina necrosis secundaria¹³¹. En cambio, la célula necrótica se hincha, y libera su contenido en el tejido circundante, lo que produce inflamación¹³².

Figura I-13. Características distintivas del proceso de muerte celular apoptótica y necrótica.

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales de muerte pueden ser elevados niveles de moléculas oxidantes en el interior de la célula, como las EROs, daño en el ADN ya sea por radicales, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos, moléculas que se unen a receptores específicos, etc¹³³.

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas llamadas caspasas que se caracterizan por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas, el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas). Existen dos tipos de caspasas: las iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras (caspasas -2, -8, -9, -10) presentan pro-dominios funcionales que permiten la asociación de estas moléculas con complejos de señalización.

Las caspasas ejecutoras (caspasas -3, -6, -7) se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo.

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el ADN. Estas dos vías se denominan extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente.

La vía intrínseca o mitocondrial, se activa por estrés oxidativo, radiaciones, infección viral, hipoxia, hipertermia, etc. y ocurre por alteración de la membrana mitocondrial donde se genera un poro de transición de permeabilidad mitocondrial provocando la salida de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c (activador de caspasas) y smac/diablo (proteínas que inhiben al inhibidor de las proteínas apoptóticas, IAP). Esto se acompaña de pérdida del potencial de membrana y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 (factor-1 activador de proteasas apoptóticas) y una vez unido recluta y activa a la procaspasa 9 a caspasa-9¹³⁴.

Existe una familia de proteínas, llamada familia Bcl-2, que controla la apoptosis mediante el control de la permeabilidad mitocondrial. Las proteínas pro-apoptóticas como Bax actúan promoviendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria, reside en el citosol y translocan a la mitocondria ante un estímulo de muerte. La proteína Bcl-xL se encuentra en la membrana externa de la mitocondria e inhibe la liberación de citocromo c, por lo tanto es anti-apoptótica y además puede inactivar a Bax y evitar la apoptosis^{135,136}.

La vía extrínseca o vía del receptor de muerte, se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (receptor FAS) para activar a las caspasas iniciadoras (caspasas-2 y -8)¹³⁷.

Finalmente, en la fase ejecutora de la apoptosis, la vía intrínseca y la extrínseca convergen en la activación caspasa-3. La caspasa -3 activa la endonucleasa citoplasmática, que degrada el material nuclear, y a las proteasas que degradan las proteínas nucleares y citoesqueléticas que son visualizados por los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Figura I-14)¹³⁸.

Figura I-14. Representación esquemática de los eventos apoptóticos. TNF: Factor de necrosis tumoral. IAP: inhibidor de las proteínas apoptóticas. Apaf-1: factor-1 activador de proteasas apoptóticas

Apoptosis y carcinogénesis

La reducción de la apoptosis o su resistencia juega un papel vital en la carcinogénesis. Hay muchas maneras en que una célula maligna puede adquirir reducción o resistencia a la apoptosis. En general, los mecanismos por los cuales se produce la evasión de la apoptosis pueden dividirse ampliamente en:

- 1) Equilibrio alterado de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, hay sobreexpresión de una o más proteínas anti-apoptóticas o una subexpresión de una o

más proteínas pro-apoptóticas o una combinación de ambas. La sobreexpresión de Bcl-xL confiere un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en las células tumorales y evita que se sometan a la apoptosis. La actividad anormal de p53 generada por la mutación de este gen favorece la proliferación tumoral. La expresión de los inhibidores de proteínas apoptóticas endógenas (IAP) aparece desregulada en muchos tipos de cánceres.

2) Función reducida de las caspasas. Los niveles bajos de caspasas o el deterioro de la función pueden conducir a una disminución de la apoptosis y carcinogénesis.

3) Señalización del receptor de muerte alterada. Como baja expresión de los receptores TNF y FAS o anomalías en las vías de señalización.

Los fármacos o las estrategias de tratamiento que pueden restaurar las vías de señalización apoptótica hacia la normalidad tienen el potencial de eliminar las células cancerosas. Aquellos pueden ser agentes que estimulen los Bax e inhiban los Bcl-xL, silencien los genes anti-apoptóticos, o bien terapias génicas basadas en la inserción del gen p53 o uso de antagonistas de los IAP^{139,140}

Fármacos bloqueadores del receptor de Ang II y cáncer

Cada vez hay más evidencia de que el SRA está implicado en el desarrollo de varios cánceres. Es sabido que la Ang II es pro-angiogénica, pro-oxidante, promueve el desarrollo de tumores¹⁴¹ y juega un papel crítico en la metástasis de varios tipos de cáncer al modular la adhesión, la invasión migratoria, la proliferación y la angiogénesis¹⁴². Los componentes del SRA se expresan en varios cánceres humanos¹⁴³. La sobreexpresión del receptor AT1 generalmente se asocia con características tumorales más agresivas (tumores más grandes, de mayor densidad vascular) y peores resultados^{144,145}. Por lo tanto, el bloqueo de los receptores de la Ang II por medio de los sartanes ha sido considerado en los últimos años como opción terapéutica contra el cáncer¹⁴⁶. Existen numerosos estudios con diferentes sartanes que han demostrado poseer potentes efectos antiproliferativos, entre ellos, el más estudiado y con mayor efecto es el telmisartán, que ha demostrado ser un potente inductor de apoptosis en células malignas^{147–149}.

Zn y Cáncer

Como se mencionó anteriormente, la deficiencia de zinc resulta en una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y esto aumentaría el riesgo de desarrollar cáncer¹⁵⁰. Además, se pierde

el efecto protector que ejercen los “dedos de zinc” y por ello afecta la integridad de la estructura de ADN y también, se produce ruptura en los brazos de los cromosomas¹⁵¹.

Se ha encontrado que dietas deficientes en zinc provocan una mayor susceptibilidad al desarrollo tumoral cuando los individuos se exponen a compuestos cancerígenos¹⁵². Por ejemplo, se sabe que el zinc juega un papel importante en la salud de la glándula prostática y existen evidencias que el aumento de zinc en la dieta se encuentra asociado con una disminución de la incidencia de cáncer de próstata¹⁵³.

Las estrategias de suplementación con zinc pueden, no sólo ayudar en la prevención del cáncer, sino también limitar su malignidad. Como ya se mencionó, el zinc, además de participar en las enzimas antioxidantes, tiene actividad pro-apoptótica, aumentando el efecto antitumoral *in vivo* y restaurando la función del gen supresor de tumor, p53¹⁵⁴ y por otro lado, se encontró que es reductor tumoral¹⁵⁵

Así como se encontraron efectos pro-oxidantes para el Zn en células tumorales también presenta esta propiedad en células sanas. La exposición ante un exceso de zinc causa acidosis intracelular activando las enzimas generadoras de radicales libres como el complejo NADPH oxidasa y aumentando las EROS¹⁵⁶, lo que estimula la apoptosis¹⁵⁷. Así mismo, se reduce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2¹⁵⁸ y se incrementan los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax¹⁵⁹. En células tumorales de pulmón, la administración de altas concentraciones de zinc estimula la generación radicales libres afectando la viabilidad celular¹⁶⁰.

De acuerdo a lo expuesto, el Zn(II) desempeña funciones versátiles relacionadas con el desarrollo estructural y la catálisis de enzimas y en la mediación de señales en sistemas biológicos. Los hallazgos han sugerido que dependiendo de la concentración de Zn y del tipo de tejido y de célula (sana o maligna), este metal se comportará como pro-oxidante o anti-oxidante y actuará en la supresión tumoral.

Referencias

1. Maret W. The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):1-8. doi:10.3390/ijms17010066
2. Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev*. 2014;114:4540-4558. doi:10.1021/cr400460s
3. Maret W. Metallomics: the science of biometals and biometalloids. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1055:1-20. doi:10.1007/978-3-319-90143-5_1
4. Baran EJ. Concetos y definiciones básicas en relación a sistemas biológicos y bioinorgánicos. In: *Química Bioinorgánica*. McGraw-Hill; 1995:3-10.
5. Pokusa M, Kralova Trancikova A. The central role of biometals maintains oxidative balance in the context of metabolic and neurodegenerative disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-18. doi:10.1155/2017/8210734
6. Lippard SJ. Metals in medicine. In: *Bioinorganic Chemistry*. California: University Science Books; 1999:505-583.
7. Orvig C, Abrams MJ. Medicinal inorganic chemistry: Introduction. *Chem Rev*. 1999;99(9):2202-2203. doi:10.1021/cr980419w
8. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:599-616. doi:10.2147/DDDT.S119488
9. Haas KL, Franz KJ. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chem Rev*. 2009;109(10):4921-4960. doi:10.1021/cr900134a
10. Baran EJ. Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina. *An Acad Nac Ciencias Exactas, Físicas y Nat*. 2014;66(63):5-21.
11. Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes: Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat*. 2005;8(3):131-146. doi:10.1016/j.drug.2005.04.006
12. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011;3(1):1351-1371. doi:10.3390/cancers3011351
13. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*. 2003;1:47-61.
14. McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(1):10-16. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0840
15. de Sousa GF, Wlodarczyk SR, Monteiro G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian J Pharm Sci*. 2014;50(4):693-702. doi:10.1590/S1984-82502014000400004
16. Garbutcheon-Singh, K. Benjamin Grant MP, Harper B, Krause-Heuer A, Manohar M, Orkey N, Aldrich-Wright J. Transition Metal Based Anticancer Drugs. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(5):521-542. doi:10.2174/156802611794785226
17. Baran E. Química Bioinorgánica del Zinc. In: *Química Bioinorgánica*. 1st ed. Buenos Aires: McGraw-Hill; 1995:123-135.
18. Rayner G, Canham. Los elementos del grupo 12. In: *Química Inorgánica Descriptiva*. 2nd ed. Pearson; 2000:504-517.
19. Krężel A, Maret W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch Biochem Biophys*. 2016;611:3-19. doi:10.1016/j.abb.2016.04.010
20. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(9):399-411. doi:10.1016/S0753-3322(03)00081-7
21. Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ, Owyang C. Zinc absorption in human small intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver*

- Physiol.* 1989;256(1):87-91.
22. Cousins RJ. Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis. *Int J Vitam Nutr Res.* 2010;80(4-5):243-248. doi:10.1024/0300-9831/a000030
 23. Chesters JK, Will M. Zinc transport proteins in plasma. *Br J Nutr.* 1981;46(1):111-118. doi:10.1079/bjn19810014
 24. Wastney ME, Aamodt RL, Rumble WF, Henkin RL. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2017;251(2):R398-R408. doi:10.1152/ajpregu.1986.251.2.r398
 25. Plum LM, Rink L, Hajo H. The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(4):1342-1365. doi:10.3390/ijerph7041342
 26. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 1993;73(1):79-118. doi:10.1152/physrev.1993.73.1.79
 27. King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr.* 2000;130(5):1360S-1366S. doi:10.1093/jn/130.5.1360s
 28. Léonard A, Gerber GB, Léonard F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat Res Genet Toxicol.* 2003;168(3):343-353. doi:10.1016/0165-1110(86)90026-6
 29. Vallee BL, Auld DS. Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;87(1):220-224. doi:10.1073/pnas.87.1.220
 30. Nriagu J. Zinc toxicity in humans. In: *Encyclopedia of Environmental Health.* ; 2011:801-807. doi:10.1016/b978-0-444-52272-6.00675-9
 31. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G, Raschella G. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* 2017;3(1):1-12. doi:10.1038/cddiscovery.2017.71
 32. Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz LE, Marcos A. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *Age.* 2013;35(3):839-860. doi:10.1007/s11357-011-9377-3
 33. Maret W. Zinc in cellular regulation: the nature and significance of "zinc signals". *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):1-12. doi:10.3390/ijms18112285
 34. Vašák M, Hasler DW. Metallothioneins: New functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol.* 2000;4(2):177-183. doi:10.1016/S1367-5931(00)00082-X
 35. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr.* 2000;130(5S Suppl):1455-1458. doi:10.1093/jn/130.5.1455S
 36. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44(5):479-496. doi:10.3109/10715761003667554
 37. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481-493.
 38. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Jt Bone Spine.* 2007;74(4):324-329. doi:10.1016/j.jbspin.2007.02.002
 39. Marreiro D do N, Cruz KJC, Morais JBS, Beserra JB, Severo JS, Soares de Oliveira AR. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants.* 2017;6(2):1-24. doi:10.3390/antiox6020024
 40. Dreosti IE. Zinc and the gene. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2001;475(1-2):161-167. doi:10.1016/S0027-5107(01)00067-7
 41. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *BioMetals.* 2001;14(3-4):315-330. doi:10.1023/A:1012993017026
 42. Chai F, Truong-Tran AQ, Evdokiou A, Young GP, Zalewski PD. Intracellular zinc depletion induces caspase activation and p21 Waf1/Cip1 cleavage in human epithelial cell lines. *J Infect Dis.*

- 2000;182(s1):S85-S92.
doi:10.1086/315914
43. Provinciali M, Stefano G Di, Fabris N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17(9):735-744. doi:10.1016/0192-0561(95)00063-8
44. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3: a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18530-18533. doi:10.1074/jbc.272.30.18530
45. Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. *Materwiss Werksttech*. 2002;33(12):764-769. doi:10.1002/mawe.200290008
46. Prasad AS. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med*. 2008;14(5-6):353-357. doi:10.2119/2008-00033.Prasad
47. Prasad AS. Zinc: Role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(6):646-652. doi:10.1097/MCO.0b013e3283312956
48. Uriu-Adams JY, Keen CL. Zinc and reproduction: effects of zinc deficiency on prenatal and early postnatal development. *Birth Defects Res Part B - Dev Reprod Toxicol*. 2010;89(4):313-325. doi:10.1002/bdrb.20264
49. Machado JU, Urribarri LQ, Zambrano NB, José García I, Vera GV, Mery Guerra V, Azuaje F, Levy A. Concentraciones séricas de zinc en embarazadas preeclámpicas y normotensas. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2013;73(1):15-24.
50. Brandão-Neto J, Stefan V, Mendonça BB, Bloise W, Castro AVB. The essential role of zinc in growth. *Nutr Res*. 1995;15(3):335-358. doi:10.1016/0271-5317(95)00003-8
51. Ogawa Y, Kinoshita M, Shimada S, Kawamura T. Zinc and skin disorders. *Nutrients*. 2018;10(2):1-19. doi:10.3390/nu10020199
52. Brugha R, Marlais M, Abrahamson E, Brugha R. The cardiovascular system. In: *Paediatric Clinical Examination*. ; 2013:87-108. doi:10.5005/jp/books/12246_7
53. Badeer HS. Hemodynamics for medical students. *Adv Physiol Educ*. 2017;25(1):44-52. doi:10.1152/advances.2001.25.1.44
54. Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner BE, Graves J, Hill MN, Jones DW, Kurtz T, Sheps SG, Roccella EJ. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 1. Blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association cou. *Hypertension*. 2005;45(1):142-161. doi:10.1161/01.HYP.0000150859.47929.8e
55. Wehrwein EA, Joyner MJ. Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 117. ; 2013:89-102. doi:10.1016/B978-0-444-53491-0.00008-0
56. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*. 1979;280(5719):235-236. doi:10.1038/280235a0
57. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;292(1):82-97. doi:10.1152/ajpcell.00287.2006
58. Skidgel RA, Kaplan AP, Erdös EG. Histamine, bradykinin, and their antagonists. *Goodman Gilman's Pharmacol Basis Ther*. 2011;12:1-12.
59. C. Guyton A, E. Hall J. *Textboof of Medical Physiology*.; 2006.
60. Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*. 2009;3(2):84-95. doi:10.1016/j.jash.2008.09.002
61. Nickenig G, Harrison DG. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part I: Oxidative stress and

- atherogenesis. *Circulation*. 2002;105(3):393-396. doi:10.1161/hc0302.102618
62. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci*. 2001;100(5):481. doi:10.1042/cs20000263
63. Consejo Argentino de Hipertensión Arterial. Consenso de Hipertensión Arterial. *Rev Argent Cardiol*. 2018;86(2):1-53.
64. Bunag R. Essential hypertension. In: *The Comprehensive Pharmacology Reference*. Pearson; 2011:1-6. doi:10.1016/B978-008055232-3.60057-1
65. Lederer ED. Secondary hypertension. In: *Clinical Decisions in Nephrology, Hypertension and Kidney Transplantation*. Springer New York; 2013:515-531. doi:10.1007/978-1-4614-4454-1_43
66. Delucchi A, Majul C, Vicario A, Cerezo G, Fábregues G. Registro Nacional de Hipertensión Arterial. Características epidemio- lógicas de la hipertensión arterial en Argentina. Estudio RENATA 2. *Rev Fed Argentina Cardiol*. 2017;46(462):62-66.
67. Lassègue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension: an update. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):852-860. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.02.004
68. Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(1 54-1).
69. Tomat AL, Costa M de los Á, Arranz CT. Zinc restriction during different periods of life: influence in renal and cardiovascular diseases. *Nutrition*. 2011;27(4):392-398. doi:10.1016/j.nut.2010.09.010
70. Tubek S. Role of zinc in regulation of arterial blood pressure and in the etiopathogenesis of arterial hypertension. *Biol Trace Elem Res*. 2007;117(1-3):39-51. doi:10.1007/BF02698082
71. Gouaref I, Bellahsene Z, Zekri S, Alamir B, Koceir E-A. The link between trace elements and metabolic syndrome/oxidative stress in essential hypertension with or without type 2 diabetes. *Ann Biol Clin*. 2016;74(2):233-243. doi:10.1684/abc.2016.1126
72. Tubek S. Gender differences in selected zinc metabolism parameters in patients with mild primary arterial hypertension. *Biol Trace Elem Res*. 2006;114(1-3):55-64. doi:10.1385/BTER:114:1:55
73. Senturk ümit K, Kaputlu I, Gunduz F, Kurr O, Gokalp O. Tissue and blood levels of zinc, copper, and magnesium in nitric oxide synthase blockade-induced hypertension. *Biol Trace Elem Res*. 2000;77(2):97-106. doi:10.1385/BTER:77:2:97
74. Sato M, Yanagisawa H, Nojima Y, Tamura J WO. Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase. *Clin Exp Hypertens*. 2002;24(5):355-370. doi:10.1081/CEH-120004797
75. Kurihara N, Yanagisawa H, Sato M, Tien CK, Wada O. Increased renal vascular resistance in zinc-deficient rats: role of nitric oxide and superoxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(12):1096-1104. doi:10.1046/j.1440-1681.2002.03783.x
76. Yanagisawa H, Nodera M, Wada O. Zinc deficiency aggravates tubulointerstitial nephropathy caused by ureteral obstruction. *Biol Trace Elem Res*. 1998;65(1):1-6. doi:10.1007/BF02784109
77. Ito Y, Fujita T. Trace elements and blood pressure regulation. *Nihon Rinsho*. 1996;54(1):106-110.
78. Sosa-Rosado JM. Tratamiento no farmacológico de la hipertensión arterial. *An la Fac Med*. 2017;71(4):241-244. doi:10.15381/anales.v71i4.102
79. Bragulat E, Antonio M. Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial: fármacos antihipertensivos. *Med Integr*. 2001;37(5):215-221.
80. Roush GC, Kaur R, Ernst ME. Diuretics: a review and update. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2014;19(1):5-13.

doi:10.1177/1074248413497257

81. Miura SI, Karnik SS, Saku K. Angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2011;12(1):1-7. doi:10.1177/1470320310370852
82. Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation.* 2001;103(6):904-912. doi:10.1161/01.CIR.103.6.904
83. Pradhan A, Gupta V, Sethi R. Fimasartan: a new armament to fight hypertension. *J Fam Med Prim Care.* 2019;8(7):2184. doi:10.4103/jfmpc.jfmpc_300_19
84. Abraham HMA, White CM, White WB. The comparative efficacy and safety of the angiotensin receptor blockers in the management of hypertension and other cardiovascular diseases. *Drug Saf.* 2015;38(1):33-54. doi:10.1007/s40264-014-0239-7
85. Kellici T, Tzakos A, Mavromoustakos T. Rational drug design and synthesis of molecules targeting the Angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *Molecules.* 2015;20(3):3868-3897. doi:10.3390/molecules20033868
86. Moutevelis-Minakakis P, Gianni M, Stougiannou H, Zoumpoulakis P, Zoga a., Vlahakos a. D, Iliodromitis E, Mavromoustakos T. Design and synthesis of novel antihypertensive drugs. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2003;13(10):1737-1740. doi:10.1016/S0960-894X(03)00251-8
87. Xu F, Mao C, Liu Y, Wu L, Xu Z, Zhang L. Losartan chemistry and its effects via AT1 mechanisms in the kidney. *Curr Med Chem.* 2009;16(28):3701-3715. doi:10.2174/092986709789105000
88. Timmermans P, Carini DJ, Chiu AT, Duncia J V., Price WA, Wells GJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL. Angiotensin II receptor antagonists: From discovery to antihypertensive drugs. *Hypertension.* 1991;18(5):136-142.
89. Yan L, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Analysis of transmembrane domains 1 and 4 of the human angiotensin II AT1 receptor by cysteine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(4):2284-2293. doi:10.1074/jbc.M109.077180
90. Zhang H, Unal H, Gati C, Han GW, Liu W, Zatsepin N a., James D, Wang D, Nelson G, Weierstall U, Sawaya MR, Xu Q, Messerschmidt M, Williams GJ, Boutet S, Yefanov OM, White T, Wang C, Ishchenko A, et al. Structure of the angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell.* 2015;161(4):833-844. doi:10.1016/j.cell.2015.04.011
91. Balakumar P, Jagadeesh G. Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(2):71-92. doi:10.1530/JME-14-0125
92. Nikiforovich G V., Zhang M, Yang Q, Jagadeesh G, Chen HC, Hunyady L, Marshall GR, Catt KJ. Interactions between conserved residues in transmembrane helices 2 and 7 during angiotensin AT1 receptor activation. *Chem Biol Drug Des.* 2006;68(5):239-249. doi:10.1111/j.1747-0285.2006.00444.x
93. Fujino M, Miura SI, Kiya Y, Tominaga Y, Matsuo Y, Karnik SS, Saku K. A small difference in the molecular structure of angiotensin II receptor blockers induces AT1 receptor-dependent and-independent beneficial effects. *Hypertens Res.* 2010;33(10):1044-1052. doi:10.1038/hr.2010.135
94. Miura SI, Nakao N, Hanzawa H, Matsuo Y, Saku K, Karnik SS. Reassessment of the unique mode of binding between angiotensin II type 1 receptor and their blockers. *PLoS One.* 2013;8(11):e79914. doi:10.1371/journal.pone.0079914
95. Miura S. Molecular Mechanism Underlying Inverse Agonist of Angiotensin II Type 1 Receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(28):19288-19295. doi:10.1074/jbc.M602144200
96. Balakumar P, K. Bishnoi H, Mahadevan N. Telmisartan in the management of diabetic nephropathy: a contemporary view. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8(3):183-190. doi:10.2174/157339912800563972
97. Zhang H, Unal H, Desnoyer R, Han GW, Patel N, Katritch V, Karnik SS, Cherezov V,

- Stevens RC. Structural basis for ligand recognition and functional selectivity at angiotensin receptor. *J Biol Chem*. 2015;290(49):29127-29139. doi:10.1074/jbc.M115.689000
98. Miura SI, Okabe A, Matsuo Y, Karnik SS, Saku K. Unique binding behavior of the recently approved angiotensin II receptor blocker azilsartan compared with that of candesartan. *Hypertens Res*. 2013;36(2):134-139. doi:10.1038/hr.2012.147
99. Takezako T, Unal H, Karnik SS, Node K. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased agonism. *Pharmacol Res*. 2017;123:40-50. doi:10.1016/j.phrs.2017.06.013
100. Israili ZH. Clinical pharmacokinetics of angiotensin II (AT1) receptor blockers in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2000;14 Suppl 1:S73-S86. doi:10.1038/sj.jhh.1000991
101. Cooper GM, Hausman RE. The Development and Causes of Cancer. In: *The Cell: A Molecular Approach*. ; 2007:743. doi:10.1016/j.pbb.2009.09.001
102. Gamudi D, Blundell R. Tumor suppressor genes. *Res J Med Sci*. 2010;4(4):280-284. doi:10.3923/rjmsci.2010.280.284
103. Adamson ED. Oncogenes in development. *Development*. 1987;99(4):449-471.
104. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: oncogene addiction - a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3(8):448-457. doi:10.1038/ncponc0558
105. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
106. Ballesteros I, Abriata G. Vigilancia epidemiológica del cáncer. Análisis de Situación de Salud por Cáncer. Argentina, 2018. *Inst Nac Cáncer Minist Salud la Nación*. 2018:1-48.
107. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3):962-970. doi:10.1002/1097-0142(19930801)72:3+<962::AID-CNCR2820721303>3.0.CO;2-H
108. Botelho MC, Teixeira JP, Oliveira PA. Carcinogenesis. In: *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. Academic Press; 2014:713-729. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00371-7
109. Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, DeMarini DM, Caldwell JC, Kavlock RJ, Lambert PF, Hecht SS, Bucher JR, Stewart BW, Baan RA, Coglian VJ, Straif K. Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 2016;124(6):713-721. doi:10.1289/ehp.1509912
110. Ravanat JL, Douki T. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. *Radiat Phys Chem*. 2016;128:92-102. doi:10.1016/j.radphyschem.2016.07.007
111. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475-1485. doi:10.1056/NEJMr0804615
112. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000;21(6):167-223. doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8
113. Krump NA, You J. Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(11):684-698. doi:10.1038/s41579-018-0064-6
114. Marks F, Fürstenberger G, Müller-Decker K. Tumor promotion as a target of cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2007;174:37-47. doi:10.1007/978-3-540-37696-5_3
115. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(3):213-219. doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.213
116. Tian JM, Ran B, Zhang CL, Yan DM, Li XH. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Brazilian J Med Biol Res*. 2018;51(3):1-7. doi:10.1590/1414-

117. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(1):75-91. doi:10.1007/s10555-016-9618-0
118. Messerschmidt JL, Prendergast GC, Messerschmidt GL. How cancers escape immune destruction and mechanisms of action for the new significantly active immune therapies: helping nonimmunologists decipher recent advances. *Oncologist.* 2016;21(2):233-243. doi:10.1634/theoncologist.2015-0282
119. Farnsworth RH, Achen MG, Stacker SA. The evolving role of lymphatics in cancer metastasis. *Curr Opin Immunol.* 2018;53:64-73. doi:10.1016/j.coi.2018.04.008
120. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998;153(3):865-873. doi:10.1016/S0002-9440(10)65628-3
121. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-1928. doi:10.1083/jcb.201708007
122. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1203:120-125. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x
123. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(9-10):951-965. doi:10.1016/S0891-5849(99)00173-2
124. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases: a review. *Curr Med Chem.* 1999;6(4):279-309.
125. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-139. doi:10.1080/10590500902885684
126. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell.* 2002;9(5):1031-1044. doi:10.1016/S1097-2765(02)00520-8
127. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
128. Kumari S, Badana AK, Murali Mohan G, Shailender G, Malla RR. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark Insights.* 2018;13:1-9. doi:10.1177/1177271918755391
129. Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):1-10. doi:10.1186/s13046-018-0909-x
130. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hooevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010;38(1):96-109. doi:10.1177/0192623309356453
131. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):1-14. doi:10.1186/1756-9966-30-87
132. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(12):3448-3459. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
133. Kao J, Rosenstein BS, Peters S, Milano MT, Kron SJ. Cellular response to DNA damage. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1066:243-258. doi:10.1196/annals.1363.012
134. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000;10(9):369-377. doi:10.1016/S0962-8924(00)01803-1

135. Wolter KG, Hsu Y Te, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1281-1292. doi:10.1083/jcb.139.5.1281
136. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ. Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 2011;145(1):104-116. doi:10.1016/j.cell.2011.02.034
137. Angosto MC. Bases moleculares de la apoptosis. *Real Acad Nac Farm.* 2003;69:36-64.
138. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
139. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-495. doi:10.1093/carcin/21.3.485
140. Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis.* 2005;10(1):111-121. doi:10.1007/s10495-005-6066-7
141. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki KI, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Ikeda H, Matsuishi T, Imaizumi T. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest.* 2003;112(1):67-75. doi:10.1172/JCI16645
142. Ishikane S, Takahashi-Yanaga F. The role of angiotensin II in cancer metastasis: potential of renin-angiotensin system blockade as a treatment for cancer metastasis. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:96-103. doi:10.1016/j.bcp.2018.03.008
143. Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1675-1684. doi:10.1093/carcin/bgn171
144. Arrieta O, Villarreal-Garza C, Vizcaino G, Pineda B, Hernández-Pedro N, Guevara-Salazar P, Wegman-Ostrosky T, Villanueva-Rodríguez G, Gamboa-Domínguez A. Association between AT1 and AT2 angiotensin II receptor expression with cell proliferation and angiogenesis in operable breast cancer. *Tumor Biol.* 2015;36(7):5627-5634. doi:10.1007/s13277-015-3235-3
145. Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nagasaka T, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F. Angiotensin II type I receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumour angiogenesis and patient survival. *Br J Cancer.* 2006;94(4):552-560. doi:10.1038/sj.bjc.6602961
146. Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. Angiotensin II receptor blocker: possibility of antitumor agent for prostate cancer. *Mini-Reviews Med Chem.* 2006;6(7):835-844. doi:10.2174/138955706777698633
147. de Araújo Júnior RF, Leitão Oliveira ALC, de Melo Silveira RF, de Oliveira Rocha HA, de França Cavalcanti P, de Araújo AA. Telmisartan induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human renal cancer cells. *Exp Biol Med.* 2015;240(1):34-44. doi:10.1177/1535370214546267
148. Koyama N, Nishida Y, Ishii T, Yoshida T, Furukawa Y, Narahara H. Telmisartan induces growth inhibition, DNA double-strand breaks and apoptosis in human endometrial cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(3):0093050. doi:10.1371/journal.pone.0093050
149. Godugu C, Patel AR, Doddapaneni R, Marepally S, Jackson T, Singh M. Inhalation delivery of telmisartan enhances intratumoral distribution of nanoparticles in lung cancer models. *J Control Release.* 2013;172(1):86-95. doi:10.1016/j.jconrel.2013.06.036s
150. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:1-14. doi:10.4414/smw.2012.13659
151. Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem.* 2004;15(10):572-578. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.07.005
152. Fong LYY, Lau KM, Huebner K, Magee PN. Induction of esophageal tumors in

- zinc-deficient rats by single low doses of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA): Analysis of cell proliferation, and mutations in H-ras and p53 genes. *Carcinogenesis*. 1997;18(8):1477-1484. doi:10.1093/carcin/18.8.1477
153. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Wu K, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci EL. Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(13):1004-1007. doi:10.1093/jnci/95.13.1004
 154. Margalit O, Simon AJ, Yakubov E, Puca R, Yosepovich A, Avivi C, Jacob-Hirsch J, Gelernter I, Harmelin A, Barshack I, Rechavi G, D'Orazi G, Givol D, Amariglio N. Zinc supplementation augments in vivo antitumor effect of chemotherapy by restoring p53 function. *Int J Cancer*. 2012;131(4). doi:10.1002/ijc.26441
 155. Prasad AS, Beck FWJ, Snell DC, Kucuk O. Zinc in cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):879-887. doi:10.1080/01635580903285122
 156. Noh KM, Koh JY. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci*. 2000;20(23):1-5.
 157. Lee SR. Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1-11. doi:10.1155/2018/9156285
 158. Ku JH, Seo SY, Kwak C, Kim HH. The role of survivin and Bcl-2 in zinc-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2012;30(5):562-568. doi:10.1016/j.urolonc.2010.06.001
 159. Feng P, Li T, Guan Z, Franklin RB, Costello LC. The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptosis in malignant prostate cells. *Mol Cancer*. 2008;7(25):1-6. doi:10.1186/1476-4598-7-25
 160. Ninsontia C, Phiboonthaiyanan PP, Chanvorachote P. Zinc induces epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer H460 cells via superoxide anion-dependent mechanism. *Cancer Cell Int*. 2016;48:1-16. doi:10.1186/s12935-016-0323-4
 161. Etelvino G, Peluso A, Santos R. New Components of the Renin-Angiotensin System: Alamandine and the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16:1-6. doi:10.1007/s11906-014-0433-0

CAPÍTULO II

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

Introducción

En este capítulo se discute la síntesis y caracterización de los cinco complejos de coordinación formados entre el biometal Zn(II) y los sartanes: losartán, valsartán, candesartán, telmisartán y azilsartán. Por análisis elementales y determinaciones termogravimétricas se determina la estequiometría de los complejos obtenidos. Mediante estudios espectrales (electrónicos, fluorescencia, vibracionales y de resonancia magnética electrónica) se determinan las esferas de coordinación alrededor del zinc y sus estabilidades en solución. Finalmente, se esquematiza la estructura propuesta para cada complejo. En el caso de la obtención del cristal se muestra la estructura cristalina refinada para el mismo.

Complejo de Zn(II) y Losartán

Losartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico

El losartán, cuyo nombre según IUPAC es (2-butil-4-cloro-1-{{2'-(1H-tetrazol-5-yl)bifenil-4-il}metil}-1H-imidazol-5-il)metanol es un antagonista selectivo del receptor de angiotensina con alta afinidad y selectividad. Fue el primer antagonista no peptídico del receptor de angiotensina de administración oral. En general se usa su sal monopotásica llamado losartán potásico (Figura II-1). El losartán potásico tiene un peso molecular de 461 g/mol con fórmula empírica $C_{22}H_{23}N_6ClOK$, su pKa es 4.9 y es altamente soluble en agua (3.3 mg/mL a pH: 7.8), también es soluble en alcoholes y solventes orgánicos comunes como acetonitrilo, dimetilsulfóxido y dimetilformamida¹. Se une competitivamente al receptor AT1 de angiotensina II, evitando sus efectos fisiológicos. Su metabolito activo E3174 también contribuye sustancialmente al efecto antihipertensivo ya que persiste en el organismo pasadas las 24 horas de administración oral del fármaco. Si se administra en combinación con el diurético hidroclorotiazida, se produce un efecto sinérgico². La desventaja de su uso es que presenta baja biodisponibilidad (aproximadamente 33%) y por tal motivo otros antagonistas se fueron desarrollando en los últimos años³.

Figura II-1. Estructuras químicas de a) losartán y b) losartán potásico

Síntesis de $[Zn(Lo)s)_2] \cdot 3H_2O$

Para la síntesis del complejo $[Zn(Lo)s)_2] \cdot 3H_2O$, se disolvió 1 mmol de losartán en 10 mL agua destilada, se agregó 0,5 mmol de $Zn(NO_3)_2$ disuelto en 5 mL de agua destilada y se agitó a temperatura ambiente, pH final 7. Se formó un precipitado blanco, el cual se filtró y se lavó con agua destilada. Ese precipitado se secó en estufa a 60 °C. El porcentaje de Zn se determinó por absorción atómica. Análisis elemental: Calculado para $C_{44}H_{50}Cl_2N_{12}O_5Zn$ (963.3 g/mol): %C, 54,8; %H, 5,2; %N, 17,5 y %Zn, 6,78. Experimental: %C, 54,7; %H, 5,2; %N, 17,5 y %Zn, 6,97.

Análisis termogravímetro (TGA) y térmico diferencial (DTA): se determinó en atmósfera de oxígeno con un flujo de 50 mL/min y a una velocidad de 10°/min. El complejo $[Zn(Lo)s)_2] \cdot 3H_2O$ sufrió la pérdida de tres moléculas de agua lábiles a 107 °C ($\Delta m\%$ calculado = 5,6; $\Delta m\%$ experimental = 5,5). Esta pérdida estuvo acompañada de un pico endotérmico en el DTA a la misma temperatura. A 800 °C se formó el residuo ZnO, el cual se caracterizó por espectroscopía infrarroja. La pérdida de peso fue 90,48% (calc: 91,56%).

Estas medidas permitieron determinar que la relación metal:ligando en el complejo es 1:2 y que presenta tres moléculas de agua de hidratación.

Síntesis de $[Zn(Lo)s)Cl]$

La formación de mono cristales aptos para la determinación estructural por rayos X depende fundamentalmente de los factores cinéticos. Un gel es un semisólido con una distribución, estructura y tamaño de poro que depende del método de preparación y los precursores químicos⁴. El gel de sílice es un sistema que contiene una red regular rígida formada por la polimerización del SiO_3Na_2 lo que hace que, en la difusión, disminuya la velocidad de precipitación de los compuestos y mejore el crecimiento de los cristales. El rango de tamaño

de poro se encuentra entre los 50 y 150 nm, ofrece compatibilidad con el pH del experimento y no tiene propiedades de óxido-reducción⁵.

Para la obtención de cristales de ZnLos, aptos para ser estudiados por difracción de rayos X, se empleó el método de difusión en gel (Figura II-2). El gel se preparó usando una solución al 5% de SiO_3Na_2 , la cual se acidificó con HCl al 50% hasta pH=7 agitando con una varilla. Esta solución se transfirió inmediatamente a un tubo en forma de “U”, donde gelificó al cabo de 5 minutos. En una de las ramas laterales del tubo se añadió una solución acuosa de losartán (1mmol, 10mL) y en la otra una solución acuosa de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (0,5 mmol, 5mL). Luego de 6 meses se observó el crecimiento de cristales dentro del gel.

Los cristales obtenidos no presentaban el mismo espectro FTIR que $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y la determinación estructural del mismo dio lugar a la fórmula: $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$ donde se observa la presencia del anión cloruro en su esfera de coordinación, el cual fue incorporado a partir del HCl utilizado para preparar el gel de silicato.

Figura II-2. Procedimiento para la difusión en gel

Estudios en fase sólida

Espectroscopía vibracional

Se midieron los espectros FTIR de losartán, $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$ y se compararon los modos vibracionales característicos de los tres compuestos (Figura II-3, Tabla II-1) Las asignaciones se realizaron de acuerdo a resultados obtenidos previamente por otros autores^{6,7}. La banda del estiramiento N-H, que se presenta aproximadamente en 3500 cm^{-1} está ausente debido a la desprotonación de la sal potásica del losartán. Las bandas de estiramiento O-H del ligando y de las moléculas de agua del complejo se encuentran en el

rango de $3380\text{--}3180\text{ cm}^{-1}$. Se observaron pequeñas modificaciones en los modos de flexión del grupo COH y de estiramiento del grupo CO (COH) en la coordinación del ligando al centro metálico. Las bandas debidas a los modos estiramiento simétricos de los grupos aromáticos C=C y C=N (aprox. $1615\text{--}1524\text{ cm}^{-1}$) muestran mayor intensidad en el espectro Raman, como era de esperar. Tanto en los espectros de FTIR y Raman las posiciones de los modos de vibración del enlace C-C del bifenilo en 1260 y 1206 cm^{-1} , se desplazaron y mostraron diferentes intensidades tras la complejación con Zn(II). Los principales cambios en los espectros de vibración del complejo se deben a los modos del grupo tetrazol (de 1100 a 954 cm^{-1}) que indican que la coordinación del catión de zinc se produjo a través de esta forma aniónica del ligando. Los cambios observados en los modos OH pueden ser indicativos de que este grupo también está involucrado en la coordinación con el centro metálico.

El espectro vibracional del cristal $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$ mostró algunos cambios con respecto al espectro del polvo $[\text{Zn}(\text{Los})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. El estiramiento OH se observó como una fuerte banda, desplazada a baja energía ya que el átomo de H está unido al átomo de N del tetrazol (enlace H). Las bandas relacionadas con la flexión del grupo COH también se desplazaron (1154 cm^{-1}) con respecto al ligando y el espectro del complejo de polvo. La coordinación del ión Zn(II) al grupo imidazol en este complejo produjo un cambio de las bandas asignadas a νCN (1460 cm^{-1} y 1426 cm^{-1}) a energías más altas. La estructura resuelta del complejo mostró la presencia de un puente de tetrazol entre los dos iones metálicos (véase más adelante) por lo tanto, se esperaba que estos modos vibracionales aparecieran desplazados con respecto a las bandas del complejo de polvo. En efecto, la nueva banda en 1032 cm^{-1} y la banda de 1013 cm^{-1} que se desplazó al azul, son indicativas de un modo de coordinación diferente del grupo tetrazol con el ion Zn.

Figura II-3. Espectros infrarrojos de losartán (azul), [Zn(Los)₂].3H₂O (rojo) y [Zn(Los)Cl] (negro).

Tabla II-1. Asignaciones propuestas de los diferentes modos vibracionales de FTIR y Raman (itálica) (en cm⁻¹) de los espectros de la sal de potasio de losartán y sus complejos de Zn(II), [Zn(Los)₂].3H₂O y [Zn(Los)Cl].

Asignaciones	KLos	[Zn(Los) ₂].3H ₂ O	[Zn(Los)Cl]
ν N-H			
ν O-H	3189 (f)	3376 (f)	3352 (mf) puente H
ν CH arom en fase	3057 (h) 3061 (d)	3059 (m) 3070 (d)	3064 (d)
ν CH arom fuera de fase	3033 (h)	3028 (m)	3032 (d)
ν CH antisimétrico CH ₃	2957 (f) 2971 (m)	2955 (f) 2965 (m)	2957 (f)
ν CH simétrico CH ₃	2930 (mf)	2930 (f)	2936 (f)
ν CH simétrico CH ₂	2871 (m)	2868 (m)	2871 (m)
ν CN	1613 (md) 1614 (mf), 1606 (f)	1603 (d) 1615 (mf), 1605 (m)	1596 (d)
ν CC	1579 (m) 1578 (m)	1577 (d) 1582 (m), 1567 (h)	1560 (d)
ν CN en plano arom + ν CC	1527 (md) 1524 (f)	1527 (h) 1527 (m)	
ν CC	1507 (h) 1509 (m), 1502 (m)	1509 (h) 1509 (m)	1508 (h)
ν CC + δ CCH en plano + ν CN	1497 (m) 1498 (m)	1494 (h) 1498 (m)	1480 (h)
δ CCH en plano + ν CN	1460 (m), 1422 (f) 1462 (md), 1427 (d)	1460 (mf), 1426 (m) 1463 (d), 1432 (d), 1425 (d)	1466 (mf), 1435 (h)
ν CC + δ CCH en plano	1408 (m), 1380 (m)	1409 (m), 1382 (m)	1410 (h)
CH ₂ balanceo	1357 (m)	1356 (m)	1363 (m)
δ COH + δ CCH	1341 (m)	1351 (h)	1340 (h)
CH ₂ balanceo + CH ₂ balanceo	1309 (d) 1294 (f)	1310 (d) 1298 (f)	1310 (h)
ν C-C enlace puente del bifenilo	1260 (f), 1237 (h) 1261 (md)	1255 (f) 1253 (m)	1256 (m)
ν NN + ν C-C enlace puente del bifenilo	1206 (m) 1208 (m)	1222 (m)	
ν CO (COH) + δ CCH arom, CH ₂ balanceo y balanceo	1187 (m) 1187 (m)	1190 (h) 1193 (m)	1154 (m)
ν NN	1132 (m), 1112 (m)	1105 (d)	
CH ₂ balanceo + δ CCH arom en plano	1107 (m)	1092 (d)	1097 (m)
ν NN + δ CCH en plano arom + respiración anillo	1074 (m)	1074 (d), 1025 (h)	1032 (m)
δ NNN + ν NN	999 (f) 1013 (f)	1007 (f) 1010 (d)	1013 (m)
δ CCH fuera del plano arom + CH ₂ torsión	954 (h), 933 (m)	954 (d), 935 (d)	954 (d)
δ CCH fuera del plano arom	885 (d), 840 (m)	882 (d), 825 (m)	887 (md), 829 (m)
δ CCH fuera del plano arom, ν C-Cl	762 (m)	762 (m)	762 (m)

Abreviaturas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, medio; d, débil; md: muy débil; h, hombro. ν, estiramiento; δ, flexión; arom, aromático.

Difracción de rayos X del cristal [Zn(Los)Cl]

Los datos del cristal, el procedimiento de recolección de datos, los métodos de determinación de la estructura y los resultados de refinamiento se resumen en la Tabla II-2. Los datos estructurales completos del cristal se depositaron en el Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) bajo el número de referencia CCDC 1458978. La estructura cristalina de [Zn(Los)Cl] se muestra en el diagrama ORTEP⁸ de la Figura II-4 y las longitudes de enlace [Å] y los ángulos [°] alrededor del ion Zn(II) en el complejo clorolosartanzinc(II) se muestran en la Tabla II-3.

El sistema se describe como un complejo supra-molecular de Zn(II). El ligando losartán está cargado negativamente por la pérdida del protón en el anillo de tetrazol CN_4H . El ion Zn(II) se encuentra en un entorno tetraédrico de ZnN_3Cl , coordinado al N del imidazol mediante par electrónico libre [$d(\text{Zn}-\text{N1}) = 2,016(3) \text{ Å}$], a dos N laterales del tetrazol [$d(\text{Zn}-\text{N5}) = 2,041(3) \text{ Å}$, $d(\text{Zn}-\text{N6}) = 2,034(3) \text{ Å}$], cada uno de los cuales pertenece a dos aniones de losartán invertidos, y a un ion cloro [$d(\text{Zn}-\text{Cl}) = 2,211(1) \text{ Å}$]. Los ángulos de enlace L-Zn-L en el complejo están en el rango de $103,8(1)$ a $116,9(1)^\circ$. Como se puede apreciar en la Figura II-4, los complejos de ZnN_3Cl vecinos se unen mediante el par de aniones de losartán antes mencionados a través de sus anillos de tetrazol para conformar un dímero centro-simétrico local en la red, $(\text{ZnN}_3\text{Cl})_2$, con una distancia Zn...Zn de $3,842(1) \text{ Å}$. La coordinación da lugar a una estructura supramolecular tridimensional que se extiende por todo el cristal.

El complejo supramolecular se estabiliza en el sólido mediante un enlace intermolecular OH... N3' que involucra como donante a un grupo oxhidrilo de un ligando de losartán y como aceptor el nitrógeno tetrazol N3 de un ligando vecino [$d(\text{O}...\text{N3}') = 2,917(5)$, $(\text{OH} \dots \text{N3}') = 173(7)^\circ$].

Figura II-4. Estructura cristalina del complejo clorolosartanzinc.

Tabla II-2. Datos del cristal y resultados de la estructura de refinamiento para el $[Zn(Lo)Cl]$

Fórmula empírica	$C_{22}H_{22}Cl_2N_6OZn$
Peso fórmula	522,72
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	1,54184 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P 2_1/n$
Dimensiones de la celda unidad	$a = 12,5723(7)$ Å $b = 9,4476(6)$ Å $c = 20,0046(10)$ Å $\beta = 92,543(5)^\circ$
Volumen	$2373,8(2)$ Å ³
Z, densidad (calculada)	4, 1,463 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	$3,725$ mm ⁻¹
F(000)	1072
Tamaño del cristal	$0,053 \times 0,094 \times 0,118$ mm ³
θ - rango para la recolección de datos	$4,073$ to $72,473^\circ$
Rangos de índice	$-12 \leq h \leq 15, -11 \leq k \leq 7, -23 \leq l \leq 24$
Reflexiones colectadas	10795
Reflexiones independientes	4640 [R(int) = 0.0559]
Reflexiones observadas	3009
Compleitud a $\theta = 67,684^\circ$	100,0 %
Método de refinamiento	F^2 Matriz completa de mínimos cuadrados de F^2
Datos/restricciones/parámetros	4640 / 0 / 366
Bondad del ajuste en F^2	1,004
Índices R finales ^a [$>2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0501, wR2 = 0,1121$
Índices R (todos los datos)	$R1 = 0,0903, wR2 = 0,1349$
Pico dif. más grande y hueco	$0,369$ and $-0,270$ e.Å ⁻³
Fórmula empírica	$C_{22}H_{22}Cl_2N_6OZn$

$$^a R_1 = \sum |F_o| - |F_c| / \sum F_o, wR_2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$$

Tabla II-3. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del ion Zn(II) en el complejo clorolosartanzinc

N(1)-Zn	2,016(3)
Cl(2)-Zn	2,211(1)
Zn-N(6)#1	2,034(3)
Zn-N(5)#2	2,041(3)
N(1)-Zn-N(6)#1	110,8(1)
N(1)-Zn-N(5)#2	107,1(1)
N(6)#1-Zn-N(5)#2	103,8(1)
N(1)-Zn-Cl(2)	116,9(1)
N(6)#1-Zn-Cl(2)	109,3(1)

Transformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes: (#1) $x-1/2$, $-y+3/2$, $z+1/2$; (#2) $-x+3/2$, $y-1/2$, $-z+3/2$

Reflectancia difusa

Se obtuvieron los espectros de reflectancia difusa de los complejos $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$ (Figura II-5). Estos espectros resultaron similares y mostraron una banda con máximo en 259 nm y un hombro en 283 nm para el $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 254 nm y hombro de 280 nm para el $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$.

Figura II-5. Espectros de reflectancia difusa de $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{Los})\text{Cl}]$

Estudios en solución

Espectroscopía UV y estabilidad

En la Figura II-6 se pueden observar los espectros UV del ligando y del complejo disueltos en etanol. El espectro del ligando muestra tres bandas con sus máximos localizados en 207 nm, 228 nm y 246 nm y sus coeficientes de absorptividad molar de $\epsilon = 9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $2,11 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Las bandas a esas longitudes de onda y los valores de ϵ en el orden de 10^4 indican que las transiciones son de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos aromáticos⁹. Estos resultados coinciden con datos reportados previamente¹⁰. En el complejo $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, se espera que se produzcan bandas de transferencia de carga entre orbitales del metal y el ligando. En el espectro electrónico del complejo en etanol, las bandas permanecieron sin corrimiento, dentro del error experimental, 206 nm, 224 nm y 250 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $8,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente), observándose variaciones de intensidades relativas, lo que demuestra la interacción con el metal.

Figura II-6. Espectros UV de soluciones etanólicas $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ de losartán (izquierda) y del complejo $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (derecha)

La estabilidad del complejo en solución etanólica se evaluó midiendo la variación espectral durante 90 min (Figura II-7). La absorbancia se mantuvo constante durante ese intervalo de tiempo, por lo tanto, se puede asegurar la estabilidad del complejo en el rango de tiempo necesario para realizar los ensayos biológicos. Este comportamiento también fue observado en DMSO.

Figura II-7. Espectros UV. Determinación de la estabilidad del complejo $[Zn(Los)_2] \cdot 3H_2O$ a una concentración de $1 \times 10^{-5} M$ en solución etanólica a distintos tiempos entre 0 y 90 min. La flecha indica el sentido de desplazamiento de las curvas.

Conductividad Molar

Se realizaron mediciones de conductividad de soluciones 1 mM de $ZnSO_4$ y losartán en agua y soluciones de $[Zn(Los)_2] \cdot 3H_2O$ en DMSO, y en una mezcla de 0,5% DMSO en H_2O . Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C. Los valores de conductividad molar para soluciones de $ZnSO_4$ y de losartán potásico resultaron en 171 y 68 $\Omega^{-1} cm^2/mol^{-1}$ respectivamente, típicos para electrolitos 2:2 y 1:1, respectivamente. Estos resultados fueron similares a datos reportados anteriormente^{11,12}. Estos valores permanecen prácticamente sin cambios hasta las 4 horas (datos no mostrados). La conductividad molar del complejo, ya sea en DMSO o en una mezcla de DMSO- H_2O al 0,5% resultó 14 y 13 $\Omega^{-1} cm^2/mol^{-1}$, respectivamente y es indicativa de un complejo de Zn(II) neutro no dissociado. Estos valores de conductividad molar permanecen sin cambios hasta 4 horas (Tabla II-4). Por lo tanto, se ha determinado mediante dos ensayos experimentales que el complejo en solución (etanólica, DMSO y DMSO- H_2O al 0,5%) permanece sin descomposición al menos durante las primeras 4 horas de disolución.

Tabla II-4. Conductividad molar de soluciones de $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; a) DMSO y b) 0,5% DMSO en H_2O

t (min)	$[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}^{\text{a}}$	$[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}^{\text{b}}$
5	14	12
10	12	15
15	14	13
20	13	15
30	14	13
60	14	15
120	13	14
180	12	14
240	14	14

Espectroscopía de fluorescencia

Se obtuvieron los espectros de fluorescencia de las soluciones tanto de losartán como del complejo $[\text{Zn}(\text{Los})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Figura II-8). Estos espectros fueron obtenidos midiendo la fluorescencia en las longitudes de onda de excitación y emisión que varían de 200 a 320 nm y de 300 a 500 nm, respectivamente. El ligando losartán mostró un pico máximo de emisión de 380 nm luego de la excitación a 302 nm mientras que el complejo emitió en 365 nm luego de ser excitado a 295 nm. Estas propiedades luminiscentes se atribuyen a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos fenilos y la formación del complejo desplazó la banda hacia el azul e incrementó la intensidad de emisión. Estos cambios pueden atribuirse a que cuando el ligando se une al centro metálico se incrementa su rigidez y se reduce la pérdida energética por decaimiento vibracional¹³. Nuevamente, el cambio observado permite confirmar la formación del complejo de coordinación.

Figura II-8. Espectros de fluorescencia de $[Zn(Los)_2] \cdot 3H_2O$ y losartán a una concentración de 1×10^{-5} M en solución etanólica.

Con los datos obtenidos a partir de las determinaciones de los análisis elementales, termogravimétricos y caracterización fisicoquímica, se concluye una coordinación del ligando con el metal como la que se muestra en la Figura II-9.

Figura II-9. Estructura propuesta para $[Zn(Los)_2] \cdot 3H_2O$ (ZnLos)

Complejo de Zn(II) y Candesartán

Candesartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico

El candesartán es un antagonista de angiotensina II, no sólo usado en el tratamiento de la hipertensión, sino también en falla cardíaca, infarto de miocardio y nefropatía diabética.

Su nombre según IUPAC es el ácido 2-etoxi-3-[[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]benzimidazol-4-carboxílico. Clínicamente se emplea su éster, el profármaco candesartán cilexetilo cuyo nombre es 2-etoxi-3-[[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]benzimidazol-4-carboxílate ciclohexil 1-hidroxietil carbonato éster. El candesartán cilexetil se hidroliza por una esterasa intestinal durante la absorción a su forma activa como candesartán (Figura II-10). El uso de la forma profármaco incrementa la biodisponibilidad del candesartán. A pesar de esto, la biodisponibilidad es relativamente pobre y va desde el 15 % hasta el 40 %¹⁴.

Candesartán tiene un peso molecular de 461 g/mol y su fórmula empírica es $C_{24}H_{20}N_6O_3$. Es un polvo blanco insoluble en agua y escasamente soluble en metanol. Su valor de pKa es de 6¹⁵.

a)

b)

Figura II-10. Estructuras de candesartán (a) y candesartán cilexetilo (b)

Síntesis de $[\text{ZnCand}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ZnCand)

Para la síntesis del complejo $[\text{ZnCand}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se suspendió 1 mmol de candesartán en 10 mL metanol, se agregó NaOH 1M gota a gota hasta pH 7, luego se agregó 1 mmol de ZnCl_2 disuelto en 5 mL de metanol y se llevó a reflujo durante 8 hs, pH final 6. Se formó un precipitado blanco, el cual se filtró y se lavó con metanol. Ese precipitado se secó en estufa a 60 °C. Análisis elemental: Calc. Para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_7\text{Zn}$ (575,38): %C, 50,08; %H, 4,52; %N, 14,60 y %Zn: 11,37. Exp: %C, 49,6; %H, 4,0; %N, 14,4 y %Zn: 11,82.

Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA): el complejo $[\text{ZnCand}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ experimentó la pérdida de dos moléculas de agua lábiles a una temperatura de 64 °C ($\Delta m\%$ calc. = 6,26; $\Delta m\%$, exp. = 6,11) y dos moléculas de agua de coordinación a 164 °C ($\Delta m\%$ calc. = 6,26; $\Delta m\%$, exp. = 5,9). Ambas pérdidas se vieron acompañadas de picos endotérmicos en el DTA a la misma temperatura. Se formó el residuo ZnO a 800 °C que fue caracterizado por espectroscopía infrarroja. La pérdida de peso total fue 84,82% y se correlacionó con lo calculado (85,84%). En este complejo se determinó por consiguiente una estequiometría ligando:metal 1:1.

Estudios en fase sólida

FTIR

Se obtuvieron los espectros FTIR del ligando Candesartán y su complejo $[\text{ZnCand}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura II-11). Se asignaron los modos vibracionales de los principales grupos funcionales del candesartán de acuerdo a reportes anteriores¹⁶ y se analizaron los cambios que se produjeron por complejación del fármaco, como el desplazamiento de las frecuencias de las bandas y/o variación de intensidad de las mismas. En la Tabla II-5 se presentan las asignaciones de frecuencias vibracionales correspondientes. Como puede observarse, en el espectro del ligando, la banda ancha alrededor de 3445 cm^{-1} , que se debe al estiramiento NH del candesartán, desaparece con la formación de complejo. La banda del estiramiento OH incrementó su intensidad en el complejo posiblemente por la contribución de los modos vibracionales asignados a las moléculas de H_2O de coordinación y de hidratación. Este ensanchamiento está ausente en el espectro del complejo, indicando la desaparición de dicho puente, por interacción del Zn(II) con el ligando. Las bandas correspondientes al grupo ácido carboxílico COOH

disminuyeron su intensidad al formar el complejo (1705 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} , 823 cm^{-1}) o desaparecieron (1212 cm^{-1} , 1190 cm^{-1}), lo que indica que este grupo está desprotonado e involucrado en la coordinación con el ion metálico. Se observaron nuevas bandas, o un aumento en la intensidad de las mismas para el ZnCand correspondientes a modos vibracionales asociados a flexiones del grupo carboxilato en 1463 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} y 1111 cm^{-1} . Asimismo, la banda asociada al estiramiento antisimétrico del grupo carboxilato en el complejo se ubica en 1652 cm^{-1} y la que corresponde al estiramiento simétrico se encuentra en 1356 cm^{-1} . Siendo que la magnitud del desdoblamiento ($\Delta\nu = \nu_{as} - \nu_s$) es indicativo del modo de coordinación de los grupos carboxilato formados por pérdida del H del grupo ácido carboxílico¹⁷, el cálculo de dicha diferencia para el complejo CuCand es de 296 cm^{-1} lo que sugiere un modo monodentado de coordinación para el complejo $[\text{ZnCand}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Los cambios observados en los modos vibracionales asignados al anillo de tetrazol (1479 cm^{-1} , $\delta\text{ NNH}$; 1238 cm^{-1} , $\nu\text{ NN} + \nu\text{ NH} + \delta\text{ NNH}$ y 674 cm^{-1} , $\pi\text{ NNNH}$) son indicativos de la interacción del metal a través de este grupo. Por lo tanto, a partir del análisis del espectro, se sugiere que el ión metálico interacciona con el fármaco por el grupo carboxilato y el tetrazol (ambos desprotonados) formando un anillo quelato con cada uno de los ligandos.

Figura II-11. Espectros FTIR de candesartán y su complejo ZnCand

Tabla II-5. Asignación de las bandas del espectro FTIR de candesartán y el complejo ZnCand. Los valores se expresan en cm^{-1}

Asignaciones	Candesartán	ZnCand
ν NH	3445 (d)	
ν OH	3410 (d)	3383 (f)
ν CH _{arom} en fase	3059 (m)	3061 (h)
ν CH _{arom} fuera de fase	3025 (h)	3026 (h)
ν CH _{asimétrico} CH ₃	2989 (m) 2963 (h)	2987 (m) 2943 (h)
ν CH _{simétrico} CH ₂ , CH ₃	2937 (m)	2934 (h)
ν CH _{asimétrico} CH ₂ , CH ₃	2905 (h) 2901 (m)	2899 (h)
ν CH _{simétrico} CH ₃	2871 (m)	2856 (h)
ν NH OCOH	2300	
ν C=O + δ COH	1705 (mf)	1706 (md)
ν C=C + ν C=N _{benzimidazol} + V _{asimétrico} COO ⁻		1652 (sh)
ν C=C + ν C=NBz	1610 (m)	1621 (m)
$\delta_{\text{en fase}}$ NNH _{tz} + $\delta_{\text{en fase}}$ CCH _{arom} + ν C=C	1549 (mf)	1548 (mf)
$\delta_{\text{en fase}}$ CCH _{arom} + CH ₂ deformación tijereteo + CH ₃ deformación + ν C-C _{tetrazol-bifenilo}	1517 (h)	1511 (h)
δ NNH + ν C-C _{tetrazol-bifenilo} + $\delta_{\text{en fase}}$ CCH _{arom}	1479 (f)	1489 (h)
δ NNH + δ CCH _{en fase} + CH ₂ deformación tijera + δ COH + ν CN _{benzimidazol}	1461 (h)	1463 (m)
ν C=N _{tetrazol-bifenilo} + $\delta_{\text{en fase}}$ CCH _{benzimidazol} + CH ₂ balanceo + CH ₂ torción + δ COH	1426 (f)	1429 (m) 1409 (m)
$\delta_{\text{simétrico}}$ CH ₃ + CH ₂ balanceo + ν CN _{benzimidazol} + ν C-COO ⁻	1387 (m)	1387 (m)
δ NNH + CH ₂ balanceo + ν C=C _{benzimidazol} + ν CN + V _{simétrico} COO ⁻	1353 (m)	1356 (m)
ν NN + ν NH + δ NNH	1238 (mf)	1251 (d)
ν CO (COH) + ν NN + δ CCH _{arom}	1212 (h) 1190 (h)	
$\delta_{\text{en fase}}$ CCH _{arom} + ρ CH ₂ + CH ₂ balanceo + $\delta_{\text{en fase}}$ NNH + ν CN _{benzimidazol} + ν (Bz)C-C(COO ⁻)	1134 (m) 1112 (h)	1154 (m) 1111 (d)
δ NNN + δ NCN + δ fuera fase CCH + ν (Bz)C-C(COO ⁻)	1039 (s) 1002 (h)	1038 (s) 1008 (h)
$\delta_{\text{fuera fase}}$ COH + $\delta_{\text{fuera fase}}$ CCH _{benzimidazol} + δ CCC (Et) + CCOO (COO ⁻)	823 (m)	818 (d)
ν fuera fase NH + $\delta_{\text{fuera fase}}$ CCH + $\delta_{\text{en fase}}$ CCC _{arom} + NNCC _{deformación}	754 (f)	763 (m) 745 (h)
δ OCO (COOH) + δ (Bz)COC (Et)	698 (m)	697 (md)
NNNH _{deformación} + respiración bifenilo	674 (h)	
respiración bifenilo		670 (md)

Abreviaturas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, medio; d, débil; md: muy débil; h, hombro. ν , estiramiento; δ , flexión; arom, aromático

Estudios en solución

Espectroscopía UV y estabilidad

El espectro UV de candesartán disuelto en DMSO a una concentración de 1×10^{-5} M exhibió tres bandas con sus máximos localizados en 266 nm, 301 nm y 345 nm y valores de $\epsilon = 7,3 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, $\epsilon = 3,08 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ y $5,3 \times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹, mientras que para el complejo ZnCand las bandas aparecieron en 266 nm, 294 nm y 344 nm. $\epsilon = 9,7 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, $\epsilon = 6,2 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ y $1,3 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ (Figura II-12). Las bandas se corresponden con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligando. Las posiciones de las bandas electrónicas en el complejo de Zn(II) son, dentro del error experimental, similares a las de candesartán observándose cambios de intensidad relativos que indicarían la interacción del ligando con el metal.

Figura II-12. Espectros UV de candesartán (izquierda) y el complejo ZnCand (derecha) disueltos en DMSO.

Se determinó la estabilidad del complejo disuelto en solución de DMSO, midiendo las variaciones espectrales de soluciones del complejo en el tiempo. Nuevamente, el espectro electrónico del complejo no indica variaciones notorias (al menos durante los 90 min de medida (Figura II-13) por lo que se descarta la disociación del mismo durante las preparativas para la realización de los ensayos experimentales.

Figura II-13. Espectros UV. Determinación de la estabilidad del complejo ZnCand durante 90 minutos

Conductividad molar

La estabilidad del complejo fue también determinada realizando estudios conductimétricos. Se prepararon dos soluciones de ZnCand, una en DMSO y la otra en 0,5% de DMSO en agua (misma condición que la usada en las pruebas biológicas). Se monitoreó la conductividad durante 4 horas. Se observó que en DMSO la conductividad se mantuvo constante, sin embargo la solución de ZnCand en 0,5% de DMSO alcanzó un máximo de conductividad de $83 \Omega^{-1} \text{cm}^2/\text{mol}^{-1}$ y luego disminuyó con el tiempo a $63 \Omega^{-1} \text{cm}^2/\text{mol}^{-1}$ (Tabla II-6). Este comportamiento puede deberse a la hidrólisis parcial y reorganización del complejo¹⁸. En general, se establece que la conductividad molar en agua para un no-electrolito es menor que $80 \Omega^{-1} \text{cm}^2/\text{mol}^{-1}$ y en DMSO es menor a $50 \Omega^{-1} \text{cm}^2/\text{mol}^{-1}$, por lo que se sugiere que el complejo permanece sin disociar en ambos solventes¹⁹.

Tabla II-6. Conductancia molar de soluciones de ZnCand en ^aDMSO y ^b0.5% DMSO en H₂O

t (min)	ZnCand ^a	ZnCand ^b
5	12	80
10	15	80
15	14	79
20	15	74
30	14	72
60	15	72
120	12	70
180	13	68
240	12	63

Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de los espectros de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 272 nm mostraron que tanto candesartán como su complejo de Zn(II) exhibieron una banda de emisión a 360 nm, la cual va acompañada de un incremento en la intensidad de fluorescencia en el espectro del complejo (Figura II-14). La banda de emisión de fluorescencia más intensa en el complejo puede atribuirse a que la coordinación del ligando al Zn(II) aumenta la rigidez del mismo y reduce la pérdida de energía por descomposición no-radiactiva²⁰.

Figura II-14. Espectros de fluorescencia de candesartán y ZnCand

Resonancia Magnética Nuclear

El complejo ZnCand también fue caracterizado por técnicas de RMN de ^1H y ^{13}C . El complejo fue disuelto en DMSO- d_6 y se midió a una frecuencia de trabajo de 600 MHz y 150 MHz para obtener los espectros de H y C, respectivamente.

A continuación, se muestran los espectros teóricos ^1H -RMN (Figura II-15) y ^{13}C -RMN (Figura II-17) de candesartán²¹ y los espectros experimentales ^1H -RMN (Figura II-16) y ^{13}C -RMN (Figura II-18) de ZnCand con sus asignaciones. Así mismo, se presentan los desplazamientos químicos observados para ambos compuestos (Tabla II-7 y Tabla II-8).

En el espectro de RMN de ^1H del candesartán se encontró que las señales de los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}$ cuyos picos aparecen 11,11 y 12,32 ppm respectivamente están ausentes en el complejo lo que indicaría la pérdida de estos protones y la coordinación a través de estos grupos (como ya fue observado por espectroscopía vibracional).

Los picos correspondientes a los grupos aromáticos aparecen desplazados hacia campo alto con respecto al ligando. Cuando los metales de transición se unen a moléculas orgánicas provocan el corrimiento de las señales de los grupos próximos a la coordinación a menores campos²².

En el complejo (Figura II-16) apareció una nueva señal en 3,43 ppm, con una integración correspondiente a 4 protones que es asignada a las 2 moléculas de H_2O de coordinación.

Con respecto al espectro de ^{13}C y debido a la coordinación, la señal correspondiente al grupo $-\text{COOH}$ se desplaza de 167 a 169 ppm y se puede explicar por el decrecimiento de la densidad

electrónica alrededor dicho carbono. Asimismo, la señal del C del grupo tetrazol en 150 ppm se corre hacia campo bajo unos 6 ppm²³.

Figura II-15. Espectro simulado de RMN de ^1H de candesartán²¹

Figura II-16. Espectro experimental de RMN de ^1H de ZnCand en DMSO- d_6

Figura II-17. Espectro simulado de RMN de ^{13}C de candesartán²¹

Figura II-18. Espectro experimental de RMN de ^{13}C de ZnCand

Tabla II-7. Datos de desplazamiento químico en el RMN de ^1H de candesartán y ZnCand

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	
	Candesartán (teórico)	ZnCand (Experimental)
CH_3	1,38 - 1,39 - 1,40	1,34-1,35-1,36
DMSO-d6	2,5	2,5
H_2O		3,43
$-\text{CH}_3$	4,05 - 4,06 - 4,07 - 4,08	4,47-4,48-4,5-4,51
$-\text{CH}_2$	5,37	5,81
Ar-H	7,4 - 7,41 - 7,41 - 7,53 - 7,54 - 7,55 - 7,76 - 7,8 - 7,84 - 8,05	6,95 - 6,96 - 6,98 - 6,99 - 7,23 - 7,24 - 7,24 - 7,28 - 7,34 - 7,49 - 7,49 - 7,5
$-\text{COOH}$	11,11	
$-\text{NH}$	12,30	

Tabla II-8. Datos de desplazamiento químico en el RMN de ^{13}C de candesartán y Zncand.

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	
	Candesartán (teórico)	Zncand (Experimental)
CH_3	14	13
CH_2	47 - 65	44 - 64
C-Ar	138,27 - 137,27 - 137,22 - 135,23 - 135,23 - 129,18 - 129,18 - 128,74 - 128,74 - 128,30 - 127,16 - 126,83 - 126,73 - 125,97 - 123,14 - 122,68 - 122,54 - 116,56	139,47 - 139,24 - 138,91 - 135,22 - 131,14 - 129,28 - 128,85 - 128,78 - 127,73 - 126,11 - 125,45 - 125,34 - 121,14 - 121,10 - 118,61 - 115,50 - 115,42
C (tetrazol)	150	156
C (imidazol)	160	160
-COO	168	170

En base a la caracterización fisicoquímica del complejo, se postula la siguiente estructura (Figura II-19)

Figura II-19. Estructura propuesta para ZnCand

Complejo de Zn(II) con Valsartán

Valsartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico

El fármaco antihipertensivo valsartán es uno de los ARBs usados para el tratamiento de la reducción de la presión arterial. Es un fármaco lipofílico de moderada acción, se absorbe por vía oral y se transporta unido a proteínas plasmáticas. Se suele administrar combinado con otros agentes antihipertensivos en pacientes que no responden a los β -bloqueadores, inhibidores de la ECA o diuréticos. Es eficaz en el tratamiento de pacientes pediátricos, adolescentes y ancianos con hipertensión leve a moderada²⁴.

La nomenclatura IUPAC lo denomina ácido (2S)-3-Metil-2-[pentanoil[[20-(1H-tetrazol-5-yl)bifenil-4-yl]metil]amino]butanoico (Figura II-20). Su fórmula molecular es $C_{24}H_{29}N_5O_3$ y su peso molecular es 435 g/mol. Es un polvo blanco, insoluble en H_2O , escasamente soluble en cloruro de metileno, muy soluble en etanol y metanol. Su pKa es 4,9²⁵.

Figura II-20. Estructura de valsartán

Síntesis de $[ZnVals(H_2O)_2](ZnVals)$

Para la síntesis del complejo $[ZnVals(H_2O)_2]$ se disolvió 1 mmol de valsartán en 10 mL de etanol, se llevó a pH 7 con NaOH 1M, se agregaron 0,5 mmol de $ZnCl_2$ disueltos en 5 mL de etanol y se agitó a 80 °C, pH final 7. Se dejó evaporar el solvente y al cabo de 4 días se formó un precipitado blanco, el cual se filtró y se lavó con etanol tibio. Ese precipitado se secó en estufa a 60 °C. Por espectroscopia de absorción atómica se determinó el contenido de Zn. Análisis elemental: Calc. Para $C_{24}H_{29}N_5O_5Zn$ (534 g/mol): %C, 53,9; %H, 5,8; %N, 13,2 y %Zn 12,2. Exp: %C, 53,54; %H, 5,23; %N, 13,23 y %Zn 12,2.

Análisis termogravímetro (TGA) y térmico diferencial (DTA): los análisis se realizaron en atmósfera de oxígeno (50 ml/min) a una velocidad de 10 °/min. El complejo [ZnVals(H₂O)₂] sufrió la pérdida de dos moléculas de agua a 95 °C (Δm % calc. 6,7; Δm %, exp. = 6,7). Esta pérdida estuvo acompañada de un pico endotérmico en el DTA a la misma temperatura. La pérdida de peso total fue 84,3% (Calc: 84,8%) y el residuo de ZnO generado se caracterizó por espectroscopía infrarroja.

Ambos estudios permiten proponer una relación ligando:metal 1:1 en el complejo sólido y la presencia de las dos moléculas de agua de coordinación.

Estudios en fase sólida

FTIR

Los espectros FTIR del ligando valsartán (previamente reportado²⁶) y su complejo ZnVals fueron medidos y los modos vibracionales de los grupos principales fueron asignados y comparados (Figura II-21). Así mismo, para su asignación, se compara con los datos vibracionales extraídos de previas determinaciones para la sal de sodio de valsartán (Na₂Vals)²⁷. En la Tabla II-9 se presentan las principales asignaciones características.

Las bandas del espectro FTIR del complejo ZnVals coinciden con la de los complejos de lantánidos con valsartán previamente reportado²⁸. Para el ligando, se observó la banda ancha en 3436 cm⁻¹ la cual corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -NH. Esta banda también fue observada en los espectros de ZnVals y Na₂Vals debido a la vibración del grupo OH de las moléculas de agua. En la zona de 3000 cm⁻¹, las bandas débiles pueden atribuirse al modo de estiramiento CH del anillo aromático. Las bandas observadas en el rango de 2963–2615 cm⁻¹ para el ligando se asignan a la formación de enlaces puente de H y a los modos de estiramiento CH asimétricos y simétricos.

Los modos vibracionales de estiramiento de los grupos C=O amida y C=N aparecen solapados a 1605 cm⁻¹. El modo de estiramiento del grupo carboxilato del ligando se observa a 1730 cm⁻¹ y esta banda desaparece por complejación. En ZnVals aparecen nuevas bandas que se pueden asociar al estiramiento antisimétrico del grupo carboxilato en 1625 cm⁻¹ y al estiramiento simétrico en 1390 cm⁻¹. La diferencia $\Delta\nu$ entre estos dos modos (235 cm⁻¹) sugiere una coordinación monodentada de este ligando con el centro metálico¹⁷ por resultar mayor que la diferencia obtenida en la sal sódica de 228 cm⁻¹ donde el anión carboxilato se encuentra en forma iónica.

Las bandas asociadas a los modos de anillo de tetrazol (1453 cm^{-1} , 1274 cm^{-1} , 993 cm^{-1}) del ligando adquirieron baja intensidad o desaparecieron, lo que denota la desprotonación y/o coordinación de este grupo con el ion metálico. Los modos de vibración del grupo bifénilo también se muestran en la Tabla II-9.

Figura II-21. Espectros FTIR de valsartán y su complejo ZnVals.

Tabla II-9. Asignación de las bandas de los espectros FTIR de valsartán, ZnVals y Na₂Vals. Los valores se expresan en cm⁻¹

Asignaciones	Valsartán	ZnVals	Na ₂ Vals
ν NH, ν OH	3436 (m)		
ν OH _{agua}		3416 (m)	3424 (m)
ν CH aromático	3129 (h), 3054 (h)	3061 (d)	3061 (d)
ν asimétrico CH, CH ₃	2965 (mf)	2965 (f)	2965 (f)
ν simétrico CH, CH ₃		2932 (h)	2931 (h)
ν simétrico CH, CH ₂	2882 (h), 2737 (m)	2872 (m)	2872 (m)
ν C=O	1730 (f)		
ν asimétrico COO ⁻		1625 (mf)	1628 (mf)
ν C=N, ν C=O amida	1605(mf)	1605 (mf)	1592 (mf)
δ NNH + δ CCH _{en el plano} + ν C ₂₃ -C ₁₈ + ν CN	1467 (f) 1453 (h)	1463 (f)	1461 (f)
δ NNH + δ CCH _{en el plano} + ν C ₂₃ -C ₁₈ ν simétrico COO ⁻	1410 (m) 1390 (d)	1428 (h) 1408 (f) 1390 (f)	1406 (f) 1400 (f)
δ NNH + ν NN + δ CC _{puente bifenilo}	1274 (m), 1210 (m)	1265 (d), 1244 (d), 1206 (m)	1261 (d), 1206 (d)
δ _{en el plano} CCH + CH ₂ balanceo y aleteo	1172 (h)	1175 (d)	1177 (d)
δ NNH + ν NN	1108 (d)	1106 (d)	1104 (d)
CH ₂ balanceo y aleteo	1062 (d) 1051 (d)		
δ NNN+ ν NN	1006 (d), 993 (d)	1016 (d), 1007 (d)	1012 (d)

Abreviaturas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, medio; d, débil; md: muy débil; h, hombro. ν , estiramiento; δ , flexión; arom, aromático;

Estudios en solución

Espectroscopía UV y estabilidad

El espectro UV de valsartán disuelto en etanol a una concentración de 1×10^{-5} M exhibió tres bandas con sus máximos localizados en 207 nm, 228 nm y 249 nm ($\epsilon = 4,82 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, $\epsilon = 1,69 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ y $1,94 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, respectivamente), mientras que para el complejo ZnVals las bandas aparecieron localizadas en 206 nm, 228 nm y 251 nm con $\epsilon =$

$4,44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon = 1,81 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $1,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente (Figura II-22). Las bandas pueden ser asignadas a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del ligando. Al formarse el complejo de Zn(II), la posición de las bandas electrónicas permanecen sin desplazamiento, pero se observan modificaciones en las intensidades de las bandas probablemente debido a la interacción con los orbitales d del metal²⁹.

Figura II-22. Espectros UV de valsartán (izquierda) y el complejo ZnVals (derecha) disueltos en etanol.

En la Figura II-23 se muestra que el complejo permaneció estable en solución durante 90 minutos, dato que resultó útil para las aplicaciones biológicas.

Figura II-23. Espectros UV. Determinación de la estabilidad del complejo ZnVals durante 90 minutos

Conductividad

Se midió la conductancia molar como parámetro de estabilidad del complejo ZnVals. Las medidas se realizaron en el complejo disuelto en etanol y en 0,5% DMSO en H₂O (Tabla II-10). En ambos casos, los valores de conductividad se mantuvieron constantes durante 4 horas, demostrando nuevamente la estabilidad del complejo obtenido en solución y la neutralidad del complejo en solución.

Tabla II-10. Conductancia molar de soluciones de ZnVals en ^aetanol y ^b0,5% DMSO en H₂O

t (min)	[Zn(Vals)] ^a	[Zn(Vals)] ^b
5	23	16
10	22	12
15	22	13
20	23	14
30	22	14
60	23	14
120	22	12
180	23	12
240	23	13

Espectroscopía de fluorescencia

Se obtuvieron los espectros de fluorescencia de las soluciones 1×10^{-5} M de ligando y complejo (Figura II-24). En ambos casos, para una longitud de onda de excitación de 295 nm, el valsartán emitió fluorescencia mostrando una banda a 366 nm mientras que el complejo lo hace a 351 nm. Al igual que el complejo ZnLos, las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos aromáticos le brindan propiedades fluorescentes, la formación de complejo causó un desplazamiento hipsocrómico e incrementó la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión. Como ya fue mencionado, la complejación hace que el ligando sea más rígido, lo que reduce la pérdida energética por decaimiento vibracional¹³.

Figura II-24. Espectros de fluorescencia de valsartán y Znvals

Resonancia Magnética Nuclear

Mediante técnicas de RMN se caracterizó adicionalmente el complejo ZnVals. Se muestran los espectros de ^1H -RMN (Figura II-26) y ^{13}C -RMN (Figura II-28) del complejo disuelto en DMSO- d_6 medidos a una frecuencia de 600 MHz y 150 MHz para H y C respectivamente. Así mismo, se compararon datos experimentales con datos simulados y reportados de valsartán (Figura II-25 y Figura II-27)³⁰.

En el espectro de RMN de ^1H del ligando se encuentra que las señales de los grupos $-\text{COOH}$ y

-NH cuyos picos aparecen en 11,80 y 10,74 ppm respectivamente están ausentes en el complejo lo que indicaría la desprotonación y/o coordinación de esos grupos. La región comprendida entre 7-8 ppm representa los protones de grupos aromáticos, que en el complejo aparecen desplazados hacia campo alto. En el complejo apareció una nueva señal en 3,36 ppm que se puede asignar a los H de las aguas de coordinación (Tabla II-11).

En el espectro de ^{13}C , la señal del C del grupo tetrazol del complejo se desplaza 24 ppm hacia campo alto mientras que la señal del grupo $-\text{COOH}$ se corre 14 ppm, esto se produce como consecuencia que el metal origina una disminución de la densidad electrónica alrededor de los carbonos próximos³¹. La señal correspondiente al grupo $\text{C}=\text{O}$ de la amida permanece invariable.

Figura II-25. Espectro simulado de ^1H -RMN de valsartán³⁰

Figura II-26. Espectro experimental de ^1H -RMN de ZnVals en DMSO-d_6

Figura II-27. Espectro simulado de ^{13}C -RMN de valsartán³⁰

Figura II-28. Espectro experimental de ^{13}C -RMN de ZnVals

Tabla II-11. Datos de desplazamiento químico en el ^1H -RMN de valsartán y ZnVals

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	
	Valsartán (teórico)	Znvals (Experimental)
-CH ₃	0,98, 0,98, 0,98	0,78, 0,74, 0,00
-CH ₃	1,06, 1,06, 1,06, 1,06, 1,06, 1,06	1,56, 1,45, 1,32, 1,24, 1,15, 0,89
-CH ₂	2,40, 2,40, 1,59, 1,59, 1,42, 1,42	2,39, 2,39, 2,24, 2,14, 2,03, 1,70
DMSO-d ₆	2,5	2,5
-CH	2,84, 4,27	2,89, 4,54
H ₂ O		3,36
-CH ₂	4,39, 4,38	4,72, 4,59
Ar-H	7,82, 7,75, 7,59, 7,59, 7,54, 7,53, 7,33, 7,33	7,62, 7,51, 7,42, 7,42, 6,97, 6,87, 6,79, 6,75
-COOH	10,74	
-NH	11,80	

Tabla II-12. Datos de desplazamiento químico en el ^{13}C -RMN de valsartán y ZnVals

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	
	Valsartán (teórico)	ZnVals (Experimental)
CH ₃	14, 19, 19	14, 18, 20
CH ₂	22, 27, 36, 48	22, 27
CH	30, 61	33, 67
C-Ar	137,94, 137,57, 136,25, 131,31, 129,23, 129,23, 128,59, 128,59, 128,29, 127,54, 126,82, 125,69	130,89, 129,40, 129,22, 128,70, 127,39
C (tetrazol)	166	142
C=O	173	174
COOH	176	162

Luego de analizar todos los resultados espectrales obtenidos para la caracterización fisicoquímica, junto con los datos de los análisis elementales y térmicos, se propone la estructura del complejo en la Figura II-29

Figura II-29. Estructura propuesta para ZnVals

Complejo de Zn(II) y Telmisartán

Telmisartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico

Telmisartán es uno de los bloqueadores del receptor de angiotensina II más potentes. A diferencia de otros ARBs, se caracteriza por no tener el grupo bifeniltetrazol lo que le da mayor afinidad por el receptor AT1 y el proceso de disociación es más lento y por lo tanto, posee larga duración de acción³². Presenta una elevada biodisponibilidad (42%) comparada con valsartán (39%) o losartán (33%) , se transporta unido a proteínas plasmáticas, y tiene una vida media de 13 a 19 horas aproximadamente, se excreta principalmente por vía fecal³³.

Según la nomenclatura IUPAC se lo designa como ácido (4'-[4-Metil-6-(1-metil-2-benzimidazolil)-2-propil-1-benzimidazolil]metil}-2-bifenilcarboxílico (Figura II-30). Su fórmula molecular es $C_{33}H_{30}N_4O_2$ y su peso molecular es 514 g/mol. Es un polvo blanco. Es insoluble en H_2O , escasamente soluble en etanol y metanol y ligeramente soluble en cloruro de metileno. Es muy soluble en soluciones básicas de 1M de NaOH. Su pKa es 4,45³⁴.

Figura II-30. Estructura molecular de telmisartán

Síntesis de $[Zn(Telm)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ (ZnTelm)

Para la síntesis del complejo $[Zn(Telm)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$, a 10 mL de una solución 0,2 mM de telmisartán en etanol, se ajusta el pH a 7 con NaOH 1M, y se agrega gota a gota 5 mL de una solución 0,1 mM de $ZnCl_2$ en etanol siendo el pH final de la solución igual a 7. La solución resultante se dejó reposar y a las 24 hs se formó un precipitado blanco, el cual se filtró y se lavó con etanol caliente. Ese precipitado se secó en estufa a 60 °C. Por espectroscopia de absorción atómica se determinó el contenido de zinc. Análisis elemental:

Calculado para $C_{66}H_{66}N_8O_8Zn$ (P.M.1163 g/mol): %C, 68; %H, 5,6; %N, 9,7 y %Zn, 5,7. Experimental: %C, 67,8; %H, 5,4 %N, 9,5 y %Zn, 5,5.

Análisis termogravímetro (TGA): las medidas en atmósfera de oxígeno confirmaron que el complejo ZnTelm presenta dos moléculas de agua lábiles perdidas a 60 °C (Δm % calc 3,1; Δm % exp 3,6). Dos moléculas de agua adicionales fueron perdidas a 227 °C (Δm % calc 3,1; Δm % exp 2,9). A 800 °C se formó el residuo ZnO, el cual se caracterizó por espectroscopía infrarroja y la pérdida de peso fue 92,2% (Calc: 93,0 %).

Estas determinaciones permitieron evaluar que la relación L:M en el complejo resultó ser 2:1 y que el mismo presenta dos moléculas de agua de coordinación y otras dos de hidratación.

Estudios en fase sólida

Espectroscopía de FTIR

Las bandas vibracionales obtenidas en los espectros FTIR del telmisartán y su complejo de Zn(II) fueron asignadas y comparadas entre sí y con el complejo de Cu(II) obtenido previamente³⁵. Los espectros FTIR y los modos vibracionales de telmisartán y su complejo ZnTelm se muestran en la Figura II-31 y, respectivamente. Para el telmisartán nuevamente se pudo observar una banda ancha en la zona de 3000-2600 cm^{-1} , asignada a la formación de puentes H intramoleculares. El modo de estiramiento carbonilo (C=O) del grupo ácido carboxílico localizado a 1696 cm^{-1} desapareció por desprotonación y/o complejación. Por lo tanto, el grupo carboxilato presentó vibraciones de estiramiento del grupo COO⁻ antisimétricas y simétricas ($\nu_{as}(COO^-)$ y $\nu_s(COO^-)$), y su diferencia $\Delta\nu = \nu_{as}(COO^-) - \nu_s(COO^-)$ como se mencionó previamente, se utilizó como criterio para establecer el modo de coordinación del grupo $-COO^-$ al metal¹⁷. El valor obtenido para el grupo carboxilato en el complejo (192 cm^{-1}) indicó un modo de coordinación monodentado. Además, la desprotonación y/o coordinación del ligando se vio acompañado de una reducción de la intensidad de los modos espectrales relacionados con el grupo -OH del grupo $-COOH$. Las bandas asignadas a los grupos de benzimidazol (Bz) y COH de telmisartán (1267-1130 cm^{-1}) aparecieron con baja intensidad en el complejo, lo que denota la interacción del grupo desprotonado -COH con el centro metálico.

Todos estos resultados sugirieron que la coordinación del ion zinc(II) con el ligando telmisartán se produjo a través del grupo carboxilato (COO^-). Resultados similares fueron reportados para los complejos Y(III) y Nd(III) con telmisartán³⁶.

Figura II-31. Espectros FTIR de telmisartán y su complejo ZnTelm.

Tabla II-13. Asignación de las bandas del espectro FTIR de telmisartán y ZnTelm. Los valores se expresan en cm^{-1} .

Asignación	Telmisartán	ZnTelm
ν OH	3403 (d)	
ν OH (H_2O)		3394(a, m)
ν CH_{arom}		3224 (m)
ν CH_{arom} en fase	3059 (d)	3055 (d)
ν CH_{arom} fuera de fase	3033 (d)	3026 (d)
ν $\text{CH}_{\text{asimétrico}}$ CH_3	2959 (m)	2961 (m)
ν $\text{CH}_{\text{asimétrico}}$ CH_2 , CH_3	2928 (m)	2930 (m)
ν $\text{CH}_{\text{simétrico}}$ CH_3	2870 (d)	2871 (m)
ν C=O (COOH)	1696 (f)	
ν C=C + ν $\text{CN}_{\text{benzimidazol}}$	1613 (d)	1636 (h)
	1600 (d)	1611(f)
$\nu_{\text{asimétrico}}$ COO^-		1592 (f)
Modos benzimidazol- bifenilo	1560 (md)	1561 (m)
	1522 (d)	1535 (m)
	1517 (h,m)	1508 (m)
	1479 (f)	1480 (f)
	1456 (mf)	1457 (h)
	1444 (f)	1450 (mf)
	1413 (f)	
$\nu_{\text{simétrico}}$ COO^-		1400 (f)
$\delta_{\text{en fase}}$ CCH+ ν C-C $_{\text{bifenilo}}$	1383 (m)	1381 (mf)
CH_2 balanceo+ CH_2 balanceo	1332 (f)	1343 (f)
δ COH + ν CCH	1323 (m)	
	1305 (f)	
δ COH + δ CCH + CH_2 torción + ν C-C $_{\text{benzimidazol}}$ + ν $\text{CN}_{\text{benzimidazol}}$	1297(f)	1292 (m)
	1267 (mf)	1282 (m)
	1246 (f)	1244 (d)
ν C-O (COH) + δ CCH $_{\text{arom}}$	1230 (f)	1231 (d)
$\delta_{\text{en fase}}$ arom CCH + CH_2 balanceo + CH_2 balanceo + ν $\text{CN}_{\text{benzimidazol}}$	1129 (m)	1130 (md)
	1089 (d)	1094 (d)

Abreviaturas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, medio; d, débil; md: muy débil; h, hombro; a, ancha. ν , estiramiento; δ , flexión; arom, aromático;.

Estudios en solución

Espectroscopía UV y estabilidad

Se obtuvieron los espectros electrónicos de soluciones 1×10^{-5} M de telmisartán y ZnTelm en DMSO. Las bandas observadas a 254 nm y 296 nm en el telmisartán ($\epsilon = 1,94 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, $\epsilon = 2,07 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹) y a 259 nm y 301 nm en el complejo de Zn(II) ($\epsilon = 4,18 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, $\epsilon = 4,33 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹) pueden ser asignadas transiciones electrónicas de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y se deben principalmente a la presencia de los grupos aromáticos. El complejo mostró un desplazamiento hacia el rojo ($\Delta\lambda = 5$ nm) en ambas bandas (Figura II-32).

Figura II-32. Espectros UV de telmisartán (izquierda) y el complejo ZnTelm (derecha) disueltos en DMSO.

Se midió la estabilidad en solución del complejo por espectroscopía UV durante 90 minutos (Figura II-33) y se observó que en general la variación espectral es mínima durante los 15 minutos que dura la preparación de las muestras por disolución antes de efectuar medidas biológicas.

Figura II-33. Espectros UV. Determinación de la estabilidad del complejo ZnTelm durante 90 minutos

Conductividad

La conductividad molar de una solución 1×10^{-3} M en DMSO del complejo fue determinada para demostrar adicionalmente su estabilidad en el tiempo. Durante 4 h los valores de conductividad se mantuvieron relativamente constantes, es decir que el complejo en solución no sufrió disociaciones en ese período. Estos datos son consistentes con los estudios de espectroscopia electrónica. Al mismo tiempo, por los bajos valores de conductividad obtenidos se demuestra que el complejo se encuentra en la forma de no-electrolito en dicho solvente.

A la concentración 1×10^{-3} M (valor usado en las medidas de conductividad), el complejo no pudo ser disuelto en la mezcla de 0,5% de DMSO en H_2O por lo que la medida se pudo efectuar solo en DMSO (Tabla II-14)

Tabla II-14. Conductancia molar de la solución 1×10^{-3} M de ZnTelm en DMSO

t (min)	ZnTelm
5	31
10	29
15	31
20	30
30	30
60	31
120	31
180	31
240	29

Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia de las soluciones 1×10^{-5} M de ligando y complejo fueron medidos (Figura II-33). Telmisartán contiene en su estructura dos fluoróforos: el grupo bifenilo y benzimidazol que exhiben fuerte fluorescencia. Cuando el complejo y el ligando se excitan a una longitud de onda de 343 nm, se observa un pico máximo de emisión a 366 nm en ambos casos pero con incremento de intensidad para el complejo, razón debida a que la complejación produce la inhibición del decaimiento no-radiactivo³⁷.

Figura II-34. Espectros de fluorescencia de telmisartán y ZnTelm

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron registrados y las correspondientes señales del complejo fueron asignadas. Estos resultados se compararon con espectros simulados y reportados del ligando^{38,39}.

En las Tablas II-15 y Tabla II-16 se presentan los valores de desplazamientos químicos de ambos compuestos y en las Figuras II-35, II-36, II-37 y II-38, los respectivos espectros. En el espectro de ^1H -RMN, la señal del grupo $-\text{COOH}$ presente en el ligando desapareció en el complejo lo que indicaría la desprotonación y/o coordinación de este grupo al centro metálico. En el complejo apareció una nueva señal en 3,35 ppm que se puede asignar a las moléculas de agua de coordinación.

En el espectro de ^{13}C , la señal del grupo $-\text{COOH}$ se corre 4 ppm hacia campo bajo, como se menciona, esto es consecuencia de la disminución de la densidad electrónica sobre el C al unirse al metal en la coordinación⁴⁰.

Figura II-35. Espectro simulado de ^1H -RMN de telmisartán^{38,39}

Figura II-36. Espectro experimental de ^1H -RMN de ZnTelm en DMSO-d6

Figura II-37. Espectro simulado de ^{13}C -RMN de telmisartán ^{38,39}

Figura II-38. Espectro experimental de ^{13}C -RMN de ZnTelm.

Tabla II-15. Datos de desplazamiento químico en el RMN de ^1H de telmisartán y ZnTelm

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	
	Telmisartán (teórico)	ZnTelm (Experimental)
-CH ₃	0,99	0,97
-CH ₂	1,83	1,79
-CH ₃	2,63	2,56
DMSO-d ₆	2,5	2,5
-CH ₂	2,97	2,89
H ₂ O	-	3,35
-CH ₃	3,81	3,70
-CH ₂	5,62	5,44
Ar-H	7,18-7,71	7,01-7,69
-COOH	11,97	-

Tabla II-16. Datos de desplazamiento químico en el ^{13}C -RMN de telmisartán y ZnTelm

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	
	Telmisartán (teórico)	ZnTelm (Experimental)
CH ₃	13, 16	14, 16
CH ₂	20, 28, 46	21, 29, 46
CH ₃	31	32
C-Ar	109, 11, 118, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 130, 130, 134, 135, 136, 138, 140, 142, 142, 153, 156	111, 111, 119, 122, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 129, 129, 129, 134, 135, 139, 141, 143, 154, 156,
COOH	171	174

La caracterización del complejo obtenido entre el ion Zn(II) y el ligando telmisartán conduce a la estructura propuesta en la Figura II-39.

Figura II-39. Estructura propuesta para ZnTelm

Complejo de Zn(II) y Azilsartán

Azilsartán: características fisicoquímicas y perfil farmacológico

Azilsartán (Figura II-40) es un bloqueador del receptor de Angiotensina II, uno de los últimos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para el manejo de la hipertensión. La presentación farmacológica es su prodroga, el azilsartán medoxomil que es convertida en su forma activa, el azilsartán, por hidrólisis en el intestino durante su absorción⁴¹. Tiene alta afinidad por el receptor AT1 comparado con valsartán y olmesartán, siendo más eficaz⁴².

De acuerdo con la nomenclatura IUPAC se lo designa como ácido 2-Etoxi-1-[[2'-(5-oxo-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-4-bifenilil]metil]-1H-benzimidazol-7-carboxílico. Su fórmula molecular es $C_{25}H_{20}N_4O_5$ y su peso molecular es 456 g/mol. Es un polvo blanco cristalino. Es insoluble en H_2O , muy soluble en metanol y ligeramente soluble en acetona y en acetonitrilo. Su pKa es 6,1 y es más lipofílico que el candesartán⁴³

Figura II-40. Estructuras químicas de azilsartán (a) y azilsartán medoxomil (b)

Síntesis de $[Zn_2(Azil)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ (ZnAzil)

Para la preparación de este complejo, se disolvió 0,1 mmol de azilsartán en 10 mL de metanol, se ajustó a pH 7 con NaOH 1M y se agregó, gota a gota, 5 mL de una solución 0,1 mmol de $ZnCl_2$ en metanol, se agitó durante 10 minutos obteniendo un valor de pH final de

7. Se obtuvo una solución que luego de dos días formó un precipitado blanco, el cual se lavó con metanol, se filtró y se secó en estufa a 60°C. El contenido de Zn(II) fue determinado analíticamente mediante el uso de Zincon (ácido 2-[2-[(Z)-N-[(E)-(6-oxo-3-sulfociclohexa-2,4-dien-1-ylidene)amino]-C-fenilcarbonimidoil]hidrazinil] benzoico. Análisis elemental: Calc. Para $C_{50}H_{48}N_8O_{16}Zn_2$ (1146 g/mol): %C, 52,3; %H, 4,2 y %N, 9,8. %Zn, 11,4. Exp: %C, 52,5; %H, 4,2 y %N, 9,7; %Zn, 11,3.

Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA): bajo atmósfera de oxígeno (50 mL/min) y a una velocidad de 10 °/min se confirmó que el complejo ZnAzil perdió seis moléculas de agua en el rango de temperatura que va desde 30 °C hasta 155 °C. Simultáneamente, el DTA mostró dos picos endotérmico a 60°C y a 155°C muy ancho (Δm % calc 9,4; Δm % exp 9,3), los que se asignan a dos moléculas de agua de cristalización y cuatro de coordinación, respectivamente. El residuo final obtenido 800 °C fue de 14.3% (Calc: 14,2%), y se demuestra la presencia de ZnO por espectroscopía infrarroja.

Mediante el análisis de los datos obtenidos se propone una relación L:M 1:1 y la presencia de dos moléculas de agua de cristalización y cuatro de coordinación.

Obtención de cristales de ZnAzil

Para la obtención de cristales apropiados para determinaciones por rayos X, se usó el método de gel formando tres capas en un tubo. Para ello, en un tubo de ensayo de boca ancha se colocó en el fondo azilsartán (0,05 mmol) disuelto en metanol a pH 7 mezclado con 15 mL de gel de silicato de sodio (silicato de sodio disuelto al 5 % en agua llevado a pH 7 con HCl al 50 %) y luego de gelificar, por encima se colocó 15 mL del mismo gel sin ningún otro agregado y posteriormente se añadió $ZnCl_2$ (0,05 mmol) también disuelto en metanol en 15 mL de gel (Figura II-41). Dos meses después se obtuvieron cristales transparentes de ZnAzil.

Figura II-41. Esquema de la difusión en gel para obtención de cristales de ZnAzil.

Estudios en fase sólida

Espectroscopía FTIR

Tanto el cristal como el polvo blanco mostraron el mismo patrón espectral infrarrojo denotando que se trata del mismo compuesto. Las asignaciones se realizaron comparando con los espectros vibracionales de candesartán⁴⁴ que tiene una estructura química similar y con los espectros de compuestos con grupos 5-oxo-1,2,4-oxadiazol⁴⁵.

Las características espectrales principales se muestran en la Tabla II-17 y en la Figura II-42. El fuerte estiramiento del grupo -OH del azilsartán a 3425 cm^{-1} debido al grupo carboxílico desapareció con la coordinación. Se asigna una nueva banda de intensidad media al estiramiento del grupo OH, localizada en 3421 cm^{-1} , a las moléculas de agua de cristalización y coordinación. La ausencia de la banda en 1773 cm^{-1} en el complejo de zinc, asociada al modo de estiramiento C=O del ligando, también es indicativa de la desprotonación y/o coordinación del ácido carboxílico. Se observa disminución de intensidad y/o desplazamientos de las bandas del ligando que incluyen las vibraciones del grupo C-OH (1389 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} y 1258 cm^{-1}). Las bandas del grupo carboxilato relacionadas con los modos de estiramiento antisimétrico y simétrico se ubican a 1622 cm^{-1} y 1390 cm^{-1} , respectivamente. La diferencia $\Delta\nu = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, utilizada como criterio para establecer la coordinación del grupo COO^- al metal¹⁷ dio un valor de $\Delta\nu$ (aprox. 232 cm^{-1}) que está en concordancia con un modo de coordinación monodentado. Las bandas de estiramiento C=O del grupo oxadiazol del ligando permanecieron en la misma posición e intensidad en el complejo, lo que indica que este grupo no interactuó con el

centro metálico. La banda de estiramiento -NH del azilsartán a 3226 cm^{-1} está ausente en el complejo, lo que indica desprotonación y/o coordinación de este grupo. Las bandas que incluyen los modos vibracionales del grupo NH del ligando (1490 cm^{-1} , 1478 cm^{-1} , 1112 cm^{-1} y 1093 cm^{-1}) se presentan en el complejo con menor intensidad y ligeramente desplazadas. Estos resultados están de acuerdo con las determinaciones estructurales de rayos X y muestran que el ligando está cargado negativamente por la pérdida de dos protones en la coordinación. Además, en la región de 3200 cm^{-1} y 2600 cm^{-1} , el ligando mostró bandas fuertes y anchas debido a la formación de puentes H.

Figura II-42. Espectros FTIR de azilsartán y su complejo ZnAzil

Tabla II-17. Asignación de las bandas del espectro FTIR de azilsartán y ZnAzil. Los valores se expresan en cm^{-1}

Asignación	Azil	ZnAzil
ν O-H	3425 (f)	
ν O-H agua		3421 (m)
ν N-H	3226 (h)	
ν C=O ácido carboxílico	1773 (f)	
ν C=O oxadiazol	1692 (f)	1686 (f)
ν C=N+ ν_{as} COO ⁻	1613 (m)	1622 (f)
$\delta_{\text{en fase}}$ CCH arom + ν C=C (estiramiento anillo)	1550 (f)	1550 (mf)
ν CN en fase arom + ν CC	1519 (md)	1522 (d)
ν CC + δ CCH en fase + ν CN + $\delta_{\text{en fase}}$ (NH)	1490 (f) 1478 (f) 1468 (f)	1491 (m) 1478 (m) 1461 (h)
δ CCH en fase + ν CN + δ COH	1438 (h) 1432 (f) 1413 (h)	1463 (mf), 1452 (h) 1435 (m) 1428 (h) 1409 (h)
ν CC + δ CCH en fase + ν_{s} COO ⁻	1389 (m) 1380 (h)	1390 (mf)
CH ₂ balanceo	1354 (f)	1355 (h)
CH ₂ balanceo + CH ₂ torsión + ν C- C enlace puente bifenilo + ν CO (COH)	1280 (f) 1258 (f) 1242 (m)	1280 (m) 1243 (m)
ν CO	1160(m)	1152 (m)
δ CCH arom, CH ₂ torsión y balanceo	1146 (m)	1145 (h)
ν anillo, $\delta_{\text{en fase}}$ (C-H), $\delta_{\text{en fase}}$ (N-H)	1112 (m) 1093 (m) 1082 (d)	1116 (d) 1104 (d)
δ CCH en fase arom + respiración anillo	1044 (f)	1040 (m)
δ CCH op arom + ν NO	878 (m) 818 (m)	872 (m) 819 (m)

Abreviaturas: vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil; vw: muy débil; h, hombro. ν , estiramiento; δ , flexión;; arom, aromático; op, fuera del plano; ip, en el plano.

Difracción de Rayos X

Los datos del cristal, el procedimiento de recolección de datos, los métodos de determinación de la estructura y los resultados se resumen en la Tabla II-18.

Tabla II-18. Datos del cristal y resultados de la estructura de refinamiento para el complejo ZnAzil

=====	
Fórmula empírica	C ₅₀ H ₄₈ N ₈ O ₁₆ Zn ₂
Peso fórmula	1147,70
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
Dimensiones de la celda unidad	<i>a</i> = 15,038(1) Å <i>b</i> = 10,8207(4) Å <i>c</i> = 16,8623(9) Å β = 103,192(7)°
Volúmen	2671,4(3) Å ³
Z, densidad (calculada)	2, 1,427 Mg/m ³
Coeficiente de absorción	0,973 mm ⁻¹
F(000)	1184
Tamaño del cristal	0,297 x 0,073 x 0,033 mm ³
θ - rango para la recolección de datos	3,172 a 29,036°.
Rangos de índice	-19 ≤ <i>h</i> ≤ 20, -12 ≤ <i>k</i> ≤ 14, -12 < <i>l</i> ≤ 22
Reflexiones colectadas	13103
Reflexiones independientes	5916 [R(int) = 0,0883]
Reflexiones observadas	2894
Compleitud a θ = 67.684°	99,8 %
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados de F ²
Datos / restricciones / parámetros	5916 / 6 / 360
Bondad del ajuste en F ²	1,019
Índices R finales ^a [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	R1 = 0,0810, wR2 = 0,1998
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1803, wR2 = 0,2503
Pico dif. más grande y hueco	1,671 y -0,434 e.Å ⁻³
=====	
^a R1 = $\Sigma F_o - F_c / \Sigma F_o $, wR2 = $[\Sigma w(F_o ^2 - F_c ^2)^2 / \Sigma w(F_o ^2)^2]^{1/2}$	

Como se muestra en la Figura II-43, la molécula de ZnAzil en estado sólido es dimérica formando un complejo binuclear centrosimétrico. Las distancias de los enlaces y los ángulos alrededor del Zn(II) se detallan en la Tabla II-19. El ligando azilsartán tiene doble carga negativa por la pérdida de los protones en los grupos carboxilato terminal y oxadiazol. El metal se encuentra en un entorno distorsionado tetraédrico de ZnON (Ow) 2, coordinado a un átomo de O carboxílico de un azilsartán [*d* (Zn-O) = 1,942(4) Å], al átomo de N del oxadiazol de otro ligando invertido [*d* (Zn-N) = 1,989(5) Å] y a dos moléculas de agua [distancias de enlace Cd-Ow de 1,974(6) y 1,948(5) Å]. Los ángulos de enlace L-Zn-L están en el rango de 99,6(2) a 128,6(2)°.

Figura II-43. Estructura cristalina del complejo ZnAzil

Las distancias y los ángulos de enlace observados dentro del anión azilsartán concuerdan con las medidas correspondientes informadas para el azilsartán neutro en estado sólido⁴⁶. Como era de esperar, las principales diferencias se producen en las longitudes de los enlaces afectados por la doble desprotonación mencionada anteriormente y la unión al metal. De hecho, en el extremo carboxílico, C=O y C-OH, las distancias de unión de 1,222(4) y 1,308(4) Å en el producto farmacéutico neutro son ahora 1,224(8) y 1,277(8) Å en el grupo aniónico carboxilato del ligando coordinado al metal. En el extremo de oxadiazol, las longitudes de enlace N-C que involucran al átomo de N desprotonado coordinado al metal, que son 1,359(5) y 1,369(4) Å para azilsartán neutro, se acortan por coordinación y resonancia π del sistema aromático (1,356(8) y 1,357(8) Å) en el complejo de zinc.

Tabla II-19. Longitud de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del ion Zn(II) en complejo ZnAzil

Zn-O(1)	1,942(4)	O(1)-Zn-O(2W)	128,6(2)
Zn-N(3')	1,989(5)	O(1)-Zn-O(1W)	99,6(2)
Zn-O(1W)	1,974(6)	O(2W)-Zn-O(1W)	101,7(3)
Zn-O(2W)	1,948(5)	O(1)-Zn-N(3')	105,5(2)
		O(2W)-Zn-N(3')	109,7(2)
		O(1W)-Zn-N(3')	110,6(3)

El complejo binuclear se estabiliza aún más por un enlace intramolecular OwH.. O que implica como aceptor el otro átomo de O carboxílico [d (Ow ... O) = 2.726(8) Å, (Ow-H ... O) = 169(10) °]. La estructura de enlaces de H se detalla en la Tabla II-20

Tabla II-20. Distancias de enlace de hidrógeno (Å) y ángulos (°) para el complejo ZnAzil

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1W)-H(1A)...O(3W)	0,86(1)	2,1(1)	2,672(8)	126(11)
O(1W)-H(1B)...O(5)#1	0,86(1)	1,89(3)	2,714(7)	159(6)
O(2W)-H(2A)...N(1)#2	0,86(1)	1,87(3)	2,722(7)	169(15)
O(2W)-H(2B)...O(2)#3	0,86(1)	1,88(2)	2,726(8)	169(10)

Transformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes: (#1) x+1/2, -y+1/2, z+1/2; (#2) x, y+1, z; (#3) -x+1, -y+1, -z+1.

Estudios en solución

Espectroscopía UV y estabilidad

Se obtuvo el espectro electrónico de soluciones 1×10^{-5} M de azilsartán y ZnAzil en DMSO (Figura II-44). En el ligando, las bandas se observaron a 258 nm, 270 nm y 305 nm ($\epsilon = 1,61 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹, $\epsilon = 1,63 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ y $\epsilon = 8,5 \times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹, respectivamente). Debido a la presencia de grupos aromáticos y los altos valores de absorptividad molar las transiciones electrónicas observadas se asignaron a tránsitos de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. En el complejo de Zn(II) se mantuvo sin desplazamientos la banda a 258 nm ($\epsilon = 2,18 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹) pero la banda de 280 nm ($\epsilon = 1,31 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹) aumentó su intensidad y la de 315 nm ($\epsilon = 1,06 \times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹) disminuyó notoriamente, indicando la interacción con el centro metálico.

Figura II-44. Espectros UV de azilsartán (a) y el complejo ZnAzil (b) disueltos en DMSO.

Así mismo, la estabilidad del complejo ZnAzil en solución fue medida por espectroscopía electrónica durante 90 minutos (Figura II-45) y se observó que las bandas características no modificaron apreciablemente sus valores de absorbancia, indicando la estabilidad del complejo al menos durante la manipulación de su disolución.

Figura II-45. Espectros UV. Determinación de la estabilidad del complejo ZnAzil durante 90 minutos

Conductividad

Como soporte para establecer la estabilidad del compuesto, se estudió la variación de la conductividad molar en el tiempo de una solución de complejo 1×10^{-3} M en DMSO y en 0,5% de DMSO en agua. Durante 4 horas los valores de conductividad se mantuvieron constantes. Los bajo valores de conductividad y la constancia indican la no disociación del complejo manteniéndose estable en el tiempo (Tabla II-21). Estos datos fueron consistentes con los estudios de espectroscopia electrónica.

Tabla II-21. Conductancia molar de soluciones de ZnAzil en ^aDMSO y ^b0.5% DMSO en H₂O

t (min)	ZnAzil ^a	ZnAzil ^b
5	25	15
10	25	15
15	23	15
20	23	14
30	24	13
60	24	13
120	24	12
180	22	12
240	21	13

Espectroscopía de fluorescencia

Se midieron los espectros de fluorescencia de las soluciones de azilsartán y ZnAzil a una concentración de 1×10^{-5} M en DMSO (Figura II-46). Ambos compuestos presentan fluorescencia debido a la presencia de grupos bifenilo y benzimidazol. La longitud de onda de excitación es de 295 nm y la emisión es de 336 nm para ambos compuestos, sin embargo, la diferencia de intensidad observada radica en que la coordinación retarda el proceso de decaimiento de fluorescencia³⁷

Figura II-46. Espectros de fluorescencia de azilsartán y ZnAzil

La caracterización fisicoquímica del complejo ZnAzil, junto con las determinaciones estructurales por rayos X, permiten proponer la estructura del complejo descrita en la Figura II-43 y en la Figura II-47.

Figura II-47. Estructura del complejo ZnAzil

Conclusión

Se prepararon cinco nuevos complejos de coordinación entre sartanes y el ión Zn(II): $[Zn(LoS)_2] \cdot 3H_2O$, $[ZnCand(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$, $[ZnVals(H_2O)_2]$, $[Zn(Telm)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$, $[Zn_2(Azil)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$. Las estequiometrias fueron determinadas por análisis elementales y el contenido de agua por estudios termogravimétricos y de análisis térmico diferencial. En estado sólido, se determinó el modo de coordinación al metal por espectroscopía infrarroja analizando los cambios observados por coordinación de los modos de vibración principales de los grupos funcionales, lo que fue corroborado por estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de los complejos disueltos en DMSO- d_6 . Asimismo, y en solución, los espectros electrónicos permitieron determinar que no hay cambios notables en la posición de las bandas de transferencia de carga de los ligandos y sólo se observa alguna variación de intensidades relativas por coordinación. Lo que puede observarse en las determinaciones de espectros UV, es que las intensidades de las bandas de absorción en general duplican las del ligando cuando la relación metal:ligando es 1:2 y se mantienen

similares para relaciones M:L 1:1. Por medidas de conductividad molar, se confirmó que los compuestos actúan como no electrolitos en solución, por lo que no se descomponen al disolver. Las medidas por espectroscopía de fluorescencia permitieron determinar que se produce interacción entre los ligandos y el metal. Por medidas en el tiempo de las variaciones de conductividad y espectroscopía electrónica de los complejos disueltos se demostró que los complejos no se descomponen al menos en el tiempo de manipulación previo a las determinaciones biológicas. Se concluye que los complejos presentan esferas de coordinación tetraédricas para losartán (2N, 2O), candesartán (N,3O) valsartán (N,3O) y azilsartán (N,3O) entre los grupos funcionales de los ligandos y/o agua de coordinación y sólo en el caso de telmisartán se determinó una coordinación octaédrica (6O). Sólo en los casos de losartán y telmisartán el metal coordina con dos ligandos. En el resto de los complejos la relación ligando:metal observada es 1:1.

Referencias

1. Al-Majed ARA, Assiri E, Khalil NY, Abdel-Aziz HA. Losartan: comprehensive profile. *Profiles Drug Subst Excipients Relat Methodol.* 2015;40:159-194. doi:10.1016/bs.podrm.2015.02.003
2. Goa KL, Wagstaff AJ. Losartan Potassium: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs.* 1996;51(5):820-845. doi:10.2165/00003495-199651050-00008
3. Bonfílio R, Mendonça TF, Pereira GR, De Araújo MB, Tarley CRT. Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using hplc and uv spectrophotometry. *Quim Nova.* 2010;33(2):377-383. doi:10.1590/S0100-40422010000200026
4. Moreno A, Mendoza ME. Crystallization in gels. *Handb Cryst growth.* 2014;2:1277-1315. doi:10.1016/B978-0-444-63303-3.00031-6
5. Arend H, Connelly JJ. Tetramethoxysilane as gel forming agent in crystal growth. *J Cryst Growth.* 1982;56(3):642-644. doi:10.1016/0022-0248(82)90048-3
6. Goyal R, Nagpal M, Arora S, Dhingra GA. Development and optimization of fast dissolving tablets of losartan potassium using natural gum mucilage. *J Pharm Technol Res Manag.* 2015;1(2):153-169. doi:10.15415/jptrm.2013.12009
7. Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Barrio D a, Lezama L, Rojo T, Williams P. Losartan and its interaction with copper(II): biological effects. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(19):6418-6424. doi:10.1016/j.bmc.2007.06.056
8. Farrugia LJ. ORTEP-3 for windows - A version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI). *J Appl Crystallogr.* 1997;30(5):565-568. doi:10.1107/S0021889897003117
9. Kumar S, Singh SP. Spectroscopy of Organic Compounds. *Guru Nanak Dev Univ.* 2006;66:1-36.
10. Pawar HA, Lalitha KG. Development and validation of a novel RP-HPLC method for estimation of losartan potassium in dissolution samples of immediate and sustained release tablets. *Chromatogr Res Int.* 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/736761
11. Vink H. Electrolytic conductivity of mixed electrolyte solutions. *Phys Chem.* 1994;98(8):1039-1045. doi:10.1002/bbpc.19940980808
12. De Oliveira Rossini P, Felix FS, Angnes L. A simple and precise conductometric method for the determination of losartan in pharmaceutical products. *Cent Eur J Chem.* 2012;10(6):1842-1849. doi:10.2478/s11532-012-0110-6
13. Gusev A, Braga E, Shul'gin V, Lyssenko K, Eremenko I, Samsonova L, Degtyarenko K, Kopylova T, Linert W. Luminescent properties of Zn and Mg complexes on N-(2-carboxyphenyl)salicylideneimine basis. *Materials.* 2017;10(897):1-10. doi:10.3390/ma10080897
14. Singh B, Lokhandae RS, Dwivedi A, Sharma S, Dubey N. Improved simultaneous quantitation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by UPLC-MS/MS and its application in bioequivalence studies. *J Pharm Anal.* 2014;4(2):144-152. doi:10.1016/j.jpha.2013.05.003
15. Cagigal E, González L, Alonso R., Jiménez R. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;26(3):477-486. doi:10.1016/S0731-7085(01)00413-7
16. Islas MS, Rojo T, Lezama L, Merino MG, Cortes MA, Puyol MR, Ferrer EG, Williams PAM. Improvement of the antihypertensive capacity of candesartan and trityl candesartan by their SOD mimetic copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2013;123:23-33. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.02.005

17. Deacon G. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. *Coord Chem Rev.* 1980;33(3):227-250. doi:10.1016/S0010-8545(00)80455-5
18. Savic IM, Nikolic GS, Savic IM, Cakic MD. Conductometric studies on the stability of copper complexes with different oligosaccharides. *Cent Eur J Chem.* 2010;8(5):1078-1085. doi:10.2478/s11532-010-0082-3
19. Ali I, Wani WA, Saleem K. Empirical formulae to molecular structures of metal complexes by molar conductance. *Synth React Inorganic, Met Nano-Metal Chem.* 2013;43(9):1162-1170. doi:10.1080/15533174.2012.756898
20. Zhao J, Zhao D, Chen S, Zhang J, Hu J. The tetrazole-carboxylate bifunctional ligand directed three structural diversity complexes. *Inorganica Chim Acta.* 2015;428:112-116. doi:10.1016/j.ica.2015.01.028
21. Raman B, Sharma BA, Mahale G, Singh D, Kumar A. Investigation and structural elucidation of a process related impurity in candesartan cilexetil by LC/ESI-ITMS and NMR. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;56(2):256-263. doi:10.1016/j.jpba.2011.05.024
22. Lachowicz JI, Nurchi VM, Crisponi G, Jaraquemada-Pelaez MDG, Caltagirone C, Peana M, Zoroddu MA, Szewczuk Z, Cooper GJS. Complex formation equilibria of Cu²⁺ and Zn²⁺ with Irbesartan and Losartan. *Eur J Pharm Sci.* 2017;97:158-169. doi:10.1016/j.ejps.2016.11.010
23. De Oliveira RS, Boffo EF, Reis FCC, Nikolaou S, Andriani KF, Caramori GF, Doro FG. A ruthenium polypyridyl complex with the antihypertensive drug valsartan: Synthesis, theoretical calculations and interaction studies with human serum albumin. *Polyhedron.* 2016;114:232-241. doi:10.1016/j.poly.2015.12.029
24. Siddiqui N, Husain A, Chaudhry L, Alam SS, Mitra M, Bhasin PS. Pharmacological and pharmaceutical profile of valsartan: a review. *J Appl Pharm Sci.* 2011;1(4):12-19.
25. Ardiana F, Suciati, Indrayanto G. Valsartan. *Profiles Drug Subst Excipients Relat Methodol.* 2015;40:431-493. doi:10.1016/bs.podrm.2015.01.004
26. Etcheverry SB, Di Virgilio AL, Nascimento OR, Williams P a M. Dinuclear copper(II) complexes with valsartan. Synthesis, characterization and cytotoxicity. *J Inorg Biochem.* 2012;107(1):25-33. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.10.005
27. Ekawa B, Nunes WDG, Teixeira JA, Cebim MA, Ionashiro EY, Junior Caires F. New complexes of light lanthanides with the valsartan in the solid state: thermal and spectroscopic studies. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2018;135:299-309. doi:10.1016/j.jaap.2018.08.023
28. Modh PH, Vora JJ. Synthesis, spectral, thermal, anti microbial and catalytic activity of Zn²⁺ and Cd²⁺ chelates with valsartan. *Int J Pharma Bio Sci.* 2014;5(2):383-389.
29. Bajju GD, Sharma P, Kapahi A, Bhagat M, Kundan S, Gupta D. Oxovanadium(IV) Complexes with nitrogen donors: synthesis, characterization, and biological activities. *J Inorg Chem.* 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/982965
30. Li F, Zhang H, Jiang L, Zhang W, Nie J, Feng Y, Yang M, Liu M. Dynamic NMR study and theoretical calculations on the conformational exchange of valsartan and related compounds. *Magn Reson Chem.* 2007;45(11):929-936. doi:10.1002/mrc.2072
31. Lin S-J, Hong T-N, Tung J-Y, Chen J-H. Molecular Structures of Ge(tpp)(OAc)₂ and In(tpp)(OAc) and Their Implications: Correlations between the ¹³C NMR Chemical Shift of the Acetato Ligand and Different Types of Carboxylate Coordination in M(por)(OAc)_n. *Inorg Chem.* 2002;36(18):3886-3891. doi:10.1021/ic961304i
32. McInnes G. 24-Hour powerful blood pressure-lowering: is there a clinical need? *J Am Soc Hypertens.*

- 2008;2(4):16-22.
doi:10.1016/j.jash.2008.03.004
33. Stangier J, Schmid J, Türck D, Switek H, Verhagen A, Peeters PAM, van Marle SP, Tamminga WJ, Sollie FAE. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [¹⁴C]telmisartan in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2000;40(12 I):1312-1322.
doi:10.1177/009127000004001202
 34. Bakheit AHH, Abd-Elgalil A a., Mustafa B, Haque A, Wani T a. Telmisartan. 2015:371-429.
doi:10.1016/bs.podrm.2015.01.003
 35. Islas MS, Martínez Medina JJ, López Tévez LL, Rojo T, Lezama L, Griera Merino M, Calleros L, Cortes MA, Rodriguez Puyol M, Echeverría GA, Piro OE, Ferrer EG, Williams PAM. Antitumoral, antihypertensive, antimicrobial, and antioxidant effects of an octanuclear copper(II)-telmisartan complex with an hydrophobic nanometer hole. *Inorg Chem*. 2014;53(11):5724-5737. doi:10.1021/ic500483p
 36. Bano S, Mohd A, Aslam A, Khan P, Siddiqi KS. Complexation and mechanism of fluorescence quenching of telmisartan with Y (III) and Nd (III). *J Chem Eng Data*. 2010;55:5759-5765. doi:10.1021/je100711u
 37. Zhao J, Zhao D, Guo Y, Peng K, Li X, Chen S, Hu J. Photoluminescence properties of three d10 complexes constructed from the bifunctional benzimidazole-carboxylate-based connector. *Inorganica Chim Acta*. 2014;418:8-14.
doi:10.1016/j.ica.2014.04.011
 38. Bakheit AHH, Abd-Elgalil A a., Mustafa B, Haque A, Wani T a. Telmisartan. *Profiles Drug Subst Excipients Relat Methodol*. 2015;40:371-429.
doi:10.1016/bs.podrm.2015.01.003
 39. Kumar AS, Ghosh S, Mehta GN. Efficient and improved synthesis of Telmisartan. *Beilstein J Org Chem*. 2010;6:1-5.
doi:10.3762/bjoc.6.25
 40. Domiano P, Pelizzi C, Predieri G, Vignalli C, Palla G. Aroylhydrazones as chelating agents: d10-metal complexes of pyridine-2-carbaldehyde salicyloylhydrazone and x-ray structure of the zinc derivative. *Polyhedron*. 1984;3(3):281-286.
doi:10.1016/S0277-5387(00)88108-5
 41. U.S. Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and research review(s). NDA 200-796: azilsartan medoxomil. *Clin Pharmacol Biopharm*. 2011:1-128.
 42. Zaiken K, Cheng JWM. Azilsartan medoxomil: a new angiotensin receptor blocker. *Clin Ther*. 2011;33(11):1577-1589.
doi:10.1016/j.clinthera.2011.10.007
 43. Jassem NA, Rajab NA. Formulation and in vitro evaluation of azilsartan medoxomil nanosuspension. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2017;9(7):110.
doi:10.22159/ijpps.2017v9i7.18917
 44. Islas MS, Franca C a., Etcheverry SB, Ferrer EG, Williams P a M. Computational study and spectroscopic investigations of antihypertensive drugs. *Vib Spectrosc*. 2012;62:143-151.
doi:10.1016/j.vibspec.2012.04.009
 45. Hemming K. 1,2,4-Oxadiazoles. *Compr Heterocycl Chem III*. 2008;9:243-314.
doi:10.1016/B978-008044992-0.00504-6
 46. Ge Y, Li T, Cheng J. Crystal type I of azilsartan polymorphs: preparation and analysis. *J Cryst Process Technol*. 2016;06(01):1-10.
doi:10.4236/jcpt.2016.61001

CAPÍTULO III

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Introducción

En este capítulo se evalúan las actividades antiproliferativas de los ligandos y se comparan con la de los complejos así como con la sal ZnSO_4 . Así mismo, se determina la acción de los compuestos sobre la generación de estrés oxidativo. También, se estudia el mecanismo de acción de muerte celular.

Ensayo de viabilidad celular: Ensayo de MTT

Se realizó el ensayo de viabilidad celular usando las líneas A549 y MRC-5 luego de ser tratadas por 24hs con diferentes concentraciones de ZnSO_4 , de ligandos (losartán, candesartán, valsartán, telmisartán, azilsartán) y sus complejos de Zn(II) .

Efectos del ZnSO_4

La línea tumoral A549 fue tratada con concentraciones crecientes (0-500 μM) de ZnSO_4 durante 24 hs. Luego del ensayo de MTT, se determinó que el tratamiento con ZnSO_4 hasta una concentración de 100 μM no afectó a la viabilidad celular, sin embargo a concentraciones de 250 μM y 500 μM redujo la viabilidad un 40 y 25% respectivamente respecto al control (la concentración necesaria para inhibir un 50 % del crecimiento celular, $\text{IC}_{50} = 221 \pm 25 \mu\text{M}$) (Figura III-1a). El efecto de la exposición a Zn exógeno en células A549 produce un incremento en apoptosis, inhibición de crecimiento y alteración del estrés oxidativo y este comportamiento coincide con previos reportes^{1,2}.

La línea normal MRC-5 fue tratada en las mismas condiciones y se pudo observar que el ZnSO_4 incrementa la proliferación celular hasta 25 μM y luego decrece en forma dosis-dependiente ($\text{IC}_{50} = 374 \mu\text{M}$) (Figura III-1b). Como todo metal esencial, el ión Zn^{2+} a bajas concentraciones es esencial para mantener los procesos celulares y el metabolismo; sin embargo, Zn^{2+} en una concentración alta puede resultar tóxico por la producción de estrés oxidativo que conduce a la muerte celular in vitro³.

Complejo de Zn (II) con Losartán (ZnLos)

La línea celular A549 fue tratada con concentraciones crecientes (0-500 μM) de Losartán y ZnLos durante 24 hs. En el ensayo de viabilidad celular (MTT) muestra que en el losartán no se observó citotoxicidad hasta una concentración de 250 μM donde la viabilidad solo se redujo un 4%, no obstante, a 500 μM , un 63% de células lograron sobrevivir. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores^{4,5}. El complejo ZnLos declinó la viabilidad

celular en forma dosis-dependiente. El efecto citotóxico fue significativo partir de 75 μM donde la inhibición fue de 80% y conforme aumentaba la concentración, la reducción fue de 36% y 32% para 250 μM y 500 μM respectivamente siendo su $\text{IC}_{50} = 200 \pm 12,56 \mu\text{M}$ (Figura III-1a).

En la línea celular MRC-5, los compuestos losartán y ZnLos resultaron ser poco citotóxicos (Figura III-1b). Este comportamiento fue previamente observado en otros fibroblastos normales de piel⁶.

Figura III-1. Efecto de diferentes concentraciones del ZnSO_4 (verde), losartán (azul) y ZnLos (rojo) sobre la viabilidad celular de la línea A549 (a) y MRC-5 (b). *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Por lo tanto, queda demostrado que la complejación de losartán con Zn(II) le otorga al fármaco propiedades citotóxicas sobre células tumorales y atenúa los efectos tóxicos del Zn(II) hasta 250 μM sobre células normales.

Complejo de Zn(II) con Candesartán (ZnCand)

Para evaluar el efecto citotóxico de candesartán y su complejo ZnCand, se ensayaron los compuestos hasta concentraciones de 200 μM durante 24hs.

En la línea tumoral A549, el ligando no mostró efecto significativo sobre la proliferación celular tal como se ha reportado previamente⁷, sin embargo, el complejo ZnCand, a partir de 80 μM comenzó a afectar significativamente la viabilidad (25% de inhibición). El decrecimiento fue en forma de dosis dependiente llegando a inhibir un 38% y un 73% para concentraciones de 160 y 200 μM , respectivamente ($\text{IC}_{50} = 175 \pm 3.2 \mu\text{M}$) (Figura III-2a).

En la línea MRC-5, ninguno de los tres compuestos afectaron significativamente la viabilidad celular, siendo el ligando y el complejo menos tóxicos que la sal de zinc (Figura III-2b).

Figura III-2. Efecto de diferentes concentraciones del ZnSO_4 (verde), candesartán (azul) y ZnCand (rojo) sobre la viabilidad celular de la línea A549 (a) y MRC-5 (b). *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0.05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0.05$.

De lo observado anteriormente, la complejación de candesartán con Zn(II) le concedió al ligando actividad citotóxica sobre la línea A549, más potente que la sal de Zn. En células no malignas, el complejo resultó tener baja toxicidad.

Complejo de Zn(II) con Valsartán (ZnVals)

La evaluación del efecto citotóxico del valsartán y su complejo de ZnVals , se llevó a cabo ensayando los compuestos de 0 a 500 μM durante 24hs.

En las células A549, valsartán desde la concentración 2,5 μM hasta 100 μM demostró favorecer la proliferación celular, estos resultados coinciden con un estudio realizado anteriormente⁸, este ligando tampoco mostró cambios significativos a mayores concentraciones.

El complejo ha demostrado disminuir la viabilidad a medida que aumenta la concentración teniendo un efecto citotóxico más potente que el metal a bajas concentraciones ($< 100 \mu\text{M}$). A partir de 250 μM , tanto el metal como el complejo tienen comportamiento similar ($\text{IC}_{50} = 220 \pm 15,7 \mu\text{M}$) (Figura III-3a).

Sobre la línea normal MRC-5, valsartán nuevamente demostró inducir proliferación a bajas concentraciones. Mientras que el complejo redujo la viabilidad alrededor de un 20% al igual que el metal (<100 μM). Hacia altas concentraciones, tanto el ligando como el complejo indujeron similar toxicidad leve (Figura III-3b).

Figura III-3. Efecto de diferentes concentraciones del ZnSO₄ (verde), valsartán (azul) y ZnVals (rojo) sobre la viabilidad celular de la línea A549 (a) y MRC-5 (b). *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

De lo anteriormente evaluado, la formación del complejo ZnVals generó efectos citotóxicos sobre el ligando precursor los cuales fueron más efectivos que en el caso del metal. Asimismo, este complejo ha demostrado tener baja toxicidad en células normales.

Complejo de Zn(II) con Telmisartán (ZnTelm)

Para examinar la citotoxicidad de telmisartán y ZnTelm, los compuestos se probaron hasta la concentración de 100 μM durante 24hs.

Como se observa en la Figura III-4a, telmisartán ejerce un efecto citotóxico en función de la dosis llegando a dejar viables un 50% de las células a 100 μM . Estos datos son consistentes con investigaciones previas^{4,9}. Cuando las células fueron tratadas con ZnTelm, se detectó que concentraciones mayores a 65 μM provocaron una marcada disminución de la viabilidad comparado con el ligando, $\text{IC}_{50} = 75 \pm 8,1 \mu\text{M}$.

Sobre la línea normal MRC-5 (Figura III-4b), se aprecia que tanto telmisartán como ZnTelm no exhibieron cambios significativos sobre la viabilidad celular.

Figura III-4. Efecto de diferentes concentraciones del ZnSO_4 (verde), telmisartán (azul) y ZnTelm (rojo) sobre la viabilidad celular de la línea A549 (a) y MRC-5 (b). *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que la formación del complejo de telmisartán con Zn(II) logra reducir significativamente la población celular tumoral en comparación con su ligando parental y ventajosamente, este complejo así como el ligando no ejercieron efectos citotóxicos sobre las células normales.

Complejo de Zn(II) con Azilsartan (ZnAzil)

Las células A549 expuestas a concentraciones entre 0 y 500 μM tanto de ligando como de complejo durante 24 hs mostraron que azilsartán no indujo citotoxicidad alguna, excepto a 500 μM donde se vieron afectadas un 20% de células. El complejo ZnAzil redujo la viabilidad en forma dosis-dependiente, a 25 μM se observó que redujo un 65% de la viabilidad y posteriormente se redujo a 21% a 500 μM , su IC_{50} fue $155 \pm 12 \mu\text{M}$ (Figura III-5a). Existe además una mayor citotoxicidad a concentraciones $< 100 \mu\text{M}$ respecto tanto del ligando con de la sal de zinc.

En la línea celular MRC-5, los compuestos ejercieron una leve actividad citotóxica a partir de 250 μM como se puede apreciar en Figura III-5b. Similares resultados se han obtenidos para una línea tumoral y normal tratadas con azilsartán¹⁰.

Figura III-5. Efecto de diferentes concentraciones del ZnSO_4 (verde), azilsartán (azul) y ZnAzil (rojo) sobre la viabilidad celular de la línea A549 (a) y MRC-5 (b). *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Al formar un complejo de coordinación entre Zn(II) y azilsartán, se potencia la actividad principalmente a bajas concentraciones, el nuevo complejo resultó tener mejor actividad que el metal en sí mismo y con escaso efecto tóxico sobre las células normales.

Conclusiones sobre el ensayo de viabilidad celular

Los nuevos complejos presentaron un incremento de actividad citotóxica respecto a la sal de Zn y al ligando precursor. Asimismo, se demostró que tienen actividad selectiva sobre las células tumorales ya que no afectaron en forma significativa las células normales. Los valores de IC_{50} se muestran en la Tabla III-1. De los todos los complejos obtenidos, ZnTelm fue quien tiene menor IC_{50} , por lo que se podría considerar como el agente citotóxico más efectivo.

Tabla III-1. Tabla comparativa con los valores IC_{50} de los ligandos, sus complejos y la sal de ZnSO_4 evaluada sobre la línea celular A549 durante 24hs.

Compuestos	IC_{50} (μM)	Compuestos	IC_{50} (μM)
Losartán	>500	ZnLos	$200 \pm 12,56$
Candesartán	>200	ZnCand	$175 \pm 3,2$
Valsartán	>500	ZnVals	$220 \pm 15,7$
Telmisartán	>100	ZnTelm	$75 \pm 8,1$
Azilsartán	>500	ZnAzil	155 ± 12
ZnSO_4	221 ± 25		

Mecanismo de acción

Las células cancerígenas poseen alteraciones en las proteínas involucradas en la señalización de la muerte celular y son, a menudo, resistentes a los agentes quimioterapéuticos. Una forma de diseñar una estrategia antineoplásica es estimulando a la célula a que desencadene la muerte celular programada.

Las células tumorales requieren niveles moderados de EROs para la activación del receptor tirosina quinasas y factores de crecimiento, que promueven la progresión y proliferación del ciclo celular¹¹. Está bien establecido que algunos agentes quimioterapéuticos y la radioterapia generan especies reactivas de oxígeno (EROs) en pacientes durante la terapia contra el cáncer¹². Los radicales libres, particularmente las EROs, se han propuesto como mediadores comunes para la apoptosis. La producción excesiva de EROs cambia el equilibrio en el estado redox y desencadena daño de los componentes celulares como DNA, proteínas y lípidos¹³.

Además, ciertos agentes inhiben las enzimas encargadas de biosintetizar glutatión (GSH), un tripéptido endógeno con grupo tiol capaz de proteger a las células contra las EROs. No obstante, la disminución de GSH está estrechamente relacionada con la inducción apoptótica en la mayoría de los casos y la relación con su producto de oxidación, glutatión oxidado (GSSG), GSH/GSSG puede ser una buena medida del estado redox celular¹⁴.

Altos niveles de EROs pueden dañar la membrana mitocondrial lo que conlleva la liberación de citocromo C, cambios en la conformación de proteínas anti y pro-apoptóticas con la consecuente activación de caspasas y clivaje de ADN en el núcleo, efectuando así, el mecanismo de apoptosis intrínseca¹⁵. También es posible, dependiendo del tipo celular, del agente y si se ha generado una masiva concentración de EROs, que la respuesta de muerte sea necrosis o una combinación de necrosis y apoptosis.

A pesar que generalmente se observa incremento de EROs en la progresión de la apoptosis, existen ciertos agentes en cuyos mecanismos de acción, las EROs se mantienen en concentraciones cercanas a las basales o disminuyen por debajo del requisito necesario para la supervivencia de la célula tumoral, induciendo de esta forma, también la muerte celular¹⁶.

En esta sección, se estudian los mecanismos de acción por los cuales los ligandos, la sal ZnSO_4 y los complejos de Zn(II) inducen la muerte celular.

Estrés oxidativo

Con el fin de determinar el posible mecanismo de acción, se determinó si el ligando, metal y complejo eran capaces de provocar muerte por estrés oxidativo, para ello se midió la generación de especies reactivas del oxígeno, la cantidad de GSH y GSSG y se calculó la relación GSH/GSSG. Además se midió el contenido proteico (mg de proteínas) para normalizar la cantidad de células por cada experimento.

Los niveles de EROs se determinaron fluorométricamente usando la sonda dihidrorodamina 123 (DHR 123) o la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). Para el contenido de GSH y GSSG se usó la técnica modificada de Hissin¹⁷. En los extractos celulares se midió la cantidad de proteínas mediante la técnica de Bradford¹⁸.

Apoptosis

Para evaluar si el mecanismo de muerte se produjo por apoptosis o necrosis, se efectuaron dos ensayos: uno por microscopía de fluorescencia usando la doble tinción naranja de acridina y bromuro de etidio donde se pudieron diferenciar los diferentes estadios de senescencia en conjunto con la morfología celular y por western blot para observar la expresión de las proteínas pro-apoptótica Bax, anti-apoptótica Bcl-xL y caspasas (3 o 9).

Mecanismo de acción del complejo ZnLos

Generación de especies reactivas del oxígeno

Inicialmente se midieron los niveles basales de EROs de las células MRC-5 y A549; se halló que el contenido de especies oxidantes de la línea tumoral supera casi el doble (1539 ± 35 IF/mg proteínas) al de la línea normal (809 ± 73 IF/mg proteínas), medidas que coinciden con la literatura donde está claramente dilucidado que el entorno fisiológico celular normal, posee un sistema enzimático que elimina las EROs¹⁹.

Posteriormente, se detectó y cuantificó la generación de especies reactivas en la línea tumoral A549 luego de incubar por 24 hs a diferentes concentraciones (0-500 μ M) de losartán, ZnSO₄ y ZnLos.

Los resultados demostraron que ZnSO₄ actúa como inductor del estrés oxidativo incrementando la producción de EROs en forma dosis dependiente, lo que explica la disminución de la viabilidad celular comentada (Figura III-7).

El tratamiento con losartán disminuye levemente la producción de EROs sin afectar la viabilidad celular como se comentó anteriormente. Estudios previos mostraron que este compuesto suprime la generación de EROs sobre modelos celulares no tumorales²⁰. En la evaluación del complejo ZnLos, este demostró incrementar las EROs con respecto al valor basal (Figura III-6).

*Figura III-6. Efecto de ZnSO₄, losartán y ZnLos sobre la producción de EROs. Los valores se expresan como porcentaje del basal y representan el promedio $\pm$ SEM *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.*

Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

Para ahondar sobre la participación de los EROs en la muerte celular, se midieron los niveles de GSH y se estimó la relación GSH/GSSG en los tres compuestos a las mismas concentraciones evaluadas para la generación de EROs.

Los niveles de GSH y la relación GSH/GSSG aumentaron a concentraciones bajas de ZnSO₄, alcanzando su máximo a concentraciones de ZnSO₄ de 25 μM y disminuyeron a concentraciones más altas. Esta disminución ha sido previamente reportada (hasta 100 μM)²¹ y está en concordancia con el aumento de la generación celular de EROs y la disminución de la viabilidad celular (Figura III-7).

Figura III-7. Comparación de los efectos producidos por $ZnSO_4$ sobre la viabilidad celular, la generación de EROs y la relación GSH/GSSG

Losartán produjo una leve disminución en el contenido de GSH pero no ejerció efectos significativos sobre la relación GSH/GSSG. En tumores miocárdicos ha demostrado ejercer el mismo efecto reductivo²². El complejo ZnLos generó un decrecimiento significativo de los niveles de GSH así como la relación GSH/GSSG y estos datos coinciden con la producción concomitante de EROs (Figura III-8).

Figura III-8. (a) μg de glutatión reducido (GSH) por mg de proteína y (b) relación GSH/GSSG como porcentaje referido al basal en la línea celular A549 luego del tratamiento a diferentes concentraciones de $ZnSO_4$ (verde), losartán (azul) y ZnLos (rojo) por 24hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Estos resultados sugieren que la producción de EROs tiene un rol importante en la inducción de muerte celular por parte del complejo ZnLos ya que es capaz de generar un desbalance del estado redox celular.

Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio

La doble tinción fluorescente con naranja de acridina y bromuro de etidio permite detectar células viables, apoptóticas y necróticas. Células vivas aparecen color verde con su morfología característica, células en apoptosis temprana (AT_e) muestran núcleo redondeando verde brillante y citoplasma verde/amarillo y en apoptosis tardía (AT_a) de color naranja con núcleo condensado y fragmentado. Células en necrosis aparecen rojas.

Las células tratadas con losartán (Figura III-9) afectaron levemente la viabilidad, entre las afectadas se pudo observar que éstas se encontraban en apoptosis temprana. El tratamiento con la sal de zinc a 500 μ M mantuvo viables aproximadamente un 33% de células (Tabla III-2), de las cuales la forma de muerte que predominó fue la necrosis (38%), la apoptosis tardía apareció en un 28%. Sin embargo, el tratamiento con el complejo generó muerte celular por apoptosis tardía principalmente.

Figura III-9 (a) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de células tratadas con 500 μ M de ZnSO₄, losartán y ZnLos durante 24hs teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio. Control (-): DMSO 0,5% Control (+) H₂O₂ 1%. Células vivas (V), apoptosis temprana (AT_e), apoptosis tardía (AT_a) y necrosis (N). Magnificación 40x. (b) Representación del porcentaje de células en diferentes estadios.

Tabla III-2. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO₄, losartán y ZnLos. Control + 1% H₂O₂; Control-, 0,5% DMSO.

	Células vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control +	3,452 ± 0,345	49,378 ± 0,324	42,46 ± 3,64	4,44 ± 1,873
Control -	98,95 ± 1,232	1,12 ± 0,654		
ZnSO₄	33,2 ± 5,876		28,5 ± 4,833	38,3 ± 3,521
Losartán	70,43 ± 3,72	29,57 ± 1,456		
ZnLos	35,71 ± 2,94		59,52 ± 1,543	4,76 ± 1,2

Western blot de proteínas apoptóticas

Adicionalmente, se estudió la expresión o inhibición de las proteínas pro y anti-apoptóticas Bax y Bcl-xL, respectivamente. Se observó que la relación Bax y Bcl-xL es significativamente mayor en las células que han sido expuestas al complejo ZnLos que en

las células tratadas con ZnSO_4 . El tratamiento con losartán causó una baja relación BAX/Bcl-xL, lo que resultó coincidente con experimentos anteriores²³ (Figura III-10).

Figura III-10. (a) Western blot representativos de la expresión de Bax y Bcl-xL correspondientes a células tratadas con 500 μM de ZnSO_4 , losartán y ZnLos durante 24hs. Control negativo: 0,5% DMSO. Los ensayos se realizaron por triplicado. β -actina fue usado como control interno para normalizar. (b) Relación Bax/Bcl-xL obtenidos del análisis de densitometría de bandas. #Diferencias significativas entre losartán, ZnSO_4 , ZnLos a la misma concentración $p < 0,05$

Así, de acuerdo a lo estudiado se observa que la respuesta celular al tratamiento del complejo ZnLos se desencadena mediante una secuencia de eventos bioquímicos que comienzan con alteración del equilibrio redox celular con la consecuente disminución del GSH y posterior activación de los mediadores de la señalización apoptótica como Bax e inhibición de la expresión de Bcl-xL.

Mecanismo de acción del complejo ZnCand

Generación de especies reactivas del oxígeno

Se evaluó la generación de especies reactivas por parte de candesartán, ZnSO_4 y ZnCand a concentraciones entre 0 y 200 μM sobre las células A549.

Tanto con el ligando como el complejo mantuvieron las EROs por debajo de los niveles basales, a 200 μM disminuyeron entre 33% y un 25% respectivamente (Figura III-11). El resultado obtenido para el ligando es coincidente con previos estudios donde candesartán ha demostrado atenuar el estrés oxidativo en células cancerígenas²⁴. La disminución del estrés oxidativo como se mencionó más arriba, puede promover la disfunción mitocondrial y desencadenar la apoptosis²⁵.

Figura III-11. Efecto de ZnSO_4 , candesartán y ZnCand sobre la producción de EROs usando la sonda H_2DCFDA . Los valores se expresan como porcentaje del basal representan el promedio $\pm$ SEM *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo con el metal a la misma concentración (250 μM) $p < 0,05$.

Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

En la Figura III-12 se puede observar que los niveles de GSH y la relación GSH/GSSG aumentaron significativamente luego del tratamiento con candesartán y ZnCand. De acuerdo con estudios previos, en células que han perdido las defensas antioxidantes intrínsecas, situación que sucede en las células tumorales, candesartán tiene capacidad de modificar el estado redox celular ya que induce un aumento en los valores de GSH y GSH/GSSG²⁶.

Figura III-12. (a) μg de glutatión reducido (GSH) por mg de proteína y (b) relación GSH/GSSG como porcentaje referido al basal en la línea celular A549 luego del tratamiento a diferentes concentraciones de ZnSO₄ (verde), candesartán (azul) y ZnCand (rojo) por 24hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Medición de potencial de membrana mitocondrial

La mitocondria es una organela especial dentro de la célula ya que contiene su propio ADN. Dentro de las células, tiene funciones bien caracterizadas como el metabolismo energético, la homeostasis del calcio, la regulación redox y la apoptosis. Debido a que un nivel adecuado de ATP celular y el equilibrio redox son esenciales para la viabilidad y proliferación celular, atacar farmacológicamente a las mitocondrias causando una disfunción que afectara a toda la célula tumoral, sería una estrategia atractiva para la terapia contra el cáncer²⁷.

Como en el tratamiento con los complejos ZnCand y ZnVals (ver la sección siguiente) se encontró una disminución en las EROs, para estudiar el mecanismo de acción, se midió el potencial de membrana mitocondrial.

En la Figura III-13 se observa el comportamiento del potencial de membrana cuando las células A549 fueron tratadas con concentraciones crecientes de ZnSO_4 , candesartán y ZnCand. El ZnSO_4 causó despolarización mitocondrial evidenciado por la disminución del potencial de membrana, siendo estos datos consistentes con resultados previamente reportados²⁸.

El candesartán no tuvo efecto alguno. Se ha estudiado que este fármaco, preserva la función mitocondrial²⁹. Contrario al metal y al ligando, el complejo incrementa el potencial de membrana indicando que se produce hiperpolarización mitocondrial hasta 160 μM , posterior a esta concentración, se produce un descenso rápido de estos valores. La hiperpolarización mitocondrial se asocia a la activación de la vía apoptótica dependiente de las mitocondrias, que inicialmente implica una hiperpolarización transitoria seguida de una despolarización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c desde las mitocondrias hacia el citosol que posteriormente activará las caspasas³⁰.

Figura III-13. Variación del potencial de membrana mitocondrial (% $\Delta\psi$) en células A549 tratadas con concentraciones crecientes de ZnSO_4 (verde), candesartán (azul) y ZnCand (rojo) por 24hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio

Para estudiar el modo de muerte celular, se trabajó a la concentración del $IC_{50} = 175 \mu M$ de ZnCand y se comparó con las mismas concentraciones del ligando y metal. Los porcentajes de muerte celular se correspondieron con lo medido por el ensayo de MTT. Las células tratadas con candesartán no mostraron signos de muerte (Figura III-14). La tinción de las células tratadas con $175 \mu M$ $ZnSO_4$ arrojó un 26% de células en apoptosis temprana y un 3% de células necrosadas (Tabla III-3). El complejo ZnCand generó 42% de células en apoptosis tardía que presentaron condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos (células en color naranja) y 1% de necrosis (células rojas).

Figura III-14. (a) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de células tratadas con $175 \mu M$ de $ZnSO_4$, candesartán y ZnCand durante 24hs teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio. Control (-): DMSO 0,5% Control (+) H_2O_2 1%. Células vivas (V), apoptosis temprana (AT_e), apoptosis tardía (AT_a) y necrosis (N). Magnificación 40x. (b) Representación del porcentaje de células en diferentes estadios. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$ #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Tabla III-3. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO₄, candesartán y ZnCand. Control + 1% H₂O₂; Control-, 0,5% DMSO.

	Células vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control +	3,452 ± 0,345	49,378 ± 0,324	42,46 ± 3,64	4,44 ± 1,873
Control -	98,95 ± 1,232	1,12 ± 0,654		
ZnSO₄	70,3 ± 7,43		26,38 ± 7,54	3,32 ± 2,53
Candesartán	95,2 ± 5,72	4,8 ± 3,231		
ZnCand	56,65 ± 4,98		42,35 ± 1,543	1,82 ± 1,872

Western blot de proteínas apoptóticas

Por western blot, se evaluó la expresión de las proteínas regulatorias de la apoptosis a concentraciones equivalentes a las del IC₅₀ de ZnCand. Como se muestra en la Figura III-15, la expresión de Bax y caspasa-9 en las células A549 tratadas con ZnCand aumentó considerablemente y la expresión de Bcl-xL se redujo, por lo tanto la relación Bax/Bcl-xL resultó incrementada con respecto al control. Esto confirma que la muerte celular provocada por el complejo ZnCand es por apoptosis. Durante la apoptosis tardía, la enzima caspasa-9 se mantiene activa³¹, dato que coincide con la morfología celular observada. Con respecto al candesartán, mostró sus propiedades antiapoptóticas, estimulando la expresión de Bcl-xL y provocando el efecto contrario sobre Bax y caspasa-9, evento similar hallado en estudios previos donde se demostró que este fármaco reducía la apoptosis arrojando un pequeño número de células en apoptosis temprana^{32,33}.

Figura III-15. Western blot representativos de la expresión de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 correspondientes a células tratadas con 175 μM de ZnSO_4 , candesartán y ZnCand durante 24hs. Control negativo: 0,5% DMSO. Los ensayos se realizaron por triplicado. β -actina fue usado como control interno para normalizar. (b) Relación Bax/Bcl-xL obtenidos del análisis de densitometría de bandas. (c) Densitometría de las bandas #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Estos resultados sugieren que el complejo a altas concentraciones se comporta como antioxidante, disminuyendo el estrés oxidativo, lo que altera la membrana mitocondrial por una hiperpolarización transitoria seguida de una disminución en el potencial de membrana, evento que precede a la muerte celular apoptótica³⁴. Sustenta este mecanismo, no solo la expresión elevada de Bax y caspasa-9 así como la disminución de Bcl-xL, sino que también la morfología celular apoptótica característica observada por fluorescencia.

Mecanismo de acción del complejo ZnVals

Generación de especies reactivas del oxígeno

La producción de EROs por parte de las células A549 fue medida luego de ser tratadas con concentraciones de 0 a 500 μM de ZnSO_4 , valsartán y ZnVals. El tratamiento con el ligando disminuyó los niveles de radicales libres, al igual que candesartán. Ese resultado concuerda con los reportes donde valsartán suprime la generación de especies reactivas del oxígeno^{35,36} y se comporta como un agente antioxidante³⁷. El complejo ZnVals, redujo marcadamente los niveles de EROs en las células A549 (Figura III-16).

Figura III-16. Efecto de ZnSO₄, valsartán y ZnVals sobre la producción de EROs usando la sonda H₂DCFDA. Los valores se expresan como porcentaje del basal representan el promedio $\pm$ SEM *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo con el metal a la misma concentración $p < 0,05$.

Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

Los niveles de GSH y GSSG fueron determinados luego de tratar las células tumorales con concentraciones crecientes (0-500 μ M) de valsartán y ZnVals. Tanto valsartán como ZnVals provocaron un aumento del contenido de GSH a medida que incrementaba la concentración. Sin embargo, para valsartán, la relación GSH/GSSG se mantuvo casi constante pero se observó que a concentraciones mayores a 250 μ M, experimentó un leve incremento. Valsartán ha demostrado restaurar los valores de GSH en células tumorales cuando se produce una reducción de los mismos³⁸, esto podría deberse a que impide la degradación y mejora la actividad de la glutatión reductasa, enzima encargada de reconvertir el GSSG a GSH³⁹. El cociente GSH/GSSG determinado para el complejo, mostró un marcado aumento a partir de 100 μ M (Figura III-17).

Figura III-17. (a) μg de glutatión reducido (GSH) por mg de proteína y (b) relación GSH/GSSG como porcentaje referido al basal en la línea celular A549 luego del tratamiento a diferentes concentraciones de ZnSO_4 (verde), valsartán (azul) y ZnVals (rojo) por 24hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Medición de potencial de membrana mitocondrial

Las células A549 tratadas con concentraciones crecientes de ZnVals demostraron incrementar el potencial de membrana mitocondrial (hiperpolarización) hasta una concentración 100 μM . A concentraciones mayores, disminuye gradualmente pero permanece en niveles mayores que el basal. El valsartán disminuyó el potencial mitocondrial y a medida que se aumentó la concentración se restauraron los niveles basales. Estos datos coinciden con un estudio reciente donde este fármaco mejora la función mitocondrial³⁹ (Figura III-18).

Figura III-18. Variación del potencial de membrana mitocondrial ($\% \Delta \psi$) en las células A549 tratadas con concentraciones crecientes de ZnSO_4 (verde), valsartán (azul) y ZnVals (rojo) por 24hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio

Mediante la doble tinción se determinó el modo de muerte celular provocada por el metal y el complejo. Se usó el IC_{50} del ZnVals como concentración de estudio para los tres compuestos. Como se ve en la Figura III-19, las células tratadas con valsartán se tiñen de color verde brillante, además se puede observar que estas se encuentran en mitosis ya que se aprecia la separación de cromosomas, por lo tanto se puede inferir que el ligando tiene carácter proliferativo sobre esta línea. En el caso del ZnSO_4 , a una concentración de 220 μM (cercana a su IC_{50}), se vio que era citotóxico para un 45% de las células y coincide con los valores arrojados por el ensayo de MTT. El principal modo de muerte fue por apoptosis temprana (34%) y en menor medida, por necrosis (11%). Por otra parte, el complejo demostró que la apoptosis tardía fue el principal mecanismo de muerte celular ya que la tinción reveló una coloración naranja intensa acompañada de morfología característica como protuberancias en la membrana, cuerpos apoptóticos y contracción celular (Tabla III-4)

Figura III-19. (a) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de células tratadas con 220 μ M de ZnSO₄, valsartán y ZnVals durante 24hs teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio. Control (-): DMSO 0,5% Control (+) H₂O₂ 1%. Células vivas (V), apoptosis temprana (AT_e), apoptosis tardía (AT_a) y necrosis (N). Magnificación 40x. (b) Representación del porcentaje de células en diferentes estadios. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$ #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Tabla III-4. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO₄, valsartán y ZnVals. Control + 1% H₂O₂; Control-, 0,5% DMSO.

	Células vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control +	3,452 ± 0,345	49,378 ± 0,324	42,46 ± 3,64	4,44 ± 1,873
Control -	98,95 ± 1,232	1,12 ± 0,654		
ZnSO₄	55,23 ± 4,07	34,11 ± 3,41		11,11 ± 2,53
Valsartán	95,2 ± 5,72	4,8 ± 3,231		
ZnVals	48,92 ± 4,78		50,93 ± 6,245	2,01 ± 1,28

Western blot de proteínas apoptóticas

Para estudiar en profundidad el mecanismo molecular de muerte celular, se analizó por western blot la activación o inhibición de caspasa 9 y la regulación de la familia de las proteínas Bcl-2.

Los resultados mostraron que valsartán previene la muerte por apoptosis ya que disminuye la expresión de las caspasa 9 y aumenta Bcl-xL disminuyendo la relación Bax/Bcl-xL (Figura III-20). El efecto de este fármaco de evitar la progresión de la apoptosis por inhibición de la actividad de algunas caspasas, como por ejemplo, las caspasas 3, 8 y 9⁴⁰, y disminución de la expresión de Bax y estimulación de la expresión de Bcl-xL había sido reportado previamente⁴¹. Por el contrario, el complejo resultó ser inductor de apoptosis, intensificando la expresión de caspasa 9 y Bax e incrementando la relación Bax/Bcl-xL.

Figura III-20. (a) Western blot representativos de la expresión de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 correspondientes a células tratadas con 220 μ M de ZnSO₄, valsartán y ZnVals durante 24hs. Control negativo: 0,5% DMSO. Los ensayos se realizaron por triplicado. β -actina fue usado como control interno para normalizar. (b) Relación Bax/Bcl-xL obtenidos del análisis de densitometría de bandas. (c) Densitometría de las bandas. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Al igual que el complejo anterior, el nuevo complejo ZnVals es capaz de lograr depleción en el estrés oxidativo generando un desbalance redox celular, lo que induce una disfunción mitocondrial y desencadena la muerte celular por apoptosis. Efecto opuesto al de su ligando predecesor, quien ha demostrado disminuir las EROs sin afectar la viabilidad celular. Está claramente dilucidado que el valsartán, sin bien puede actuar como un agente antioxidante, es un potente inhibidor de la apoptosis^{42,43}. Por lo tanto, la modificación estructural del valsartán por formación de un complejo de coordinación con Zn(II), logró conferirle al fármaco propiedades citotóxicas antitumorales.

Mecanismo de acción del complejo ZnTelm

Generación de especies reactivas del oxígeno

Se observó que los compuestos tienen el potencial de inducir la producción de EROs en células A549 de una manera dependiente de la dosis (0-100 μ M) como se muestra en la Figura III-21. Estos datos están de acuerdo con otros hallazgos en los que el telmisartán desencadena la formación de EROs en líneas celulares de leucemia⁴⁴. Sin embargo, se encontró que en el tratamiento con la dosis IC₅₀ de ZnTelm (75 μ M), el nivel de EROs intracelular aumentó significativamente en comparación con la misma concentración de telmisartán.

Figura III-21. Efecto de ZnSO₄, telmisartán y ZnTelm sobre la producción de EROs usando la sonda H₂DCFDA. Los valores se expresan como porcentaje del basal representan el promedio $\pm$ SEM *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo con el metal a la misma concentración $p < 0,05$.

Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

Se midieron los niveles de GSH y GSSG ya que los mismos pueden ser usados como marcadores de estrés oxidativo. El tratamiento con telmisartán y ZnTelm provocó una disminución de los niveles de GSH en forma dosis dependiente (0-100 μ M); sin embargo, las células tratadas con ZnTelm disminuyeron el contenido de GSH y la relación GSH/GSSG en concentraciones más bajas que el telmisartán (Figura III-22a y 20b). Esta disminución coincide con la producción de EROs por ambos compuestos. Estudios previos evidenciaron que telmisartán es capaz de reducir el contenido de GSH⁴⁵.

Figura III-22. (a) Contenido de glutati3n reducido (GSH) (b) relaci3n GSH/GSSG como porcentaje referido al basal en la l3nea celular A549 luego del tratamiento a diferentes concentraciones de ZnSO₄ (verde), telmisart3n (azul) y ZnTelm (rojo) por 24hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentraci3n $p < 0,05$.

Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio

Para determinar si la muerte celular inducida por ZnTelm se logr3 mediante apoptosis, se realiz3 una tinci3n fluorescente doble con naranja de acridina y bromuro de etidio. Se seleccion3 la dosis del IC₅₀ para ZnTelm y la misma concentraci3n de ligando y metal para comparar y dilucidar los mecanismos de muerte celular. Como se observa en la Figura III-23, el tratamiento con ZnSO₄ a 75 μM no mostr3 efecto significativo en la inducci3n de la apoptosis y las c3lulas se mantuvieron vivas con una morfolog3a normal. Las c3lulas tratadas con telmisart3n 75 μM indujeron una muerte celular del 39%, con un 6% de apoptosis temprana, 16 % apoptosis tard3a y 20% de necrosis (Tabla III-5). La acci3n del complejo ZnTelm logr3 generar 48 % de c3lulas viables, 29% de c3lulas en la apoptosis temprana, 20% de apoptosis tard3a y 1% de necrosis. Del mismo modo, para el tratamiento con ZnTelm, fue posible observar gr3nulos rojos correspondientes a los lisosomas, que est3n involucrados en el inicio de la apoptosis⁴⁶. Estudios previos mostraron que el telmisart3n media frecuencias bajas de eventos apopt3ticos tempranos y tard3os contra c3lulas cancerosas renales en concentraciones m3s altas (100 y 200 μM)^{47,48}. En las c3lulas A549 se observaron cambios morfol3gicos apopt3ticos t3picos que incluyen la aparici3n de ampollas en la membrana, cuerpos apopt3ticos granulares y contracci3n celular en respuesta al tratamiento con ZnTelm.

Figura III-23. (a) Imágenes representativas obtenidas por microscopia de fluorescencia de células tratadas con 220 μM de ZnSO_4 , telmisartán y ZnTelm durante 24hs teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio. Control (-): DMSO 0,5% Control (+) H_2O_2 1%. Células vivas (V), apoptosis temprana (AT_e), apoptosis tardía (AT_a) y necrosis (N). Magnificación 40x. (b) Representación del porcentaje de células en diferentes estadios. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$ #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Tabla III-5. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO₄, telmisartán y ZnTelm. Control + 1% H₂O₂; Control-, 0,5% DMSO.

	Células vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control +	3,452 ± 0,345	49,37 ± 0,324	42,46 ± 3,64	4,44 ± 1,873
Control -	98,95 ± 1,23	1,12 ± 0,654	--	--
ZnSO₄	89,3 ± 2,06	10,69 ± 2,08	--	--
Telmisartán	56,39 ± 0,98	5,93 ± 0,81	16,72 ± 0,78	20,85 ± 2,348
ZnTelm	48,32 ± 2,98	29,76 ± 3,98	20,23 ± 3,72	1,72 ± 0,449

Western blot de proteínas apoptóticas

Se estudiaron las vías de señalización de apoptosis en células A549, incluidas las proteínas pro-apoptóticas Bax y caspasa-3 y la proteína anti-apoptótica Bcl-xL. La expresión de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-3 y Bax aumentó en las células tratadas con ZnTelm en comparación con el grupo de control, telmisartán y ZnSO₄, mientras que la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL disminuyó (Figura III-24). Se observó que la relación Bax/Bcl-xL incrementa significativamente en el tratamiento con ZnTelm. Estos resultados indican que ZnTelm promueve la apoptosis en las células A549. En estudios anteriores, también se observó que el tratamiento con telmisartán produjo reducción de la expresión de Bcl-xL⁴⁷ y un incremento de la caspasa-3, resultando ser un estimulador de apoptosis.

Figura III-24. (a) Western blot representativos de la expresión de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 correspondientes a células tratadas con 220 μM de ZnSO_4 , telmisartán y ZnTelm durante 24hs. Control negativo: 0,5% DMSO. Los ensayos se realizaron por triplicado. β -actina fue usado como control interno para normalizar. (b) Relación Bax/Bcl-xL obtenidos del análisis de densitometría de bandas. (c) Densitometría de las bandas. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

En conjunto, estos datos sugieren que el estrés oxidativo juega un papel clave sobre los efectos tóxicos del fármaco comercial y el complejo. El mecanismo principal de la muerte celular A549 producida por el tratamiento con ZnTelm es la apoptosis temprana. En contraste, el tratamiento con telmisartán sugiere principalmente un mecanismo de muerte celular necrótica. Se puede concluir que la combinación entre Zn(II) y un fármaco antihipertensivo con propiedades antitumorales comprobadas como lo es el telmisartán puede causar efectos sinérgicos que potencien la actividad anticancerígena en el nuevo compuesto.

Mecanismo de acción del complejo ZnAzil

Generación de especies reactivas del oxígeno

Los niveles de EROs en células A549 tratadas con ZnAzil aumentaron notablemente en forma dependiente de la dosis (0-250 μM). El incremento de EROs producido por ZnSO_4 fue menor que el del complejo. El azilsartán produjo estrés oxidativo celular significativo a concentraciones superiores a 150 μM . Esto concuerda con investigaciones anteriores, donde azilsartán incrementó la producción de EROs a partir de 100 μM ¹⁰. Los resultados del ensayo de EROs se muestran en la Figura III-25.

Figura III-25. Efecto de ZnSO_4 , azilsartán y ZnAzil sobre la producción de EROs usando la sonda H_2DCFDA . Los valores se expresan como porcentaje del basal representan el promedio $\pm$ SEM *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo con el metal a la misma concentración $p < 0,05$.

Determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

En la Figura III-26 se puede ver que los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG disminuyeron significativamente luego del tratamiento con ZnAzil, lo que sugiere que este compuesto indujo el agotamiento de GSH con el correspondiente incremento de GSSG a medida que aumenta la producción de EROs. De manera similar, se encontró una pequeña disminución en los niveles de GSH y en las proporciones de GSH/GSSG para el azilsartán. El mismo comportamiento pudo ser visualizado en experimentos reportados⁴⁹

Figura III-26. (a) Contenido de glutatión reducido (GSH) (b) relación GSH/GSSG como porcentaje referido al basal en la línea celular A549 luego del tratamiento a diferentes concentraciones de ZnSO₄ (verde), azilsartán (azul) y ZnAzil (rojo) por 24 hs. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M de seis mediciones en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Ensayo de Naranja de acridina y Bromuro de etidio

Para explorar los mecanismos subyacentes en el modo de muerte celular, se analizaron los efectos del azilsartán, ZnSO₄ y ZnAzil mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio (Figura III-27, Tabla III-6). Esta técnica reveló que el tratamiento con ZnAzil (155 μ M) dejó 50% de las células vivas, un 49% de las células apoptóticas de las cuales 22% estaban en apoptosis temprana y 27% en apoptosis tardía y al 1% de las células necróticas, mientras que el ligando (155 μ M) indujo solo al 3% de las células apoptóticas y mantuvo vivo el 97% restante. El tratamiento con ZnSO₄ a la misma concentración generó el 16% de células en apoptosis tardía. En el tratamiento con ZnAzil se observaron cambios morfológicos compatibles con el mecanismo apoptótico (condensación de la cromatina, la contracción celular y la formación de cuerpos apoptóticos), en comparación con el control y el tratamiento con azilsartán.

Figura III-27. (a) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de células tratadas con 220 μM de ZnSO_4 , azilsartán y ZnAzil durante 24 hs teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio. Control (-): DMSO 0,5% Control (+) H_2O_2 1%. Células vivas (V), apoptosis temprana (AT_e), apoptosis tardía (AT_a) y necrosis (N). Magnificación 40x. (b) Representación del porcentaje de células en diferentes estadios. *Diferencias significativas con respecto al basal para $p < 0,05$ #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Tabla III-6. Porcentaje de células vivas y muertas por ZnSO_4 , azilsartán y ZnAzil Control + 1% H_2O_2 ; Control-, 0,5% DMSO.

	Células vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control +	$3,452 \pm 0,345$	$49,37 \pm 0,324$	$42,46 \pm 3,64$	$4,44 \pm 1,873$
Control -	$98,95 \pm 1,23$	$1,12 \pm 0,654$		
ZnSO_4	$82,3 \pm 6,42$	$16,75 \pm 3,78$		$0,95 \pm 1,33$
Azilsartán	$97,2 \pm 4,22$	$2,8 \pm 3,1$		
ZnAzil	$48,82 \pm 4,18$	$22,28 \pm 7,19$	$27,36 \pm 1,543$	$1,54 \pm 1,872$

Western blot de proteínas apoptóticas

Se midieron los efectos de soluciones de concentraciones 155 μM de ZnSO_4 , azilsartán y ZnAzil en los niveles de expresión de las proteínas de señalización Bax, Bcl-xL y caspasa 9. Como se muestra en la Figura III-28, ZnAzil elevó significativamente la expresión de Bax y Caspasa 9 en células A549 en comparación con el control. El nivel de expresión de Bax y Caspasa 9 en el tratamiento con ZnSO_4 fue ligeramente superior al del control. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las expresiones de Bax y caspasa 9 en las células tratadas con azilsartán en comparación con el control. Este resultado se condice con la literatura donde azilsartán impide la progresión de la apoptosis⁵⁰.

El nivel de expresión de Bcl-xL se redujo en las células tratadas con ZnAzil y se encontró un ligero aumento después del tratamiento con azilsartán. Se calcularon los cocientes Bax/Bcl-xL y muestran que aumentó significativamente en las células A549 tratadas con ZnAzil.

Figura III-28. (a) Western blot representativos de la expresión de Bax, Bcl-xL y caspasa 9 correspondientes a células tratadas con 155 μ M de ZnSO₄, azilsartán y ZnAZil durante 24hs. Control negativo: 0,5% DMSO. Los ensayos se realizaron por triplicado. β -actina fue usado como control interno para normalizar. (b) Relación Bax/Bcl-xL obtenidos del análisis de densitometría de bandas. (c) Densitometría de las bandas #Diferencias significativas entre ligando, metal y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Estos datos sugieren que el complejo ZnAzil podría hacer que las células se vuelvan más vulnerables al estrés oxidativo y producir un desequilibrio en el entorno intracelular redox. La generación de EROs puede causar una serie de efectos celulares como la escisión del ADN y el daño oxidativo de diferentes componentes celulares y, finalmente, desencadenar la apoptosis.

Conclusiones sobre la actividad antitumoral

Los efectos citotóxicos de los fármacos resultaron mejorados cuando se modifican sus estructuras por complejación. Los complejos provocaron muerte celular por medio de la activación la vía intrínseca de la apoptosis ya que alteraron el estado redox celular, ya sea incrementando las EROs como en el caso de ZnLos, ZnTelm y ZnAzil o bien disminuyendo el nivel de estos y afectando la integridad mitocondrial como lo hicieron ZnCand y ZnVals.

Las células normales tienen cantidades de EROs más bajas que las tumorales y mantienen producción y eliminación de EROs constante para mantener el balance redox favorable (homeostasis redox), manteniendo la célula viable y funcional. Los cinco complejos de Zn obtenidos produjeron pequeñas disminuciones en la viabilidad celular de las células de fibroblastos de pulmón, mostrando especificidad en la citotoxicidad contra células de cáncer.

Por el contrario, las células tumorales presentan mayores niveles de EROs que las normales debido a su mayor actividad metabólica y las EROs a su vez son las responsables de mantener el fenotipo de cáncer. El incremento de las EROs en las células de cáncer de pulmón producido por los complejos ZnLos, ZnTelm y ZnAzil generó la disminución del sistema antioxidante natural, GSH (que ayuda a proteger las células contra las EROs) y de la relación con su producto de oxidación, GSH/GSSG y este desbalance produjo estrés oxidativo y apoptosis. Sin embargo, es reconocido que ambos extremos de balance redox pueden causar daño celular. Tanto el estrés oxidativo como el reductivo incrementan la muerte celular. En el caso de los complejos ZnCand y ZnVals se observó disminución de las EROs celulares, acompañado del incremento de GSH y del cociente GSH/GSSG, generando una reducción del estrés oxidativo. En estos casos el potencial de membrana mitocondrial aumentó, conduciendo nuevamente al aumento de las proteínas reguladoras de apoptosis caspasas y Bax y reducción de la expresión de Bcl-xL, produciendo muerte celular por apoptosis tardía⁵¹.

En la Figura III-29 se ilustran los posibles mecanismos de acción de los complejos.

Figura III-29. Mecanismos de acción propuestos para ZnLos, ZnTelm y ZnAzil (izquierda) y para ZnCand y ZnVals (derecha).

Referencias

1. Zhao WJ, Song Q, Zhang ZJ, Mao L, Zheng WJ, Hu X, Lian H. The kinetic response of the proteome in A549 cells exposed to ZnSO₄ stress. *PLoS One*. 2015;10(7):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0133451
2. Kocdor H, Ates H, Aydin S, Cehreli R, Soyarat F, Kemanli P, Harmanci D, Cengiz H, Kocdor M. Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3899-3909. doi:10.2147/DDDT.S87662
3. Ng CT, Yong LQ, Hande MP, Ong CN, Yu LE, Bay BH, Baeg GH. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1621-1637. doi:10.2147/IJN.S124403
4. Godugu C, Patel AR, Doddapaneni R, Marepally S, Jackson T, Singh M. Inhalation delivery of telmisartan enhances intratumoral distribution of nanoparticles in lung cancer models. *J Control Release*. 2013;172(1):86-95. doi:10.1016/j.jconrel.2013.06.036s
5. Xia T, He Q, Shi K, Wang Y, Yu Q, Zhang L, Zhang Q, Gao H, Ma L, Liu J. Losartan loaded liposomes improve the antitumor efficacy of liposomal paclitaxel modified with pH sensitive peptides by inhibition of collagen in breast cancer. *Pharm Dev Technol*. 2018;23(1):13-21. doi:10.1080/10837450.2016.1265553
6. Amri MA, Firdaus MAB, Fauzi MB, Chowdhury SR, Fadilah NR, Wan Hamirul WK, Reusmaazran MY, Aminuddin BS, Ruszymah BHI. Cytotoxic evaluation of biomechanically improved crosslinked ovine collagen on human dermal fibroblasts. *Biomed Mater Eng*. 2014;24(4):1715-1724. doi:10.3233/BME-140983
7. Rasheduzzaman M, Park SY. Antihypertensive drug-candesartan attenuates TRAIL resistance in human lung cancer via AMPK-mediated inhibition of autophagy flux. *Exp Cell Res*. 2018;368(1):126-135. doi:10.1016/j.yexcr.2018.04.022
8. Shen L, Zhang T, Lu H. Overexpression of AGT promotes bronchopulmonary dysplasia via the JAK/STAT signal pathway. *Oncotarget*. 2017;8(56):96079-96088. doi:10.18632/oncotarget.21712
9. Li J, Chen L, Yu P, Liu B, Zhu J, Yang Y. Telmisartan exerts anti-tumor effects by activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Molecules*. 2014;19(3):2862-2876. doi:10.3390/molecules19032862
10. Ahmadian E, Khosroushahi AY, Eftekhari A, Farajnia S, Babaei H, Eghbal MA. Novel angiotensin receptor blocker, azilsartan induces oxidative stress and NFkB-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:939-946. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.117
11. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GRS, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(19):8788-8793. doi:10.1073/pnas.1003428107
12. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*. 2004;3(4):294-300. doi:10.1177/1534735404270335
13. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, Castro J De, Espinosa E, Redondo A, Sereno M, García-Cabezas MÁ, Vara JAF, Domínguez-Cáceres A, Perona R, González-Barón M. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control*. 2004;15(7):707-719. doi:10.1023/B:CACO.0000036189.61607.52
14. Halprin KM, Ohkawara A. The

- measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. *J Invest Dermatol.* 1967;48(2):149-152. doi:10.1038/jid.1967.24
15. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):323-333. doi:10.1016/S0891-5849(00)00302-6
16. Jeong C-H, Joo SH. Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *J Cancer Prev.* 2016;21(1):13-20. doi:10.15430/jcp.2016.21.1.13
17. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
19. Kaushik N, Uddin N, Sim GB, Hong YJ, Baik KY, Kim CH, Lee SJ, Kaushik NK, Choi EH. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Sci Rep.* 2015;5:1-11. doi:10.1038/srep08587
20. Zawada WM, Banninger GP, Thornton J, Marriott B, Cantu D, Rachubinski AL, Das M, Griffin WST, Jones SM. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *J Neuroinflammation.* 2011;8(129):1-13. doi:10.1186/1742-2094-8-129
21. Yuan N, Wang Y-H, Li K-J, Zhao Y, Hu X, Mao L, Zhao W-J, Lian H-Z, Zheng W-J. Effects of exogenous zinc on the cellular zinc distribution and cell cycle of A549 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(11):2014-2020. doi:10.1271/bbb.120216
22. Stevens SCW, Velten M, Youtz DJ, Clark Y, Jing R, Reiser PJ, Bicer S, Devine RD, McCarthy DO, Wold LE. Losartan treatment attenuates tumor-induced myocardial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;85:37-47. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.05.007
23. Sun L, Wang W, Xiao W, Liang H, Yang Y, Yang H. Angiotensin II induces apoptosis in intestinal epithelial cells through the AT2 receptor, GATA-6 and the Bax pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(4):663-668. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.003
24. Uemura H, Ishiguro H, Ishiguro Y, Hoshino K, Takahashi S, Kubota Y. Angiotensin II Induces Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res.* 2008;6(2):250-258. doi:10.1158/1541-7786.mcr-07-0289
25. Lin B, Tan X, Liang J, Wu S, Liu J, Zhang Q, Zhu R. A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep.* 2014;4(7041):1-7. doi:10.1038/srep07041
26. Macconi D, Remuzzi G. Candesartan and renal protection: More than blocking angiotensin type 1 receptor? *Kidney Int.* 2008;74(9):1112-1114. doi:10.1038/ki.2008.420
27. Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med Chem.* 2013;5(1):53-67. doi:10.4155/fmc.12.190
28. Rudolf E, Rudolf K, Cervinka M. Zinc induced apoptosis in HEP-2 cancer cells: The role of oxidative stress and mitochondria. *BioFactors.* 2005;23(2):107-120. doi:10.1002/biof.5520230206
29. De Cavanagh EMV, Toblli JE, Ferder L, Piotrkowski B, Stella I, Fraga CG, Inserra F. Angiotensin II blockade improves mitochondrial function in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Biol.* 2005;51(6):573-578. doi:10.1170/T665
30. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol*

- Rev. 2007;87(1):99-163.
doi:10.1152/physrev.00013.2006
31. Chandra D, Tang DG. Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. Lack of evidence for Apaf-1-mediated procaspase-9 activation in the mitochondria. *J Biol Chem.* 2003;278(19):17408-17420. doi:10.1074/jbc.M300750200
 32. Kabel AM, Elkhoely AA. Ameliorative effect of coenzyme Q10 and/or candesartan on carboplatin-induced nephrotoxicity: Roles of apoptosis, transforming growth factor-B1, nuclear factor kappa-B and the Nrf2/HO-1 pathway. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2017;18(6):1629-1636. doi:10.22034/APJCP.2017.18.6.1629
 33. Lv J, Jia R, Yang D, Zhu JL, Ding G. Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(1):81-86. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.035
 34. Kim JM, Bae HR, Park BS, Lee JM, Ahn HB, Rho JH, Yoo KW, Park WC, Rho SH, Yoon HS, Yoo YH. Early mitochondrial hyperpolarization and intracellular alkalization in lactacystin-induced apoptosis of retinal pigment epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305(2):474-481. doi:10.1124/jpet.102.047811
 35. Dandona P, Kumar V, Aljada A, Ghanim H, Syed T, Hofmayer D, Mohanty P, Tripathy D, Garg R. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor- κ B, in mononuclear cells of normal subjects: Evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4496-4501. doi:10.1210/jc.2002-021836
 36. Jiao B, Wang Y, Cheng Y, Gao J, Zhang Q. Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF- β 1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels. *Biosci Trends.* 2011;5(4):173-181. doi:10.5582/bst.2011.v5.4.173
 37. Monacelli F, Poggi A, Storace D, Durante A, Traverso N, Viviani GL, Odetti P. Effects of valsartan therapy on protein glycoxidation. *Metabolism.* 2006;55(12):1619-1624. doi:10.1016/j.metabol.2006.07.024
 38. Ibrahim DM, Radwan RR, Abdel Fattah SM. Antioxidant and antiapoptotic effects of sea cucumber and valsartan against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: The role of low dose gamma irradiation. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;170:70-78. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.03.022
 39. Imran M, Hassan MQ, Akhtar MS, Rahman O, Akhtar M, Najmi AK. Sacubitril and valsartan protect from experimental myocardial infarction by ameliorating oxidative damage in Wistar rats. *Clin Exp Hypertens.* 2019;41(1):62-69. doi:10.1080/10641963.2018.1441862
 40. Deng X, Xia K, Chen P, Ali Sheikh MS, Yang D-F, Li S-M, Yang T-L. Reversion of left ventricle remodeling in spontaneously hypertensive rats by valsartan is associated with the inhibition of caspase-3, -8 and -9 activities. *Biomed Reports.* 2015;3(4):533-536. doi:10.3892/br.2015.458
 41. Bin W, Tao Y, Hongjia Z, Guo Q, Lian Y, Ouyang Q. Effects of valsartan on monocrotaline-induced right ventricular-pulmonary arterial uncoupling. *Int J Clin Exp Med.* 2018;11(2):603-611.
 42. Wang ZC, Qi J, Liu LM, Li J, Xu HY, Liang B, Li B. Valsartan reduces AT1-AA-induced apoptosis through suppression oxidative stress mediated ER stress in endothelial progenitor cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(5):1159-1168.
 43. Wu B, Lin R, Dai R, Chen C, Wu H, Hong M. Valsartan attenuates oxidative stress and NF- κ B activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2013;705(1-3):140-147. doi:10.1016/j.ejphar.2013.02.036
 44. Kozako T, Soeda S, Yoshimitsu M, Arima

- N, Kuroki A, Hirata S, Tanaka H, Imakyure O, Tone N, Honda S, Soeda S. Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan induces apoptosis and autophagy in adult T-cell leukemia cells. *FEBS Open Bio*. 2016;6(5):442-460. doi:10.1002/2211-5463.12055
45. Patel BM, Damle D. Combination of telmisartan with cisplatin controls oral cancer cachexia in rats. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/642848
 46. Brunk UT, Neuzil J, Eaton JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep*. 2001;6(2):91-97. doi:10.1179/135100001101536094
 47. de Araújo Júnior RF, Leitão Oliveira ALC, de Melo Silveira RF, de Oliveira Rocha HA, de França Cavalcanti P, de Araújo AA. Telmisartan induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human renal cancer cells. *Exp Biol Med*. 2015;240(1):34-44. doi:10.1177/1535370214546267
 48. Mielczarek-Putka M, Otto-Ślusarczyk D, Chrzanowska A, Filipiek A, Graboń W. Telmisartan influences the antiproliferative activity of linoleic acid in human colon cancer cells. *Nutr Cancer*. 2019;16:1-12. doi:10.1080/01635581.2019.1613552
 49. Li YW, Li YM, Hon Y, Wan QL, He RL, Wang ZZ, Zhao CH. AT1 receptor modulator attenuates the hypercholesterolemia-induced impairment of the myocardial ischemic post-conditioning benefits. *Korean Circ J*. 2017;47(2):182-192. doi:10.4070/kcj.2015.0295
 50. Gao Q, Ou Z, Jiang T, Tian YY, Zhou JS, Wu L, Shi JQ, Zhang YD. Azilsartan ameliorates apoptosis of dopaminergic neurons and rescues characteristic parkinsonian behaviors in a rat model of Parkinson's disease. *Oncotarget*. 2017;8(15):24099-24109. doi:10.18632/oncotarget.15732
 51. Korge P, Calmettes G, Weiss JN. Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2015;1847(6-7):514-525. doi:10.1016/j.bbabi.2015.02.012

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II

Evaluación del antagonismo del receptor de angiotensina II

Receptor de Angiotensina II tipo 1. Mecanismo de unión y señalización

La angiotensina II (Ang II) promueve el mantenimiento de la presión sistémica a través de los sistemas cardiovascular y renal y sus efectos se ejercen por medio de la unión a los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) y de tipo 2 (AT2).

El receptor AT1 se expresa en tejidos como el riñón, el corazón, la glándula suprarrenal, el cerebro, el pulmón y el tejido adiposo; sin embargo, el foco está en el músculo liso arterial. El receptor AT2 se expresa altamente en los tejidos fetales, y disminuye después del nacimiento.

Cuando el receptor AT1 se activa por medio de la Ang II se genera una cascada de señalización en el músculo liso y culmina en una respuesta contráctil. Una de las vías consiste en la liberación de calcio en el citosol desde el retículo sarcoplásmico, el Ca^{2+} se une a la calmodulina y el complejo Ca^{2+} -calmodulina es capaz de activar la MLCK (quinasa de la cadena liviana de miosina). Esta enzima fosforila a la cadena liviana de miosina II y posteriormente, esto activa la miosina ATPasa y se forman puentes cruzados actina-miosina, lo que induce contracción de músculo liso¹ (Figura IV-1).

Es por esto, que las mediciones de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular son un método útil para entender los eventos asociados a la contracción celular como respuesta a la activación del receptor AT1.

Figura IV-1. Diagrama de la señalización mediada por Ang II cuando se une al receptor AT1 en células vasculares. MLCK: quinasa de la cadena liviana de miosina. MLC: cadena liviana de miosina.. EROs: especies reactivas del oxígeno.

Por otro lado, la Ang II ha demostrado ser inductora de la producción de EROs en la vasculatura y el estrés oxidativo tiene un rol importante en la patogenia de la hipertensión. Las EROs son potentes moduladores de la contracción y la remodelación estructural ya que reaccionan con el óxido nítrico, NO, que tiene propiedades vasodilatadoras y decrecen los cofactores de la NO sintasa, generan vasoconstrictores por peroxidación lipídica como los isoprostanos y activan factores de transcripción proinflamatorios, estimulando la producción del factores de crecimiento e inducción de fibrosis².

La generación de EROs y la liberación de calcio intracelular se atenúa cuando los receptores AT1 son bloqueados por los fármacos antagonistas, los sartanes³.

En esta sección, se evalúa si los nuevos complejos de sartanes con Zn(II) son capaces de unirse al receptor AT1 con igual, menor o mayor afinidad que los ligandos libres y además, se estudia si son capaces de inhibir tanto la producción de EROs como la liberación de calcio como medida indirecta de contracción celular, ambos eventos provocados por la Ang II.

Ensayo de unión competitiva al receptor AT1

Para el ensayo de unión competitiva al receptor AT1 se procedió de la siguiente manera. La línea celular HEK-293 transfectada transientemente con el receptor AT1R-YFP (HEK-293T) fue coincubada, en todos los casos, con una solución de 10 μ M TAMRA-AII (Ang II marcada con 5-carboxitetrametilrodamina) más soluciones de 0,1, 1 o 10 μ M de ligandos, complejos, ZnSO_4 o con solución 10 μ M con Ang II sin marcar. Posterior a la incubación, se realizó la tinción con DAPI y contando los núcleos teñidos se obtiene el número de células. Posteriormente, las células HEK-293T tratadas fueron observadas mediante microscopía confocal, se tomaron imágenes usando láseres de longitud de onda de 450 nm para ver la tinción con DAPI, a 488 nm para YFP (proteína amarilla fluorescente) y a 555 nm para TAMRA. Las imágenes obtenidas se cuantificaron con la intensidad de la señal emitida por YFP y se normalizaron al número de células presentes en el campo de visión.

Ensayo de unión para controles y ZnSO_4

Primeramente, se realizaron los ensayos controles para establecer la unión total y descartar las uniones inespecíficas (por ejemplo, uniones al receptor AT2). Se realizaron los siguientes experimentos: el primero con una solución 10 μ M de Ang II marcada con el fluoróforo TAMRA-AII, que se consideró como la unión total (100% de unión de TAMRA-AII). El segundo control se realizó con una solución 10 μ M de Angiotensina II sin marcar y TAMRA-AII para uniones no específicas, como ocurre por ejemplo con el receptor AT2, (Figura IV-2). Las diferencias entre la unión total y la unión no específica indican el rango entre 0 y 100% de unión y los valores obtenidos del ensayo con los compuestos se refieren a esta diferencia.

Otro control utilizado fue con células HEK-293 no transfectadas las cuales se expusieron a TAMRA-AII con el objetivo de observar si TAMRA-AII se unía a otros receptores. En este ensayo, TAMRA-AII no se unió a células no transfectadas (datos no mostrados).

Figura IV-2. Imágenes representativas confocales correspondientes a unión total (arriba) y a uniones no específicas (abajo) de la TAMRA-AII en células HEK 293 sobreexpresando el receptor AT1.

Cuando se realizó el tratamiento con ZnSO_4 se observó que disminuyó la unión de TAMRA-AII al receptor AT1 (Figura IV-3). Estudios anteriores han demostrado que los iones Zn(II) coordinan con el átomo de nitrógeno del grupo imidazol en el residuo de histidina en la Ang II, lo que produciría cambios en su conformación estructural^{4,5}. Por lo tanto, la atenuación de la señal observada podría deberse a la interacción de Zn(II) con TAMRA-AII modificando la estructura del péptido y afectando su capacidad para unirse al receptor AT1.

Figura IV-3. Imágenes representativas confocales correspondientes al tratamiento con diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μM) de ZnSO_4 coincubado con Tamra-AII (rojo) sobre células HEK293 transfectadas transitoriamente con el receptor AT1 (marcado con YFP, amarillo), núcleo teñido con DAPI (azul).

Ensayo de unión al AT1R de losartán y el complejo ZnLos

Las células HEK-293 transfectadas con AT1R-YFP, al ser co-tratadas con TAMRA-AII y los compuestos, mostraron que tanto ligando como complejo desplazaron la unión de TAMRA-AII, siendo el complejo ZnLos más potente que el ligando losartán y para ambos casos. Este efecto antagónico se incrementó con el aumento de concentración (Figura IV-4). Similares perfiles de unión para el losartán fueron estudiados previamente⁶.

Figura IV-4. (A) Imágenes confocales representativas correspondientes al tratamiento con diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μ M) de losartán y ZnLos co-incubados con TAMRA-AII (rojo) sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el receptor AT1 (marcado con YFP, amarillo), núcleo teñido con DAPI (azul). (B) Representación cuantitativa del porcentaje de unión de TAMRA-AII en presencia de los compuestos. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar obtenidos de tres o cuatro campos en tres experimentos distintos. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Ensayo de unión al AT1R de candesartán y el complejo ZnCand

El tratamiento mostró que, para ambos compuestos la intensidad de la inhibición de la unión dependió del incremento de la concentración. A la concentración de 0,1 μM de candesartán y ZnCand, el efecto antagónico resultó similar, sin embargo, conforme aumentaba la concentración, la inhibición fue más marcada para el complejo. El efecto de bloqueo del ZnCand entre 1 μM y 10 μM no mostró diferencia significativa (Figura IV-5).

Figura IV-5. (A) Imágenes confocales representativas correspondientes al tratamiento con diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μM) de candesartán y ZnCand co-incubados con TAMRA-AII (rojo) sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el receptor AT1 (marcado con YFP, amarillo), núcleo teñido con DAPI (azul). (B) Representación cuantitativa del porcentaje de unión de TAMRA-AII en presencia de los compuestos. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar obtenidos de tres o cuatro campos en tres experimentos distintos. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Ensayo de unión al AT1R de valsartán y el complejo ZnVals

Cuando las células HEK-293T fueron co-tratadas con valsartán y ZnVals, hubo disminución de la unión de TAMRA-AII en forma dosis-dependiente en ambos casos. Bajas concentraciones de valsartán exhibieron un leve bloqueo de TAMRA-AII. El tratamiento con ZnVals redujo la unión de TAMRA-AII a casi doble de lo que produjo el ligando (Figura IV-6).

Figura IV-6. (A) Imágenes confocales representativas correspondientes al tratamiento con diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μM) de valsartán y ZnVals co-incubados con TAMRA-AII (rojo) sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el receptor AT1 (marcado con YFP, amarillo), núcleo teñido con DAPI (azul). (B) Representación cuantitativa del porcentaje de unión de TAMRA-AII en presencia de los compuestos. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar obtenidos de tres o cuatro campos en tres experimentos distintos. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Ensayo de unión al AT1R de telmisartán y el complejo ZnTelm

El tratamiento con telmisartán y ZnTelm disminuyó notablemente la unión de TAMRA-AII al receptor AT1 en forma dependiente de la concentración. El porcentaje de unión a TAMRA-AII disminuyó significativamente cuando las células se pre-incubaron con ZnTelm en comparación con telmisartán a igualdad de concentraciones (Figura IV-7).

Figura IV-7. (A) Imágenes confocales representativas correspondientes al tratamiento con diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μ M) de telmisartán y ZnTelm co-incubados con TAMRA-AII (rojo) sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el receptor AT1 (marcado con YFP, amarillo), núcleo teñido con DAPI (azul). (B) Representación cuantitativa del porcentaje de unión de TAMRA-AII en presencia de los compuestos. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar obtenidos de tres o cuatro campos en tres experimentos distintos. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Ensayo de unión al AT1R de azilsartán y el complejo ZnAzil

Las HEK-293 tratadas con azilsartán lograron disminuir la unión de TAMRA-AII, siendo el efecto notable a una concentración 10 μM y no habiendo diferencias a menores concentraciones. Las células incubadas con las diferentes concentraciones de ZnAzil demostraron inhibir efectivamente la unión de TAMRA-AII pero no mostraron un dependencia con la concentración, el antagonismo fue efectivo en las tres concentraciones y el efecto de las concentraciones más bajas fue mayor que el provocado por el ligando (Figura IV-8).

Figura IV-8. (A) Imágenes confocales representativas correspondientes al tratamiento con diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μM) de azilsartán y ZnAzil co-incubados con TAMRA-AII (rojo) sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el receptor AT1 (marcado con YFP, amarillo), núcleo teñido con DAPI (azul). (B) Representación cuantitativa del porcentaje de unión de TAMRA-AII en presencia de los compuestos. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar obtenidos de tres o cuatro campos en tres experimentos distintos. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Efecto de los compuestos sobre el estrés oxidativo inducido por Ang II

El objetivo de este ensayo fue evaluar si los complejos resultan capaces de atenuar el estrés oxidativo causado por la Ang II. Para ello, las células HEK-293T fueron co-tratadas durante 24 hs con una solución 10 μ M de Ang II y los ligados o complejos a las mismas concentraciones testeadas para el ensayo de unión al receptor AT1. Como controles se emplearon una solución 10 μ M de Ang II sola (control positivo) o 0,5% de DMSO (control negativo). La producción de EROs se midió utilizando la sonda dihidroetidio (DHE)⁷ y los valores se expresaron como la intensidad de fluorescencia emitida por mg de proteínas, las cuales fueron determinadas por el método de Bradford⁸.

Efecto de losartán y ZnLos sobre los niveles de EROs

Cuando las células HEK-293T fueron co-tratadas con Ang II y losartán o ZnLos, estos ejercieron efectos protectores contra las EROs en forma dosis dependiente. Se pudo notar una mínima diferencia del efecto provocado por ambos compuestos, siendo estos igual de efectivos para reducir las EROs. El tratamiento a la mayor concentración (10 μ M) arrojó valores similares al control negativo (estado basal). Estos resultados coinciden con estudios previos donde el losartán atenúa el estrés oxidativo⁹

Con respecto al ZnSO₄, por lo dicho anteriormente, podría estar interaccionado con la Ang II y evitando su efecto estimulador sobre el estrés oxidativo, por lo cual se observa, al menos en las concentraciones testeadas, menor producción de EROs intracelular (Figura IV-9).

Figura IV-9. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante la sonda dihidroetidio (DHE) en las células HEK-293T co-incubadas con 10 μ M de Ang II y 0,1, 1 y 10 μ M de losartán o ZnLos. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la intensidad de fluorescencia/mg proteína obtenidas de seis medidas en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas entre el control positivo (Ang II) y ligando o complejo $p < 0,05$.

Efecto de candesartán y ZnCand sobre los niveles de EROs

Tanto el candesartán como el ZnCand disminuyeron la producción de EROs provocada por la Ang II en forma dosis-dependiente. Esto coincide con estudios recientes que sugieren que candesartán actúa como agente antioxidante normalizando el estado redox celular¹⁰. A bajas concentraciones (0,1 μ M), no hubo diferencias entre los dos compuestos, sin embargo, a medida que aumentaba la concentración, el complejo ZnCand ejerció mejores efectos protectores contra los EROs que el ligando (Figura IV-10).

Figura IV-10. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante la sonda dihidroetidio (DHE) en las células HEK-293T co-incubadas con 10 μM de Ang II y 0,1, 1 y 10 μM de candesartán o ZnCand. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la intensidad de fluorescencia/mg proteína obtenidas de seis medidas en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas entre el control positivo (Ang II) y ligando o complejo $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Efecto de valsartán y ZnVals sobre los niveles de EROs

Cuando las células fueron tratadas con valsartán y ZnVals, ambos ejercieron efectos inhibidores de las EROs. A bajas concentraciones (0,1 y 1 μM) hubo mayor supresión de EROs por parte del complejo que del ligando, pero a la concentración de 10 μM el efecto fue similar en los dos casos y estos alcanzaron los niveles basales (Figura IV-11). Estos resultados concuerdan con investigaciones previas donde el tratamiento con valsartán previene el daño oxidativo¹¹.

Figura IV-11. Determinación de las especies reactivas de oxígenos (EROS) mediante la sonda dihidroetidio (DHE) en las células HEK-293T co-incubadas con 10 μM de Ang II y 0,1, 1 y 10 μM de valsartán o ZnVals. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la intensidad de fluorescencia/mg proteína obtenidas de seis medidas en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas entre el control positivo (Ang II) y ligando o complejo $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Efecto de Telmisartán y ZnTelm sobre los niveles de EROs

A una concentración 0,1 μM de telmisartán no se observó efecto significativo sobre la generación de las EROs, pero luego, se produjo una leve disminución a medida que aumentaba la concentración. Por el contrario, el complejo ZnTelm tuvo atenuación más marcada con el incremento de la concentración y alcanzó niveles cercanos a los basales. ZnTelm demostró ejercer efectos similares al ligando a concentraciones 100 veces menores que este (Figura IV-12). Reportes anteriores demostraron que telmisartán reduce levemente la producción de EROs^{12,13}.

Figura IV-12. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante la sonda dihidroetidio (DHE) en las células HEK-293T co-incubadas con 10 μ M de Ang II y 0,1, 1 y 10 μ M de telmisartán o ZnTelm. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la intensidad de fluorescencia/mg proteína obtenidas de seis medidas en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas entre el control positivo (Ang II) y ligando o complejo $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$.

Efecto de azilsartán y ZnAzil sobre los niveles de EROs

Existen antecedentes previos que demuestran la capacidad antioxidante de azilsartán. Se ha reportado por ejemplo, que inhibe el estrés oxidativo en células endoteliales¹⁴. En nuestros experimentos, tanto el azilsartán como el ZnAzil atenuaron significativamente la fluorescencia de DHE, siendo el cambio más notorio para el complejo. La disminución, en ambos casos, se dio en forma dependiente de la dosis. El tratamiento con el complejo a dosis de 1 y 10 μ M no mostró diferencias en los efectos provocados y se alcanzaron los niveles basales (Figura IV-13).

Figura IV-13. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROS) mediante la sonda dihidroetidio (DHE) en las células HEK-293T co-incubadas con 10 µM de Ang II y 0,1, 1 y 10 µM de azilsartán o ZnAzil. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la intensidad de fluorescencia/mg proteína obtenidas de seis medidas en tres experimentos independientes. *Diferencias significativas entre el control positivo (Ang II) y ligando o complejo $p < 0,05$. #Diferencias significativas entre ligando y complejo a la misma concentración $p < 0,05$

Influencia de los compuestos en la liberación de calcio intracelular provocada por Ang II

Las medidas de calcio intracelular libre $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron midiendo las señales fluorescentes del estado basal de las células HEK-293T (transfectadas con el receptor AT1), incubadas con la sonda Fura-2AM, con la inyección posterior de una solución 10 µM de Ang II sola (que se consideró como la máxima estimulación) o 10 µM de Ang II con el agregado de soluciones 0,1, 1 y 10 µM de los compuestos, respectivamente. La determinación se realizó durante 90 segundos. $[Ca^{2+}]_i$ se calculó con la ecuación de Grynkiewicz¹⁵.

Efecto del ZnSO_4 sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$

En primer lugar, se evaluó si el zinc era capaz de incrementar el calcio intracelular libre por sí mismo. A una concentración de $10\ \mu\text{M}$ no demostró tener efecto alguno. Se conoce que para que incremente la concentración de calcio intracelular, las concentraciones deben ser superiores a $100\ \mu\text{M}$ ¹⁶.

El agregado de Ang II incrementó inmediatamente la concentración de calcio intracelular libre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta alcanzar un pico máximo y lo mantuvo elevado durante el tiempo de experimentación, tal como se esperaba¹⁷.

Cuando se co-administró ZnSO_4 a diferentes concentraciones con Ang II, se observó una leve atenuación en la concentración de calcio intracelular. Esto podría ser posible por la interacción del Zn con Ang II previamente comentada. (Figura IV-14)

Figura IV-14. Efecto de ZnSO_4 sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T determinado con la sonda Fura-2AM. La flecha indica una concentración $10\ \mu\text{M}$ de Ang II añadida con varias concentraciones del compuesto ($0, 1, 1$ y $10\ \mu\text{M}$). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de 6 medidas en tres experimentos independientes.

Efecto de losartán y ZnLos sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Cuando las células fueron tratadas con losartán y ZnLos, el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue menor que el tratamiento con Ang II sola, siendo el efecto del complejo más marcado que el del ligando. Además, el complejo logró restablecer los valores basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura IV-15). El comportamiento del ligando es consistente con estudios previos^{18,19}.

Figura IV-15. Efecto de losartán (A) y ZnLos (B) sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T determinado con la sonda Fura-2AM. La flecha indica la adición de una concentración 10 μM de Ang II sola o junto a varias concentraciones de los compuestos (0,1, 1 y 10 μM). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de 6 medidas en tres experimentos independientes.

Efecto de candesartán y ZnCand sobre $[Ca^{2+}]_i$

Cuando se realiza el tratamiento con Ang II y los compuestos, se pudo observar que las tres concentraciones de candesartán disminuyen la respuesta de Ang II sobre la liberación de calcio intracelular mientras que ZnCand bloquea la acción de la Ang II y restaura rápidamente los valores basales de $[Ca^{2+}]_i$. Las concentraciones de 1 y 10 μM fueron más efectivas (Figura IV-16). Experimentos en cardiomiocitos estimulados demostraron que candesartán disminuye levemente el pico de liberación de calcio²⁰.

Figura IV-16. Efecto de candesartán (A) y ZnCand (B) sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T determinado con la sonda Fura-2AM. La flecha indica la adición de una concentración 10 μM de Ang II sola o junto a varias concentraciones de los compuestos (0,1, 1 y 10 μM). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de 6 medidas en tres experimentos independientes.

Efecto de valsartán y ZnVals sobre $[Ca^{2+}]_i$

En experimentos anteriores, se determinó que valsartán causa una inhibición parcial de la liberación de calcio como respuesta a la Ang II²¹. En la Figura IV-17 se puede observar que la adición simultánea de Ang II y valsartán produjo el mismo efecto. En forma dosis dependiente, redujo escasamente la liberación de Ca^{2+} , siendo las concentraciones de 0,1 y 1 μM las menos efectivas. Por el contrario, ZnVals impidió la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y además lo mantuvo a concentraciones similares al estado basal.

Figura IV-17. Efecto de valsartán (A) y ZnVals (B) sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T determinado con la sonda Fura-2AM. La flecha indica la adición de una concentración 10 μM de Ang II sola o junto a varias concentraciones de los compuestos (0,1, 1 y 10 μM). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de 6 medidas en tres experimentos independientes.

Efecto de telmisartán y ZnTelm sobre $[Ca^{2+}]_i$

Telmisartán redujo la liberación calcio intracelular y lo mantuvo a niveles bajos durante el tiempo de experimentación. El complejo ZnTelm tuvo efecto más potente y disminuyó el flujo de calcio hasta alcanzar valores cercanos a los niveles basales. Para ambos casos, estos efectos fueron dependientes de la concentración (Figura IV-18).

Los datos obtenidos para el ligando son consistentes con un estudio donde la pre-incubación de Ang II con telmisartán inhibe la liberación de Ca^{2+} comparado con la incubación con Ang II libre²².

Figura IV-18. Efecto de telmisartán (A) y ZnTelm (B) sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T determinado con la sonda Fura-2AM. La flecha indica 10 μM de Ang II añadida con varias concentraciones de los compuestos (0,1, 1 y 10 μM). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de 6 medidas en tres experimentos independientes.

Efecto de azilsartán y ZnAzil sobre $[Ca^{2+}]_i$

En la Figura IV-19, se puede apreciar que azilsartán demostró impedir la total liberación de Ca^{2+} provocada por la Ang II. El complejo ZnAzil tuvo similar efecto al azilsartán a la concentración de 0,1 μM pero su efecto se diferenció a mayores concentraciones donde logró impedir la liberación de grandes cantidades Ca^{2+} en forma más efectiva que el ligando parental y lo restauró a niveles basales.

Figura IV-19. Efecto de azilsartán (A) y ZnAzil (B) sobre el calcio intracelular libre en las células HEK-293T determinado con la sonda Fura-2AM. La flecha indica la adición de una concentración 10 μM de Ang II sola o junto a varias concentraciones de los compuestos (0,1, 1 y 10 μM). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de 6 medidas en tres experimentos independientes.

Resumen sobre las acciones de los compuestos sobre el receptor de AT1

En el siguiente esquema se resumen las actividades sobre el receptor AT1 ejercidas por los ligandos y los complejos.

Figura IV-20. Comparación de las actividades sobre el receptor AT1, la regulación de EROS y calcio intracelular ejercidas por los ligandos y los complejos.

Conclusiones sobre las acciones de los compuestos sobre el receptor de AT1

Este estudio demostró que los complejos ejercieron un antagonismo más potente sobre el receptor AT1 que los ligandos precursores y esa capacidad podría estar asociada a la modificación estructural y espacial, lo cual haría que los grupos químicos encuentren nuevos sitios de interacción dentro del sitio de unión en el receptor de angiotensina II.

Si bien se observa que el telmisartán produce mayor bloqueo del receptor entre los sartanes probados, la complejación produce el antagonismo más alto (casi total). Esto puede deberse a la estructura abierta del complejo, ya que el ligando actúa como monodentado a través de los grupos carboxilato, dejando el resto de la molécula libre para interactuar en el sitio del receptor, pero con diferente densidad electrónica, por el efecto inductivo del ácido de Lewis, Zn(II).

Tabla IV-1. Tabla comparativa de los porcentajes de unión TAMRA-AII (como medida de bloqueo de receptor) cuando fue tratada junto con los ligandos o los complejos.

	Sartán			ZnSartán		
Concentración, μM	0,1	1	10	0,1	1	10
Losartán (%)	57,07	46,5	38,53	21,84	16,75	8,65
Candesartán (%)	31,41	21,71	18,87	35	3,75	2,07
Valsartán (%)	67,40	38,00	32,33	39,05	10,43	3,66
Telmisartán (%)	29,74	4,21	4,05	3,44	3,22	0,34
Azilsartán (%)	30,39	28,82	8,39	13,69	12,15	11,63

Los complejos con candesartán y valsartán también producen una mejora sustancial sobre su unión con el receptor respecto al ligando, y lo atribuimos a las estructuras de los complejos. En estos dos casos, los sartanes coordinan de manera bidentada a través de uno de los oxígenos del grupo $-\text{COO}^-$ y el nitrógeno del anillo tetrazol con el ion Zn(II) . Se sabe que este bioelemento cumple una función estructural (como se mencionó en la introducción) dando la conformación necesaria a las proteínas para que puedan ejercer sus efectos biológicos. Por otro lado, los complejos donde el Zn coordina con dos ligandos en forma bidentada (ZnLos y ZnAzil) son los que menor efecto producen y posiblemente tenga que ver con un efecto estérico atribuido a la presencia de dos ligandos (si bien se observan mejoras respecto al fármaco libre, por complejación) (Tabla IV-1).

Al ejercer esta fuerte afinidad, puede ser un justificativo para las respuestas mediadas por el receptor AT_1 tales como la generación de EROs y la liberación de calcio intracelular. En este estudio, se corroboró que los fármacos bloqueadores del receptor AT_1 previenen el estrés oxidativo pero la combinación de estos fármacos con Zn(II) , les provee acción superior en la prevención del daño oxidativo.

Si bien telmisartán es el que menos efecto antioxidante produce, la complejación mejora este efecto en aproximadamente un 40 %, mientras que para azilsartán y losartán, que siguen en su efecto antioxidante, las mejoras son del orden de un 20%. Candesartán y valsartán producen el mejor efecto de disminución de EROs y su porcentaje por complejación mejora en un 25 %, considerando un promedio de las tres concentraciones usadas. Es decir, que se mantiene la relación entre la estructura y la actividad considerando la capacidad de secuestrar los EROs (Tabla IV-2). Este efecto también se observó en las

células tumorales, en las que los complejos de ZnCand y ZnVals mostraron un comportamiento antioxidante generando reducción de EROs intracelular.

Tabla IV-2. Porcentajes de EROs generadas por la co-incubación de Ang II más los compuestos. Los porcentajes se refieren a las EROs producidas por Ang II considerada como 100%

	Sartán			ZnSartán		
Concentración, μM	0,1	1	10	0,1	1	10
Losartán (%)	37,93	33,26	20,93	35,77	26,84	21,64
Candesartán (%)	26,65	25,24	20,99	20,59	15,61	12,42
Valsartán (%)	34,27	28,13	18,76	24,32	19,18	19,78
Telmisartán (%)	78,84	64,09	55,96	52,56	40,97	24,90
Azilsartán (%)	42,03	30,97	21,11	31,86	18,43	16,32

En todos los casos se vio que la movilización de calcio intracelular (como parámetro relacionado a la contractilidad) estaba relacionada con la activación/bloqueo del receptor AT1 y los nuevos complejos de Zn fueron capaces de regular el flujo de calcio en comparación con los sartanes libres cuando las células eran estimuladas con Ang II.

Por consiguiente, queda demostrado que la modificación de estos agentes antihipertensivos mediante la formación de complejos con Zn(II) podría ser una potencial terapia complementaria en el tratamiento de la hipertensión.

Referencias

- Hilgers RHP, Webb RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med*. 2005;230(11):829-835. doi:10.1177/153537020523001107
- Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(2):135-142. doi:10.1007/s11906-010-0100-z
- Ramalingam L, Menikdiwela K, LeMieux M, Dufour JM, Kaur G, Kalupahana N, Moustaid-Moussa N. The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1106-1114. doi:10.1016/j.bbadis.2016.07.019
- Loo JA, Hu P, Smith RD. Interaction of angiotensin peptides and zinc metal ions probed by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994;5(11):959-965. doi:10.1016/1044-0305(94)80014-6
- Kim J-Y, Kim M-J, Kim H-T. Determination of a binding site of Cu, Ni, Mg, and Ca metal ions with Angiotensin II peptide by electrospray tandem mass spectrometry. *Bull Korean Chem Soc*. 2010;31(5):1377-1380. doi:10.5012/bkcs.2010.31.5.1377
- Hong J, Leung M, Zhang Y, Catt K, Sandberg K. Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT1 angiotensin receptor. Identification of amino acid residues that determine binding of the antihypertensive drug losartan. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16533-16536.
- Owusu-Ansah E, Yavari A, Banerjee U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. *Protoc Exch*. 2008;131(5):1-9. doi:10.1038/nprot.2008.23
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Su Q, Huo CJ, Li HB, Liu KL, Li X, Yang Q, Song XA, Chen WS, Cui W, Zhu GQ, Shi XL, Liu JJ, Kang YM. Renin-angiotensin system acting on reactive oxygen species in paraventricular nucleus induces sympathetic activation via AT1R/PKC γ /Rac1 pathway in salt-induced hypertension. *Sci Rep*. 2017;7:1-13. doi:10.1038/srep43107
- Chen S, Ge Y, Si J, Rifai A, Dworkin LD, Gong R. Candesartan suppresses chronic renal inflammation by a novel antioxidant action independent of AT1R blockade. *Kidney Int*. 2008;74(9):1128-1138. doi:10.1038/ki.2008.380
- Jiao B, Wang Y, Cheng Y, Gao J, Zhang Q. Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF- β 1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels. *Biosci Trends*. 2011;5(4):173-181. doi:10.5582/bst.2011.v5.4.173
- Takaya T, Kawashima S, Shinohara M, Yamashita T, Toh R, Sasaki N, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2006;186(2):402-410. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.009
- Mariele D, Piras A, Madeddu C, Cadeddu C, Deidda M, Massa E, Antoni G, Giovanni M, Mercuro G. Long-term protective effects of the angiotensin receptor blocker telmisartan on epirubicin-induced inflammation, oxidative stress and myocardial dysfunction. *Exp Ther Med*. 2011;2(5):1003-1009. doi:10.3892/etm.2011.305
- Liu H, Mao P, Wang J, Wang T, Xie CH. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, attenuates tert-butyl hydroperoxide-induced endothelial cell injury through inhibition of mitochondrial dysfunction and anti-inflammatory activity. *Neurochem Int*. 2016;94:48-56. doi:10.1016/j.neuint.2016.02.005

15. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-3450. doi:3838314
16. Hershfinkel M, Moran A, Grossman N, Sekler I. A Zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca^{2+} and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;98(20):11749-11754. doi:10.1073/pnas.201193398
17. Fortuño A, Muñiz P, Ravassa S, Rodriguez JA, Fortuño MA, Zalba G, Díez J. Torasemide inhibits angiotensin II-induced vasoconstriction and intracellular calcium increase in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;34(1):138-143. doi:10.1161/01.HYP.34.1.138
18. Nitschke R, Henger A, Ricken S, Gloy J, Müller V, Greger R, Pavenstädt H. Angiotensin II increases the intracellular calcium activity in podocytes of the intact glomerulus. *Kidney Int.* 2000;57(1):41-49. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00810.x
19. Shao Q, Saward L, Zahradka P, Dhalla NS. Ca^{2+} mobilization in adult rat cardiomyocytes by angiotensin type 1 and 2 receptors. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(9):1413-1418. doi:10.1016/S0006-2952(97)00653-9
20. Ozdemir S, Ugur M, Gürdal H, Turan B. Treatment with AT1 receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca^{2+} transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys.* 2005;435(1):166-174. doi:10.1016/j.abb.2004.11.027
21. Verheijen I, Fierens FLP, DeBacker JP, Vauquelin G, Vanderheyden PML. Interaction between the partially insurmountable antagonist valsartan and human recombinant angiotensin II type 1 receptors. *Fundam Clin Pharmacol.* 2000;14(6):577-585. doi:10.1111/j.1472-8206.2000.tb00443.x
22. Mulders ACM, Hendriks-Balk MC, Mathy MJ, Michel MC, Alewijnse AE, Peters SLM. Sphingosine kinase-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9):2043-2048. doi:10.1161/01.ATV.0000237569.95046.b9

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Introducción

Modelos animales en hipertensión

En la investigación cardiovascular, los modelos animales han permitido el estudio de la enfermedad cardiovascular tanto en las primeras etapas, así como la investigación de los mecanismos de la patogénesis y los efectos de la intervención farmacológica. El objetivo de estos estudios es proporcionar conceptos que se relacionen con las respuestas observadas en humanos. Un modelo animal ideal que imite cualquier enfermedad cardiovascular en humanos debe tener las siguientes características: permitir estudios en enfermedades crónicas estables, producir síntomas que sean predecibles y controlables, satisfacer la economía, tener consideraciones técnicas y de bienestar animal, y permitir la medición de parámetros cardíacos, bioquímicos y hemodinámicos relevantes. La hipertensión esencial cursa con muchas anormalidades en los sistemas reguladores fisiológicos de la presión arterial, incluidos neurotransmisores y factores hormonales con alteraciones del músculo liso cardíaco y vascular y el endotelio. Por lo tanto, estas son las características de la hipertensión humana que los modelos de ratas deberían imitar. La vasoconstricción excesiva, que comúnmente involucra los péptidos endógenos, la angiotensina II y la endotelina, o la vasodilatación deficiente, que a menudo involucra óxido nítrico (NO), son mecanismos comunes al humano en la hipertensión murina^{1,2}.

En el pasado, los perros se empleaban principalmente como modelo para estudiar la hipertensión. Actualmente, el modelo animal preferido es la rata a pesar que tiene algunas características que no mimetizan con la enfermedad humana, por ejemplo, la hipertensión y la insuficiencia cardíaca se desarrolla en forma aguda, siendo que en humanos se desarrolla lentamente, en segundo lugar el hecho que se utilicen ratas jóvenes (la enfermedad cardiovascular es poco común en humanos jóvenes) y en tercer lugar, la mayoría de las cepas de ratas no desarrollan aterosclerosis³. Además, la hipertensión humana probablemente se desencadena por influencias ambientales como el aumento de la ingesta de sal, la obesidad y la falta de ejercicio que actúan junto con una predisposición genética⁴. En la Tabla V-1 se resumen algunos de los modelos murinos más usados para estudiar la hipertensión

Tabla V-1. Resumen de algunos de los modelos murinos usados en hipertensión ⁵

Modelos	Tipo de animal
Genéticos	SHR - Ratas hipertensas espontáneas
	SHR stroke-prone (propensas a accidente cardiovascular)
	Ratas transgénicas (TGR (mREN2)27)
Metabólicos	DOCA-sal (administración de mineralocorticoides)
	DTZ-SHR (Ratas diabéticas hipertensas)
Farmacológicos	Inhibición de la NO sintasa (administración L-NAME)
	Administración de Angiotensina II
Quirúrgicos	Oclusión de la arteria renal
	Coartación aortica
	Reducción de masa renal (hipertensión de Goldblatt)

Modelo de hipertensión L-NAME

El óxido nítrico (NO) es un gas lábil capaz de difundir libremente a través de las membranas celulares. La producción enzimática del NO a partir del aminoácido L-arginina es mediada por una familia de tres sintasas de óxido nítrico (NOS). Una de estas sintasas, la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS), se encuentra en células endoteliales y es esencial para el mantenimiento del tono vascular basal⁶. El NO es un vasodilatador parácrino, ya que luego de ser producido por células endoteliales difunde hacia las células de musculo liso vasculares próximas causando relajación, que resulta en la vasodilatación y en la reducción de la presión arterial sistémica⁷. Así mismo, el NO presenta ese efecto protector sobre la vasculatura por sus acciones antiproliferativas y antifibróticas⁸. La disfunción endotelial y la subsecuente deficiencia de NO está asociada al desarrollo de hipertensión y de enfermedades cardiovasculares⁹.

Figura V-1. Mecanismo de relajación de musculo liso mediante la acción del óxido nítrico (NO). eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, GTP: guanosin trifosfato. GMPc: guanosin monofosfato cíclico. L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil ester

Dentro de los inhibidores de la eNOS, se encuentra el N^ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), cuya administración crónica es ampliamente usada como modelo murino de hipertensión y ha demostrado ser útil para el estudio de remodelado vascular. L-NAME reduce la actividad de la eNOS y por ende, la concentración de NO, impidiendo la vaso-relajación y resultando en el incremento de la presión arterial¹⁰ (Figura V-1). La respuesta hemodinámica frente a la inhibición de la eNOS se caracteriza por un aumento en la resistencia vascular, una marcada reducción del flujo sanguíneo renal y disminución de la tasa de filtración glomerular¹¹. Los reportes sugieren que L-NAME por un lado activa la enzima convertidora de angiotensina (ACE)¹² y por otro lado, el deterioro renal causado desencadena la liberación de renina y por lo tanto, estos eventos incrementan los niveles de angiotensina II¹³. Adicionalmente, el tratamiento con L-NAME incrementa el número de receptores de angiotensina II de tipo 1 (AT1) así como la afinidad de estos por la Ang II¹⁴.

La respuesta adaptativa de las arterias frente a la hipertensión producida por la deficiencia de NO es la de estimular la síntesis de proteínas fibróticas (por ejemplo el colágeno), así como inducir la proliferación de las células de músculo liso produciendo remodelado estructural vascular e hipertrofia¹⁵. Estos efectos hipertróficos se ven favorecidos también por el incremento de Ang II¹⁶.

El hecho de que en este modelo esté activado el sistema renina angiotensina (SRA) hizo que numerosos estudios fueran llevados a cabo para evaluar la terapia antihipertensiva de los fármacos bloqueadores de angiotensina II¹⁷⁻¹⁹. En el caso del fármaco telmisartán, se determinó que el mismo logró reducir la presión arterial en el modelo inducido L-NAME tanto

a corto plazo²⁰ como a largo plazo²¹, en forma más efectiva cuando se emplean terapias combinadas con antidiuréticos como la espironolactona²².

Luego de evaluar las actividades antitumorales y de unión al receptor AT1 *in vitro* de todos los complejos de Zn con los fármacos bloqueadores de Ang II (sartanes), se eligió el complejo Zn-Telmisartán por ofrecer un mejor efecto citotóxico antitumoral a bajas concentraciones comparado con el resto de los complejos y por haber logrado un mejor bloqueo del receptor AT1 y mayor inhibición de la liberación de calcio, además de inhibir la producción de EROs.

Diseño experimental

Todos los procedimientos y protocolos fueron realizados de acuerdo a lo establecido por el Instituto Nacional de Salud (Bethesda, MD, EE. UU) y las pautas instauradas por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste.

En este estudio se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar Kyoto provistas por el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. Al inicio, los animales tenían 8 semanas de edad con pesos de 230 ± 20 g. Los animales fueron divididos al azar en 5 grupos con 5 individuos cada uno ($n = 25$) y alojados en condiciones estándar de laboratorio (temperatura $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, con ciclo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 60-70% de humedad) con acceso libre a agua y alimento regular durante 5 semanas.

Al final del estudio, un animal de cada grupo fue sometido a eutanasia y se extrajo la aorta torácica para estudios histológicos posteriores donde se evaluaron los cambios morfológicos en la vasculatura.

Para inducir la hipertensión, las ratas fueron tratadas con L-NAME (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) (30 mg/kg/día en agua potable) durante 4 semanas. Los animales del grupo control bebieron solo agua potable. Durante la última semana, los animales fueron tratados con ZnSO₄, telmisartán y ZnTelm en el agua de bebida según el siguiente esquema: grupo 1, control no tratado con L-NAME; grupo 2: L-NAME (30 mg/kg/día en agua potable); grupo 3, L-NAME más ZnSO₄ (10 mg/Kg/día en agua potable); grupo 4: L-NAME más telmisartán (10 mg/Kg/día, solución acuosa de DMSO al 0,1%); grupo 5: L-NAME más ZnTelm (11mg/Kg/día en solución acuosa de DMSO al 0,1%). El período de estudio y las dosis de L-NAME y telmisartán se seleccionaron en base a reportes anteriores^{21,23–25}. Para ZnTelm, se administró la dosis molar equivalente de telmisartán.

La presión arterial de cada rata fue registrada mediante un método no invasivo utilizando un pletismógrafo de cola conectado a un software (Physiologic, Exxer, Ingeniería electrónica, Argentina)²⁶. Para ello, cada rata fue colocada en un cepo inmovilizador sobre una manta térmica calentada a 37°C, dejando la cola fuera de éste. Se esperó un lapso de 5 minutos de manera que el animal estuviera calmo. Sobre la cola (en contacto con la manta térmica) se colocó un manguito y se insufló manualmente (Figura V-2). El dispositivo contaba con un sensor de pulso y presión que podían ser visualizados a través del software. Este sistema funciona ocluyendo el flujo de sangre a la cola con un manguito especializado. El transductor mide de manera intermitente la presión arterial en función de la oclusión crónica del flujo sanguíneo en la cola (Figura V-3).

La presión arterial se midió una vez por semana, desde el inicio del experimento. El promedio de al menos tres mediciones de presión arterial se tomó en cada animal.

Figura V-2. Esquema de la técnica de registro de presión arterial en la rata

Figura V-3. Medida representativa de la presión arterial y las señales de pulso usando un pletismógrafo de cola. PAS: presión arterial sistólica. PAD: presión arterial diastólica.

Análisis histológicos ex vivo

Inmediatamente después de ser extraídos, los segmentos aórticos de cada tratamiento se fijaron durante dos días con una solución de formaldehído al 6% y luego se deshidrataron e incluyeron en parafina. Los tejidos se seccionaron transversalmente con un grosor de 5 μ m. Posteriormente, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para el análisis morfológico²⁷ y se realizó la tinción tricrómica de Masson para la evaluación de la producción de colágeno²⁸ donde se tiñe el colágeno de color azul y de color rojizas las fibras musculares. Las imágenes se observaron en un microscopio Olympus CX-35 y se analizaron en el Programa ImageJ (Instituto Nacional de Salud). El área de la sección transversal (AST) se calculó restando el área interna del área externa. Se midió el grosor de la pared (W), el diámetro de la luz vascular (L) y se calculó la relación entre ambos (W/L). Para cada rata, se midieron tres secciones aórticas y se determinó la media para cada grupo experimental.

Efecto del ZnTelm sobre la presión arterial sistólica

Se administró L-NAME durante 4 semanas en las ratas Wistar macho normotensas para inducir la hipertensión. Se midió la presión arterial al menos dos veces por semana para asegurar que se estaba produciendo un aumento de la presión (datos no mostrados). A partir de la quinta semana (inicio del tratamiento), se midió la presión arterial sistólica (PAS)

diariamente a cada individuo y se calculó el promedio de la PAS de todos los individuos del mismo grupo.

Como se muestra en la Figura V-4, durante la quinta semana, el grupo de control mantuvo una PAS con valores normales y estables durante todo el experimento. El grupo L-NAME mantuvo una PAS elevada sin cambios significativos ($p < 0,01$). El grupo L-NAME que recibió además $ZnSO_4$ en esa semana no modificó la PAS durante los 7 días de administración ($p < 0,01$) sugiriendo que la sal del metal no induce efecto alguno por sí sola. El grupo L-NAME + telmisartán mostró una reducción en el PAS, sin embargo, el grupo L-NAME + ZnTelm mostró una disminución aún más marcada de la PAS en comparación con el grupo anterior. Al final del experimento, la PAS del grupo L-NAME + ZnTelm alcanzó valores cercanos a los normales, mientras que el grupo L-NAME + telmisartán demostró tener pequeñas diferencias con el grupo normotenso ($p < 0,01$).

Figura V-4. Evaluación del efecto de $ZnSO_4$, telmisartán y ZnTelm sobre la presión arterial sistólica en ratas Wistar con hipertensión inducida por L-NAME ($n = 5$ por grupo). Cada resultado representa la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). * Valores estadísticamente significados ($P < 0,01$)

Efecto de ZnTelm sobre la morfometría aórtica

Para evaluar los efectos de $ZnSO_4$, telmisartán y ZnTelm sobre la remodelación vascular de ratas con hipertensión inducida por L-NAME, se midió el espesor de la pared (W) y el

diámetro de la luz vascular (L) en las aortas torácicas mediante tinción con hematoxilina-eosina (HE). La relación W/L se utilizó como índice de remodelado vascular. Las secciones aórticas de las ratas con hipertensión inducida mostraron hipertrofia de la pared vascular con un aumento significativo en W, en la relación W/L y en el área de sección transversal (AST) en comparación con el grupo control. El grupo L-NAME + telmisartán mostró una reducción en W, W/L y AST en comparación con el grupo L-NAME y el grupo L-NAME + ZnTelm redujo levemente con respecto al grupo tratado con telmisartán pero con diferencia significativa de AST entre estos dos grupos ($p < 0,01$). No se observaron diferencias entre el grupo L-NAME + ZnSO₄ y el grupo L-NAME, indicando que la sal del metal no tuvo efecto alguno (Tabla V-2, Figura V-5). Por lo tanto, el tratamiento con ZnTelm no sólo disminuyó la presión arterial sino que también contrarrestó el remodelado vascular provocado por la hipertensión.

*Tabla V-2. Efecto del ZnSO₄, telmisartán and ZnTelm sobre los cambios morfológicos de la aorta torácica. W: grosor de la pared vascular, L: diámetro de la luz vascular, AST: área de sección transversal. Los valores se expresan como la media $\pm$ SD. #Diferencias significativas entre el grupo L-NAME y los grupos tratados con telmisartán y ZnTelm ($p < 0,01$). * Diferencias significativas entre el tratamiento con telmisartán y ZnTelm ($p < 0,01$).*

	Control	L-NAME	L-NAME + ZnSO ₄	L-NAME + Telmisartán	L-NAME + ZnTelm
L (μm)	1238,9 $\pm$ 90,3	1386 $\pm$ 79,6	1380,3 $\pm$ 22,3	1297,5 $\pm$ 27,2	1290 $\pm$ 45,4
W (μm)	96,1 $\pm$ 3,2	126,1 $\pm$ 4,3	119,6 $\pm$ 4,2	102,5 $\pm$ 7,5	99,8 $\pm$ 3,6
W/L	7,75 $\pm$ 0,68	9,09 $\pm$ 0,69	8,66 $\pm$ 0,47	7,89 $\pm$ 0,5	7,73 $\pm$ 0,64
AST ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	402,62 $\pm$ 51,1	598,51 $\pm$ 49,1 [#]	563,45 $\pm$ 42,4 [#]	498,33 $\pm$ 37 [*]	436,68 $\pm$ 13,9 [*]

Figura V-5. Imágenes representativas de las secciones de aorta torácica teñidas con hematoxilina-eosina ($\times 200$, barra 100 μm)

Efecto de ZnTelm sobre el colágeno aórtico

Como ya se mencionó, la hipertensión provoca cambios estructurales y funcionales en la vasculatura, incluida la rigidez arterial causada por el depósito de colágeno ²⁹. La fibrosis se evaluó mediante la tinción tricrómica de Masson. El colágeno se tiñe de azul y la fibra muscular de rojo. Como se muestra en la Figura V-6, la deposición de colágeno fue escasa en el grupo de control. El grupo que sólo recibió L-NAME durante 5 semanas, expresó un exceso de colágeno en la matriz del endotelio vascular. Los grupos que recibieron tratamiento de L-NAME con telmisartán o ZnTelm redujeron la deposición de colágeno. En esos grupos, se detectaron fibras más organizadas y circunscritas lo que indicó una menor fibrosis. Por lo tanto, mediante la administración de ZnTelm a ratas hipertensas se observó no sólo la reducción de la presión arterial sino también una disminución en el colágeno vascular y una atenuación de la remodelación del tejido de la aorta

Figura V-6. Efecto de ZnSO₄, telmisartán y ZnTelm sobre la deposición de colágeno en la aorta torácica. El panel A muestra muestras de imágenes representativas de las secciones aórticas teñidas con la tinción tricrómica de Masson. ($\times 200$, barra = 100 μ m). El panel B muestra los porcentajes de colágeno en la aorta. Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 25$). * $p < 0,01$ versus grupo de control, # $p < 0,01$ versus grupo L-NAME.

Conclusiones sobre la evaluación antihipertensiva de ZnTelm

Se demostró que tanto telmisartán como el complejo ZnTelm redujeron los efectos de hipertensión arterial inducida por L-NAME en las ratas Wistar en los 7 días de administración. El complejo ZnTelm aumentó la acción hipotensora del fármaco original. Los resultados morfométricos indicaron que tanto telmisartán como ZnTelm revirtieron la progresión de la fibrosis vascular producida por la hipertensión, sin embargo ZnTelm demostró ser más efectivo. Asimismo, produjeron reducción de las fibras de colágeno (responsables del aumento de la rigidez arterial). Estos hallazgos respaldan un mecanismo protector de ZnTelm que se contrapone a los mecanismos pro-fibróticos en el modelo de hipertensión inducida por L-NAME.

Referencias

1. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):89-105. doi:10.1016/S0008-6363(98)00076-5
2. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):77-88. doi:10.1016/S0008-6363(98)00077-7
3. Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2016;6(3):70-80.
4. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. Animal models of hypertension: a scientific statement from the american heart association. *Hypertension.* 2019;73(6):e87-e120. doi:10.1161/HYP.0000000000000090
5. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med.* 2005;146(3):160-173. doi:10.1016/j.lab.2005.05.005
6. Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96(1):68-75. doi:10.1590/S0066-782X2011000100012
7. Houston M, Hays L. Acute effects of an oral nitric oxide supplement on blood pressure, endothelial function, and vascular compliance in hypertensive patients. *J Clin Hypertens.* 2014;16(7):524-529. doi:10.1111/jch.12352
8. Šimko F, Šimko J. The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. *Physiol Res.* 2000;49(1):37-46.
9. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2009;32(8):1103-1108. doi:10.1007/s12272-009-1801-1
10. Fechhelm RG, Griffiths WB, Martin LR, Gallaway BJ. Intra- and interannual variation in the relative condition and proximate body composition of arctic ciscoes from the Prudhoe Bay Region of Alaska. *Trans Am Fish Soc.* 1996;125(4):600-612. doi:10.1577/1548-8659(1996)125<0600:IAIVIT>2.3.CO;2
11. Van Der Linde NAJ, Van Den Meiracker AH, Boomsma F. Role of angiotensin II in L-NAME-induced systemic and renal hemodynamic effects in hydrochlorothiazide-pretreated hypertensive subjects. *J Hypertens.* 2003;21(2):345-351. doi:10.1097/00004872-200302000-00026
12. Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest.* 1997;99(2):278-287. doi:10.1172/JCI119156
13. Šimko F, Baka T, Krajčirovicova K, Repova K, Aziriova S, Zorad S, Poglitsch M, Adamcova M, Reiter RJ, Paulis L. Effect of melatonin on the renin-angiotensin-aldosterone system in L-NAME-Induced hypertension. *Molecules.* 2018;23(2):1-15. doi:10.3390/molecules23020265
14. Figueroa-Guillén ES, Castro-Moreno P, Rivera-Jardón FF, Gallardo-Ortiz IA, Ibarra-Barajas M, Godínez-Hernández D. Angiotensin II pressor response in the L-NAME-induced hypertensive pithed rat: Role of the AT 1 receptor. *Proc West Pharmacol Soc.* 2009;52:54-56.
15. Bernátová I, Pechánová O, Kristek F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-Nitro-L-arginine methyl ester treatment. *Jpn J Pharmacol.* 1999;81(1):99-106. doi:10.1254/jjp.81.99
16. Polichnowski AJ, Lu L, Cowley AW. Renal injury in angiotensin II+L-NAME-induced hypertensive rats is independent of elevated blood pressure. *Am J Physiol -*

- Ren Physiol.* 2011;300(4):1008-1016.
doi:10.1152/ajprenal.00354.2010
17. Hashim S, Anand-Srivastava MB. Losartan-induced attenuation of blood pressure in L-NAME hypertensive rats is associated with reversal of the enhanced expression of G α proteins. *J Hypertens.* 2004;22(1):181-190.
doi:10.1097/00004872-200401000-00028
 18. Casellas D, Herizi A, Artuso A, Mimran A, Jover B. Candesartan prevents L-NAME-induced cardio-renal injury in spontaneously hypertensive rats beyond hypotensive effects. *JRAAS.* 2001;2(1):84-90.
<https://doi.org/10.1177/14703203010020011501>.
 19. Okazaki H, Minamino T, Tsukamoto O, Kim J, Okada KI, Myoishi M, Wakeno M, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Angiotensin II type 1 receptor blocker prevents atrial structural remodeling in rats with hypertension induced by chronic nitric oxide inhibition. *Hypertens Res.* 2006;29(4):277-284.
doi:10.1291/hyres.29.277
 20. Lucero M, Santander Y, Parola L, Del Mauro JS, Moretón M, Bertera FM, Chiappetta D, Höcht C, Taira CA. Comparación de la respuesta antihipertensiva aguda al telmisartán y al irbesartán en ratas espontáneamente hipertensas. *Rev Argent Cardiol.* 2016;84(1):8-13.
doi:10.7775/rac.v84.i1.6997
 21. Sadek SA, Rashed LA, Bassam AM, Said ES. Effect of aliskiren, telmisartan and torsemide on cardiac dysfunction in L-nitro arginine methyl ester (L-NAME) induced hypertension in rats. *J Adv Res.* 2014;6(6):967-974.
doi:10.1016/j.jare.2014.11.003
 22. Takahashi T, Ono H, Ono Y, Ishimitsu T, Matsuoka H. Combination therapy with telmisartan and spironolactone alleviates L-NAME exacerbated nephrosclerosis with an increase in PPAR- γ and decrease in TGF- β 1. *Int Heart J.* 2007;48(5):637-647.
doi:10.1536/ihj.48.637
 23. Girardi JM, Farias RE, Ferreira AP, Raposo NRB. Rosuvastatin prevents proteinuria and renal inflammation in nitric oxide-deficient rats. *Clinics.* 2011;66(8):1457-1462.
doi:10.1590/S1807-59322011000800025
 24. Morán A, de Urbina AVO, Martín ML, Rodríguez-Barbero A, Román LS. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;620(1-3):90-96.
doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.026
 25. Chaswal M, Das S, Prasad J, Katyal A, Mishra AK, Fahim M. Effect of losartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist on cardiac autonomic functions of rats during acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Physiol Res.* 2012;61(2):135-144.
 26. Fritz M, Rinaldi G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: Influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008;58(3):215-221.
doi:10.1016/j.vascn.2008.08.002
 27. Noma T, Mizushige K, Yao L, Yu Y, Kiyomoto H, Hosomi N, Kimura S, Abe Y, Ohmori K, Matsuo H. Alteration in aortic wall stiffness and accumulation of collagen during the prediabetic stage of type II diabetes mellitus in rats. *Jpn Circ J.* 1999;63(12):988-993.
doi:10.1253/jcj.63.988
 28. Zhang L-H, McKallip RJ, Garner RE, Pang X-F, Zhao Z-Q, Bai F, Wang N-P. Angiotensin II AT1 receptor alters ACE2 activity, eNOS expression and CD44-hyaluronan interaction in rats with hypertension and myocardial fibrosis. *Life Sci.* 2016;153:141-152.
doi:10.1016/j.lfs.2016.04.013
 29. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular fibrosis in aging and hypertension: molecular mechanisms and clinical implications. *Can J Cardiol.* 2016;32(5):659-668.
doi:10.1016/j.cjca.2016.02.070

CAPÍTULO VI

EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD

Interacción con Albúmina

La albúmina plasmática es la proteína que se encuentra en mayor abundancia en la sangre y su función es la de contribuir con la presión coloidosmótica sanguínea, transportar y distribuir moléculas endógenas y exógenas. El hecho que se produzca la unión proteína-fármaco permite la absorción, la distribución, metabolismo y excreción. Por lo tanto, la eficacia del fármaco dependerá de su afinidad a la albúmina¹.

Un fármaco puede unirse a las proteínas plasmáticas en un mayor o en un menor grado, dependiendo de diferentes factores, como el pH del plasma, la concentración de proteínas plasmáticas, la concentración del fármaco, la presencia de otro agente con mayor afinidad por el número limitado de sitios de unión con la proteína. El grado de unión con las proteínas plasmáticas y la afinidad de un fármaco por un sitio de unión no específico son de gran importancia clínica. De igual importancia es la facilidad con la que los fármacos se disocian de las proteínas plasmáticas. Aquéllos que se unen fuertemente, tienden a tener una vida media mucho mayor, ya que se liberan gradualmente desde el reservorio de proteína plasmática.

La albúmina sérica bovina (ASB) ha sido una de las proteínas más estudiadas debido a su homología con la albúmina sérica humana (ASH). ASB y ASH son 76% homologas, la única diferencia entre estas dos proteínas es que en ASH hay un solo triptófano (trp-214) mientras que en ASB hay dos (Trp-134 y Trp-212)². Por lo tanto, para estudios de interacción, ASB en vez de ASH es muy usado por su fácil disponibilidad y bajo costo.

Debido a la presencia de los residuos triptófanos, ASB presenta fluorescencia intrínseca. La espectroscopía de fluorescencia es una técnica útil para el estudio de la interacción de fármacos con ASB y los parámetros termodinámicos obtenidos ayudan a entender la unión fármaco-ASB. Las mediciones de fluorescencia de moléculas orgánicas y macromoléculas pueden proporcionar información sobre la unión de sustancias de moléculas pequeñas a proteínas, tales como el mecanismo de unión, el modo de unión, las constantes de unión, los sitios de unión y las distancias intermoleculares. La intensidad de fluorescencia de un compuesto puede disminuir debido a una variedad de interacciones moleculares, como reacciones de estado excitado, reordenamientos moleculares, transferencia de energía, formación de complejo de estado fundamental y extinción colisional. Tal disminución en la intensidad se denomina *quenching*³.

En esta técnica, una solución de ASB se excita a 280 nm ya que los residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina (Trp, Tyr y Phe, respectivamente) absorben a esa longitud de onda y se observa una banda de fluorescencia en 336 nm. Por lo general, la fluorescencia de la Phe no se observa fácilmente, mientras que la fluorescencia de la Tyr se observa entre 300 y 310 nm, y no se observa en concentraciones de ASB mayores a 4×10^{-6} M.

Los datos del *quenching* de fluorescencia se analizan mediante la ecuación de Stern-Volmer y se grafican como la intensidad relativa de fluorescencia (F_0/F) vs la concentración de albúmina.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia antes y después del agregado del desactivador (*quencher*), respectivamente; K_q es la constante bimolecular de *quenching*, τ_0 es la vida media del fluoróforo en ausencia del *quencher* y se considera que el tiempo de vida de fluorescencia de un biopolímero es de 10^{-8} s⁴, $[Q]$ es la concentración del *quencher*, y K_{SV} es la constante de *quenching* de Stern-volmer.

La disminución de la 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, siendo estático o dinámico o tener una curvatura hacia arriba si el *quenching* es combinado tanto estático como dinámico. Sin embargo, el gráfico no define el tipo de *quenching*. Una de las formas de distinguir entre el *quenching* dinámico o estático es examinar el efecto de la temperatura sobre la constante K_{SV} . El valor de K_{SV} se incrementará con el aumento de temperatura si el *quenching* es dinámico pero el efecto será inverso en el *quenching* estático.

Cuando las moléculas pequeñas se unen de forma independiente a un conjunto de sitios en una molécula, el equilibrio entre moléculas libres y enlazadas se representa mediante la ecuación de Scatchard:

$$\text{Log} [(F_0 - F)/F] = \text{log} [K_a] + n \text{log}[Q] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde $[Q]$ es la concentración de ASB, K_a es la constante de unión y n es el número de sitios de unión. El valor de la constante de unión, K_a , es importante para entender la

distribución del fármaco en el plasma. De la ecuación 2, se procede a graficar y mediante regresión lineal se obtiene la constante de unión (K_a) y el número de sitios de unión (n) a partir de la pendiente y de la intersección en el eje “y”, respectivamente. En general, la constante de unión de un compuesto a la albúmina debe ser lo suficientemente alta para asegurar que se transporte y la distribución a través del organismo, pero al mismo tiempo lo suficientemente baja para que el compuesto pueda liberarse para que alcance su objetivo. Por tal motivo, el rango óptimo se considera $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. Pero además de los sitios primarios, varios sitios de más baja afinidad están disponibles. Por lo tanto, un orden de magnitud de 10^3 M^{-1} del valor de la constante también describe el carácter reversible de la interacción⁶.

Las fuerzas de interacción entre una molécula orgánica y una macromolécula biológica incluyen fuerzas hidrofóbicas, enlaces puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas, etc⁷. Para caracterizar las fuerzas existentes entre el ligando y el complejo con la ASB, se analizan los parámetros termodinámicos dependientes de la temperatura ΔH , ΔS y ΔG . Las magnitudes y los signos de estos parámetros pueden explicar las principales fuerzas involucradas en la unión. Las temperaturas elegidas fueron 25 °C (298K), 30 °C (303K) y 37 °C (310K) y son aquéllas en donde la ASB no sufre ninguna degradación estructural. Los valores de ΔH y ΔS se pueden estimar a partir de la ecuación de van't Hoff

$$\ln K_a = - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Donde K_a es la constante de unión correspondiente a las temperaturas medidas y R es la constante de los gases. El cambio de energía libre (ΔG) puede estimarse a partir de la siguiente relación:

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

Los signos negativos de ΔG indican que el proceso de unión es espontáneo y el efecto es contrario cuando los signos son positivos. Los valores negativos de ΔH indican que la formación del complejo es exotérmica y valores positivos indican que el proceso es endotérmico.

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: (a) $\Delta H > 0$ y $\Delta S > 0$, fuerzas hidrofóbicas; (b) $\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$, fuerzas de Van der Waals y uniones puentes de hidrógeno; (c) $\Delta H < 0$ y $\Delta S > 0$, interacciones electrostáticas⁸.

La albúmina es la principal proteína transportadora en sangre para Zn(II). Modula la captación de zinc por las células endoteliales y facilita la captación de Zn(II) por los eritrocitos. Previos resultados de experimentos de interacción a diferentes valores de pH sugirieron que los residuos de histidina parecen estar involucrados en la unión de zinc. La concentración de Zn(II) en el plasma sanguíneo es cercana a 19 μM y la mayor parte se encuentra unido a la albúmina. El log K para la interacción de albúmina de suero bovino-Zn(II) se calculó en 7,28⁹ y la constante de Stern-Volmer que mide la disminución de la fluorescencia intrínseca de ASB por su interacción con Zn(II) tiene un valor de $K_{sv} = 529 \pm 15 \text{ L.mol}^{-110}$.

Interacción de losartán y el complejo ZnLos con ASB

Para evaluar la interacción del ligando losartán y el complejo ZnLos con ASB, se prepararon soluciones de ASB a 6 μM , buffer Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4) y se agregaron los compuestos disueltos en DMSO (0,5% en buffer) de manera de obtener concentraciones entre 0 y 100 μM . Se incubaron a 25 °C (298K), 30 °C (303K) y 37 °C (310K) durante 1 h. Los espectros de fluorescencia se midieron a una excitación de 280 nm y se recogieron los espectros de emisión entre 290 nm y 450 nm (λ_{max} : 336 nm).

En la Figura VI-1a y 1b, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para ASB con la adición de losartán y ZnLos. En ambos casos, se observó que hubo interacción de ASB con el ligando y el complejo debido a la disminución en la intensidad de la fluorescencia o *quenching*.

A

B

Figura VI-1. Espectro de fluorescencia de ASB losartán (A) y ZnLos (B) a diferentes concentraciones (0-100 μM) $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes.

En la Figura VI-2, se presentan los gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$) de la interacción ASB con losartán y ZnLos. Los gráficos resultaron lineales y de la pendiente se obtuvo las constantes K_{sv} , cuyos valores se muestran en la Tabla VI-1. Los valores de la constante de Stern-Volmer disminuyeron con el incremento de temperatura lo que indicaría que el proceso es de tipo estático.

A

B

Figura VI-2. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de la interacción de ASB con losartán (A) y ZnLos (B) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$.

El número de sitios de unión y la constante de unión de la interacción K_a entre losartán y ZnLos con ASB se obtuvieron de la intersección y la pendiente del gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$

vs. $\log [Q]$ (Figura VI-3). Para ambos casos, la constante de unión K_a se encuentra en el orden 10^3 - 10^4 M indicando una interacción moderada y disminuye al aumentar la temperatura sugiriendo que hay una reducción en la estabilidad del complejo losartán-ASB y ZnLos-ASB. Los valores de n fueron cercanos a 1, demostrando que hay uno solo sitio de unión (Tabla VI-1) Estudios previos de interacción de BSA con losartán arrojaron resultados y comportamientos similares¹¹.

Figura VI-3. Gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ vs. $\log [Q]$ de la interacción de ASB con losartán (A) y ZnLos (B) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Tabla VI-1. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con losartán y ZnLos.

Compuestos	T (K)	$K_{sv}(\times 10^4)$ ($Lmol^{-1}$)	r^2	$K_q (\times 10^{12})$ ($Lmol^{-1}s^{-1}$)	$K_a (\times 10^4)$ ($Lmol^{-1}$)	n
Losartán	298	$2,86 \pm 0,32$	0,9886	$2,86 \pm 0,32$	$4,7 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,02$
	303	$2,25 \pm 0,27$	0,9822	$2,25 \pm 0,27$	$1,7 \pm 0,07$	$0,76 \pm 0,03$
	310	$1,65 \pm 0,72$	0,9806	$1,65 \pm 0,72$	$1,1 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,06$
ZnLos	298	$3,81 \pm 0,82$	0,9957	$3,81 \pm 0,82$	$7,6 \pm 0,07$	$1,19 \pm 0,14$
	303	$2,88 \pm 0,45$	0,9827	$2,88 \pm 0,45$	$0,8 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,32$
	310	$2,47 \pm 0,06$	0,9845	$2,47 \pm 0,06$	$0,4 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,27$

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores K_{sv} .

Los parámetros termodinámicos se evaluaron a partir de la ecuación de Van't Hoff en donde los valores negativos de entalpía ΔH y entropía ΔS indican interacciones de Van der Waals

y enlace puente de hidrógeno y un valor negativo de energía libre (ΔG) sugiere que el proceso es espontáneo para ambos casos (Tabla VI-2).

Tabla VI-2. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y losartán y ZnLos diferentes temperaturas.

Compuestos	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Losartán	-95,25	-249,52	-20,89 (298 K)
			-19,64 (303 K)
			-17,89 (310 K)
ZnLos	-183,40	-542,44	-21,75 (298 K)
			-19,04 (303 K)
			-15,24 (310 K)

Interacción de candesartán y el complejo ZnCand con ASB

Se analizó la interacción del ligando candesartán y el complejo ZnCand con la ASB. Para ello, ASB se disolvió en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) de manera de obtener una concentración final de 6 μ M. Candesartán y ZnCand se agregaron a la solución de ASB hasta obtener concentraciones entre 0 y 40 μ M. Cada solución se incubó a 25 °C (298K), 30 °C (303K) y 37 °C (310K) durante 1 h. Los espectros de fluorescencia se midieron a una excitación de 280 nm y se recogieron los espectros de emisión entre 290 nm y 450 nm (λ_{max} : 336 nm). El espectro de la interacción de ASB con candesartán mostró un solapamiento de bandas (Figura VI-4A) y se utilizó el método de ajuste de curvas con el algoritmo de Levenberg-Marquadt para deconvolucionar las bandas y ajustar los picos correspondientes a ASB. Para el caso del complejo ZnCand, no hubo solapamiento por lo que se trabajó con los espectros medidos.

De la Figura VI-4a y Figura VI-5, se puede observar que a medida que aumenta la concentración del ligando y el complejo, disminuye la intensidad de fluorescencia de la albúmina (*quenching*), lo cual indica que hay una interacción de la proteína con el candesartán y el ZnCand.

Figura VI-4. (A) Espectro de fluorescencia de ASB y candesartán a diferentes concentraciones (0-40 μM) (B) Espectro desconvolucionado de ASB y candesartán $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes.

Figura VI-5. Espectro de fluorescencia de ASB y ZnCand a diferentes concentraciones (0-40 μM) $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$.

A partir de las intensidades máximas de fluorescencia, aplicando la ecuación de Stern-Volmer y graficando F_0/F vs $[Q]$ se obtuvieron los gráficos lineales mostrados en la Figura VI-6. Los valores de K_{sv} y K_q (Tabla VI-3) disminuyen con el aumento de temperatura indicando que el proceso es estático.

A partir de la intersección y la pendiente del gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ se calcularon las constantes de unión (K_a) y el número de sitio de unión (n) (Figura VI-7 y Tabla VI-3). Se puede observar que las constantes de unión disminuyeron con un aumento de la temperatura, lo que indicó en una disminución de la estabilidad de la unión entre ASB y el

compuesto y corroborando que el proceso es estático. Las constantes están en el rango intermedio, lo que sugiere que el candesartán y ZnCand podrían ser transportados por ASB.

Figura VI-6. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de la interacción de ASB con candesartán (A) y ZnCand (B) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Figura VI-7. Gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ de la interacción de ASB con candesartán (A) y ZnCand (B) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Tabla VI-3. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con candesartán y ZnCand.

Compuestos	T (K)	$K_{sv}(x 10^4)$ (Lmol ⁻¹)	r^2	$K_q (x 10^{12})$ (Lmol ⁻¹ s ⁻¹)	$K_a (x 10^5)$ (Lmol ⁻¹)	n
Candesartan	298	7,47 ± 0,74	0,9988	7,47 ± 0,74	16,71 ± 1,34	1,29 ± 0,05
	303	5,02 ± 0,12	0,9979	5,02 ± 0,12	11,37 ± 0,78	1,29 ± 0,02
	310	4,45 ± 0,47	0,9967	4,45 ± 0,47	7,41 ± 0,43	1,23 ± 0,02
ZnCand	298	7,53 ± 0,39	0,9994	7,53 ± 0,39	4,44 ± 0,17	1,19 ± 0,14
	303	4,54 ± 0,23	0,9997	4,54 ± 0,23	1,11 ± 0,25	1,12 ± 0,32
	310	4,26 ± 0,16	0,9918	4,26 ± 0,16	0,70 ± 0,04	1,14 ± 0,27

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores K_{sv} .

Los parámetros termodinámicos se evaluaron con la ecuación de Van't Hoff y se obtuvieron los valores de ΔH y ΔS , y con estos, ΔG . Los valores de ΔH , ΔS y ΔG se muestran en la Tabla VI-4. Como puede observarse, para ambos compuestos un valor negativo de energía libre (ΔG) indica que el proceso es espontáneo. Los valores negativos de ΔH y ΔS indican interacciones de van der Waals y enlace puente de hidrógeno.

Tabla VI-4. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y candesartán y ZnCand a diferentes temperaturas.

Compuestos	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Candesartán	-51,72	-54,61	-35,44(298 K)
			-35,17(303 K)
			-34,79 (310 K)
ZnCand	-108,09	-256,68	-31,60 (298 K)
			-30,32 (303 K)
			-28,52 (310 K)

Interacción de valsartán y el complejo ZnVals con ASB

Para determinar la interacción de ASB con valsartán y ZnVals, soluciones 0,5 % de DMSO en agua de estos compuestos fueron añadidas a soluciones de ASB 6 μM en buffer Tris-HCl de manera de obtener concentraciones entre 0 y 100 μM . Las medidas de fluorescencia se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ (298K), 30 $^{\circ}\text{C}$ (303K) y 37 $^{\circ}\text{C}$ (310K) incubando cada temperatura durante 1h.

Los espectros muestran disminución de la intensidad de fluorescencia en la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de ASB a medida que aumentan las concentraciones de los compuestos. Este proceso puede atribuirse a la formación de un complejo entre ASB y valsartán o ASB y ZnVals, respectivamente (Figura VI-8).

Figura VI-8. Fluorescencia de ASB a diferentes concentraciones de valsartán (A) y Znvals (B). $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes

Los valores de quenching fueron analizados posteriormente con la ecuación de Stern-Volmer y graficados como F_0/F vs $[Q]$ (Figura VI-9). Los valores de K_{SV} obtenidos para ambos compuestos disminuyeron con el incremento de la temperatura sugiriendo una interacción estática (Tabla VI-5).

Figura VI-9. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de la interacción de ASB con valsartán (A) y ZnVals (B) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Como se hizo en los caso anteriores, se grafica $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ en donde, para ambos compuestos, se observó una curvatura hacia arriba (Figura VI-10a y 10b), pero a bajas concentraciones, la zona era lineal (Figura VI-10c y d), por lo que, como se hace habitualmente, se tomaron los cuatro primeros valores para el cálculo de las constantes de unión (K_a) a partir de la pendiente y el número de sitios de unión (n) en la ordenada al origen. En la Tabla VI-5 se resumen los datos obtenidos. La tendencia decreciente de K_a con el aumento de la temperatura muestra que hay moderada afinidad entre los compuestos y ASB. El número de sitios de unión entre los compuestos y ASB, aproximadamente igual a 1, sugiriendo que solo hay un sitio de unión en la molécula de ASB. Por lo tanto, los compuestos pueden unirse y ser transportados por la proteína. Los resultados obtenidos para valsartán están en concordancia con estudios previamente realizados¹².

Figura VI-10. Gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ de la interacción de ASB con valsartán (A) y ZnVals (B) a diferentes temperaturas ($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm.

Tabla VI-5. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con valsartán y ZnVals.

Compuestos	T (K)	$K_{\text{sv}}(\times 10^4)$ (Lmol^{-1})	r^2	$K_q (\times 10^{12})$ ($\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$K_a (\times 10^3)$ (Lmol^{-1})	n
Valsartán	298	$1,29 \pm 0,07$	0,9837	$1,29 \pm 0,07$	$1,9 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,02$
	303	$1,17 \pm 0,02$	0,9919	$1,17 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,04$
	310	$1 \pm 0,05$	0,9915	$1 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,02$
Znvals	298	$0,95 \pm 0,04$	0,9753	$0,95 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,06$
	303	$0,64 \pm 0,03$	0,9926	$0,64 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,04$
	310	$0,57 \pm 0,06$	0,9866	$0,57 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores K_{sv} .

Para elucidar la interacción entre los compuestos y ASB, se calcularon los parámetros termodinámicos a partir de la ecuación de Van't Hoff. De la Tabla VI-6 se puede ver el signo negativo de la energía libre (ΔG) indicando que el proceso es espontáneo para ambos compuestos en todas las temperaturas. Los valores negativos entropía (ΔS) y entalpía (ΔH) sugieren que la unión se da por interacciones de van der Waals y enlace puente de hidrógeno.

Tabla VI-6. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y Valsartán y ZnVals a diferentes temperaturas.

Compuestos	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Valsartán	-169,71	-507,39	-18,5 (298 K)
			-15,97 (303 K)
			-12,41 (310 K)
ZnVals	-26,97	-57,17	-9,94 (298 K)
			-9,65 (303K)
			-9,25 (310 K)

Interacción de telmisartán y el complejo ZnTelm con ASB

Telmisartán y ZnTelm presentan una fuerte fluorescencia intrínseca (360 y 368 nm, respectivamente) debido a la presencia de grupos bifenilo y benzimidazol y las bandas se solapan y aparece en la misma región espectral de ASB. Por lo tanto, para obtener datos de la interacción, la estrategia consistió en que las mediciones de *quenching* se realizaron a concentraciones fijas del ligando y complejos y se variaron las concentraciones de ASB. Telmisartán y ZnTelm se disolvieron en 0,5% DMSO en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) hasta obtener una concentración final de 10 μM y se agregaron soluciones de BSA a valores finales de 0, 2, 6, 10, 20 y 30 μM . Cada solución se incubó a 25 °C (298 K) y 37 °C (310 K) durante 1 h. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron entre 290 y 450 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm). Los espectros de emisión de fluorescencia se ajustaron mediante el método de ajuste de curvas con el algoritmo de Levenberg-Marquadt.

En la Figura VI-11, se puede ver que la fluorescencia intrínseca de telmisartán y ZnTelm disminuye regularmente con la adición de BSA, lo que indica que existe interacción entre la proteína y los compuestos. Las longitudes de onda máximas de telmisartán y ZnTelm a pH

7,4 se encuentran ambas en 360 nm. La longitud de onda máxima de telmisartán-BSA (375 nm) y ZnTelm-BSA (380 nm) se desplaza a la zona roja, lo que sugiere un aumento del microentorno hidrófilo alrededor del grupo benzimidazol.

A

B

Figura VI-11. Espectro de fluorescencia de ASB y telmisartán (A) y ZnTelm (B) a diferentes concentraciones de ASB. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes.

Los valores de fluorescencia inicial (F_0) y máxima (F) de telmisartán y ZnTelm se usaron para el gráfico de Stern-Volmer F_0/F vs $[Q]$ y se calculó K_{sv} mediante regresión lineal. De la Tabla VI-7, puede observar que estas constantes disminuyen con el aumento de la temperatura, lo que indica que los posibles mecanismos de interacción son estáticos en ambos casos.

A

B

Figura VI-12. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ de la interacción de ASB con telmisartán (A) y ZnTelm (B) a diferentes temperaturas ((▲), 298 K; (●), 310 K), $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$.

Los valores de la constante de unión (K_a) y el número de sitios de unión (n) se obtuvieron del gráfico lineal de la Figura VI-13 y se muestran en Tabla VI-7. La constante de unión de telmisartán y ZnTelm indicó que la unión es fuerte (10^4 M^{-1}) y que ambos compuestos pueden ser unidos y transportados por ASB pero la unión se torna débil a altas temperaturas. La disminución de la constante K_a con el aumento de la temperatura también concuerda con el comportamiento de K_{sv} . El número de sitios de, n , resultó aproximadamente igual a 1, lo que indica que hay un sitio único del sitio de enlace para telmisartán y ZnTelm con ASB.

Figura VI-13. Gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ de la interacción de ASB con telmisartán (A) y ZnTelm (B) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$.

Tabla VI-7. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de ASB con telmisartán y ZnTelm.

Compuestos	T (K)	$K_{sv}(\times 10^4)$ (Lmol ⁻¹)	r^2	$K_q (\times 10^{12})$ (Lmol ⁻¹ s ⁻¹)	$K_a (\times 10^4)$ (Lmol ⁻¹)	n
Telmisartán	298	$61,50 \pm 0,03$	0,9985	$61,5 \pm 0,03$	$290 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,02$
	310	$51,38 \pm 0,04$	0,9989	$51,38 \pm 0,04$	$201 \pm 0,03$	$1,17 \pm 0,04$
ZnTelm	298	$12,68 \pm 0,05$	0,9973	$12,68 \pm 0,05$	$11,09 \pm 0,09$	$0,98 \pm 0,03$
	310	$7,41 \pm 0,07$	0,9894	$7,41 \pm 0,07$	$5,65 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,04$

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores K_{sv} .

Los parámetros termodinámicos ΔH , ΔS y ΔG a partir de la ecuación de Van't Hoff se analizaron para caracterizar el tipo de interacciones existentes entre el ligando y el complejo con la ASB. El signo negativo de ΔG calculado (Tabla VI-8) sugiere que la formación del complejo entre telmisartán y Zntelm con ASB es espontánea. Los valores positivos de ΔH y ΔS obtenidos para la unión de ASB-Telm indicarían que la interacción resultante es de tipo hidrófobo, puede deberse a que participan los anillos aromáticos de triptófano, fenilalanina y tirosina. Por el contrario, los valores negativos de ΔH y ΔS para la interacción de ZnTelm y ASB indicarían que las fuerzas de van der Waals y el enlace de hidrógeno desempeñaron un papel importante en la reacción de unión y contribuyeron a la estabilidad.

Tabla VI-8. Parámetros termodinámicos de la interacción entre ASB y Telmisartán y ZnTelm a diferentes temperaturas.

Compuestos	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Telmisartán	23,3	45,48	-36,85 (298 K)
			-37,4 (310 K)
ZnTelm	-43,10	-48,12	-28,76 (298 K)
			-28,19 (310 K)

Interacción de azilsartán y el complejo ZnAzil con ASB

Para este ensayo, ASB se disolvió en buffer Tris-HCl de manera de obtener una concentración final de 6 μM . Azilsartán y ZnAzil se agregaron gota a gota a la solución de ASB hasta obtener concentraciones entre 2 y 20 μM . Cada solución se incubó a 25, 30 y 37 °C durante 1 h. El método de ajuste de curvas con el algoritmo de Levenberg-Marquadt se utilizó para desconvolucionar las bandas de fluorescencia y se ajustaron los valores de los máximos correspondientes a ASB (λ_{max} : 336 nm) y azilsartán o ZnAzil (λ_{max} : 368 nm para ambos compuestos).

Los espectros de fluorescencia de ASB muestran una banda ancha con un máximo a 336 nm y por su parte, los compuestos muestran una banda de fluorescencia a 368 nm. Se observa que la intensidad de la fluorescencia de ASB disminuye al aumentar la concentración de azilsartán y su complejo con Zn. Pero, ambos espectros mostraron adicionalmente una banda ancha con un máximo de 368 nm, cuya intensidad aumenta al

aumentar la concentración de los compuestos y, por lo tanto, se asignó la fluorescencia intrínseca de azilsartán y del complejo al hombro que se observaba (Figura VI-14).

Figura VI-14. Espectro de fluorescencia de ASB a diferentes concentraciones de azilsartán (a) y ZnAzil (b). $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes.

Por ese motivo, las bandas originadas en los espectros de emisión de fluorescencia de ASB con la adición de los compuestos no pudieron ser visibles ya que se superponían y por lo tanto se corrigieron por desconvolución espectral en dos componentes gaussianos (Figura VI-15 y Figura VI-16)

Figura VI-15. Ejemplos del espectro de emisión de ASB-Azilsartán (a) y ASB-ZnAzil (b) desconvolucionado en dos componentes gaussianos por el método de ajuste de curva. Líneas continuas corresponden a los espectros medidos; Guiones corresponden a la desconvolución.

Los espectros corregidos se muestran en la Figura VI-16 donde se muestra la disminución de las intensidades de fluorescencia de ASB con el aumento de la concentración de los compuestos.

Figura VI-16. Fluorescencia de ASB después de los procesos de ajuste y desconvolución de los espectros a diferentes concentraciones de azilsartán (a) y ZnAzil (b). $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes.

En la Figura VI-17 se muestran los gráficos de Stern-Volmer, F_0/F vs $[Q]$, contruidos a partir de las intensidades de fluorescencia en los picos de emisión. Estos gráficos son de tipo lineal y de ellos se obtuvieron los valores promedio de K_{sv} a partir de las pendientes (Tabla VI-9).

Figura VI-17. Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$) para ASB con azilsartán (a) y ZnAzil (b) a diferentes temperaturas (($\blacktriangle$), 298 K; ($\blacksquare$), 303 K; ($\bullet$), 310 K), $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

De los gráficos trazados según la ecuación $\log [(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ (Figura VI-18), se calcularon las constantes de unión (K_a) y el número de sitio de unión (n) a partir de la intersección y la pendiente (Tabla VI-9). Se puede observar que las constantes de unión disminuyeron con el aumento de la temperatura, lo que resultó en una reducción de la estabilidad de la unión entre ASB y el compuesto. Los resultados obtenidos del gráfico de la correlación inversa entre K_a y temperatura indicaron, nuevamente, que los mecanismos de *quenching* de fluorescencia de ASB inducida por azilsartán y ZnAzil son procesos estáticos y no dinámicos. Además, las constantes están en el rango intermedio, lo que sugiere que el azilsartán y el ZnAzil podrían ser unidos y transportados por ASB.

Figura VI-18. Gráficos de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB con azilsartán (A) y ZnAzil (B) a diferentes temperaturas: ($\blacktriangle$) 298 K; ($\blacksquare$) 303 K; ($\bullet$) 310 K, $\lambda_{ex} = 280$ nm

Tabla VI-9. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidad de quenching (K_q), constante de unión (K_a) y n sitios de unión para la interacción de azilsartán y ZnAzil con ASB (6 μ M)

Compuestos	T (K)	$K_{sv}(\times 10^4)$ (Lmol ⁻¹)	r^2	$K_q (\times 10^{12})$ (Lmol ⁻¹ s ⁻¹)	$K_a (\times 10^5)$ (Lmol ⁻¹)	n
Azilsartán	298	9,35 $\pm$ 0,13	0,9995	9,35 $\pm$ 0,13	3,29 $\pm$ 0,21	1,13 $\pm$ 0,02
	303	7,11 $\pm$ 0,04	0,9886	7,11 $\pm$ 0,04	1,40 $\pm$ 0,24	1,03 $\pm$ 0,03
	310	3,81 $\pm$ 0,9	0,9956	3,81 $\pm$ 0,90	0,59 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,05
ZnAzil	298	7,22 $\pm$ 0,03	0,9965	7,22 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,03
	303	5,22 $\pm$ 0,05	0,9937	5,22 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,02
	310	4,44 $\pm$ 0,01	0,9919	4,44 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,2	0,95 $\pm$ 0,07

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores K_{sv} .

Los parámetros termodinámicos se muestran en Tabla VI-10. El valor negativo de ΔG claramente define una reacción espontánea. Los valores negativos de ΔH y ΔS sugieren interacciones de Van der Waals y puente de hidrógeno en la interacción de ASB con los compuestos. Debido a las estructuras del azilsartán, ZnAzil, triptófano y tirosina, es razonable esperar interacción del tipo π - π entre los anillos aromáticos del ASB y los compuestos en estudio.

Tabla VI-10. Parámetros termodinámicos de la interacción de ASB con Azilsartán y ZnAzil

Compuestos	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Azilsartán	-108,53	-258,93	-31,36(298 K)
			-30,07(303 K)
			-28,26 (310 K)
ZnAzil	-61,14	-109,71	-28,44 (298 K)
			-27,89 (303 K)
			-27,12 (310 K)

Conclusiones sobre la evaluación de la biodisponibilidad

De los datos obtenidos para las constantes de unión de los complejos se puede sugerir que tanto ZnCand, ZnTelm y ZnAzil presentan constantes del orden de $10^4 - 10^5$ indicando la posibilidad de unión de esos compuestos en los sitios primarios y de mayor afinidad con la proteína mientras que ZnLos y ZnVals muestran constantes del orden de 10^3 sugiriendo interacción a través de sitios de menor afinidad. En ninguno de los casos existen diferencias desde el punto de vista de los parámetros termodinámicos siendo la interacción espontánea para todos. Probablemente entonces las diferentes interacciones se encuentren relacionadas a factores estéricos al momento de la unión a la albúmina.

Referencias

1. 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. doi:10.1016/j.jlumin.2008.12.010
2. Agudelo D, Bourassa P, Bruneau J, Bérubé G, Asselin É, Tajmir-Riahi HA. Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins. *PLoS One.* 2012;7(8):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0043814
3. Ashoka S, Seetharamappa J, Kandagal PB, Shaikh SMT. Investigation of the interaction between trazodone hydrochloride and bovine serum albumin. *J Lumin.* 2006;121(1):179-186. doi:10.1016/j.jlumin.2005.12.001
4. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.*; 2006. doi:10.1007/978-0-387-46312-4
5. Topală T, Bodoki A, Oprean L, Oprean R. Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Med Pharm Reports.* 2014;87(4):215-219. doi:10.15386/cjmed-357
6. Zhang Y, Shi S, Sun X, Xiong X, Peng M. The effect of Cu²⁺ on interaction between flavonoids with different C-ring substituents and bovine serum albumin: Structure-affinity relationship aspect. *J Inorg Biochem.* 2011;105(12):1529-1537. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.08.007
7. Leckband D. Measuring the forces that control protein interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;29(1):1-26. doi:10.1146/annurev.biophys.29.1.1
8. Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry.* 1981;20(11):3096-3102. doi:10.1021/bi00514a017
9. Masuoka J, Hegenauer J, Van Dyke BR, Saltman P. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin. *J Biol Chem.* 1993;268(29):21533-21537.
10. Plotnikova OA, Melnikov G V., Melnikov AG, Kovalenko A V. Comparative studies of the effects of copper sulfate and zinc sulfate on serum albumins. *Prog Biomed Opt Imaging - Proc SPIE.* 2016;9917:1-7. doi:10.1117/12.2229603
11. Sun H, Science E, Science A. Spectrofluorimetric study on the interaction of losartan potassium. *Int J Pharm Sci Res.* 2016;7(3):1026-1034. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.7(3).1026-34
12. Pawar S, Joshi R, Ottoor D. Spectroscopic and molecular docking study to understand the binding interaction of rosiglitazone with bovine serum albumin in presence of valsartan. *J Lumin.* 2018;197:200-210. doi:10.1016/j.jlumin.2018.01.017

CAPÍTULO VII

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización Fisicoquímica

Espectros Infrarrojos

Cantidades adecuadas de las muestras (1-2 mg) fueron mezcladas con 0,3 -0,4 g de KBr seco para lograr una mezcla de 1-4 % p/p de concentración final del compuesto dado. Las mezclas fueron trituradas y homogeneizadas con un mortero a fin de obtener un polvo finamente dividido y luego se prensaron. La pastilla de espesor delgado fue, posteriormente, medida en un espectrofotómetro FTIR Bruker IFS 66 desde 4000 a 400 cm^{-1} , con un total del 60 scans acumulados y una resolución espectral de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Los espectros infrarrojos obtenidos fueron analizados con el software OPUS 4.2.

Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)

El análisis termogravimétrico y el análisis térmico diferencial se realizó mediante el Analizador Termogravimétrico SHIMADZU TGA-50 y el Analizador diferencial SHIMADZU DTA-50. Se trabajó en atmósfera de O_2 con un flujo de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. El proceso de descomposición térmica se ejecutó hasta 800 $^{\circ}\text{C}$. El rango de muestra utilizado fue entre 5 y 10 mg. Se empleó Al_2O_3 como estándar para el DTA. El residuo obtenido se identificó mediante espectroscopía FTIR. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software TASYs.

Análisis elemental

Para el análisis elemental de C, H y N se usó un analizador Carlo Erba Elemental Analyzer 1108 en el que se produce la combustión de la muestra en un tubo reactor donde es transformada a CO_2 , H_2O y N_2 . La separación de los gases se realiza por cromatografía gaseosa con columna de porapac de longitud variable y para la detección se utiliza un detector de conductividad térmica. El método requiere una calibración previa con una sustancia de composición conocida. En este caso se usaron dos patrones, uno de BBOT (2,5-bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno) y el otro de ácido sulfanílico.

Determinación de contenido de Zinc

Para determinar la cantidad de Zinc, se utilizaron dos métodos. En el primero, se empleó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Instruments Laboratory, Modelo: 457. Se prepararon soluciones de manera de obtener una concentración aproximada inferior a 1,5 ppm de Zinc y se las trataron con HNO_3 para liberar el metal del complejo.

Otro método fue a través del Zincon (Ácido 2-[2-[(Z)-N-[(E)-(6-oxo-3-sulfociclohexa-2,4-dien-1-ilideno)amino]-C-fenilcarbonimidoil]hidrazinil] benzoico). Se preparó una solución madre de sal sódica de Zincon 1,6 mM mezclando 0,007 g del sólido con 200 μ L de NaOH 1M y llevando a un volumen final de 10 ml con agua destilada. Se disolvieron 25 μ L de diferentes concentraciones de complejos y ZnSO_4 (para obtener un rango de concentraciones de 0-40 μ M) en 950 μ L de buffer borato de concentración 50 mM, pH 9.0 y 25 μ L de solución madre de Zincon. Después de incubar a 20°C durante 5 min, se midió la absorbancia a 620 nm. La relación entre el metal y el complejo se calculó a partir de la curva de calibración de ZnSO_4 obtenida¹.

Espectros electrónicos UV

Los espectros electrónicos UV fueron obtenidos a partir de soluciones 10^{-5} M de las muestras en DMSO, (excepto losartán y Znlos que se usó etanol) en un espectrofotómetro UV-VIS, Shimadzu UV 2600 de arreglo de diodos de doble haz. Resolución: 0,1 nm desde 185-900 nm. Ancho de banda variable. En todos los casos se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Para el análisis de los espectros se usó el software UVProbe 2.43 Shimadzu Visual solutions.

Los estudios de estabilidad se realizaron con el fin de asegurar que el complejo no se descomponga en solución con el paso del tiempo. Se disolvieron los compuestos en el solvente adecuado (DMSO o etanol) a 25 °C e inmediatamente se registró la variación del máximo de absorbancia del espectro UV-vis en el tiempo durante 90 minutos, que es un tiempo superior al que demanda la preparación de las soluciones y su empleo para ser usadas en los diferentes ensayos biológicos.

Para la reflectancia difusa al equipo se adicionó el accesorio ISR-2600PLUS. Se utilizó BaO como estándar.

Conductancia molar

Otro parámetro para evaluar la estabilidad es la conductancia molar. Las medidas de conductividad se realizaron con un conductímetro TDS Probe 850,084, Sper Scientific Direct usando los compuestos a una concentración 10^{-3} M en solución acuosa o en 0,5% de DMSO en agua. La estabilidad se evaluó durante 4 h.

Resonancia magnética nuclear

Las mediciones de ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker Ultrashield 600, 14.1 Tesla. Se registraron los espectros de soluciones concentración de 0,01 M en DMSO- d_6 a 25 °C. Se usó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno para calibrar el desplazamiento químico (δ). Los espectros RMN obtenidos y simulación computarizada fueron procesados mediante el software MestreNova versión 7.0.0-8331.

Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos con el espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000. Se utilizaron cubetas de cuarzo con ancho de rendija de entrada y de salida de 10 nm. El paso de longitud de onda de barrido fue de 1 nm y la velocidad de scan fue de 6000 nm/minuto. Se prepararon soluciones 10^{-5} M, ya que a esta concentración se evita la saturación de emisión del detector. Primero se obtuvieron los espectros 3D, de manera de establecer la longitud de onda de excitación y emisión de los compuestos, a partir de estos datos, se trabajaron con los espectros 2D correspondientes. Los datos se procesaron con el software Lab solutions RF versión 1.11.

Determinación de estructuras cristalinas

Las mediciones se realizaron en un difractómetro Oxford Xcalibur Gemini, Eos CCD con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.154184 \text{ \AA}$) monocromada de grafito. Las intensidades de difracción de rayos X se recopilaron (scans ω con compensaciones θ y κ), se integraron y escalaron con el programa CrysAlisPro². Los parámetros de las celdas unitarias se obtuvieron mediante el refinamiento de mínimos cuadrados (según los ajustes angulares para todas las reflexiones recopiladas con intensidades mayores a siete veces la desviación estándar de los errores de medición) utilizando CrysAlisPro. Los datos se corrigieron empíricamente para su absorción utilizando el método de escaneo múltiple implementado en CrysAlisPro. La estructura se resolvió mediante el método de fase intrínseca implementado en el programa SHELXT³ y se refinó mediante mínimos cuadrados de matriz completa.

Actividad antitumoral

Líneas celulares

Células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano: línea A549

El cáncer de pulmón es la causa principal de muertes relacionadas con cáncer en el mundo. El cáncer de pulmón de células no pequeñas representa aproximadamente el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón⁴. La línea celular A549 ha constituido uno de los modelos preclínicos más empleados para estudiar las bases genéticas y moleculares de dicho tipo de cáncer ya que son células con alta actividad metabólica, expresan marcadores y genes tumorales y han servido como base de pruebas de fármacos como paclitaxel, docetaxel y bevacizumab, tanto *in vitro* como *in vivo*⁵.

La línea A549 fue derivada 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 generaciones⁶.

Las células A549 crecen en monocapa y se adhieren al soporte de cultivo. Tienen un tamaño entre 10 y 14 μm . Su morfología se caracteriza por ser fibroblastoide con forma de huso alargado, núcleo centrado y múltiples nucléolos^{7,8}.

Células fibroblásticas fetales de pulmón humano: línea MRC-5

La línea MRC-5 es muy usada como control negativo frente a estudios citotóxicos así como el desarrollo de vacunas ya que no posee ninguna característica tumoral. Además exhibe morfología y crecimiento normal así como estabilidad citogenética⁹. Esta línea deriva de un feto masculino de 14 semanas cuya madre e historia familiar no poseían signos de enfermedad neoplásica. Este criterio fue necesario para categorizarla como línea normal según lo recomendado internacionalmente¹⁰.

Son células adherentes que crecen en monocapa. Su estructura celular se caracteriza por tener forma fibroblástica con largos pseudopodos¹¹.

Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en frascos de 75 cm^2 a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% CO_2 , en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina y 10 % de suero fetal bovino (SFB). Cuando las células en cultivo alcanzaron el 70-80 % de confluencia, fueron despegadas utilizando

TrypLE™ (Gibco). De acuerdo al experimento, $2,5 \times 10^5$ células se sembraron en pocillos de 96, 48, 24 o 6 o en placas de Petri de 100 mm³ con DMEM y 10% de SFB. A las 24 horas, se removió el medio y se colocaron distintas concentraciones de ZnSO₄, de ligandos (losartán, candesartán, valsartán, telmisartán, azilsartán) y sus complejos de Zn(II), en DMEM sin SFB. Los compuestos se disolvieron en DMSO de manera que la concentración de solvente corresponda 0,5% de la solución y no afecte la viabilidad celular ¹². El control se incubó solo con 0,5% de DMSO. La incubación se realizó durante 24 horas. Posterior al tratamiento, se removió el medio y se lavó delicadamente tres veces con PBS (buffer fosfato salino) y luego se hicieron los estudios correspondientes. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Ensayo de viabilidad celular: Ensayo de MTT

Es un método indicador de actividad metabólica celular y por ende permite evaluar la viabilidad. Es un ensayo que se basa en la reducción del compuesto soluble de color amarillo, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa formando un compuesto cristalino coloreado azul-violáceo, el formazán (Figura VII-1). La cantidad de formazán producida se determina espectrofotométricamente una vez disuelto en DMSO o en alcohol isopropílico acidificado, por ende la cantidad de células vivas será proporcional a la intensidad de la solución de formazán¹³.

Figura VII-1. Reacción de reducción de MTT a formazán por la enzima succinato deshidrogenasa

A partir de una solución stock de MTT (0,05 g en 10mL de PBS) se preparó una solución de trabajo 1+9 en DMEM. Para esta determinación, se usaron placas de 96 pocillos. Posterior al lavado de las células A549 y MRC-5 con PBS, se agregó esta solución de trabajo y se incubó durante 3 h a 37 °C. Los cristales de azul de formazán se disolvieron en DMSO y la absorbancia se midió 560 nm con un lector de microplacas.

Medida de las especies reactivas de oxígeno (EROs)

Las EROs intracelulares se detectaron utilizando la sonda H₂DCFDA (diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína). Las células A549 se incubaron en placa de 48 pocillos y después de 24 h de incubación con los compuestos, las células se incubaron con la sonda a una concentración final de 10 µM durante 90 min a 37 ° C bajo protección de la luz. Posteriormente, se lisaron con Triton X-100 al 0,1%. Las EROs intracelulares se detectaron en el espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 (modo fotométrico) utilizando longitud de onda de excitación a 485 nm y emisión a 520 nm.

Determinación de niveles de GSH y relación GSH/GSSG

Las células A549, cultivadas en placas de 48 pocillos y luego de ser tratadas con los compuestos, se lavaron con PBS y se lisaron con 300 µL de Tritón X-100 al 0,1%. El nivel de GSH y la relación GSH/GSSG se midieron por fluorescencia utilizando el método modificado de Hissin y Hilf¹⁴. Para las mediciones de GSH, se mezclaron alícuotas de 100 µL con 1,8 ml de buffer fosfato frío (Na₂HPO₄ 0,1 M-EDTA 0,005 M, pH 8) y 100 µL de o-ftaldialdehído (OPT) (0,1% OPT en metanol). Para GSSG, se incubaron alícuotas de 100 µL con 0,04 M de N-etilmaleimida (NEM) para enmascarar el GSH y luego se mezclaron con 1,8 mL NaOH 0,1 M a pH 12 para hidrolizar GSSG, y se añadió OPT al 0,1% (Figura VII-2). La fluorescencia se determinó con longitud de onda de excitación a 350 nm y se midió la emisión a 420 nm. GSH y GSSG se calcularon a partir de una curva de calibración obtenidas de soluciones estándares de GSH y GSSG (Sigma-Aldrich). El contenido de proteínas se estimó utilizando la técnica de Bradford¹⁵. Se calcularon los µg GSH/mg de proteína y la relación GSH/GSSG, ambos datos se expresaron como porcentaje con respecto al control.

Figura VII-2. Esquema de la determinación de GSH y GSSG celular

Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Las células A549 fueron sembradas en placas de 24 pocillos, posterior al tratamiento fueron lavadas con PBS. Para analizar si los compuestos dañaban la mitocondria, se usó la sonda DIOC₆ (Ioduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina)¹⁶. La sonda se diluyó a una concentración final de 400 nM disuelta en PBS, se incubó durante 30 minutos a 37 °C en 5 % de CO₂. Se removió la sonda, se añadió 500 µL de PBS y se raspó el fondo del pocillo. La solución de lisado celular obtenida se midió a longitud de onda de excitación 485 nm y 535 nm de emisión.

Estudio de apoptosis por microscopía de fluorescencia

Para determinar si la muerte celular inducida por ligando, metal y/o complejo se produjo mediante apoptosis, se realizó una doble tinción fluorescente con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE)¹⁷. NA penetra en las células y emite fluorescencia verde como resultado de la intercalación en el ADN de doble cadena en células vivas. Cuando se encuentra con lisosomas activos con valores de pH ácido, actúa como una base débil y exhibe una fluorescencia roja, la cual puede observarse como gránulos rojos¹⁸. El bromuro de etidio emite fluorescencia roja después de la intercalación en el ADN de las células con una membrana celular alterada (en una etapa posterior de apoptosis y necrosis). Usando esta doble tinción, se pudieron identificar cuatro etapas celulares: células viables con núcleos de color verde brillante y una estructura organizada (control); células apoptóticas tempranas con núcleos irregulares con cromatina condensada y con cuerpos apoptóticos

teñidos en naranja, células apoptóticas tardías con núcleos naranja a rojo con cromatina altamente fragmentada y células necróticas con fluorescencia uniformemente roja.

Las células A549 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos y tratadas con concentraciones de IC_{50} de los complejos y concentraciones equivalentes de sus ligandos. Se usó como el control positivo para apoptosis, 1% de H_2O_2 . Después de 24 h de tratamiento, se recogió el medio con las células desprendidas, las células adherentes se despegaron con TrypLE Express (Gibco) y se centrifugaron ambos líquidos. El sedimento se lavó 3 veces en PBS con centrifugación, luego se resuspendió en AO/EB en solución de PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Olympus CX-35. Se realizó recuento celular en 4-5 campos y los porcentajes se expresaron en función de las células viables.

Evaluación de apoptosis por Western Blot

Para determinar el efecto de $ZnSO_4$, los ligandos y complejos sobre la expresión de Bax (pro-apoptótico), Bcl-XL (anti-apoptótico) y caspasa 3 o 9 (ejecutoras de muerte), se trataron las células A549 con una concentración de IC_{50} de los compuestos durante 24 h. Las células se lavaron y suspendieron en buffer RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mg/ml ácido desoxicólico, 1 mM EGTA, 10 μ g/ml Nonidet-40, pH 7,4, complementado con inhibidores de proteasas: 2,5 μ g/ml leupeptina, 0,95 μ g/ml aprotinina y 2,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (pH 7,4)¹⁹. Luego, 25 μ g del lisado celular se separó mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (80 V, 3 h) y se transfirió a membranas de nitrocelulosa (50 V, 2 h). Después, las membranas se bloquearon en TBS-Tween (50 mM Tris-Cl, pH 7,5 150 mM NaCl, 1% Tween 20) que contenía 5% de leche descremada durante 1 hora. Se incubó durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-Bax (1:750), anti-Bcl-XL (1:1000), Caspase-3/9 (1:750) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU) o anti- β -actina (Sigma-Aldrich) en leche descremada al 5% y luego con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugado con peroxidasa de rábano (1:1000) (Jackson Immunoresearch Inc., EE. UU) durante 1 hora. La detección de β -actina se utilizó para normalizar las transferencias. Las bandas se detectaron con un kit Opti4CN (Bio-Rad, CA, EE. UU.), posteriormente estas bandas se analizaron con el software ImageJ. Los resultados se expresaron como la relación de las densidades ópticas (DO de proteína de interés / DO β -actina) x 100.

Evaluación de la unión al receptor AT1

Células embrionarias de riñón humano: línea HEK-293

Son células provenientes de células de riñón de embrión humano expuestas a fragmentos cortos del adenovirus humano tipo 5 (Ad5). Es una línea celular muy sencilla de cultivar, son de crecimiento muy rápido, tienen mejor supervivencia y adaptación al procedimiento de transfección y una susceptibilidad natural a la adhesión a la superficie. Es la línea celular más útil como herramienta de transfección transitoria para la evaluación de las propiedades farmacológicas de múltiples subtipos de receptores y para el estudio de las relaciones estructura-actividad de estos²⁰.

Recuperación y purificación de ADN plasmídico

El plásmido pCXN2-HA-AT1R-YFP que contiene el receptor humano de angiotensina II tipo 1 (AT1R) unido a la proteína amarilla fluorescente (YFP) como reportera, fue aislado de la bacteria *E. coli* cepa DH5-Alpha ampicilino-resistente de la siguiente manera: se tomó con ansa estéril la cepa bacteriana que se encontraba en un stock de glicerol 50%, se extendió sobre una placa de Petri con Caldo de Luria (LB) (37 g de polvo premezclado de 5 g de peptona, 10 g de peptona de caseína, 10 g de cloruro de sodio, 12 g de agar-agar, 1 L de agua estéril con 100 mg/ml de ampicilina) y luego se estiró por el resto de la placa, se incubó durante 12-18 horas a 37 °C. Se tomó una colonia individual (que contiene millones de bacterias genéticamente idénticas) y se inoculó en 50 mL de cultivo bacteriano líquido Luria (0,5 g NaCl, 0,5 g triptona 0,25 g extracto de levadura y 50 ml agua destilada). El cultivo bacteriano se dejó a 37°C durante 12-18 h en una incubadora de agitación (180-225 rpm). La formación de turbidez indicó crecimiento. También se realizó un control negativo, sin inocular, para descartar crecimiento de otra bacteria.

Para la recuperación de ADN plasmídico del cultivo bacteriano y posterior purificación de ADN, se centrifugó el cultivo para sedimentar las bacterias, luego se utilizó un kit de Maxiprep de plásmido libre de endotoxinas GenElute™ (Sigma-Aldrich). La concentración óptima de ADN para transfección debió ser entre 200 - 400 nM/uL.

Transfección transiente

Esta técnica permitió introducir el plásmido que contiene la secuencia codificante del receptor AT1 dentro de la célula, que posteriormente lo va a expresar en forma transiente ya que no se integra al genoma y no se transmite en la división celular. Las células HEK-

293 se cultivaron al igual que las líneas anteriores usando DMEM. Para los experimentos, las células debieron cultivarse en portaobjetos o pocillos recubiertos con poli-D-lisina, debido a que tienen una alta tasa de crecimiento, se adhieren entre ellas y se levantan en monocapa. Para ello, una solución de 1 mg/mL de poli-D-lisina estéril fue añadida a cada placa o pocillo e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se aspiró la solución y se lavó con PBS. Se dejó secar al menos 2 h.

Las células se sembraron para obtener un 50 a 60% de confluencia. 24 horas después, usando lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) como agente de transfección, se mezcló con el ADN plasmídico y se formó un liposoma catiónico ADN-Lípido, se mezcló con DMEM durante 24 horas y luego se visualización en un microscopio de fluorescencia en tiempo real para determinar el tiempo de mayor expresión del AT1R. El mismo resultó ser a las 48 h post-transfección (Figura VII-3).

Figura VII-3. Esquema de la transfección transiente del receptor AT1

Ensayo de unión a receptor AT1

En este experimento, las células debieron cultivarse en portaobjetos delimitados con silicona, recubiertos con poli-D-lisina. Pasadas las 48 hs post-transfección, las células transfectadas (HEK-293T) fueron lavadas suavemente con la solución de ensayo fría (solución salina balanceada de Hank sin rojo fenol suplementada con 0,2% de albúmina sérica bovina, 0,01% bacitracina, 0,002% fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (en

isopropanol), 0,01% 1,10-fenantrolina (en metanol). Luego se pre-incubaron por 5-10 minutos con las diluciones de los compuestos a testear (0,1 μ M, 1 μ M and 10 μ M). Para la observación de unión total, la preincubación se realizó solo con el buffer y para uniones no específicas, con angiotensina II. Se lavaron las células y se agregaron las diluciones anteriores de los compuestos más angiotensina unida al fluoróforo tetrametilrodamina (TAMRA-AII). Se incubó en frío por 60 minutos bajo protección de la luz. Se lavó con PBS, se eliminó la silicona y se agregó una pequeña gota de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) disuelto en medio de montaje (1 μ g/ml).

Tres y cuatro imágenes de al menos tres experimentos por triplicado fueron adquiridas por microscopía láser confocal (Zeiss LSM700). Se utilizaron tres láseres: 405 nm para DAPI, 488 nm para YFP y 555 nm para TAMRA-AII. Las imágenes obtenidas se cuantificaron con la intensidad de la señal emitida por YFP y se normalizaron al número de células presentes en el campo de visión. Los números de células se obtuvieron contando los números de núcleos teñidos con DAPI. La unión específica se definió como la unión total menos la unión no específica. El porcentaje de inhibición de la unión se definió como la cantidad de TAMRA-AII que permanece en presencia de los compuestos. Las imágenes obtenidas se analizaron por el software Image J (*Tabla VII-1*, Figura VII-4).

Tabla VII-1. Esquema del proceso para el ensayo de unión a receptor AT1

Condición	Pre-incubación (5 min)	Lavado	Pre-incubación (60 min)	Lavado	Montaje	Imágenes	Análisis
Unión total	100 μ L buffer de ensayo	Buffer de ensayo	100 μ L TAMRA-AII 10 μ M	PBS	Una gota de medio de montaje + DAPI	Microscopía confocal	Image J Software
Unión no específica	100 μ L Ang II 10 μ M en buffer de ensayo		100 μ L of Ang II 10 μ M + TAMRA-AII 10 μ M				
Compuestos a ensayar	100 μ L ligandos o complejos a 0,1 μ M, 1 μ M and 10 μ M en buffer de ensayo		100 μ L ligandos o complejos a 0,1 μ M, 1 μ M and 10 μ M + TAMRA-AII 10 μ M

Figura VII-4. Esquema de ensayo para evaluar la interacción del metal, los ligandos y complejos con el receptor AT1

Determinación de EROs en HEK-293T

Para determinar si Ang II produce EROs y los compuestos son capaces de disminuir el estrés oxidativo, se usó la sonda dihidroetidio (DHE). Dentro de la célula, el dihidroetidio es oxidado por los radicales libres al producto fluorescente oxietidio ²¹. Las células HEK-293 se sembraron en placas oscuras de 96 pocillos, posterior a la transfección, las células HEK-293T se trataron con 10 μM de Ang II disuelto en DMEM, 10 μM de Ang II más 0,1 μM , 1 μM o 10 μM de compuestos disueltos en DMEM. Luego de incubar por 24 h, las células se lavaron con PBS y se les agregó 10 μM de la sonda (DHE). Se incubó por 1 h a 37°C, se lavó con PBS y se midió en lector de placa a 536 nm de excitación y 635 nm de emisión. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford. Los resultados se graficaron como la intensidad de fluorescencia de DHE/mg proteína en función de la concentración de cada compuesto.

Determinación de flujo de Calcio

En este ensayo se utilizó la sonda Fura-2 AM (Fura-2 acetoximetil éster) que es un indicador de calcio radiométrico no invasivo. Fura-2 AM atraviesa las membranas celulares y las esterasas celulares eliminan el grupo acetoximetilo. Ca^{2+} unido a Fura-2 tiene su máximo de excitación a 340 nm, y para el Ca^{2+} libre Fura-2 se excita a 363 nm. En ambos estados, el máximo de emisión es de aproximadamente a 510 nm. Las células HEK-293 se

sembraron en placas de 96 pocillos de pared negra recubiertas con poli-D-lisina y posteriormente se transfectaron. Se retiró el medio y se lavó con 1-2 ml de solución salina tamponada con HEPES (HBS) (145 mM NaCl, 5 mM, KCl 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM glucosa). Las células HEK-293T se incubaron con 5 µM de Fura-2 AM con ácido plurónico F-127 al 0,05% 1 h, a temperatura ambiente, en oscuridad. La sonda se aspiró y se agregaron 100 µl de HBS a todos los pocillos, y los niveles de Ca²⁺ intracelular se midieron posteriormente. Luego de la primera lectura, se eliminó HBS y se agregaron 100 µL de Ang II 10 µM disuelto en buffer HBS. Los pocillos restantes se trataron con 100 µL de 10 µM Ang II más los ligandos, metal y complejo en concentraciones de 0,1 µM, 1 µM y 10 µM. La intensidad de la fluorescencia se capturó a 28 °C durante 90 segundos con intervalos cinéticos de 9 segundos después de la adición de compuestos en un lector fluorométrico de placas. Para las curvas estándar, se utilizaron 1 mM de CaCl₂ (calcio saturado) y EDTA 10 mM (calcio cero). Los valores se aplicaron a la fórmula de tinte radiométrico estándar desarrollada por Grynkiewicz ²² donde $[Ca^{2+}] = K_d \beta [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$. K_d = 224 nM (constante de disociación de fura-2), R_{min} = relación para calcio cero, R_{max} = relación para calcio saturado, β = fluorescencia de calcio cero a 380 nm/fluorescencia de calcio saturado a 380 nm y R = relación de la fluorescencia experimental de 340 nm/fluorescencia de 380 nm. Se graficó la variación de la $[Ca^{2+}]$ intracelular en función del tiempo.

Experimentos “in vivo”

Los estudios *in vivo* y *ex vivo* se llevaron a cabo con animales del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. El protocolo para el uso de animales fue instaurado por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar Kyoto machos con pesos de 230 ± 20 g de 8 semanas de edad al inicio del experimento. 25 animales fueron divididos al azar en 5 grupos con 5 individuos cada uno y alojados en condiciones estándar de laboratorio con acceso libre a agua y alimento regular durante 5 semanas.

La hipertensión se indujo tratando los animales con L-NAME (30 mg/kg/día en agua potable) durante 4 semanas, excepto el grupo control que solo bebió agua potable. La última semana, además del L-NAME, los animales recibieron en el agua de bebida ZnSO₄ (10 mg/Kg/día), telmisartán (10 mg/Kg/día) o ZnTelm (11 mg/Kg/día). La presión arterial de

cada rata fue registrada semanalmente y diariamente (luego de administrar los compuestos a estudiar) mediante un pletismógrafo de cola.

Al final del experimento, un animal de cada grupo fue sometido a eutanasia y se extrajo la aorta torácica para estudios histológicos.

Análisis histológicos ex vivo

Los segmentos aórticos se fijaron durante dos días con una solución de formaldehído al 6% y luego se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, desde alcohol al 70°, 90°, 96° hasta 100° sumergiéndolos 3 veces en cada graduación durante 10 minutos, se los transfirió a xilol lavándolos 3 veces durante 10 minutos y posteriormente se los incluyeron en parafina. Se realizaron cortes con un grosor de 5 µm aproximadamente.

Para la tinción con hematoxilina-eosina²³, los tejidos fueron desparafinados inicialmente colocándolos en estufa 30 minutos a 60 °C y sumergiéndolos en xilol dos veces durante 10 minutos y posteriormente se efectuaron las hidrataciones en graduaciones decrecientes de etanol durante 10 minutos cada uno a 100°, 96°, 80° y 50° y 5 min en H₂O destilada. Más tarde, los tejidos fueron tratados con hematoxilina durante 5-10 minutos, se lavó con agua corriente y con agua destilada y se efectuó la tinción con eosina al 0,2% en agua durante 30 segundos a 2 minutos. En esta tinción se puede observar que el colágeno aparece en rosa pálido, las células musculares en rosa fuerte, citoplasma rosado y núcleos azules oscuros o púrpuras, eritrocitos en color cereza.

Para la tinción tricrómica de Masson²⁴, se desparafina de igual manera que el procedimiento anterior y se agrega Hematoxilina de Weigert durante 5 minutos, se lava con agua corriente y se añade Fucsina de Ponceau durante 5 min, luego ácido fosfomolibdico 5 min, dos veces y finalmente verde luz entre 5 y 7 min, se deshidrata con alcohol 70°, 96° y Xilol (10 minutos cada uno) y se realiza el montaje. Se observa tejido conjuntivo (donde se encuentra el colágeno) color azul tejido muscular en rojo pardo y tejido epitelial rojizo.

Las imágenes se observaron usando el microscopio Olympus CX-35 y se analizaron en el Programa ImageJ (Instituto Nacional de Salud). El área de la sección transversal (AST) se calculó restando el área interna del área externa. Se midió el grosor de la pared (W), el diámetro de la luz vascular (L) y se calculó la relación entre ambos (W/L). Para cada rata, se midieron tres secciones aórticas y se determinó la media para cada grupo experimental.

Interacción con albúmina

La albúmina sérica bovina (ASB) se disolvió en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) a una concentración final de 6 μ M. Los ligandos y los complejos disueltos en 0,5% DMSO se añadieron cuidadosamente a la solución de ASB de manera de formar una mezcla homogénea. Las soluciones se incubaron a 25 °C (298 K) y 37 °C (310 K) durante 1 hora cada uno. Se prepararon 3 soluciones de cada concentración y se realizaron tres experimentos diferentes para cada temperatura.

Los espectros de fluorescencia se midieron en el espectrofotómetro Shimadzu RF-6000, a una excitación de 280 nm y se registró el espectro de emisión entre 290 y 450 nm, las ranuras de emisión se ajustaron a 10 nm y la velocidad de escaneo fue de 6000 nm/minuto. Los espectros fueron extraídos por medio del software Lab solutions RF versión 1.11. En los casos que se debió desconvolucionar, se usó el software Origin Pro 9.1 para ajustar los espectros mediante el método de ajuste de curvas con el algoritmo de Levenberg-Marquadt. Se tomaron las medias de los valores de fluorescencia correspondiente a cada concentración para cada temperatura. Con esos datos se hicieron los cálculos posteriores y cada resultado se expresó como la media $\pm$ SD.

Análisis estadístico

Todos los ensayos celulares se realizaron por triplicado en al menos 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM (error estándar de la media). El análisis estadístico se realizó mediante prueba de ANOVA (análisis de varianzas) en conjunto con el test de Fisher (LSD) para analizar medias. Se empleó el software OriginPro 9.1.0 (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.). Se compararon los valores del control o basal con los valores del tratamiento así como los valores obtenidos a las mismas concentraciones luego del tratamiento del metal, el ligando precursor y el complejo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Referencias

1. Säbel CE, Neureuther JM, 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. doi:10.1016/j.ab.2009.10.037
2. Oxford Diffraction Ltd. CrysAlisPro. *CrysAlisPro*. 2010.
3. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr Sect A Found Crystallogr.* 2008;64(1):112-122. doi:10.1107/s0108767307043930
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-594. doi:10.4065/83.5.584
5. Maione P. Combining targeted therapies and drugs with multiple targets in the treatment of NSCLC. *Oncologist.* 2006;11(3):274-284. doi:10.1634/theoncologist.11-3-274
6. 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. doi:10.1002/ijc.2910170110
7. Jiang R, De, Shen H, Piao YJ. The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(4):663-667.
8. Ren Z-X, Yu H-B, Li J-S, Shen J-L, Du W-S. Suitable parameter choice on quantitative morphology of A549 cell in epithelial-mesenchymal transition. *Biosci Rep.* 2015;35(e00202):1-7. doi:10.1042/bsr20150070
9. Zhang K, Na T, Wang L, Gao Q, Yin W, Wang J, Yuan BZ. Human diploid MRC-5 cells exhibit several critical properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Vaccine.* 2014;32(50):6820-6827. doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.071
10. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature.* 1970;227(5254):168-170. doi:10.1038/227168a0
11. Pate K, Benghuzzi H, Tucci M, Puckett A, Cason Z. Morphological evaluation of MRC-5 fibroblasts after stimulation with static magnetic field and pulsating electromagnetic field. *Biomed Sci Instrum.* 2003;39:460-465.
12. Timm M, Saaby L, Moesby L, Hansen EW. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology.* 2013;65(5):887-894. doi:10.1007/s10616-012-9530-6
13. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-245. doi:10.1007/978-1-61779-80-5_20
14. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
16. Chang H-Y, Huang H-C, Huang T-C, Yang P-C, Wang Y-C, Juan H-F. Flow cytometric detection of mitochondrial membrane potential. *Bio-protocol.* 2016;3(8):1-8. doi:10.21769/bioprotoc.430
17. Wu X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med Sci Monit Basic Res.* 2015;21:15-20. doi:10.12659/MSMBR.893327
18. Brunk UT, Neuzil J, Eaton JW. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep.* 2001;6(2):91-97. doi:10.1179/135100001101536094
19. Juaristi JA, Aguirre MV, Todaro JS, Alvarez MA, Brandan NC. EPO receptor, Bax and Bcl-xL expressions in murine

- erythropoiesis after cyclophosphamide treatment. *Toxicology*. 2007;231(2-3):188-199.
doi:10.1016/j.tox.2006.12.004
20. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187-200.
doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014
 21. Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Physiol*. 2004;287(4):C895-C902.
doi:10.1152/ajpcell.00028.2004
 22. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-3450.
 23. Noma T, Mizushige K, Yao L, Yu Y, Kiyomoto H, Hosomi N, Kimura S, Abe Y, Ohmori K, Matsuo H. Alteration in aortic wall stiffness and accumulation of collagen during the prediabetic stage of type II diabetes mellitus in rats. *Jpn Circ J*. 1999;63(12):988-993.
doi:10.1253/jcj.63.988
 24. Zhang L-H, McKallip RJ, Garner RE, Pang X-F, Zhao Z-Q, Bai F, Wang N-P. Angiotensin II AT1 receptor alters ACE2 activity, eNOS expression and CD44-hyaluronan interaction in rats with hypertension and myocardial fibrosis. *Life Sci*. 2016;153:141-152.
doi:10.1016/j.lfs.2016.04.013

Conclusiones finales

El trabajo desarrollado en esta tesis nos permitió demostrar la hipótesis que la modificación estructural de los fármacos empleados para el tratamiento de la hipertensión (familia de sartanes) por complejación con el biometal Zn produce una mejora en su actividad.

En el capítulo II, se muestra la síntesis y caracterización de cinco complejos de sartanes (losartán, candesartán, valsartán, telmisartán y azilsartán con Zn(II) (Figura 0-1).

Losartán [Zn(Los)₂].3H₂O (ZnLos)	Candesartán [ZnCand(H₂O)₂].2H₂O (ZnCand)	Valsartán [ZnVals(H₂O)₂] (ZnVals)

Telmisartán [Zn(Telm)₂(H₂O)₂].2H₂O (ZnTelm)		Azilsartán [Zn₂(Azil)₂(H₂O)₄].2H₂O (ZnAzil)

Figura 0-1. Estructuras propuestas para los complejos de sartanes con Zn

Se determinaron las estequiometrías de los complejos, la presencia de moléculas de agua de hidratación y coordinación y los sitios de interacción con el ligando. Asimismo, se determinó que los complejos en solución son estables (al menos durante el tiempo de manipulación para efectuar las determinaciones biológicas).

En el capítulo III, se evaluó el efecto de las modificaciones estructurales introducidas sobre la actividad antitumoral. Los complejos produjeron mayores efectos citotóxicos sobre las células tumorales A549, siendo específicos ya que no alteraron la viabilidad celular de células de fibroblastos de pulmón (MRC-5). Los mecanismos de apoptosis fueron por estrés oxidativo para ZnLos, ZnTelm y ZnAzil o por daño mitocondrial para ZnCand y ZnVals. Estos dos últimos complejos presentan similitud estructural.

En el capítulo IV, se midió la interacción de los complejos y ligandos con el receptor de angiotensina II (AT1), péptido que produce el aumento de la presión arterial. Como ya se mencionó, los ligandos seleccionados producen antagonismo de dicho receptor y por lo tanto, se usan en la terapia de la hipertensión arterial. La complejación con Zn de los cinco sartanes probados mejoró su unión con el receptor. Se pudo demostrar que existe una relación entre la estructura de los complejos y la actividad. Nuevamente, el grupo de ZnCand y ZnVals se diferenció del resto en cuanto a que produjo una mejora intermedia. El complejo que produjo el mejor bloqueo del receptor AT1 fue el ZnTelm por su estructura abierta y además mejoró notoriamente el efecto del fármaco de origen. Finalmente, los complejos con dos ligantes quelatos (losartán y azilsartán) produjeron mejoras de comportamiento pero, comparados con los otros tres complejos mostraron menor porcentaje de bloqueo del receptor, probablemente por efecto estérico. Nuevamente, la relación estructura-actividad se vio reflejada en los efectos antioxidantes, que siguieron el mismo comportamiento de mejora de actividad. Los nuevos complejos demostraron reducir las EROs cuando se unieron al receptor AT1, impidiendo la unión de Ang II. El que mayor mejora de la reducción del estrés oxidativo produjo por complejación fue ZnTelm. Por otra parte, los complejos disminuyeron la liberación de calcio intracelular inducida por Ang II, por lo que serían capaces de impedir la contracción celular. De todos ellos, se observó nuevamente que el complejo ZnTelm produjo los efectos más marcados sobre la inhibición de liberación del calcio (aunque ese efecto también fue observado para el ligando sin complejar).

En el capítulo V, habiendo determinado que el complejo de ZnTelm fue el compuesto que tuvo mejor actividad antitumoral con un menor valor de IC_{50} con respecto a los otros

complejos y produjo un mejor bloqueo del receptor, se lo seleccionó para probar su efecto *in vivo*. Para ello se trabajó con un modelo de hipertensión inducida por L-NAME en ratas Wistar y se pudo demostrar que el complejo presentó mejor efecto hipotensor que el fármaco comercial, mejoró la progresión de fibrosis vascular y produjo disminución de rigidez arterial por reducción de fibras de colágeno.

Finalmente, en el capítulo VI, se evaluó la biodisponibilidad de los compuestos a través de su interacción con albúmina sérica bovina. Todas las interacciones resultaron ser espontáneas ocupando sólo un sitio de unión con la proteína. En líneas generales, a 37 °C los sartanes resultaron ser más afines por la albúmina que los complejos (menos el valsartán que sólo a esa temperatura resultó tener una afinidad parecida al complejo). Los complejos de candesartán, telmisartán y azilsartán muestran afinidades similares (con valores de constantes del orden de 10^4 Lmol^{-1}) mientras que los complejos de losartán y valsartán tienen menor afinidad para la unión. Esta variación puede deberse a las diferentes interacciones del compuesto con la proteína: π -stacking y fuerzas hidrofóbicas (telmisartán), enlaces puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, como se encontró para esta serie de complejos y los demás sartanes e interacciones electrostáticas. De todos modos, los órdenes de las constantes de afinidad están en el rango donde los compuestos pueden ser transportados y liberados por la albúmina.

El conjunto de estas observaciones puede emplearse para el diseño de nuevos fármacos en los que están potenciadas no sólo sus propiedades antihipertensivas, sino también sus propiedades antitumorales.

Anexo: Publicaciones

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

- Martínez VR, Aguirre M V., Todaro JS, Piro OE, Echeverría GA, Ferrer EG, Williams PAM. Azilsartan and its Zn(II) complex. Synthesis, anticancer mechanisms of action and binding to bovine serum albumin. *Toxicol Vitro*. 2018;48:205-220. doi:10.1016/j.tiv.2018.01.009
- Martínez VR, Aguirre M V, Todaro JS, Piro OE, Echeverría GA, Naso LG, Ferrer EG, Williams PAM. Interaction of Zn with Losartan. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in lung cancer cells and effects on alkaline and acid phosphatases. *Biol Trace Elem Res*. 2018;186(2):413-429. doi:10.1007/s12011-018-1334-x
- Martínez VR, Aguirre M V., Todaro JS, Piro OE, Echeverría GA, Ferrer EG, Williams PAM. Improvement of the anticancer activities of telmisartan by Zn(II) complexation and mechanisms of action. *Biol Trace Elem Res* (enviado)

Además, se publicaron trabajos relacionados:

- Naso L, Martínez VR, Lezama L, Salado C, Valcarcel M, Ferrer EG, Williams PAM. Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxidovanadium(IV) complex. Interactions with bovine serum albumin. *Bioorganic Med Chem*. 2016;24(18):4108-4119. doi:10.1016/j.bmc.2016.06.053
- Goitia H, Quispe P, Naso L, Martínez V, Rey M, Rizzi A, Ferrer E, Williams PAM. Interactions of rutin with oxidovanadium(IV) cation. Anticancer improvement effects of glycosylated flavonoids. *New J Chem*. 2019. doi:10.1039/c9nj01039d

Así mismo, se presentaron comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

- Imaging Techniques for Biotechnology and Biomedical Applications Workshop. La Plata. Diciembre 2016. In vitro anticancer mechanism of a Zn losartan complex. Valeria Martinez. Evelina Ferrer. Patricia Williams
- Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires. Noviembre 2017. Azilsartan and its Zn(II) complex. Synthesis, anticancer mechanisms of action and

interaction with bovine serum albumin. Valeria Martinez. Juan Todaro. Maria Victoria Aguirre. Gustavo Echeverría. Oscar Piro. Evelina Ferrer. Patricia Williams

- XX Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica. Córdoba. Mayo 2017. Síntesis y caracterización del complejo de Zn (II) y losartán. Efectos antitumorales y actividad sobre fosfatasas. Valeria Martinez. Juan Todaro. Maria Victoria Aguirre. Gustavo Echeverría. Oscar Piro. Luciana Naso Evelina Ferrer. Patricia Williams
- 50 Reunión Internacional del Ciencias Farmacéuticas. San Luis. Noviembre 2018. Nuevo complejo de Zn(II) con el fármaco antihipertensivo candesartan. Síntesis y actividades biológicas. Valeria Martinez. Juan Todaro. Maria Victoria Aguirre. Augusto Martins Lima. Nikolaos Stergiopulos. Evelina Ferrer. Patricia Williams
- 14th European Biological Inorganic Chemistry Conference. . Reino Unido. Agosto 2018. Antitumor (in vitro) and antihypertensive (in vivo) effects of a new coordination complex formed with the drug telmisartan and the biometal Z(II). Valeria Martinez. Juan Todaro. Maria Victoria Aguirre. Evelina Ferrer. Patricia Williams
- XXI Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica. Tucumán. Marzo 2019. Síntesis de complejos VO-flavonoides. Estudio de su actividad citotóxica y capacidad antioxidante. Helen Goitia. Patricia Quispe. Luciana Naso. Valeria Martinez. Alberto Rizzi. Marilin Rey. Evelina Ferrer. Patricia Williams