

TABLA DE CONTENIDO

Interacción de Casiopeínas [®] con agentes reductores biológicos	2
Síntesis y Caracterización Experimental-Computacional de μ_2 -Ciclotetравanadato de Bis(1,10-FENANTROLINA) DI(glicinato)cobre (II) de Bis[(1-10-fenantrolina) (glicinato)cobre(II)] con Potencial ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA	6
Estudio de los sitios de unión a Cu(II) y su actividad redox en las proteína alfa- y beta-sinucleína.....	12

INTERACCIÓN DE CASIOPEÍNAS® CON AGENTES REDUCTORES BIOLÓGICOS

Fabiola Nieto Camacho¹, Adrián Espinoza Guillén¹, Lena Ruiz-Azuara¹

¹Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio B, Departamento de Química Inorgánica Nuclear, Laboratorio 210 de Química Inorgánica Medicinal, Av. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, CDMX

fabelle.nc@gmail.com

Resumen

En los últimos años la cifra de muertes por cáncer a nivel mundial ha ido en incremento, esto originó nuevos enfoques para el tratamiento del cáncer que incluyen una variedad de moléculas diseñadas para actuar sobre objetivos específicos dentro de la célula neoplásica, como es el caso de las Casiopeínas®, compuestos quelatos mixtos de cobre que disminuyen la toxicidad y exhiben un mayor potencial antiproliferativo que el cisplatino en carcinoma de ovario humano, leucemia murina, carcinoma adenocolorrectal y carcinomas cervico-uterinos. Para este trabajo es de interés conocer la interacción que tienen las Casiopeínas® con reductores biológicos mediante técnicas espectroscópicas y su influencia en la producción de especies reactivas de oxígeno al generar un desbalance oxidativo en la célula que la lleva a la muerte.

Introducción

De acuerdo con la publicación realizada el 12 de septiembre del 2018 por la Organización Mundial de la Salud, la segunda causa de muerte a nivel mundial y la tercera en México es el cáncer, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En México los tipos de cáncer con mayor mortalidad registrados en el 2018 son cáncer de mama, de próstata, colorrectal, de tiroides y cervicouterino, respectivamente ⁽²⁾, sumando un total de 190 667 casos de cáncer y 83 476 muertes.

Dentro de los tratamientos que se utilizan para esta enfermedad se encuentra la quimioterapia, donde un problema frecuente en este tratamiento es el alto costo, los efectos secundarios y la resistencia que han generado algunos pacientes al medicamento, como es el caso del cis-platino, un metalofármaco que se utiliza para tratar cáncer de vejiga, cáncer testicular, de cabeza y cuello, de esófago, de pulmón, de mama, cervical, de estómago y cáncer de ovario. Un metalofármaco es una molécula en desarrollo con un centro metálico en su estructura y en los últimos años el cis-platino ha motivado la búsqueda de nuevos compuestos metálicos que puedan utilizarse en esta enfermedad y reduzcan los efectos negativos.

Las Casiopeínas® (Cas) son una familia de compuestos antineoplásicos quelatos mixtos de cobre (II) que tienen un ligante bidentado donador por nitrógenos tales como fenantrolina o biperidina y un ligante secundario bidentado donador por oxígenos como pueden ser un aminoacidato, acetilacetato o salicilaldehidato. El resultado de diferentes estudios in vitro e in vivo ha demostrado que las Casiopeínas®

poseen actividad antiproliferativa, citotóxica, genotóxica y antitumoral. Las más estudiadas han sido las llamadas CasIIgly y CasIIIa, y ésta última ya se encuentra en fase clínica 1.

Se ha evaluado el efecto citotóxico de las Casiopeínas contra varias líneas celulares tumorales, como Hela (cérvix), CHP-212 (neuroblastoma), B16 (melanoma) y A-549 (pulmón); donde se observó que la adición de las Casiopeínas generaba un agotamiento de glutatión intracelular. El mecanismo de acción de las Casiopeínas se ha dado a través de una ruptura de plásmidos del ADN y además mediante un desbalance redox de la célula favoreciendo el de estrés oxidativo⁽¹¹⁾. El potencial redox de estos compuestos les permite catalizar la reacción de Fenton generando múltiples especies reactivas de oxígeno, como los radicales hidroxilo (HO[•]) y superóxido (O₂^{•-}), además del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El mecanismo de acción propuesto con anterioridad⁽¹⁾ y que se plantea corroborar con el presente trabajo es el siguiente:

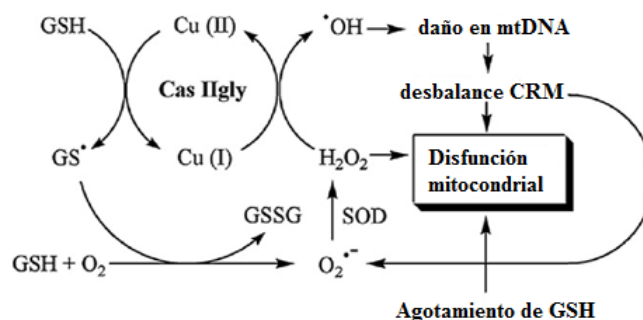


Figura 1. Mecanismo de acción propuesto de la CasiopeínaIIgly, tomada y traducida del artículo original⁽¹⁾.

Resultados

Por medio de espectroscopía de UV-vis y resonancia paramagnética electrónica se estudió la interacción de la Casiopeína CasIIIa con cisteína como reductor biológico.

En una primera instancia se obtuvieron los espectros de UV-vis de la figura 2, donde se puede observar que el entorno de coordinación del cobre (II) de la Casiopeína, constituida por dos átomos de nitrógeno provenientes de la 4,4-dimetil,2,2-bipiridina y dos átomos de oxígeno del acetilacetato, permite un máximo de absorción en 600 nm debido a las transiciones electrónicas de tipo d→d; sin embargo, este entorno de coordinación se ve afectado en presencia de una proporción 1:1 con cisteína a una concentración 4mM ocasionando un desplazamiento del máximo de absorción a longitudes de onda mayor. Este desplazamiento puede explicarse por la incorporación de un nuevo átomo donador de un ligante de campo débil a la esfera de coordinación, el cual disminuye el valor del 10Dq, considerando el modelo de campo cristalino.

Se presenta la formación de una nueva banda en un intervalo de 400 a 450 nm, la cual está asociada a la transferencia de carga S(σ)→ Cu²⁺ (x²-y²) y S(π)→ Cu²⁺ (x²-y²), que acorde con la literatura esta banda se encuentra en valores de 403 nm en metaloproteínas de cobre⁽¹²⁾ y con base en ello se puede proponer la formación de una especie de tipo [Cu(II)cas-S-cys]^(4,6).

Al mezclar la Casiopeína con cisteína en proporciones 1:5 a la cual se logró la reducción del cobre (II) y adicionando cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) en agitación con O₂ (g), se observa la generación de formazán, cuyo máximo de absorción se encuentra en 560-570 nm enmascarando la absorción de la

transición $d \rightarrow d$ del cobre. Lo cual puede ser un indicio de la generación del radical superóxido en el sistema, y que se confirmará por EPR (figura 2 d).

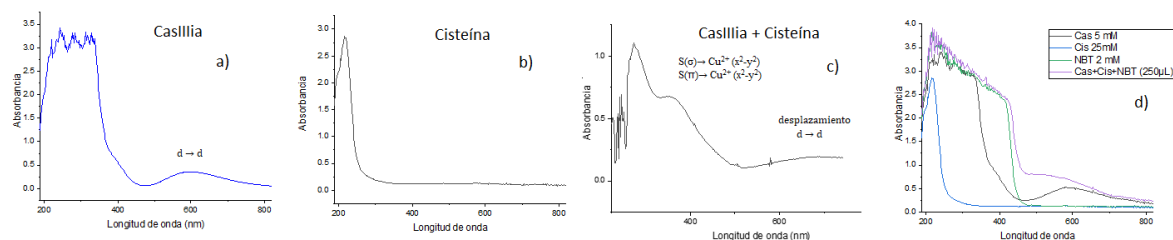


Figura 2. Espectros de UV-vis: a) CasIIIa 4mM en MeOH/H₂O, b) Cisteína 4mM en MeOH/H₂O, c) Mezcla de la CasIIIa con cisteína en relación 1:1, 4mM MeOH/H₂O, d) Mezcla de CasIIIa con cisteína en proporción 1:5 con NBT para identificar formazán en MeOH/H₂O. Mediciones realizadas inmediatamente al finalizar de mezclar.

Mediante resonancia paramagnética electrónica se identificó a la Casiopeína por las señales hiperfinas del cobre (II) que se presentaron con un valor de la constante de acoplamiento de $A_{\parallel} = 17.9179$, además de que se observaron los acoplamientos con los núcleos de nitrógeno. Al colocar cisteína en una proporción 1:1 se observa un desplazamiento de las señales hiperfinas del cobre obteniendo un valor de $A_{\parallel} = 17.1573$, esto indica que el ambiente electrónico de coordinación del cobre ha cambiado, lo que puede ser corroborado con lo observado en el espectro de UV-vis por la formación del enlace S-Cu, como se observa en los incisos a) y b) de la figura 3.

Con el sistema de Casiopeína y cisteína en proporciones 1:5 a concentración 1 mM, se mostró la reducción del cobre (II) de la Casiopeína a cobre (I) debido a que el sistema dejó de tener carácter paramagnético, llevando a la oxidación de la cisteína (figura 3 C).

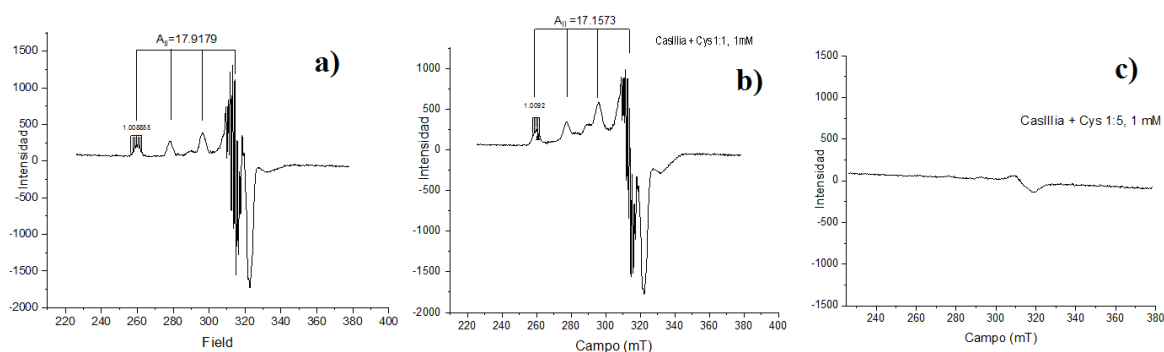


Figura 3. Espectros de RPE: a) Casiopeína CasIIIa 1mM en MeOH/H₂O, b) Cambio en el entorno electrónico de la CasIIIa con cisteína 1:1 a 1mM, c) Reducción de la CasIIIa por la cisteína en proporción 1:5 a 1mM. Mediciones realizadas inmediatamente al finalizar de mezclar.

Conclusiones

La Casiopeína CasIIIa interacciona con la cisteína cambiando el entorno de coordinación en el cual la cisteína pudiera estar coordinada al Cu (II) mediante el azufre ^(7,9) de su estructura generando un nuevo compuesto. Al aumentar la concentración de cisteína en el sistema se favorece la reducción del cobre y la

posible generación de la cisteína oxidada como se ha visto en metaloproteínas y otros compuestos⁽¹⁰⁾, por lo tanto, es una forma en la que disminuye la concentración de un reductor o antioxidante en el sistema.

Bibliografía

1. Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., & Day, B. J. (2010). Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268(3), 176–183.
2. Globocan 2018. Population Fact Sheets, “Mexico”. Recuperado de <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
3. Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition. Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge. © Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge 2015. Published in 2015 by Oxford University Press.
4. Speisky Hernán, et. al. Cu(I)-Glutathione complex: A potencial source of superoxide radicals generation. *Bioinorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 6568-6574.
5. Ana Luisa Alonso, S. Estudio de la reactividad de compuestos mixtos de Cu (II) Casiopeínas frente a especies reductoras y su participación en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Tesis 2016.
6. Dr. Fernando Cortés, Lilian G. Ramirez. Estudio teórico de la interacción de Casiopeínas con especies tioladas en ausencia y presencia de oxígeno.
7. Albro, P. (1986). Generation of hydrogen peroxide by incidental metal ion-catalyzed autooxidation of glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 27(3), 191–203.
8. Alejandro Marín, M. Estudio de la auto asociación de la casiopeína III-ia en disolución acuosa. Tesis 2016, Ernesto Carrillo Nava.
9. Ngamchuea, K., Batchelor-McAuley, C., & Compton, R. G. (2016). The Copper (II)-Catalyzed Oxidation of Glutathione. *Chemistry - A European Journal*, 22(44), 15937–15944.
10. Alexander V. Kachur, Cameron J. Koch & John E. Biaglow (1999) Mechanism of copper-catalyzed autoxidation of cysteine, *Free Radical Research*, 31:1, 23-34.
11. Becco, L., García-Ramos, J. C., Azuara, L. R., Gambino, D., & Garat, B. (2014). Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series. *Biological Trace Element Research*, 161(2), 210–215.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de la beca SNI-CONACyT Ayudantes de Investigador Nacional Emérito, al proyecto PAIP 5000-9047 y se agradece el apoyo que el Premio Coatlicue otorga para la estancia en el congreso.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN EXPERIMENTAL-COMPUTACIONAL DE μ_2 -CICLOTETRAVANADATO DE BIS(1,10-FENANTROLINA) DI(GLICINATO)DICOBRE (II) DE BIS[(1-10-FENANTROLINA) (GLICINATO)COBRE(II)] CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA

Beatriz Martínez Valencia¹, Nidia D. Corona Motolinia¹, Eduardo Sánchez Lara¹, Brenda L. Sánchez Gaytán¹, María E. Castro¹, Francisco Meléndez Bustamante² y Enrique González Vergara¹.

¹Centro de Química, Instituto de Ciencias, ²Facultad de Ciencias Químicas

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., México.

e-mail: beatriz.mvalencia@alumno.buap.mx, enrique.gonzalez@correo.buap.mx

Resumen

El cáncer representa un problema de salud pública importante a nivel mundial. En México el panorama es similar pues es la tercera causa de muerte. El presente trabajo combina una estructura similar a la Casiopeina IIa con el ión ciclotetравanadato, con el fin de proveer dos metales con potencial anticáncer en una misma estructura [1,2]. El compuesto heterobimetálico fue sintetizado, cristalizado y caracterizado por espectroscopías FTIR y Raman, así como por difracción de Rayos X de monocristal. Las propiedades estructurales y electrónicas del compuesto se calcularon mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) utilizando el funcional híbrido M06-2X [3] y el conjunto base 6-31G(d) [4]. El anión ciclo-tetравanadato funciona como ligante puente inorgánico para unir fragmentos de coordinación basados en Cu(II) del tipo Casiopeinas® [5].

Introducción

El cáncer representa un problema de salud pública importante a nivel mundial, de acuerdo con la OMS es la segunda causa de muerte y en el año 2015 provocó 8.8 millones de fallecimientos. En México el panorama es similar pues es la tercera causa de muerte [1].

En la actualidad se desarrollan nuevos tratamientos que afecten en menor grado la calidad de vida o bien aumenten la esperanza de vida de las personas que sufren esta enfermedad. Así mismo, los iones metálicos tienen una especial importancia en procesos biológicos debido a su interacción con biomoléculas. La unión de iones metálicos con ligandos orgánicos ha demostrado ser útil para fines terapéuticos [2], estos compuestos son conocidos como metalofármacos en particular los compuestos de metales de transición tienen gran ventaja por su capacidad de someterse a procesos redox.

Dentro de este contexto el vanadio tiene propiedades interesantes para su uso, en algunos organismos es considerado como micronutriente esencial y se ha encontrado que se puede emplear principalmente para tratamiento de cáncer, dado que inducen apoptosis celular, posee efectos citotóxicos y antiproliferativos [3].

De igual forma el cobre tiene una química muy versátil, ha funcionado con mayor eficacia que el cisplatino en algunos tipos de cáncer, mostrando un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células cancerosas tratadas, aunque menor aumento en las células normales, además de que se metaboliza de forma efectiva reduciendo así los efectos secundarios, esto se debe principalmente a la alta afinidad de algunos complejos del ión Cu^{2+} con el ADN, lo que puede resultar en mutaciones y errores durante la transcripción [4-8]. Las Casiopeinas®, por ejemplo, son una familia de moléculas a base de cobre cuya estructura las hace altamente reactivas al material genético debido a la presencia de 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina y sus derivados. Su mecanismo de acción puede involucrar varias vías de interferencia en el ciclo celular, prevención de la proliferación de fibroblastos y reducción de la migración celular, convirtiéndolos en agentes citotóxicos poderosos. [9-14]

Por lo tanto, la importancia de sintetizar compuestos con dos centros metálicos altamente relevantes podría producir medicamentos con propiedades anticancerosas duales.

Metodología

La síntesis del compuesto se realizó utilizando NH_4VO_3 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, glicina y monoclóhidrato de 1,10-fenantrolina en disolvente H_2O . Los compuestos sintetizados se caracterizaron por difracción de Rayos-X de monocristal y espectroscopia vibracional (IR y Raman). La síntesis se realizó a temperatura ambiente.

Metodología teórica

Las propiedades estructurales y electrónicas del compuesto se calcularon mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) [15]. Se utiliza el funcional híbrido M06-2X [16] y el conjunto base 6-31G(d) [17] para los átomos C, H, O y N. Para los átomos de V y Cu se utilizó el conjunto base LanL2DZ [18] y un potencial de core efectivo. Como primera aproximación se realizaron cálculos de energía electrónica sobre las coordenadas obtenidas de los datos de difracción de rayos-X, tanto en fase gas como acuosa utilizando la metodología PCM [19]. Se realizaron cálculos de frecuencias para caracterizar los modos normales de vibración activos en IR y Raman. Se analizaron el potencial electrostático molecular (MEP) y las cargas de Mulliken para analizar la distribución electrónica. Todos los cálculos se realizaron con el programa Gaussian16 [20].

Síntesis y cristalización

El compuesto fue preparado por método de síntesis general en el cual se prepara una solución acuosa con 1.0 mmol de monoclóhidrato de 1,10-fenantrolina (0.198g) en 30 ml de agua destilada con agitación y calor moderado, una vez disuelta esta, se adiciona 1.0 mmol de glicina (0.075g) manteniendo la agitación, posteriormente se agregó 1mmol de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.170g, 1.0 mmol), se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó a 9.5 el pH de la solución resultante con KOH (10%). Después se añadió por goteo una solución acuosa de NH_4VO_3 (0.116g, 1.0 mmol en 15 ml de H_2O). Al final se filtró y se dejó a temperatura ambiente durante tres días, separándose cristales prismáticos de color azul sin ninguna impureza y con calidad suficiente para utilizarlos en el equipo de difracción de Rayos X.

Resultados y discusión

La estructura molecular de μ_2 -Ciclotetranadato de Bis(1,10-fenantrolina) di(glicinato)dicobre (II) de Bis[(1-10-fenantrolina) (glicinato)cobre (II)] obtenida en rayos X se presenta a continuación en la Figura 1.

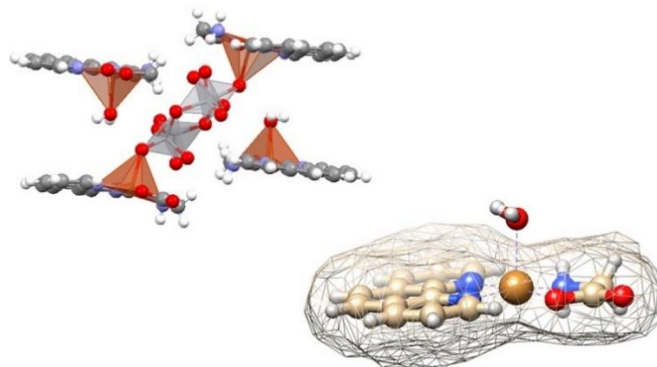


Figura 1. Estructura molecular del compuesto representada en forma de poliedros usando Mercury 4.1 y representación de la superficie del monocación [Cu(phen)(Gly)] en UCSF Chimera.

La estructura molecular de μ_2 -Ciclotetranadato de Bis(1,10-fenantrolina) di(glicinato)dicobre (II) de Bis[(1-10-fenantrolina) (glicinato)cobre(II)] calculada de forma teórica se muestra en la Figura 2.

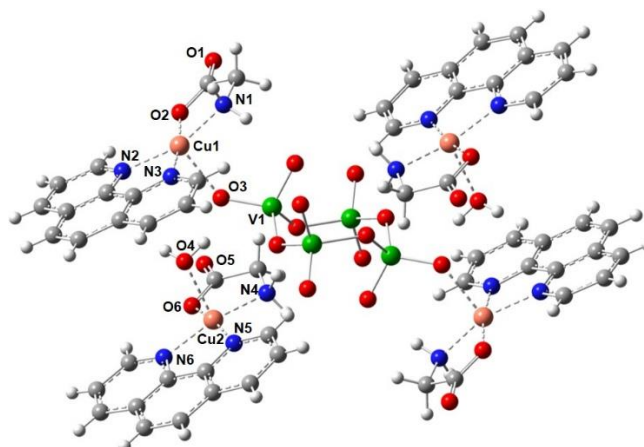
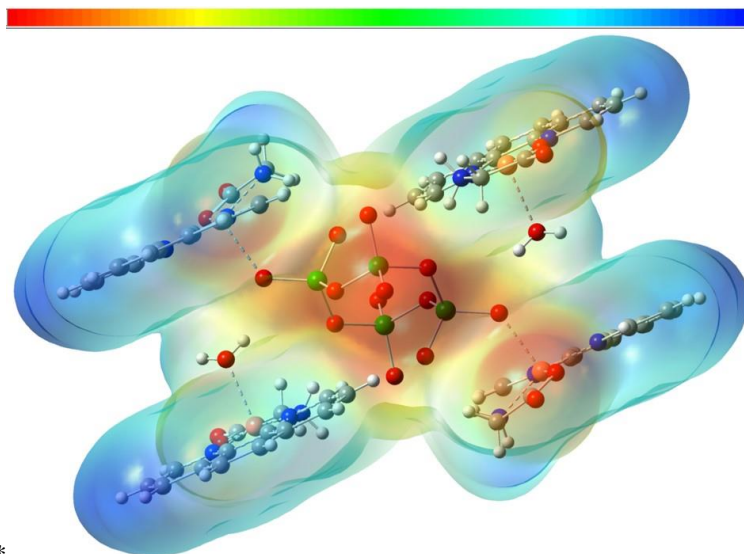


Figura 2. Estructura molecular calculada del compuesto en el nivel de teoría M06-2x/6-31G(d) y LanL2DZ para V y Cu.

En la Figura 3 se muestra el potencial electrostático molecular del compuesto. Esta superficie muestra la densidad electrónica total mapeada con el potencial electrostático usando un isovalor de 0.004. El código de colores indica que las zonas en color rojo tienen concentración de carga negativa, mientras que las regiones azules indican carga positiva. Las regiones de amarillo a verde indican valores intermedios. De la isosuperficie se puede observar que las zonas con mayor densidad de carga están ubicadas sobre ion de tetranadato y el grupo $-\text{COO}^-$ de glicina, mientras las zonas con carga positiva se localizan en las regiones de las moléculas de fenantrolina. Los enlaces de las interacciones no-covalentes $\text{Cu}\dots\text{O}-\text{V}$ y $\text{Cu}\dots\text{O}-\text{H}_2$ se encuentran en zonas de densidad electrónica intermedias.



*

Figura 3. Potencial electrostático molecular del compuesto calculado en el nivel de teoría M06-2x/6-31G(d) y LanL2DZ para V y Cu.

Las cargas netas de los átomos más positivos o más negativos también son indicadores de la distribución de los electrones en la molécula y de la disponibilidad que tienen de atraer o donar electrones para la formación de enlaces covalentes o no covalentes. El análisis de poblaciones de carga de Mulliken es ampliamente usado para el cálculo de distribución de carga en sistemas moleculares. En la Tabla 1 se muestran las cargas de Mulliken de los átomos que participan en las interacciones entre el ion tetraavanadato y las moléculas orgánicas de glicina y fenantrolina coordinadas con el Cu. La convención numérica utilizada es la de la Figura 2.

De estos resultados se puede observar que los átomos de O y N de las moléculas de glicina se coordinan con el átomo de Cu de forma muy similar y simétrica a los átomos de N de la fenantrolina, y que las distancias de los átomos de O en posición apical en la geometría piramidal cuadrada se conserva tanto en las moléculas orgánicas coordinadas con el Cu1 y como en las moléculas coordinadas con el Cu2. En los valores de las cargas se puede observar que los nitrógenos N1 y N2 tienen una carga negativa mayor que los átomos de N de las moléculas de fenantrolina y que el O4 de la molécula de H₂O que se coordina con el Cu1 tiene una carga más negativa que el O3 del tetraavanadato que se coordina con el Cu2. Estos resultados preliminares muestran que las contribuciones de los átomos de Cu y O a las interacciones no-covalentes serán diferentes en ambos enlaces. Lo cual abre una gama de posibilidades para su estudio desde el punto de vista de la teoría QTAIM y análisis de superficies de Hirshfeld.

Tabla 1. Distancias relevantes seleccionadas y cargas atómicas de Mulliken calculadas en el nivel de teoría M06-2x/6-31G(d) y LanL2DZ para V y Cu.

Interacción	Distancia (Å)	Carga de los átomos involucrados en la interacción	
O ₂ - Cu ₁	1.943	O ₂	-0.578
N ₁ - Cu ₁	2.001	Cu ₁	0.739
N ₂ - Cu ₁	2.016	N ₁	-0.825
N ₃ - Cu ₁	2.029	N ₂	-0.559
O ₃ - Cu ₁	2.243	N ₃	-0.544
O ₃ - V ₁	1.661	O ₃	-0.691
O ₆ - Cu ₂	1.934	V ₁	1.277
N ₄ - Cu ₂	1.987	Cu ₂	0.699
N ₅ - Cu ₂	2.015	N ₄	-0.842
N ₆ - Cu ₂	1.998	N ₅	-0.565
O ₄ - Cu ₂	2.275	N ₆	-0.568
		O ₄	-0.830

Como perspectivas de este trabajo, se está calculando la geometría optimizada del compuesto y a partir de dicha geometría se obtendrán los espectros IR y Raman usando la metodología validada en otros compuestos de ciclotetranadato ya estudiados y se compararán con los espectros experimentales. De igual forma se está llevando a cabo el cálculo del compuesto en estado sólido para evaluar sus propiedades electrónicas. Se realizarán estudios de las interacciones no-covalentes utilizando la metodología QTAIM y las superficies de Hirshfeld.

Conclusiones

El compuesto se caracterizó experimentalmente mediante la técnica de difracción de rayos X y espectroscopias FTIR y FT-Raman.

La estructura resultante es heterobimetálica V/Cu y estable con el anión ciclo-tetranadato el cual funciona como ligante puente inorgánico para unir fragmentos de coordinación basados en Cu(II) del tipo Casiopeinas®.

Dada la actividad antitumoral mostrada por los componentes es posible que dichos compuestos tengan potencial para emplearse como metalofármacos para terapia contra el cáncer.

Referencias

Resumen

- [1] Pedro Pedrosa, Andreia Carvalho, Pedro V. Baptista, and Alexandra R. Fernandes Inorganic Coordination Chemistry: Where We Stand in Cancer Treatment? Chapter 3, in Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordination Chemistry 2018. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80233>
- [2] Debbie C. Crans, Lining Yang, Allison Haase, and Xiaogai Yang Health Benefits of Vanadium and It's Potential as an Anticancer Agent Met Ions Life Sci. 2018 Feb 5;18. pii: /books/9783110470734/9783110470734-015/9783110470734-015.xml. doi: 10.1515/9783110470734-015.
- [3] Zhao, Y. and Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, Theor. Chem. Acc., 120, 215-41.
- [4] Rassolov, V. A., Pople, J. A., Ratner, M. A., and Windus, T. L. (1998). 6-31G* basis set for atoms K through Zn. J. Chem. Phys. 109, 1223-1229.

[5] Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E, Mejía C, Ruiz-Azuara L. Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. *Frontiers in Physiology*. 2016;6(Jan):1-13.

Extenso

- [1] OMS. Informe mundial sobre cáncer, 2014.
- [2] Orvig, K. D. Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Bioinorganic Enzymology*. 2014, 540–4563
- [3] Debbie C. Crans, Lining Yang, Allison Haase, and Xiaogai Yang
Health Benefits of Vanadium and Its Potential as an Anticancer Agent
Met Ions Life Sci. 2018 Feb 5;18. pii: /books/9783110470734/9783110470734-015/9783110470734-015.xml. doi: 10.1515/9783110470734-015.
- [4] C.H. Ng, S. M. Kong, Y. L. Maah N. Sukram M. Ahmad, A. S. Khoo. *Metallomics*, 2014, 6, 892-906.
- [5] Baskaran S., Krishnan M. M., Arumugham M. N., & Kumar, R. *J. Mol. Liq.*, 2016, 221, 1045– 1053.
- [6] Galindo-Murillo R., Garcia-Ramos J.C., Ruiz-Azuara L., Cheatham T. E., & Cortes-Guzman F., *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43, 5364-5376.
- [7] Erxleben A. *Coord. Chem. Rev.*, 2018, 92- 121.
- [8] Sigman D.S., Milne L., Xu Y., Gallagher J., Perrin D.M., Pan C., Sarkar, Bibudhendra, (ed.), *Metals and Genetics*, [Proceedings of the International Symposium on Metals and Genetics], 2nd, Toronto, ON, May 26–29, 1998 (1999), pp. 197–208.
- [9] Galindo-Murillo R., Garcia-Ramos J.C., Ruiz-Azuara L., Cheatham T. E., & Cortes-Guzman F., *Nucleic Acids Research*, 2015, 43, 5364-5376.
- [10] Erxleben A. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 92- 121.
- [11] Tovar A., Ruiz-Ramirez L., Campero A., Romerosa A., Moreno-Esparza R., Rosales-Hoz H. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2004, 98, 1045-1053.
- [12] M. E. Bravo-Gómez, J. C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103, 299-309.
- [13] Ashu Chaudhary et al *Journal of Applicable Chemistry*, 2016, 5, 1038- 1063
- [14] Chikira M., Ng C., Palaniandavar M., *International journal of Molecular Sciences*, 2015, 15, 22754-22780.
- [15] P. Hohenberg and W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*, *Phys. Rev.*, 136 (1964) B864-B71.
- [16] Zhao, Y. and Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theor. Chem. Acc.*, 120, 215-41.
- [17] Rassolov, V. A., Pople, J. A., Ratner, M. A., and Windus, T. L. (1998). 6-31G* basis set for atoms K through Zn. *J. Chem. Phys.* 109, 1223–1229.
- [18] Wadt, W. R. and Hay, P. J. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations – potentials for main group elements Na to Bi, *J. Chem. Phys.*, 82, 284-98.
- [19] Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. (2005). Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 105, 2999-3093.
- [20] Gaussian 16, Revision B.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

ESTUDIO DE LOS SITIOS DE UNIÓN A CU(II) Y SU ACTIVIDAD REDOX EN LAS PROTEÍNA ALFA- Y BETA-SINUCLEÍNA

Esau E. Rodríguez¹, Trinidad Arcos-López¹, Lidia G. Trujano-Ortiz¹, Claudio O. Fernández², Liliana Quintanar¹

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), México; ²Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR), Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

erodriguez@cinvestav.mx

Resumen

La agregación de la proteína alfa-sinucleína (AS) es un paso crítico en la enfermedad de Parkinson. La beta-sinucleína (BS) muestra un alto grado de homología (~78%) con la AS, particularmente en el N-terminal. Mientras que el Cu(II) se une específicamente a AS y desencadena su agregación, la BS inhibe la fibrilación de AS in vivo. En este trabajo, exploramos el papel de los residuos de metionina (Met) en la unión a Cu(II) en los sitios N-terminales de AS y BS, y su actividad redox. Nuestros resultados demuestran que los residuos de Met desempeñan un papel importante en los procesos de reducción y reoxidación de estos complejos de Cu-sinucleína. Para BS, la reducción del sitio de Cu es más rápida. Nuestro estudio subraya el papel que desempeñan los residuos Met en la coordinación de Cu y la reactividad de los complejos Cu-AS y Cu-BS.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia en la población adulta mayor. La agregación amiloide de la proteína alfa-sinucleína (AS) en la *substantia nigra pars compacta* es una característica fundamental en esta enfermedad. La AS es una proteína presináptica, ampliamente expresada en diversos mamíferos. Aunque el proceso de agregación de la AS ha sido estudiado, se sabe que la participación de iones metálicos divalentes en este proceso acelera su conversión a la forma agregada, siendo el más importante el Cu. En esta tesis se estudiaron los sitios de unión de Cu²⁺ a la proteína AS por diversos métodos espectroscópicos, como dicroísmo circular, absorción electrónica en la región UV-Vis, resonancia paramagnética electrónica, también se evaluó la química redox de los complejos AS-Cu y su implicación en el estrés oxidativo mediante técnicas electroquímicas, absorción electrónica y HPLC acoplado a espectrometría de masas. De nuestros estudios, encontramos que el Cu²⁺ se une específicamente al extremo N-terminal de la AS en condiciones fisiológicas, también elucidamos el sitio de coordinación completo para determinar la secuencia peptídica en extremo N-terminal, también encontramos que la acetilación en este sitio impacta en la coordinación hacia cobre. Además, evaluamos la actividad redox del complejo AS-Cu y encontramos que es dependiente de las metioninas presentes en el sitio, de esta forma caracterizamos la cinética de los

procesos de óxido-reducción. Finalmente propusimos un mecanismo que involucra la coordinación del sitio, la actividad redox y la química frente a oxígeno, caracterizando así los productos formados

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Proteínas recombinantes AS. Las proteínas recombinantes fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Profesor Claudio O. Fernández, Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR, UNR-MPIbpC) e Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR, UNR-CONICET) de la Universidad Nacional de Rosario.

Síntesis de Péptidos. Se utilizó la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, del inglés Solid-Phase Peptide Synthesis), posteriormente los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (HPLC). El equipo utilizado fue un HPLC marca Waters Modelo 1525, con un detector de arreglo de diodos modelo 2998 de la misma marca. Para la realización de la cromatografía analítica, se utilizó una columna C18 Waters Symmetry, 4.6 X 150 mm, mientras que para la purificación en fase reversa se usó una columna C18 Waters μ Bondapak semipreparativa 7.8 X 300 mm, 10 μ m, 125 Å. La fase móvil ocupada fue: agua MilliQ acidificada con TFA al 0.05% y acetonitrilo acidificado con TFA al 0.01% en (JT Baker, grado HPLC). El gradiente usado fue de 0 a 30% ACN/TFA (0.01%) en 20 minutos con flujo total de 1.5 ml por minuto y las muestras fueron analizadas midiendo la absorbancia a las longitudes de onda 210 nm y 274 nm. Todos los picos cromatográficos se analizaron mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS TOF marca Agilent). Una vez caracterizados los picos, los correspondientes a los péptidos se liofilizaron a una temperatura -50 °C y una presión de 0.18 mbar. Finalmente, los péptidos se guardaron en un desecador a -15 °C.

Absorción electrónica. Los espectros se midieron en el rango de 190 a 800 nm, colectando cada 1 nm. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos, Agilent 8453. Para los experimentos se usaron celdas de cuarzo grado *spectrosil* de diferentes pasos ópticos: una de 0.1 cm para apreciar mejor las transiciones de banda del ligante al metal (LMCT), las cuales caen entre 200 y 400 nm aproximadamente y otra de 1 cm para apreciar las transiciones tipo d-d (después de los 400 nm).

Dicroísmo circular electrónico (CD por sus siglas en inglés). Se midieron los espectros de dicroísmo circular electrónico de cada complejo, cada 2 nm en un rango de 190 nm a 800 nm con una velocidad de barrido de 100 nm/min y un ancho de banda de 5 nm, con una sensibilidad estándar (100 mdeg), un modo de escaneo continuo y acumulando de 2 a 3 scans. La concentración de péptido o proteína utilizada fue de 285 a 985 μ M y la concentración del stock de Cu^{2+} utilizada fue 30 mM. Se usó un espectropolarímetro de dicroísmo circular, Jasco 815 y una celda grado *Spectrosil* con paso óptico de 1 cm.

Espectrometría de masas mediante ionización por electrospray con tiempo de vuelo (ESI-TOF MS, por sus siglas en inglés). Se obtuvieron los espectros de masas de los diferentes péptidos sintetizados, así

como de los productos de los ciclos redox de los complejos péptidos-Cu. El equipo utilizado fue un Agilent Electrospray ionization (ESI-TOF). El rango de m/z que se usó fue de 100 a 2500 m/z y con un voltaje del fragmentador de 400 mV. En el caso de los péptidos sintetizados, la muestra se inyectó al equipo ESI-TOF después de pasar por la purificación por HPLC en fase reversa, en el caso de los complejos, que se analizaron después de los ciclos redox, las muestras se trataron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se inyectaron a una columna Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150 mm, 5 μm (PN 993967-902), flujo 0.5 ml/min, 25 °C, H₂O / ácido fórmico (0,5%), acetonitrilo y metanol, voltaje capilar 3500 V, temperatura de desgasificación 300 °C, resolución en todos los experimentos > 12.000 a m/z igual a 2722.

Resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés). Los complejos péptido-Cu²⁺ se analizaron mediante EPR a 150 K usando un sistema de nitrógeno líquido para temperatura variable ER4131VT, con un flujo adecuado para mantener a baja temperatura. El equipo usado fue espectrómetro EMX Plus EPR Bruker System, banda X, con una fuente de microondas ER 041 XG y una cavidad ER 4102ST. Se utilizaron las siguientes condiciones en el equipo: potencia de microondas: 10 mW; amplitud de modulación: 5 G; frecuencia de modulación: 100 kHz; constante de tiempo: 327 ms; tiempo de conversión: 82 ms; y cada espectro es el resultado del promedio de 12 corridas. Algunas de las muestras para EPR, fueron preparadas a partir de la solución amortiguadora con 50% en volumen de glicerol como agente crioprotector, para así obtener un adecuado glaseado de la muestra y una mejor resolución del espectro. Cabe mencionar que la adición de glicerol no afecta la medición de los complejos, lo cual se comprobó por absorción electrónica en la región UV-Vis y por CD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sitio de alta afinidad

Para identificar al sitio de mayor afinidad por Cu(II) a la AS, se titularon las proteínas AS y la variante AS-H50A, y las titulaciones fueron seguidas por EPR, CD y absorción UV-Vis. No se observaron diferencias en los espectros asociados a la adición del primer equivalente de Cu(II), lo que indica que el sitio de mayor afinidad por Cu(II) no involucra a la His50 y está localizado en el extremo amino. Con el objeto de determinar la secuencia mínima necesaria para reproducir este sitio de coordinación, se procedió a titular con cobre (II) los péptidos 1-15, 1-6 y 1-3. En la figura 1 se muestra que los espectros de EPR de los complejos de Cu(II) con los péptidos 1-6 y 1-3 reproducen al espectro de la variante AS-H50A, indicando que el sitio de mayor afinidad por Cu(II) está localizado en los primeros 3 aminoácidos del amino terminal. Este sitio de unión presenta valores $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G que corresponden a un modo de coordinación 2N2O de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg.

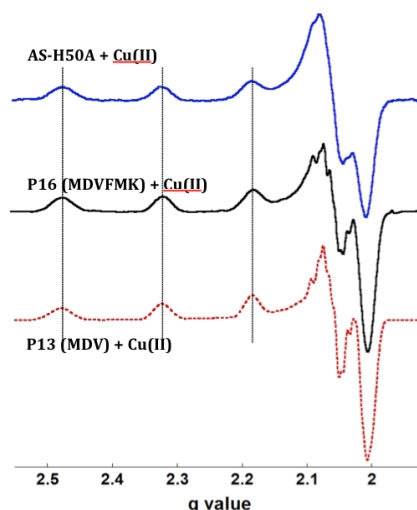


Figura 1. Espectros EPR en banda-X de los complejos P16-Cu(II), P13-Cu(II) y AS-H50A-Cu(II) a 150 K

Los espectros de CD y absorción del complejo de Cu(II) con el fragmento 1-3 presentan bandas de transferencia de carga del ligando al metal características de la coordinación del grupo NH_2 -terminal y una amida desprotonada al Cu(II). En la Figura 2 se observa la banda LMCT que corresponde a la amida desprotonada a 610 nm tanto en el complejo del fragmento 1-6 con Cu(II) como con la proteína completa. Para identificar el origen de los oxígenos de la esfera de coordinación, se evaluó la participación del grupo carboxilato del aminoácido aspártico. La titulación por EPR de la variante 1-6 (D2A) indica un marcado decremento en la afinidad del sitio, y sugiere que uno de los oxígenos proviene de la cadena lateral del Asp2.

Para caracterizar la química redox del sitio 1 en la AS, se evaluó el papel de las Met1 y Met5 en la reducción del sitio 1, usando como modelo al complejo Cu^{2+} -AS (1-6). Las reducciones de los complejos de Cu^{2+} con AS (1-6) y las variantes AS (1-6) M1I, AS (1-6) M5I y AS (1-6) M1I/M5I, seguidas por absorción electrónica, se llevaron a cabo con ascorbato de sodio a pH 7.5 en condiciones anaeróbicas. Esto se observa en la Figura 2.

Los resultados del análisis por espectrometría de masas de los complejos Cu-AS después de un ciclo redox, sugieren que las especies de metionina como sulfóxido son susceptibles a una reacción de eliminación para generar CH_3SOH (ácido metanosulfénico), modificando la cadena lateral de la metionina y convirtiéndola en un alqueno (Figura 3). Tal modificación química irreversible sobre los residuos Met1 y Met5 disminuyen la posibilidad de la AS para unir Cu^{1+} .

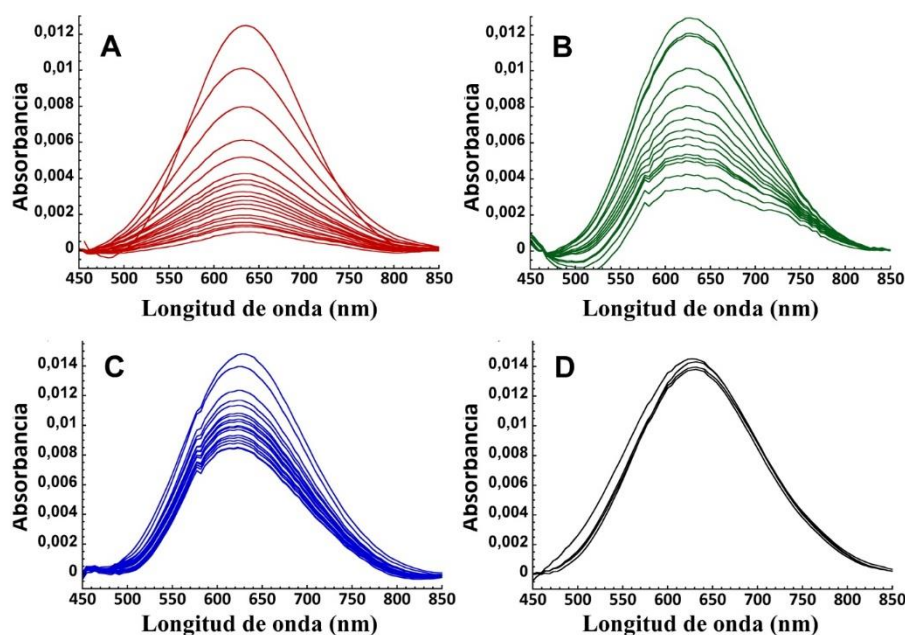


Figura 2. Espectros de absorción electrónica, siguiendo la reducción de los complejos con 16 excesos de ascorbato en solución amortiguadora MOPS 20 mM pH 7.5, a temperatura ambiente en condiciones anaeróbicas. Se muestran los espectros colectados después de la adición del agente reductor, de 0 a 120 min. AS (1-6)-Cu²⁺ en rojo, AS (1-6) M1I-Cu²⁺ en azul, AS (1-6) M5I-Cu²⁺ en verde, y AS (1-6) M1I/M5I-Cu²⁺ en negro.

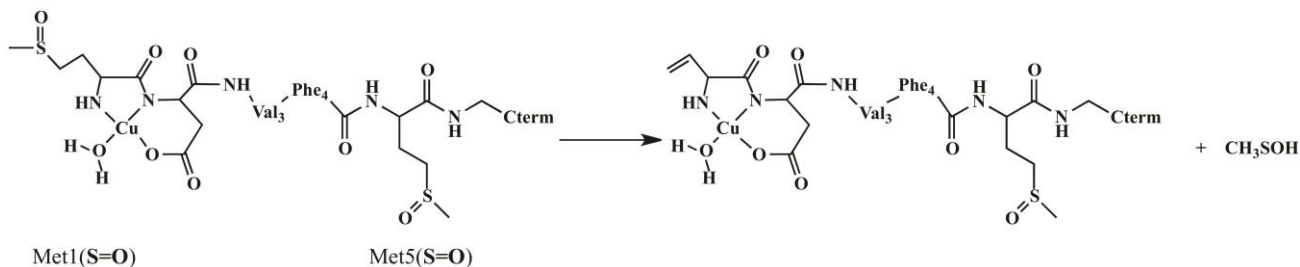


Figura 3. Mecanismo de la oxidación de las metioninas Met1 y Met5 de la AS (1-6), catalizada por cobre, donde se aprecian las especies oxidadas.

CONCLUSIONES.

Nuestros resultados demuestran que los residuos de Met desempeñan un papel importante en los procesos de reducción y reoxidación de estos complejos de Cu-sinucleína; Sin embargo, Met1 juega un papel más importante que Met5 en AS. Para BS, la reducción del sitio de Cu es más rápida, posiblemente debido a la presencia de tres residuos Met en su N-terminal. La reoxidación de estos complejos por oxígeno produce la oxidación de los residuos Met en sulfóxido.

BIBLIOGRAFÍA

Esaú E. Rodríguez, *et. al.* Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2016, 21, 5, 691–702.
 Marco C. Miotto, Esaú E. Rodríguez, *et. al.* Inorganic Chemistry 2014, 53, 4350–4358.
 Andrés Binolfi, Esaú E. Rodríguez, *et. al.* Inorganic Chemistry 2010, 49, 10668–1067.