



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Inhibición *in vitro* de la enzima Xantina Oxidasa asociada a
compuestos de coordinación de cobre(II)
(Casiopeínas®)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

ADRIÁN ESPINOZA GUILLÉN



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **DRA. LENA RUIZ AZUARA**

VOCAL: Profesor: **DRA. NORAH YOLANDA BARBA BEHRENS**

SECRETARIO: Profesor: **DRA. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ**

1er. SUPLENTE: Profesor: **DRA. SILVIA ELENA CASTILLO BLUM**

2do. SUPLENTE: Profesor: **DRA. PERLA CASTAÑEDA LÓPEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 210 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR,
EDIFICIO B DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ

SUSTENTANTE:

ADRIÁN ESPINOZA GUILLÉN

Agradecimientos

Agradezco a la **Dra. Lena Ruiz Azuara** por su apoyo, por permitirme conocer su multidisciplinario grupo de investigación y por poder realizar un trabajo de tesis enriquecido por el amplio panorama de conocimiento que integran a las **Casiopeínas[®]**.

A la **Dra. María Elena Bravo Gómez** por su tutorado en esta tesis, por compartir su valioso conocimiento que con sabiduría me transmitió; por confiar en mis habilidades y hacerme crecer académicamente; por su apoyo y palabras de aliento frente a cualquier reto que se me presentó, pero principalmente, le agradezco por hacerme revivir como estudiante esa emoción expresada como una “efervescencia en el estómago” al presentarme de una forma tan sólida el panorama de una ciencia tan joven y apasionante como lo es la Química Bioinorgánica, la cual se ha convertido en una área de estudio de mi completo interés.

A todos los **integrantes del laboratorio 210** del departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM por sus aportaciones y porque me brindaron un buen ambiente de trabajo.

Al jurado de esta tesis por sus valiosas contribuciones al trabajo.

Así también, al apoyo de **PAPIIT-IN227110** y **CONACYT-Salud 87806** por el financiamiento para realizar el presente trabajo y a la beca otorgada por la **RedFarmed** para realizar el trabajo de tesis y financiar su presentación en el II Congreso Nacional de Innovación en Salud y Química Médica.

El mundo puede percibirse y describirse de tantas formas como mentes lo habitan. A mi parecer, desde los ojos de un químico el mundo parece ser aún más asombroso, pues no hay materia en el universo cuya transformación no se pueda estudiar y explicar con las herramientas de la Química. Sin embargo, me gustaría resaltar que de todos los sistemas químicos, el que tienen mi mayor curiosidad y fascinación es **la célula**, por ser esta la unidad fundamental de la vida y cuya belleza se encuentra en su compleja estructura y funcionamiento. La biología molecular entiende a una célula como un conjunto de moléculas específicamente seleccionadas para dar origen y sustento a la vida, donde no hay ninguna más importante o menos útil. En un intento de jugar y solo resaltar lo importante que son los amigos en la vida de una persona tomaré como modelo el ejemplo antes mencionado. Si mi existir lo veo como a una célula y mis seres queridos como biomoléculas, quiero decirles a todos ustedes que son los que me llenan de vida día con día, y les estoy agradecido por darle a mi persona esa estructura que me ayuda a formarme académicamente y socialmente, por enriquecerla con sus aportaciones y afectos, y por embellecerla como sólo cada uno de ustedes sabe hacerlo. Gracias a:

MI FAMILIA* **SANDRA MARÍA CENTENO LLANOS*** MARÍA ELENA BRAVO
GÓMEZ* **SILVIA GRACIELA DÁVILA MANZANILLA*** JAVIER DÍAZ RIVERA **ANA**
LUISA ALONSO SAENZ* MARÍA JOSÉ MOSQUEIRA SANTILLÁN **MELISSA**
ZAZHIL MEDINA ESCAMILLA* STEFANY HERNÁNDEZ RAYA **CYNTHIA ARELI**
GUZMÁN BAUTISTA DIANA GONZÁLEZ TENORIO **GISELA OSORNIO SILVA***
CLAUDIA STEPHANY NAVARRO ROMERO* **HILDA CONTRERAS CRUZ***
CLAUDIA LIZET ROMERO NAVA* **DIANA GUADALUPE GÓMEZ GALINDO***
LAURA MILLÁN MEJÍA **EDITH BUENDÍA CORNEJO*** LOURDES REYES
GUTIÉRREZ **MARÍA MÓNICA MARTÍNEZ*** TANIA HAYDEÉ GARCÍA PÉREZ
JÉSSICA ANGÉLICA JAUREZ ROSAS* BRENDA SELENE LEÓN NÚÑEZ **MARÍA**
KARINA VÁZQUEZ REYES* CINDY MAGALY VILLA ÁVILA **MIRNA AIDEE REYES**
SOLÍS* ALICIA SANTANA SILVA* **SERGIO ROBLES OBREGÓN*** ARACELI
HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ* **YÉSSICA FLORES ARIAS** MARIBEL HERNÁNDEZ
CAMARILLO **LUZ DEL CARMEN MARTÍNEZ RIVERA** VÍCTOR MANUEL TRUJILLO
ESCALONA **JOSÉ FRANCISCO TORNER MORALES*** MANUEL ARIAS MAGAÑA
JORGE ANTONIO GAXIOLA TIRADO WALTER FABIÁN MENDOZA GONZÁLEZ
ERICK RUBÉN GONZALES BELTRÁN* JOSÉ LUIS CIFUENTES TOLEDO*.

[El orden de presentación fue hecho azarosamente y evité agradecer de forma personalizada, porque cada uno de ustedes sabe que las palabras referenciadas a ustedes ocuparían más hojas que mi propio trabajo de tesis.]

Agradecimientos Especiales

Quiero agradecer principalmente a **María del Carmen Guillén López**, mi madre, por enseñarme lo que no se aprende en un salón de clases. Te quiero y jamás podré pagarte lo que has trabajado y sacrificado por tus hijos. Este logro es tan tuyo como mío.

A mis hermanas **Diana Marina** y **Ana Karen**, las cuales quiero y siempre contarán conmigo, así como yo cuento con su valioso apoyo.

A mi padre **Gregorio Espinoza López**, por enseñarme que la crianza de un hijo no es igual en todos los hogares, y al final esa diferencia son las que contribuyen en tu forma de valorar y apreciar el mundo. También te quiero.

A mi abuelita **Ana María López Bazán** que me ha consentido más de lo que merezco y a **Onésimo Guillén Hernández**, q.e.p.d., por ser mi abuelo y a su vez el patrón de referencia para saber que se puede dar todo lo mejor de ti a alguien sin esperar nunca nada a cambio, agradezco lo que me dio y dejó en vida.

A mis abuelos paternos **Agustina López Hernández** y **Daniel Espinoza Pérez** por recibirme siempre con los brazos abiertos y cariño en su hogar.

A mi tíos **Gregorio Rodríguez López** y **Bertha Pineda Flores**, porque sin su gran ayuda nunca habría llegado hasta donde estoy. Siempre les estaré agradecido.

A mis tíos **Ana María**, **Adela** y **José Víctor Guillén López** por su apoyo incondicional.

A mis padres

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES	7
3.1 COBRE	7
3.1.1 EL COBRE EN ESTADO NATURAL	7
3.1.2 EL COBRE COMO BIOMETAL	9
3.1.2.1 EL COBRE COMO BIOMETAL Y SUS LIGANTES	12
3.1.2.2 EL COBRE COMO BIOMETAL Y SU ELECTROQUÍMICA	13
3.1.3 EL COBRE Y LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	14
3.2. ENZIMAS: SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) Y XANTINA OXIDASA (SOD)	19
3.2.1 ENZIMAS	19
3.2.2 ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA	22
3.2.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMIMÉTICA TIPO SOD	25
3.2.3 ENZIMA XANTINA OXIDASA	27
3.2.3.1 INHIBIDORES DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA Y SUS USOS TERAPÉUTICOS	33
3.2.3.2 COBRE COMO INHIBIDOR DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA	35
3.3. EL COBRE Y LAS CASIOPEÍNAS®	37
3.3.1 CASIOPEÍNAS®	37
3.3.2 CASIOPEÍNAS® Y LA QUÍMICA ASOCIADA A SU CENTRO METÁLICO	39
4. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
4.1. JUSTIFICACIÓN	43
4.2. HIPÓTESIS	43
4.3. OBJETIVOS	44
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	45
5.1 REACTIVOS	45
5.2 EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 PARA LA ENZIMA XANTINA OXIDASA (IC50)	46
5.3 SISTEMAS TIPO XANTINA-XANTINA OXIDASA	53
5.4 USO DEL SISTEMA ENZIMÁTICO XA-XO-NBT PARA COMPUESTOS QUE INHIBEN A LA ENZIMA XO	57

6. RESULTADOS	60
6.1 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA PARA DISTINTOS COMPUESTOS DE COBRE(II)	60
6.2 EXPERIMENTOS PREVIOS PARA EVALUAR CONTROLES POSITIVOS EN ENSAYOS DEL TIPO XA-XO CON CATALASA, MANITOL Y EDTA	61
6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA PARA SISTEMAS TIPO XA-XO A UNA CONCENTRACIÓN FIJA DE CASIOPEÍNAS[®]	63
6.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE UNA POSIBLE ACTIVIDAD TIPO SOD DE CASIOPEÍNAS[®]	65
7. DISCUSIÓN	68
8. CONCLUSIONES	72
9. BIBLIOGRAFÍA	74



1. RESUMEN

Las **Casiopeínas**[®] [1, 2] son una serie de compuestos de coordinación que tienen fórmulas generales $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{alfa-L-aminoacidato})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$, donde el donador N-N es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina); el donador por oxígeno (O-O) es acetilacetato (acac) o salicilaldehidato (salal), o un donador por nitrógeno y oxígeno como es el caso de los alfa-L-aminoacidatos.

De la literatura sabemos, por estudios tanto “*in vitro*” [3] como “*in vivo*” [3, 4], que las **Casiopeínas**[®] tienen actividad antiproliferativa [5], citotóxica [4], genotóxica [6] y antitumoral [3], que en conjunto, hace que estos compuestos se puedan proponer como posibles metalofármacos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, resaltando así la importancia de continuar con el estudio de estos compuestos de coordinación.

Aunque el mecanismo de acción para inducir la muerte celular aún no se ha elucidado, se sabe que la administración de **Casiopeínas**[®] en células tumorales desencadena señales que inducen apoptosis [4, 7]. A su vez, estudios con **Casiopeínas**[®] han demostrado que la administración en células tumorales aumentan el estrés oxidante [8], lo cual puede sugerir que este desbalance redox sea una señal que puede desencadenar la apoptosis, tal como se ha reportado en la literatura [9]; por tal motivo, es de interés conocer el mecanismo por el cual estos compuestos pueden aumentar las ERO en las células.

Para comprender el estrés oxidante observado en células tumorales tratadas con **Casiopeínas**[®], se ha demostrado que estos compuestos pueden disminuir la concentración de antioxidantes intracelulares, como es el caso del glutatión [8, 10],



que trae como consecuencia un desbalance redox que conlleva a un aumento de especies reactivas de oxígeno, y por consiguiente, pone a las células en un estado de estrés oxidante. Sin embargo, otro mecanismo viable es considerar que las **Casiopeínas**[®] pueden generar especies reactivas de oxígeno directamente por una reacción de oxido-reducción, por ejemplo, si tomamos en cuenta las propiedades electroquímicas de estos compuestos [5], observamos que el potencial de media onda se encuentra dentro del intervalo que se requiere para favorecer la dismutación del radical superóxido ($-0.16 < E_{1/2} < 0.89 \text{ V/ENH}$), por lo cual, estos compuestos podrían llevar a cabo esta catálisis. El favorecer esta dismutación traería como consecuencia la generación de H_2O_2 , el cual es una ERO que puede llevar a cabo la generación de hidroxilo mediante la reacción de Fenton [11]. Los compuestos que tienen la capacidad de dismutar al radical superóxido comúnmente se les llama compuestos biomiméticos de la enzima superóxido dismutasa (SOD) [12].

Por lo mencionado anteriormente, se resalta la importancia de conocer ensayos que confirmen la actividad tipo SOD de **Casiopeínas**[®]. Uno de los sistemas comúnmente empleado en la literatura para evaluar esta actividad biomimética es el de **Xa-XO-NBT**, donde se determinan valores de “CI50 de formación de formazán”, los cuales se interpretan como la capacidad de un compuesto de disminuir la presencia del radical superóxido en un 50% bajo las condiciones del sistema en un determinado tiempo [13]. Sin embargo, este sistema puede brindar falsos positivos en los resultados si el compuesto a evaluar inhibe a la enzima XO. Por tal motivo, en este trabajo se planteó estudiar la inhibición de la enzima XO por **Casiopeínas**[®], así como también determinar si el sistema Xa-XO-NBT se puede usar para estos compuestos.

Los resultados de la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa “*in vitro*” de cuatro **Casiopeínas**[®] en el sistema **Xa-XO** revelaron que los compuestos que contienen en su estructura al ligante 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina provocan mayor inhibición de la enzima XO en contraste con los que tienen 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en el



intervalo de concentraciones empleadas. Dicha inhibición es consecuencia de la afinidad del centro metálico con átomos donadores de electrones de la parte proteica de la enzima, lo que hace que sea una inhibición no específica.

Así también, los resultados sugirieron, al emplear el sistema **Xa-XO-NBT** como un estudio cualitativo de una posible actividad SOD de las **Casiopeínas**[®], que los compuestos cuyo ligante corresponde a la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina disminuyen la presencia del radical superóxido en una magnitud superior a la que se puede atribuir a la inhibición de la enzima XO en el sistema, lo que sugiere que podría tener actividad SOD. Para los compuestos que tienen 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina en sus estructura, la disminución del radical superóxido en el sistema se puede atribuir en su totalidad a la inhibición que provocan estos compuestos en la enzima XO.

Con respecto al sistema **Xa-XO-NBT** se puede concluir que no se puede usar para evaluar cuantitativamente la actividad SOD de las Casiopeína IV gly, Casiopeína III ia, Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea por inhibir a la enzima XO a través de una interacción no específica.



2. INTRODUCCIÓN

El **cobre** es un metal de transición esencial para los seres vivos por estar involucrado en una amplia gama de procesos biológicos. Por ejemplo, está presente en algunas enzimas importantes como la Tirosinasa, el Citocromo C Oxidasa y la Ceruloplasmina [14]. La enzima Superóxido Dismutasa de cobre-zinc (CuZnSOD) es otro ejemplo de cuproenzima que tiene como función dismutar al radical superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno [15]. Esta enzima es importante en los sistemas biológicos para mantener en equilibrio las especies reactivas de oxígeno (ERO). Se sabe que el desbalance de las ERO está presente en algunas enfermedades neurodegenerativas, en el cáncer, en enfermedades cardiovasculares y problemas de articulaciones, por mencionar algunas [16]. Hasta el momento, se ha usado a la enzima CuZnSOD, en un producto comercial llamado Orgotein[®] como parte de tratamientos a enfermedades inflamatorias en perros y caballo, así como también en ciertos estudios con humanos para disminuir la toxicidad tardía generada por el tratamiento con radioterapia con resultados satisfactorios [17, 18]. Sin embargo, el uso de esta enzima en Orgotein[®], como parte de tratamientos a enfermedades inflamatorias, ha tenido como consecuencia que se haya retirado del mercado alemán por los efectos negativos asociados de este producto al reportarse choques anafilácticos por las infiltraciones de este producto [19, 20]. Orgotein[®] es un producto costoso debido a que la enzima se extrae y purifica a partir de hígado bovino, así mismo, la elección de una vía de administración adecuada que garantice la actividad enzimática resulta problemática. Una solución a estos problemas podría ser la búsqueda de nuevos compuestos que mimeticen una actividad catalítica tipo SOD



y que representen otra opción en la clínica alternativa al uso de la enzima SOD en la clínica.

Uno de los sistemas más empleado para evaluar la actividad tipo SOD es un ensayo enzimático (Xa-XO-NBT), también conocido como el sistema de McCord-Fridovich (McCF), el cual consiste en colocar a la Xantina Oxidasa en presencia del sustrato xantina para generar el radical superóxido, el cual se sigue espectrofotométricamente de forma indirecta por medio de un indicador que corresponde al NBT. Sin embargo, para el sistema Xa-XO-NBT se debe estudiar si el compuesto al que se le evaluará la actividad SOD inhibe a la enzima XO, ya que su inhibición disminuye la concentración de sus productos “*in situ*”, entre ellos el radical superóxido, y por lo tanto, también la señal de formazán, sin ser ésta una variación atribuible a una actividad biomimética tipo Superóxido Dismutasa del compuesto.

Es de resaltar, a su vez, que un inhibidor específico de la enzima Xantina Oxidasa podría tener usos terapéuticos en enfermedades como la hiperuricemia, donde al no estar regulada la actividad de la enzima XO se incrementa la concentración del ácido úrico en el organismo, generando así daños que pueden desencadenar la enfermedad de “la gota”. La búsqueda de nuevos fármacos que inhiban específicamente a la XO es de interés por los efectos secundarios (insuficiencia renal por ejemplo) que padecen algunas personas al recibir el tratamiento convencional (alopurinol) a esta enfermedad [21].

Con la información anterior queda expuesta, de forma general, la relevancia de estudiar compuestos con actividad SOD, el uso del sistema Xa-XO-NBT y conocer inhibidores específicos de la enzima XO. Sin embargo, para las **Casiopeínas**[®] es importante estudiar si tienen una actividad tipo SOD, para así seguir esclareciendo el mecanismo que conlleva a estrés oxidante a las células tratadas con estos compuestos [8], por lo que se planteó estudiar la inhibición de la enzima XO por **Casiopeínas**[®] y evaluar si el sistema Xa-XO-NBT se puede usar con esta familia de compuestos.



Este trabajo por estar relacionado con el manejo de metaloenzimas y el estudio de su inhibición (XO), con la evaluación de una actividad biomimética enzimática (SOD), y con el manejo de compuestos de coordinación donde el centro metálico corresponde a un biometal (**Casiopeínas[®]**), se utilizará como enfoque a la Química Bioinorgánica para cumplir los objetivos.



3. ANTECEDENTES

3.1 COBRE

3.1.1 EL COBRE EN ESTADO NATURAL

El metal de transición representativo de la familia 11 en la tabla periódica (anteriormente clasificada como I-B) es el **cobre**, el cual es representado por las letras **Cu** y tiene una configuración electrónica **Ar3d¹⁰4s¹** en su forma elemental. Este metal puede encontrarse en uno de los tres posibles estados de oxidación en sus compuestos de coordinación, los cuales son: Cu^{III} (sistema **d⁸**), Cu^{II} (sistema **d⁹**) y Cu^I (sistema **d¹⁰**) [22]. Para este trabajo nos enfocaremos en el cobre Cu^{II} y Cu^I por ser los estados de oxidación que se encuentra dentro de la célula, haciendo que sean estas las especies iónicas de cobre con interés biológico [23].

El cobre representa tan solo 68 ppm de la corteza terrestre, lo que lo hace un metal poco abundante en la naturaleza [24]. Ver *Figura 1*. La mena más común como fuente de este metal es la calcopirita, o también conocida como pirita de cobre, el cual es un mineral de aspecto metálico donde encontramos al cobre en

estado de oxidación 1+ y al hierro como 3+, y cuya fórmula química se representa como CuFeS₂ [25].

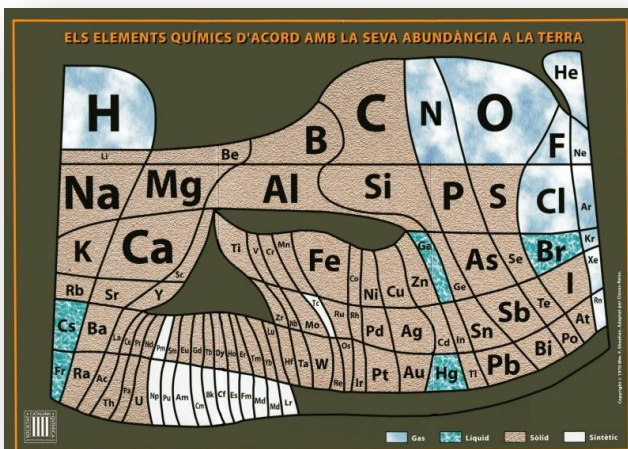
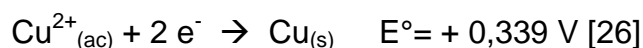


Figura 1. Tabla periódica de abundancia relativa de los elementos químicos realizada por la Sociedad Catalana de Química.



Junto con la plata (Ag) y el oro (Au), el cobre es conocido como metal de acuñar por ser uno de los tres metales más empleados con este fin a través de la historia. Sus propiedades físicas hacen que este sea un metal con muchos usos. Por ejemplo, al tener un potencial de reducción positivo, este no se oxida fácilmente, lo que permite entender por qué se ha usado como material en las monedas y utensilios domésticos [25].



A su vez, el cobre tiene la conductividad térmica más alta de todos los metales, por esta razón se utiliza en utensilios de cocina, ya que el calor se disipa rápidamente por todas las paredes del recipiente; o en su defecto, se emplea en utensilios hechos con otros materiales donde se les pone un recubrimiento de cobre. Otra propiedad física a resaltar de este metal es que es un metal blando que se usa a menudo en aleaciones [25].

Desde la perspectiva química, para los distintos compuestos de coordinación de cobre, según sea el estado de oxidación y los ligantes a los que se coordina, se favorecerán solo ciertos arreglos de los átomos del ligante alrededor del átomo de cobre.

El Cu^{I} es un sistema d^{10} , por lo que estos compuestos son diamagnéticos e incoloros, a menos que el color lo imponga el ligante con el que se coordina o por una transferencia de carga entre el metal y el ligante. Los números de coordinaciones más comunes para este estado de oxidación del cobre son 2 (lineal), 3 (trigonal plana) y 4 (tetraédrica)[24]. Ver *Figura 2*.

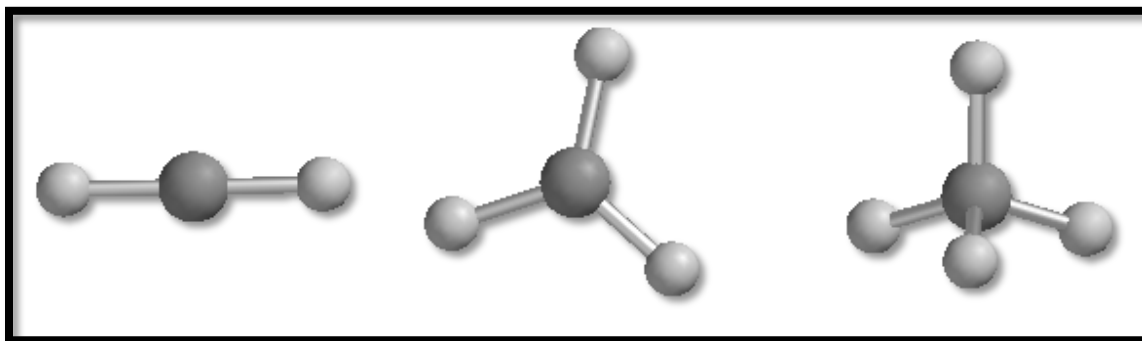


Figura 2. Geometrías para Cu(I): lineal, trigonal plana y tetraédrica.

El Cu^{II} a menudo lo podemos encontrar en compuestos de coordinación con números de coordinación 4, 5 y 6 [24]. Ver Figura 3.

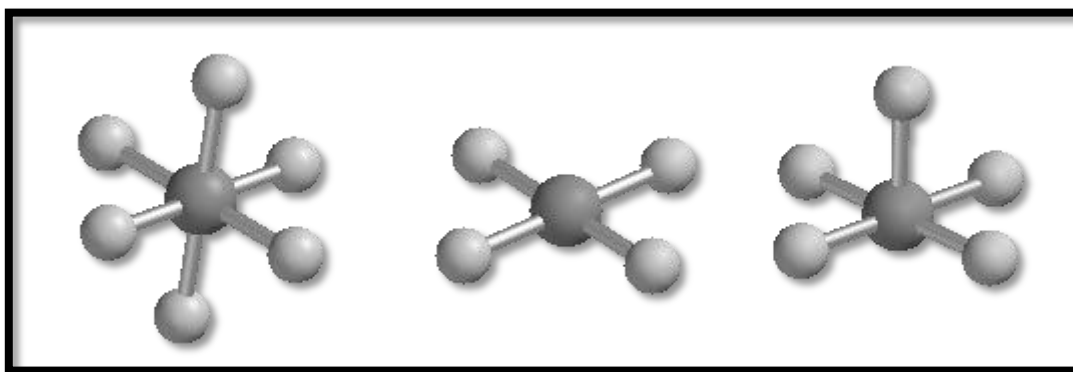


Figura 3. Geometrías para Cu(II): octaédrico, cuadrada plana y pirámide base cuadrada.

3.1.2 EL COBRE COMO BIOMETAL

Una rama joven de la Química que se ha dedicado a incrementar el conocimiento sobre la participación de los iones metálicos en los sistemas vivos ha sido la **Química Bioinorgánica**. Su campo de estudio se ha encargado de realizar un trabajo integral entre áreas como la Bioquímica, Química Inorgánica, Química Orgánica y la Biología. El origen de este nuevo enfoque científico ayuda a entender los procesos biológicos bajo nuevos marcos de referencia [27]. La



percepción de esta rama científica ha logrado clasificar a algunos elementos de la tabla periódica como biometales por el hecho de estar involucrados en “la química de la vida” [23]. Ver Figura 4.



Figura 4. Distribución en la tabla periódica de los elementos esenciales para la vida

En este trabajo nos enfocaremos en el cobre desde la perspectiva de la Química Bioinorgánica, donde es pertinente destacar que es un elemento de transición esencial para los sistemas biológicos; su importancia radica en que forma parte de numerosas enzimas y metaloproteínas en donde éste biometal contribuye en sus propiedades estructurales y catalíticas [23]. Los estados de oxidación comúnmente encontrados en sistemas biológicos para el cobre son Cu^I (Sistema d^{10}) y Cu^{II} (sistema d^9), normalmente con una geometría tetraédrica en sus



compuestos de coordinación para el primer caso, y pentacoordinadas de base cuadrada, cuadradas u octaédricas con efecto Jahn Teller para el segundo [23, 28, 29].

Los metales de transición en los seres vivos están regulados de tal forma que sus concentraciones se mantienen dentro del intervalo requerido para un buen funcionamiento de los sistemas biológicos [23]. El cobre en el ser humano ocupa el tercer lugar en abundancia dentro de los elementos traza (después del hierro y el zinc), encontrándose en una proporción de 1.7 miligramos por gramo en peso. Su deficiencia o exceso podría desencadenar una serie de daños a órganos como el cerebro, hígado, estómago, piel y pulmones, por mencionar algunos [30]. Existen personas que debido a una predisposición genética pueden tener una deficiencia o exceso de cobre, como es el caso de los que padecen el síndrome de Menkes o la enfermedad de Wilson. En el síndrome de Menkes se presenta una deficiencia de cobre como consecuencia de una mutación en el cromosoma X, la cual afecta el mecanismo de absorción del cobre y conduce al enfermo a la degradación del sistema nervioso y posteriormente la muerte [31]. La enfermedad de Wilson consiste en presentar cantidades excesivas de cobre en el organismo. Esta enfermedad está asociada a la mutación del gen *ATP7B*, el cual afecta al mecanismo de excreción del cobre y trae como consecuencia su acumulación en hígado, cerebro, riñones y ojos [32]. Sin embargo, el envenenamiento por cobre no es muy común en el cuerpo humano, ya que en caso de administrarse en dosis agudas, los compuestos de cobre inducen el vómito; y en el caso de una ingesta crónica, el hígado tiene una gran capacidad para excretar al cobre [30].

Por otro lado, uno de los objetivos de la Química Bioinorgánica es la de esclarecer cómo el cobre al estar presente en los sistemas biológicos tiene una participación muy variada. La actividad biológica de cada metaloenzima de cobre está relacionada con el estado de oxidación del metal y de su ambiente de coordinación [27].



3.1.2.1 EL COBRE COMO BIOMETAL Y SUS LIGANTES

Con el fin de entender la esfera de coordinación del cobre en las metaloenzimas y con qué átomos preferirá coordinarse este metal en función de su estado de oxidación, se retomaron los conceptos de **ácidos y bases de Lewis** y los trabajos de **Pearson**.

Como resultado de generalizar el concepto de ácidos y bases de Lewis han surgido trabajos como los de Pearson, los cuales bajo criterios empíricos y con el fin de tener la capacidad de predecir reacciones químicas y explicar otros fenómenos de manera sencilla, llegaron a la conclusión que aquellos átomos con carga positiva grande y de tamaño pequeño (ácidos duros) reaccionan más rápidamente con nucleófilos donde la reactividad es función principal de la basicidad (base duras). Sin embargo, la reactividad de los átomos con mayor tamaño y una carga positiva menor (ácidos blando) dependerá de la polarizabilidad del nucleófilo (base blanda). Bajo este modelo empírico podemos decir que en una reacción química se favorecen los productos que corresponden a la asociación de ácidos duros con bases duras y ácidos blandos con bases blandas. Así también, cinéticamente, los ácidos duros reaccionan más rápidamente con bases duras y lo ácidos blandos con bases blandas [33].

Por lo anterior, podemos decir que el Cu^{I} al ser un catión blando preferirá coordinarse a ligantes con átomos blandos como el azufre. Por tal motivo, las biomoléculas con las que más probablemente puede interaccionar el Cu^{I} en los sistemas biológicos son aquellas que tengan residuos de aminoácidos con azufre (cisteínas y metioninas) [34, 35]. Por otro lado, el Cu^{II} prefiere coordinarse a ligantes con oxígeno(base dura) por ser un ácido duro, como es el caso de biomoléculas como la serina, treonina, tirosina y agua [23, 35].



3.1.2.2 EL COBRE COMO BIOMETAL Y SU ELECTROQUÍMICA

A pesar que la mayor parte de la química de los seres vivos ocurre en un medio acuoso podemos encontrar una reactividad muy variada para un mismo elemento metálico dentro de una célula, y el cobre no es la excepción. Se sabe que en medio acuoso, el Cu^{I} presentará un comportamiento anfólitico, tal y como se observa en un diagrama unidimensional de potencial de la *Figura 5*, lo que nos indica que en solución acuosa se favorece la presencia de Cu^{II} por la propiedad del Cu^{I} de dismutarse (y si recordamos la teoría de Pearson, el oxígeno del agua al ser una base dura, estabilizará preferentemente al Cu^{II}).

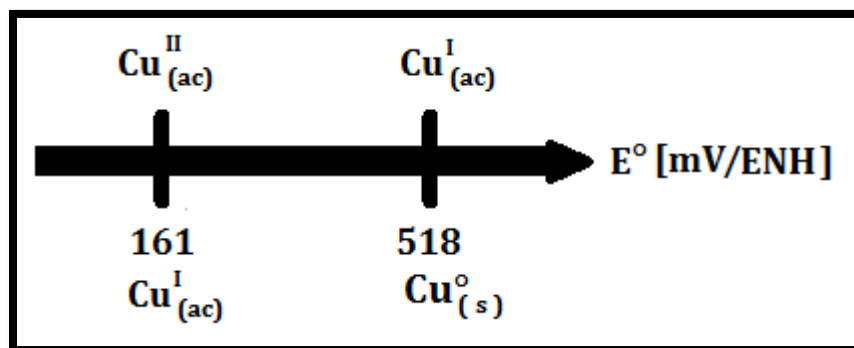


Figura 5. Diagrama unidimensional de potenciales para el sistema $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$. Valores tomados de Harris, D. C., 2001 [26].

Desde el punto de vista electroquímico se ha observado que las características de oxido-reducción para el par redox $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ varían en distintas biomoléculas, y esto depende de los átomos con los que interacciona en su esfera de coordinación [36]. Esto se explica al considerar para las metaloenzimas, donde el centro catalítico corresponde a un átomo de Cu^{II} , que se puede facilitar su reducción si su entorno de coordinación corresponde a átomos con características de bases blandas, lo cual se traduce en un aumento en su valor de potencial electroquímico; en contraste si se encuentra unido a bases duras, las cuales estabilizan al estado de



oxidación 2+, se produce una disminución en su potencial redox del centro metálico haciendo más difícil su reducción, por tal motivo, es de esperarse que el potencial redox de un centro metálico dentro de una enzima esté modulado por el ambiente de coordinación del metal.

Finalmente, es de importancia resaltar que cuando se desea estudiar un sistema biológico que contenga cobre, la actividad biológica de este metal dependerá del estado de oxidación en el que se encuentre, de su esfera de coordinación, de su geometría y su entorno proteico que, en conjunto, determinarán cual es la participación específica del cobre en cada biomolécula.

3.1.3 EL COBRE Y LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Gran parte de la vida, como ahora la conocemos, ha evolucionado en una atmosfera oxidante, donde la molécula de oxígeno tiene una variada participación en los sistemas vivos y su concentración dependerá del equilibrio que haya con su demanda en los distintos procesos biológicos.

El oxígeno (O_2) lo podemos encontrar disuelto en agua, observando que en agua de mar expuesta al aire hay una concentración aproximada de 0,284 mM y decrece al subir la temperatura (0,212 mM a 25°C). Sin embargo, es más soluble en agua con mayor pureza, por ejemplo, el agua destilada presenta concentraciones de solubilidad de 0,258 mM a 25°C y 0,355 mM a 10°C [9]. Al tomar en cuenta que el agua es el solvente de mayor proporción en el planeta tierra, y que la química de la vida se da en un sistema acuoso, nos sugiere que un medio ambiente rico en oxígeno proporciona a los organismos el lujo de utilizar a esta molécula como parte de prácticamente toda estructura biomolecular (DNA, lípidos, enzimas, proteínas, etc.); así como también sabemos que gran parte de los organismos utilizan la fosforilación oxidativa como fuente eficiente de producción de energía. Este último proceso tiene una desventaja, el cual es la



generación de radicales libres de oxígeno. Un radical libre es una especie química con carga positiva, negativa o neutra capaz de existir de manera independiente y que contiene uno o más electrones desapareados. Los metales, así como sus iones y compuestos de coordinación frecuentemente tienen electrones desapareados, pero por convención, no son considerados como radicales, a menos que algún ligante coordinado al metal sea un radical libre [37].

Para este trabajo es de relevancia saber que dentro los procesos biológicos el oxígeno es un precursor de especies químicamente reactivas. Ver Figura 6.

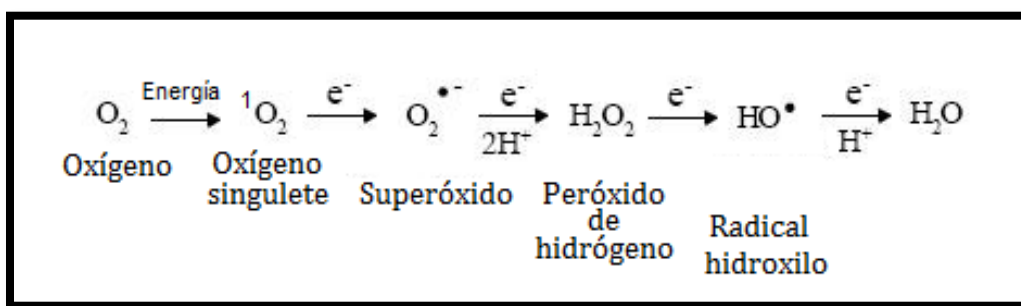


Figura 6. Reducción del oxígeno molecular a agua con especies reactivas de oxígeno (ERO) como intermediarios.

Si el radical libre proviene o contiene oxígeno podremos clasificarlo dentro del grupo de moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO), donde también se encuentran en esta clasificación las moléculas que son oxidantes pero no son radicales libres, como es el caso del peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete. Ver figura 7.

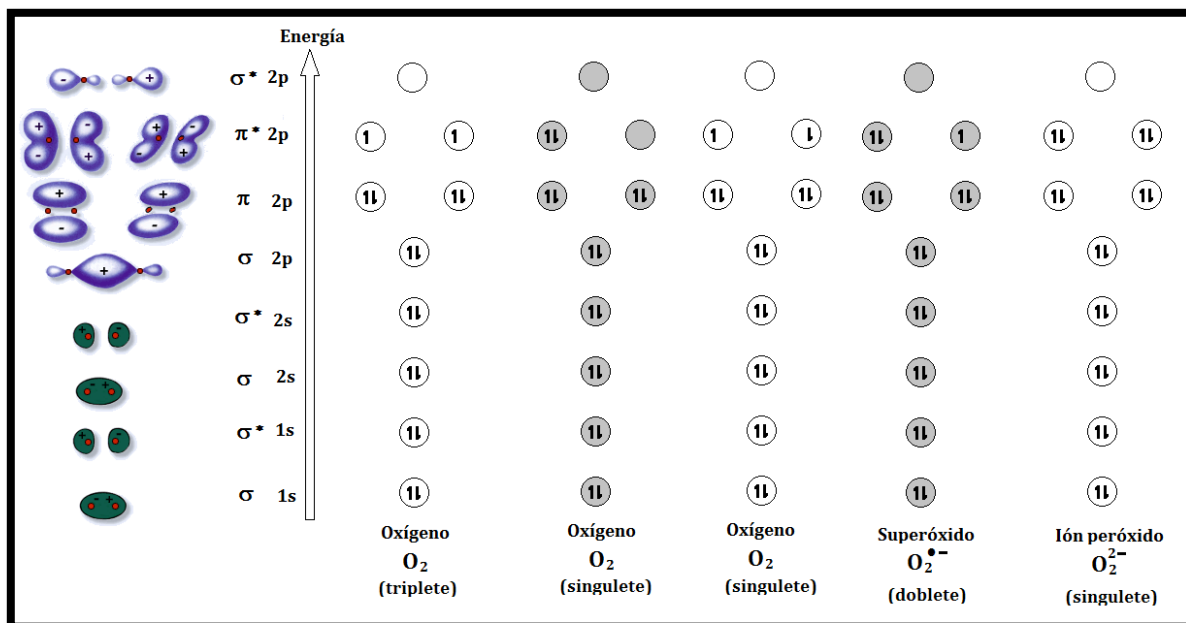


Figura 7. Diagrama de orbitales moleculares para el oxígeno molecular y algunas especies reactivas de oxígeno (ERO). Tomada y Modificada de Hallowell y Gutterdge, 2007 [9].

Al reducir el oxígeno molecular con un electrón se genera el radical libre superóxido, generándose así el primer radical libre proveniente de la molécula de oxígeno. Aproximadamente el 2% de todo el oxígeno que consumimos se convierte en el radical superóxido a través de procesos fisiológicos normales como la respiración y la respuesta inmune innata [38].

Las **especies reactivas de oxígeno (ERO)** juegan un papel importante en los sistemas biológicos al estar involucradas dentro de las señalizaciones que desencadenan la proliferación, diferenciación y muerte celular, entre otros procesos vitales para la célula [39]. En contraste, los efectos tóxicos para una célula por estas especies reactivas están asociados a un proceso denominado estrés oxidante, el cual se refiere a un desequilibrio entre las ERO y la capacidad de la célula para generar una respuesta antioxidante en donde se ven favorecidas la formación de especies reactivas de oxígeno. Las consecuencias de un alto



estrés oxidante están relacionadas con varias enfermedades, como por ejemplo la aterosclerosis, la diabetes, el cáncer y enfermedades neurodegenerativas [39].

Para el cobre, su importancia bioquímica se debe a que es un elemento esencial en la dieta del ser humano. Aproximadamente, un adulto tiene una concentración de 1.7 mg/g en su organismo [30]. Esta concentración está regulada por los organismos vivos, puesto que el exceso o deficiencia de cobre se ha observado que causa estrés oxidante [9, 40].

Para entender los efectos de la deficiencia de cobre en el ser humano se tiene que tener presente que este metal forma parte del sitio activo catalítico de enzimas que le dan a las células una citoprotección de las especies reactivas de oxígeno. La CuZnSOD dismuta al radical superóxido en peróxido de hidrógeno, por lo que la deficiencia de este metal origina una disminución de la síntesis celular de esta enzima generando así un desbalance de las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden generar daño celular [32, 38].

Como ya se mencionó, un aumento en la concentración de cobre libre en la célula también genera estrés oxidante. Esto se le puede atribuir a que el cobre puede generar **reacciones tipo Fenton** [11], la cual consiste en generar el radical hidroxilo en presencia de peróxido de hidrógeno mediante la oxidación del metal [9, 40].

Retomando que en los sistemas biológicos el cobre se puede encontrar como Cu^{II} , se puede esperar su reducción a Cu^{I} por presencia de alguna biomolécula reductora como NADH, GSH y ácido ascórbico, o por la presencia de especies reactivas de oxígeno, como es el caso del peróxido de hidrógeno o el radical superóxido [40, 41], *ver figura 8*. Una vez generado el Cu^{I} se puede llevar a cabo una reacción tipo Fenton, al re-oxidarse este metal a Cu^{II} en presencia del H_2O_2 generando como producto el radical hidroxilo.

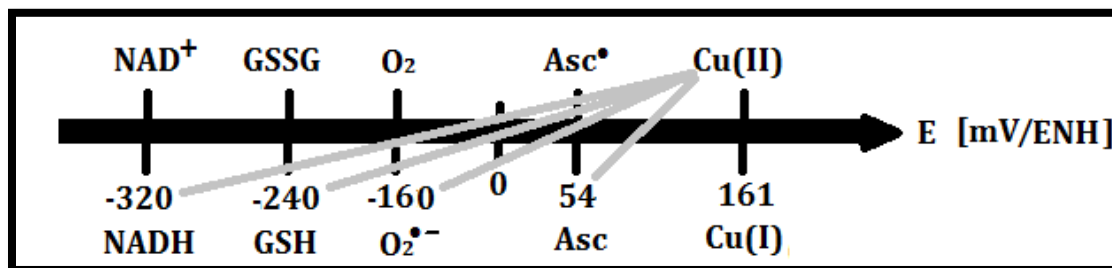


Figura 8. Diagrama unidimensional de potenciales redox para posibles reductores celulares de cobre(II): NADH, GSH, Ascorbato y $\text{O}_2^{\bullet-}$. Valores tomados de Irazo, O., 2011 [12], Harris, D.C., 2001 [26], Saleh, F. S., 2011 [42], y Jones, D. P., 2002 [43].



3.2. ENZIMAS: SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) Y XANTINA OXIDASA (SOD)

3.2.1 ENZIMAS

Una serie de moléculas importantes para la biología celular son aquellas que contienen a un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo de ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) en su estructura, llamadas alfa-L-**aminoácidos**, las cuales son denominadas así porque el grupo amino está enlazado al átomo de carbono alfa del grupo carboxilo. Ver figura 9.

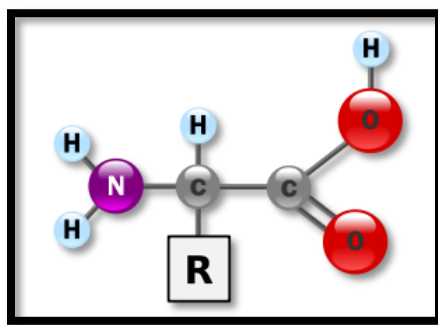


Figura 9. Estructura general de los aminoácidos

En todos los alfa-L-aminoácidos (excepto cuando $\text{R} = \text{H}$) el carbono alfa es asimétrico y constituye un centro quiral; en la mayoría de los aminoácidos naturales éste carbono tiene una configuración (S) con estereoquímica parecida a la de L(-)-gliceraldehído, por lo que se denominan **L-aminoácidos**.

Cuando dos aminoácidos reaccionan entre sí se forma un enlace amida entre el grupo carboxílico de un aminoácido y el grupo amino de otro, éste enlace comúnmente es llamado enlace peptídico. Ver figura 10.

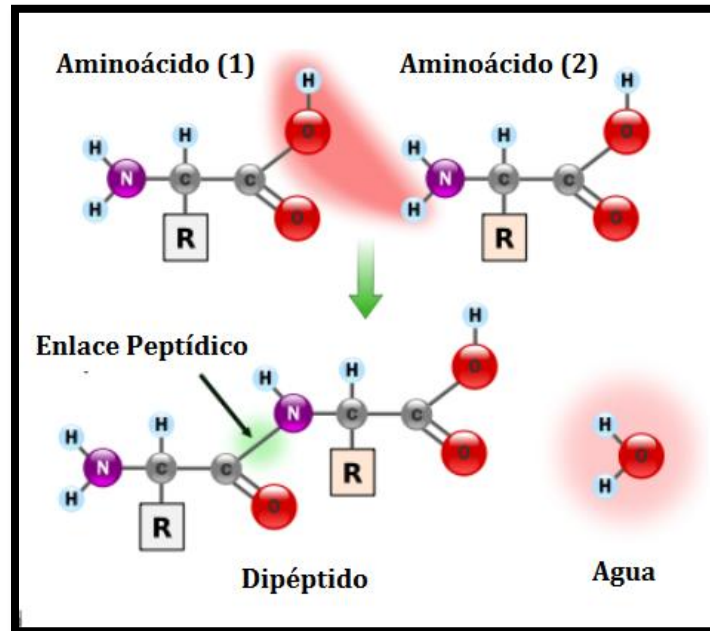


Figura 10. Formación de un enlace peptídico

Si la mencionada reacción se lleva a cabo consecutivamente entre varios aminoácidos, se llegará a formar un biopolímero denominado **péptido** ($PM < 10^4$ g/mol). Cuando un péptido alcanza un peso molecular mayor a 10^4 g/mol, esta macromolécula se define como **proteína**. Las propiedades físicas y químicas de estos biopolímeros dependerán de los aminoácidos que la forman [44].

Cada proteína posee una función particular, la cual es el reflejo de su conformación tridimensional. La disposición espacial de los átomos de una proteína puede estudiarse desde diferentes niveles estructurales: primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. El primer enfoque estructural consiste en representar la secuencia de los aminoácidos de la cadena proteica (**estructura primaria**) con el fin de estudiar el tipo de aminoácidos que contribuyen al arreglo tridimensional final. En la **estructura secundaria** de una proteína el estudio se centra en representar el arreglo de las cadenas proteicas en función de interacciones moleculares como por ejemplo puentes de hidrógeno, con el fin de encontrar patrones de plegamientos regulares y muy estables de las cadenas



polipeptídicas (hélices alfa y conformaciones beta por mencionar algunas). El estudio de la disposición global de todos los átomos de una proteína en el espacio se conoce como **estructura terciaria**, en la cual se considera el acomodo de la cadena proteica en función de las torsiones moleculares debidas a la generación de nuevos enlaces (como por ejemplo puentes disulfuros S-S), a las interacciones electrostáticas, y los giros de la cadena (ángulos y direcciones), entre otros. Finalmente, es importante mencionar que algunas proteínas están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas, las cuales pueden ser idénticas o diferentes. Las disposiciones de estos biopolímeros en complejos tridimensionales constituyen al estudio del nivel de la **estructura cuaternaria**. Ver figura 11.

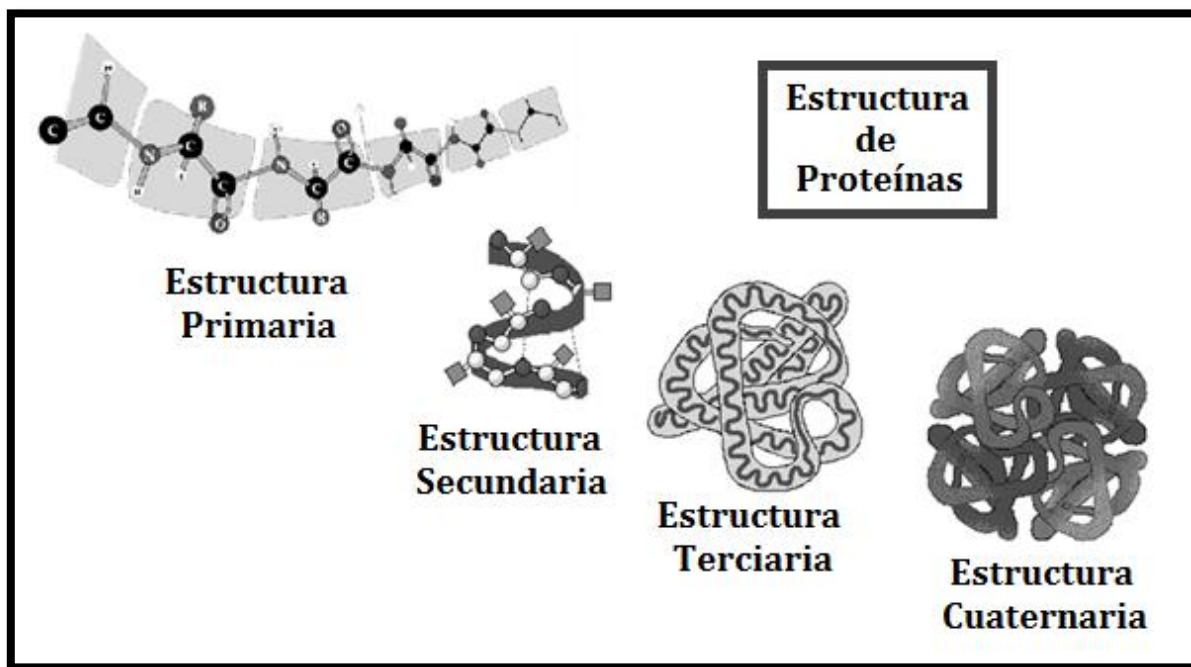


Figura 11. Estructura de proteínas

Cuando estas biomoléculas tienen actividad catalítica se les conocen como **enzimas**, las cuales están conformadas mayoritariamente por una parte proteica. Algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus



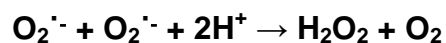
residuos de aminoácidos; sin embargo, otros requieren un componente químico adicional llamado cofactor, el cual puede ser uno o varios iones inorgánicos o moléculas orgánicas.

Una **Metaloenzima** es una enzima cuya característica particular es que dentro de su estructura contiene a uno o más iones metálicos firmemente enlazados (metales de transición), dándole así características estructurales y catalíticas específicas.

Las metaloenzimas pueden clasificarse de acuerdo al ión metálico involucrado directamente con su actividad catalítica (enzimas de Cu, Fe, Mo, Mn, etc.); por el tipo de función biológica que desempeñan (transportadoras de oxígeno, transportadoras de electrones, etc.) o más generalmente, por el tipo de reacción que catalizan (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas o ligasas).

3.2.2 ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Como consecuencia de vivir en una atmósfera con oxígeno, los organismos aeróbicos han desarrollado un grupo de enzimas capaces de dismutar el radical superóxido. Estas enzimas fueron descubiertas en 1969 por McCord y Fridovich y ahora se conocen con el nombre de **Superóxido Dismutasas (SOD)** [38]. La función enzimática de la SOD es dismutar el radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular siguiendo la siguiente reacción:



Los humanos han desarrollado tres tipos de enzimas superóxido dismutasas (SOD); cada una codificada por genes separados y sirven para un propósito distinto dependiendo de su localización celular [38]. La primera es la SOD que contiene cobre y zinc (CuZnSOD o SOD1) que se encuentra localizada



predominantemente en el citoplasma, pero también se ha encontrado en el núcleo y los lisosomas [38]. Su localización permite proteger a las proteínas, lípidos y DNA del daño oxidante y es un regulador muy importante de las señales intracelulares debidas al superóxido [38]. La segunda SOD es aquella que contiene manganeso (MnSOD o SOD2); se encuentra en la matriz mitocondrial entre las crestas. La MnSOD (SOD2) reduce el estrés oxidante en la mitocondria catalizando la dismutación del superóxido formado por la cadena de electrones durante la respiración celular [38]. Finalmente existe una tercera SOD, la ecSOD, la cual es similar a la SOD1 que usa cobre y zinc para su función catalítica. Sin embargo, a diferencia de la SOD1, esta se encuentra predominantemente en el espacio extracelular [38].

En este trabajo nos enfocaremos en la enzima CuZnSOD (SOD1) para entender el papel que juega el cobre en esta enzima y analizar si las **Casiopeínas**[®], por ser compuestos de coordinación de cobre, podrían llevar a cabo una catálisis similar. La CuZnSOD es una cuproproteína de aproximadamente 32 kDa. Es un homodimero que contiene en cada monómero un sitio activo, en el que se encuentran dos cationes metálicos, un átomo de cobre y uno de zinc. El centro catalítico cuando está oxidado tiene un ion Cu^{II} , con una geometría piramidal de base cuadrada, coordinado por cuatro histidinas y una molécula de agua, mientras que el Zn^{II} está coordinado por un oxígeno de un aspartato y tres histidinas. Una de las histidinas hará un puente entre ambos cationes por el anillo imidazolato [15, 24]. *Ver figura 12.*

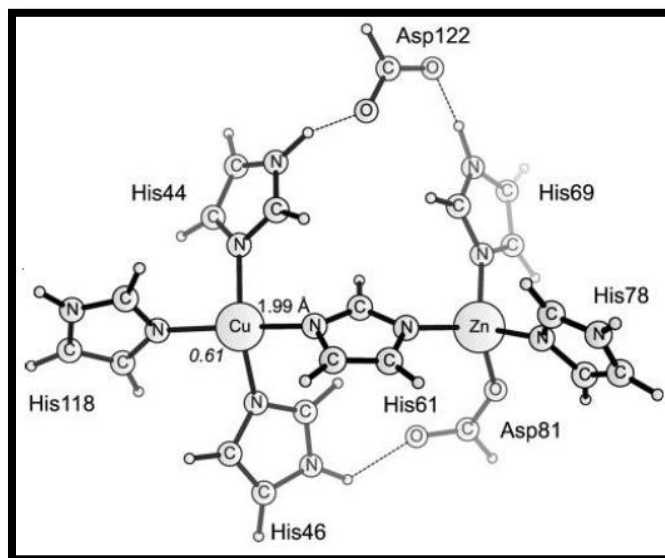


Figura 12. Sitio catalítico oxidado de la enzima ZnCuSOD sin una molécula de agua coordinada al cobre. Tomada de Pelmenschikov, V., 2005 [15].

Cuando el sustrato radical $O_2^{\cdot-}$ entra en el canal que lo dirige al sitio activo y se aproxima al centro catalítico puede ser protonado por un donador de protones mientras pasa por el canal, ya que la enzima ZnCuSOD puede asegurar un pH lo suficientemente bajo en los alrededores del centro catalítico para estabilizar el radical superóxido protonado.

La molécula de superóxido protonado se coordina al Cu^{II} y genera una ruptura del enlace Cu^{II} -His de la histidina que lo une a través de un puente con el Zn^{II} . El nitrógeno de la histidina toma el protón que antes pertenecía al radical superóxido y lleva a cabo la reducción del Cu^{II} a Cu^I , generando así una molécula de O_2 . Posteriormente, se propone que una segunda molécula de radical superóxido protonado llegue al sitio catalítico y se coordine al Cu^I . El radical superóxido forma un puente de hidrógeno con el hidrógeno de la histidina para posteriormente oxidar al Cu^I a Cu^{II} y se regenere el puente Cu^{II} -His- Zn^{II} liberando una molécula de H_2O_2 [15]. Ver figura 13.

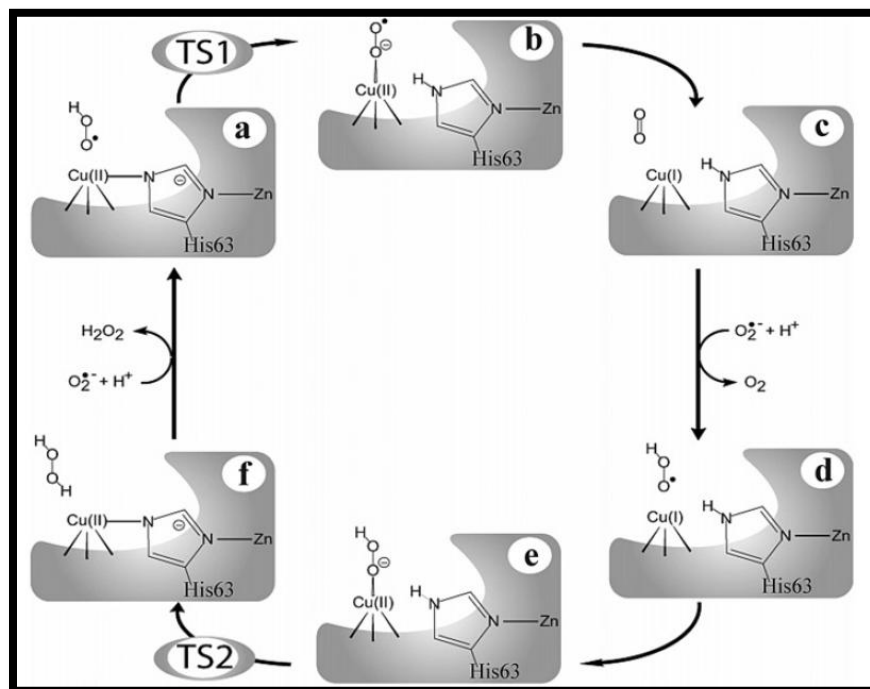


Figura 13. Mecanismo catalítico propuesto para la enzima ZnCuSOD. Tomada de Pelmeshnikov, V., 2005 [15].

3.2.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMIMÉTICA TIPO SOD

Para evaluar a un compuesto con actividad catalítica tipo SOD se tiene que buscar un sistema en el que se estudie de forma indirecta la dismutación del radical superóxido atribuido al compuesto, o de forma directa la interacción entre el compuesto y el radical superóxido. Uno de los sistemas más empleado para evaluar la actividad tipo SOD es un ensayo enzimático, conocido como el sistema de McCord-Fridovich, el cual es un método indirecto que consiste en colocar a la enzima Xantina Oxidasa (XO) en presencia de xantina (Xa) para generar como producto ácido úrico; y como subproductos peróxido de hidrógeno y al radical superóxido en proporciones no estequiométricas y en cantidades dependientes de las condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura. El seguimiento de la presencia del radical $O_2^{\bullet-}$, el cual es la especie de interés para este ensayo, se hace de



manera indirecta al colocar “*in situ*” un colorante redox como el nitroazul de tetrazolio (NBT), el cual se reducirá con el radical superóxido a un compuesto azul llamado formazán, cuyo espectro de absorción es característico y se puede seguir fácilmente su presencia espectrofotométricamente en la longitud de onda de 560nm. Con esta reacción secundaria se sigue en el sistema la presencia, ausencia o variación de la concentración del radical superóxido [13]. Ver Figura 14.

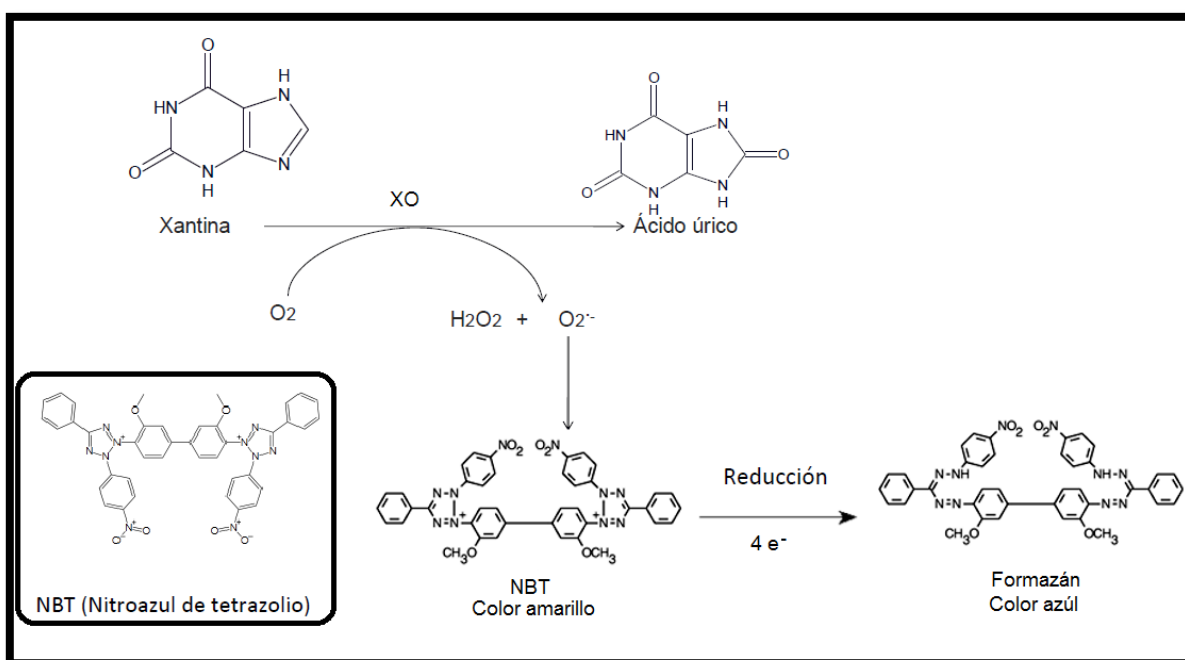


Figura 14. Sistema Xa-XO-NBT

Al colocar el compuesto con posible actividad SOD en el ensayo de la Figura 14, la señal de formazán se verá modificada, ya que un compuesto con actividad SOD, o con capacidad de atrapar al radical superóxido, entrará en una reacción de competencia por el radical superóxido con el NBT. Este es el principio para determinar la CI50 de la señal de formazán y que servirá de referencia para compararlo con otros compuestos con actividad SOD evaluados en este sistema, con sus respectivas consideraciones; ya que para este sistema se tienen que tomar los siguientes casos que pueden dar falsos positivos a este ensayo:



- El compuesto a evaluar reduce al indicador (NBT) y no la presencia del radical superóxido como se espera [12].
- El compuesto evaluado reacciona con el Formazán que se generó “*in situ*” [12].
- El compuesto inhibe a la enzima XO [12].
- La presencia de H_2O_2 , el cual es uno de los productos de la actividad de la enzima XO, puede reaccionar con el compuesto a evaluar y sus productos reaccionar con el NBT [12].

Para poder llevar a cabo la evaluación de la actividad biomimética tipo Superóxido Dismutasa (SOD), por el sistema xantina (Xa)-Xantina Oxidasa(XO)-nitroazul de tetrazolio (NBT) es necesario estudiar si las **Casiopeínas[®]** inhiben a la enzima XO y calcular las CI50 de ser el caso.

3.2.3 ENZIMA XANTINA OXIDASA

La **Xantina Oxidasa (XO)** es una metaloenzima de molibdeno, la cual podemos encontrar presente en células eucariotas, en eubacterias y en archea [24, 45]. El molibdeno es el único elemento del segundo periodo de los metales de transición con una función biológica conocida, y su participación en la enzima XO es una de ellas.

La actividad biológica de esta metaloenzima consiste en catalizar la oxidación de la xantina (Xa) a ácido úrico por medio de una reacción de hidroxilación en presencia de un aceptor de electrones, por lo que podemos clasificar a esta enzima dentro de la familia de oxotransferasas.

La reacción de oxidación de la xantina en presencia de oxígeno y la enzima Xantina Oxidasa esta descrita en la *Figura 15*.

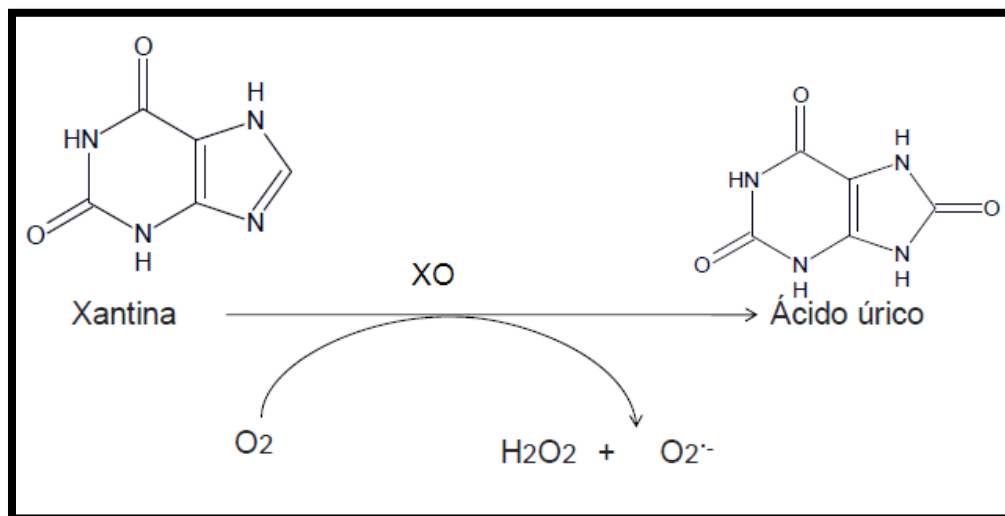


Figura 15. Reacción de oxidación de la xantina en presencia de la enzima Xantina Oxidasa

Es de resaltar que “*in vivo*” este sistema enzimático no es selectivo solo a la xantina como sustrato de la XO, sino también puede oxidar a otras moléculas heterocíclicas como lo son la hipoxantina y a una variedad de purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos [24].

Esta enzima, aproximadamente de 290 kDa, tiene dos subunidades independientes, cada una y que en conjunto envuelven a cuatro centros redox: un centro de molibdeno, dos grupos de hierro-azufre del tipo 2Fe-2S y un flavinodinucleotido (FAD), los cuales se distribuyen espacialmente en forma casi lineal [45]. Ver figura 16.

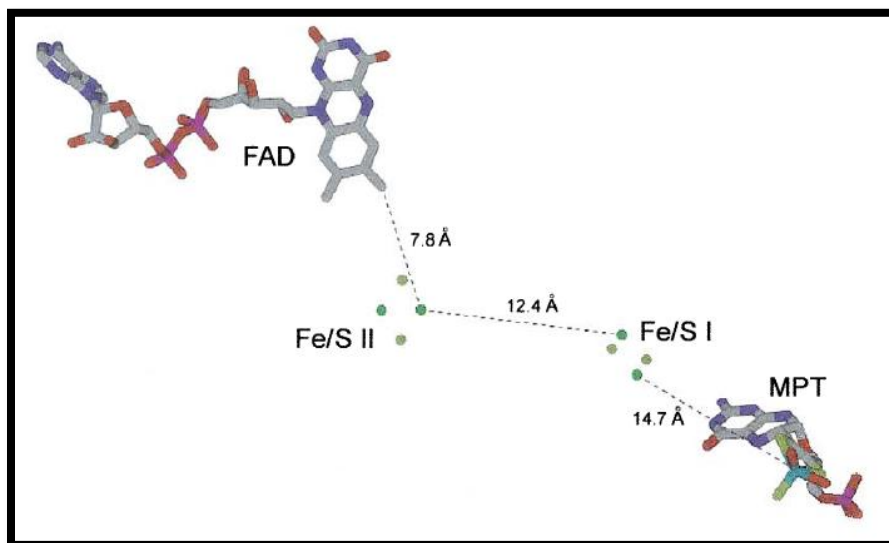


Figura 16. Arreglo lineal de los cuatro centros redox de la Xantina Oxidasa correspondientes a una molécula FAD, dos conglomerados de 2Fe-2S y una molécula MPR donde se encuentra coordinado un átomo de Mo. Tomada de Harrison, R., 2002 [45].

En el sitio donde se encuentra el molibdeno, el metal se encuentra en una esfera de coordinación con 5 ligantes, los cuales corresponden a dos azufres del ligante bidentado pterina, un grupo oxo ($\text{Mo}=\text{O}$), uno sulfo ($\text{Mo}=\text{S}$) y un ligante hidroxilo o agua ($\text{Mo}-\text{OH}$, $\text{Mo}-\text{OH}_2$). La esfera de coordinación se asemeja a una pirámide de base cuadrada con el ligando sulfuro en posición apical [45]. Ver figura 17.

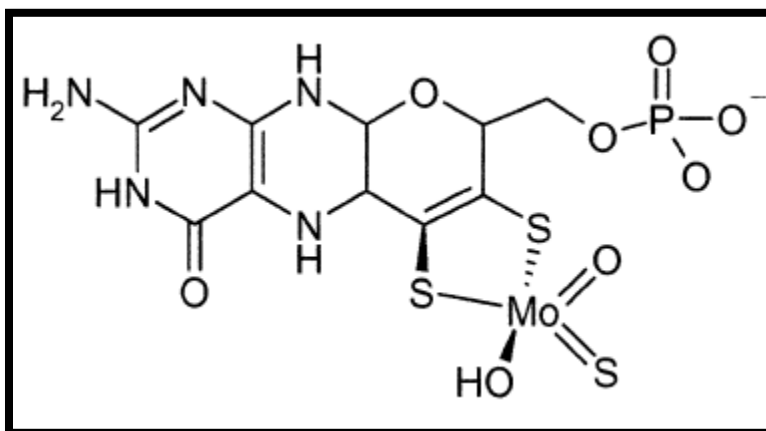


Figura 17. Cofactor de molibdeno para la enzima Xantina Oxidasa. Tomada de Harrison, R., 2002 [45].

Se propone que la reacción de oxidación de xantina a ácido úrico, el ciclo catalítico de la enzima tome lugar en el centro de molibdeno, y que el metal se encuentre en estado de oxidación VI. Este ion metálico durante la reacción catalítica cambia de estado de oxidación (VI) a (IV). La transferencia de electrones del metal pasa por los dos grupos 2Fe-2S al flavín adenín dinucleótido (FAD). La reacción de reducción (conversión de oxígeno a radical superóxido o a peróxido de hidrógeno) se espera que tome lugar en el centro donde se encuentra el FAD [45, 46]. Ver figura 18 y 19.

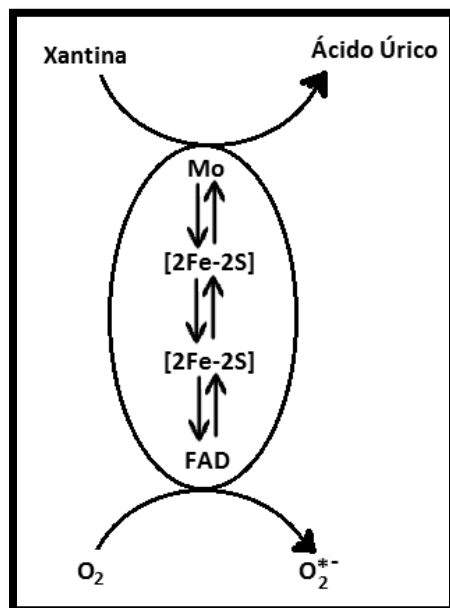


Figura 18. Diagrama esquemático que muestra la catálisis de la Xantina Oxidasa.

Por la participación de los metales en la estructura de esta enzima en el espectro de absorción electrónica UV/visible tendrá contribuciones atribuibles a los grupos 2Fe-2S en 420, 470 y 550 nm, la molécula de FAD impondrá un máximo en 450 nm y el molibdeno se caracterizará por una absorción en 350 nm [46].

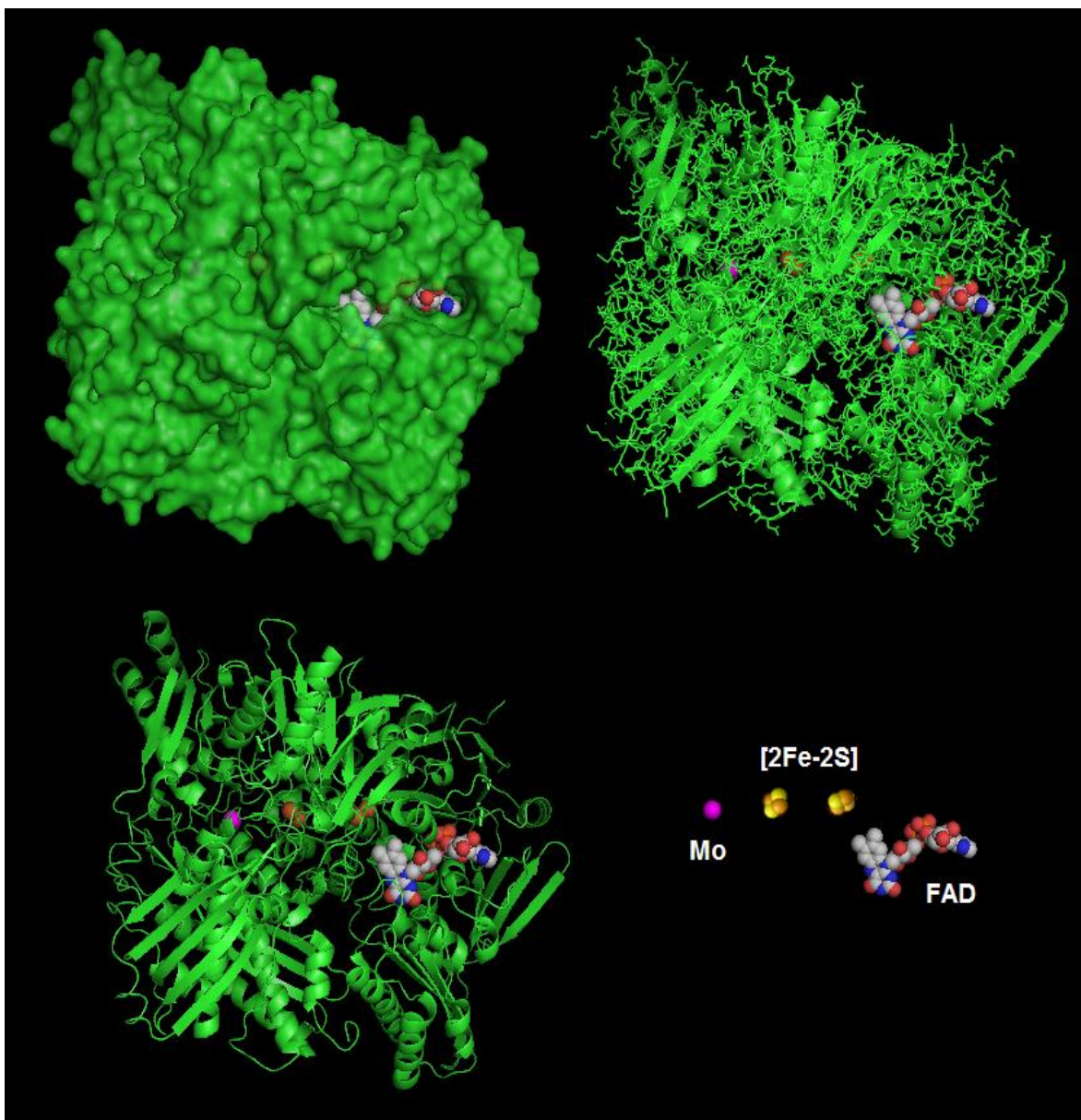


Figura 19. Molécula de FAD, grupo tipo [2Fe-2S] y átomo de Mo de la Xantina Oxidasa de la base de datos 1FIQ obtenida por difracción de rayos-X visualizada por PyMOL [47].



3.2.3.1 INHIBIDORES DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA Y SUS USOS TERAPÉUTICOS

Una enzima tiene como función biológica el catalizar reacciones químicas esenciales para el buen funcionamiento celular. De manera simplificada, una reacción enzimática se puede representar de la siguiente manera:



Donde la letra E representa a la enzima, la S al sustrato y [ES] al complejo binario del que se generará un producto P y a la enzima E. Este sistema de reacción puede hacerse más complejo al considerar que las enzimas pueden estar sujetas a algún tipo de inhibición. Los inhibidores enzimáticos son especies químicas que interfieren en la catálisis, haciéndola más lenta o deteniendo las reacciones [44].

La inhibición de una enzima puede ser reversible o irreversible. Para el primer caso, se puede mencionar de ejemplo a la “inhibición competitiva”, la cual consiste en una competencia del inhibidor con el sustrato por el sitio activo de la enzima, en muchas ocasiones por la similitud entre ambas moléculas. La consecuencia de interaccionar el inhibidor con la enzima y formar el complejo ternario [EI] es que no se lleva a cabo la catálisis. Otro ejemplo de inhibición reversible es la “inhibición no competitiva” la cual está definida cuando el inhibidor se fija a un sitio distinto al que se une el sustrato. Es de resaltar que el inhibidor solo se une al complejo [ES] y como consecuencia tampoco favorece la catálisis enzimática. Finalmente, se puede esperar casos en el que ocurra una “inhibición mixta” y que es cuando la catálisis enzimática disminuye porque el inhibidor se puede unir tanto a la enzima, como al complejo [ES] en un sitio distinto al que se une el sustrato [44]. Ver Figura 20.

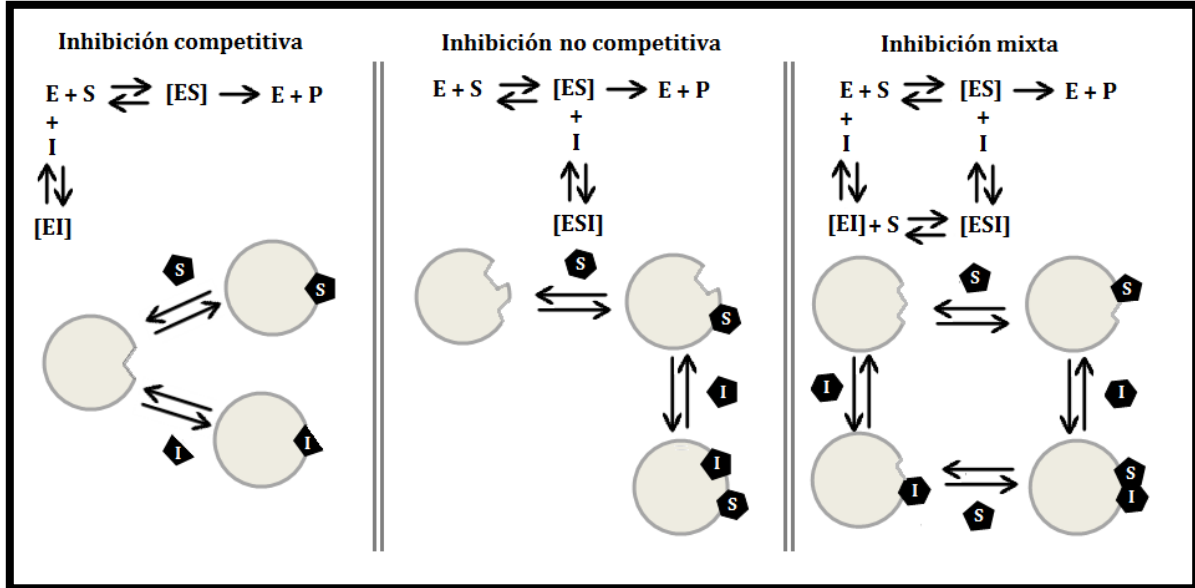


Figura 20. Esquema para las inhibiciones enzimáticas irreversibles

Una inhibición irreversible ocurre cuando el inhibidor se combina o destruye a un grupo de la enzima que es esencial para su actividad, o cuando el inhibidor forma un enlace muy estable con la enzima e impide que se pueda llevar a cabo la catálisis enzimática. Un caso especial dentro de este tipo de inhibición son los inactivadores suicidas. Estos compuestos son relativamente poco reactivos hasta que se unen al sitio activo de la enzima. Un inactivador suicida pasa a través de los primeros pasos de una reacción enzimática normal, pero a continuación se convierte en un compuesto muy reactivo que se combina irreversiblemente con la enzima en lugar de ser transformado en el producto normal [44].

Una vez presentado un panorama de los tipos de inhibición que se pueden presentar en una enzima, es de resaltar que varios inhibidores pueden utilizarse en terapia médica para tratar a pacientes que presentan desequilibrios en la regulación en sus sistemas enzimáticos.

Estudiar inhibidores de la enzima Xantina Oxidasa frecuentemente está asociado al tratamiento de pacientes con hiperuricemia. Esta enfermedad consiste en un



aumento de la concentración del ácido úrico en sangre, que posteriormente puede dar origen a la “gota”, enfermedad caracterizada por la formación de depósitos de ácido úrico en las articulaciones produciendo dolor articular, inflamación y en casos más agudos impotencia funcional, haciendo de esta enfermedad un problema de discapacidad para las personas que la padecen [48]. Actualmente, en México se usa en la clínica el alopurinol como un “antigotoso” por ser un inhibidor de la enzima Xantina Oxidasa [49], ya que esta es la responsable de generar el ácido úrico como uno de sus productos.

En la actualidad los inhibidores de la enzima XO se usan recurrentemente como una terapia atractiva para desordenes como la hiperuricemia, gota, úlceras, cáncer, isquemia, hipertensión y daño oxidante según el mecanismo de acción que desempeñe [50].

El diseñar nuevos inhibidores de la Xantina Oxidasa tiene como fin dar más opciones de fármacos en la clínica para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas donde se puedan disminuir algunos efectos secundarios de los fármacos usados en la clínica actualmente, como por ejemplo, el daño de insuficiencia renal relacionados por el tratamiento de la gota con alopurinol [21].

3.2.3.2 COBRE COMO INHIBIDOR DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA

Como ya se mencionó, la Xantina Oxidasa (XO) es una enzima que genera especies reactivas de oxígeno (ERO). Se sabe que las concentraciones de las ERO son reguladas por otras enzimas (SOD y Catalasa), de lo contrario, los daños celulares que se pueden producir por estas especies reactivas podrían ser irreversibles para los sistemas biológicos [9].

La citoprotección con enzimas antioxidantes para regular las especies reactivas de oxígeno provenientes de la enzima XO no es la única forma de disminuir los



efectos de las ERO generadas por esta enzima; la otra forma de hacerlo es mediante su inhibición. Actualmente, compuestos orgánicos como el alopurinol y algunos de sus análogos se utilizan como inhibidores de la XO en la clínica [49], sin embargo, se han realizado estudios “*in vitro*” con metales, que al interactuar con la enzima XO aumenten su actividad catalítica o la disminuyan según el caso [51].

Algunos estudios sobre la interacción de la Xantina Oxidasa con Cu^{II} , Hg^{II} y Ag^{I} han demostrado una inhibición de la actividad catalítica de la enzima [52]. Sin embargo, de los iones metálicos mencionados, el cobre, por ser un micronutriente de los seres vivos, requiere de mayor interés para ser estudiado y esclarecer si juega un papel importante en la regulación de esta enzima “*in vivo*”, así como entender el mecanismo de inhibición de este ion metálico.

Actualmente, se sabe que la inhibición de XO por Cu^{II} está en función de la concentración del metal [53]. Estudios espectrofotométricos han indicado variaciones estructurales en el entorno molecular del molibdeno y la molécula de FAD que constituyen a la enzima XO, las cuales se han explicadas por las interacciones con el cobre, donde la inhibición puede deberse a un cambio estructural de la enzima provenientes de la interacción Cu^{II} -XO [51]. Otros trabajos han indicado que la coordinación de Cu^{II} con la enzima XO es mediante átomos de azufre y nitrógeno proveniente de los residuos de aminoácidos, tal y como se ha observado en estudios de EPR [53], así también, se propone en la literatura que esta inhibición es del tipo no competitiva, ya que el Cu^{II} no interactúa directamente con sitio donde se encuentra el molibdeno, que es donde se lleva a cabo la interacción xantina-Xantina Oxidasa [51, 52].



3.3. EL COBRE Y LAS CASIOPEÍNAS®

3.3.1 CASIOPEÍNAS®

En la actualidad, el diseño de fármacos es un proceso muy complejo donde se requiere de muchas disciplinas para encontrar una nueva molécula líder con propiedades farmacológicas que permitan el tratamiento de alguna enfermedad. En años recientes han aparecido en el mercado algunos nuevos metalofármacos. El primer compuesto inorgánico para el tratamiento de cáncer fue el Cisplatino, el cual ha servido de modelo para muchos químicos inorgánicos en el diseño de nuevos compuestos [54]. Por tal motivo, el grupo de investigación encabezado por la doctora Lena Ruiz Azuara en la Facultad de Química de la UNAM se dio a la tarea de utilizar a la Química Bioinorgánica para proponer una serie de compuestos de coordinación de interés farmacéutico que pudieran ser moléculas biológicamente activas en el tratamiento del cáncer. Estos compuestos pasaron por una cadena de consideraciones al diseñarse; ya que se pretendía sintetizar y caracterizar una serie de agentes antineoplásicos, y posteriormente confirmar su uso en la clínica como tratamiento para el cáncer [55].

Debido a las propiedades del cobre, se propuso a éste metal como átomo central de un grupo de compuestos de coordinación nombrados **Casiopeínas®**. Estos compuestos tienen fórmulas generales $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{alfa-L-aminoacidato})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$, donde el donador N-N es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina) la cual se nombrará en este trabajo, de aquí en adelante, como ligante primario. El donador por oxígeno (O-O) es acetilacetato (acac) o salicilaldehidato (salal), o un donador por nitrógeno y oxígeno como es el caso de los alfa-L-aminoacidato. A este segundo grupo de moléculas bidentadas se le nombrará en este trabajo como ligante secundario. *Ver figura 21.*

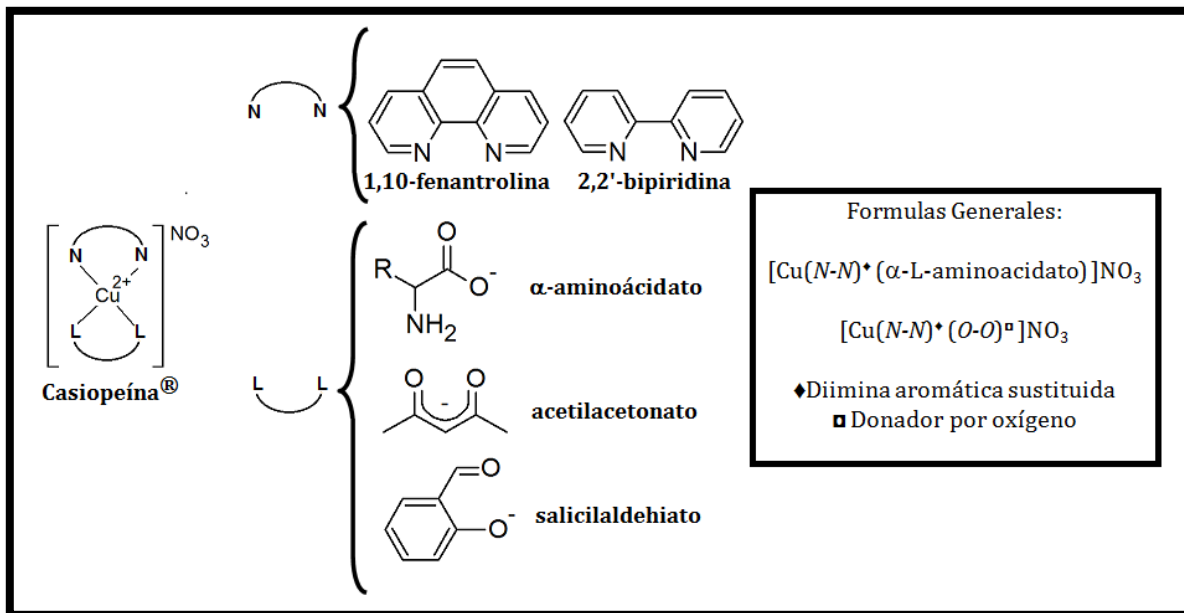


Figura 21. Formulas generales de los complejos de cobre(II) (Casiopeínas®).

En la *Figura 21* se observa que las **Casiopeínas**[®] [1, 2] son una serie de compuestos de coordinación amplia, por lo que fue necesario crear una nomenclatura que permita agrupar a estos compuestos en familias de acuerdo a su estructura. Las familias se denominan por números romanos que indican el ligante diimina que permanece constante en el grupo. Posteriormente, se escribe la abreviatura correspondiente al ligante secundario según las convenciones de la IUPAC, esta última indica exactamente la identidad del complejo. La excepción a esta nomenclatura es la Familia III y la X. Para el primer caso, esta familia está compuesta por todos aquellos complejos que presenten en su estructura un donador por oxígeno-oxígeno, no importando cual sea la diimina; para esta familia, la letra posterior al número romano indica el tipo de ligante diimina, y posteriormente se agrega una letra que indica la identidad del ligante donador por oxígeno (**a** para acac y **s** para salal) [56]. La Familia X difiere a la familia III en que en lugar del ligante donador O-O se encuentra coordinado a un péptido. *Ver Tabla 1.*



Tabla 1. Clasificación en familias según la nomenclatura del grupo de trabajo en Casiopeínas®.

Familia	Fórmula General
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína III-a	[Cu(N-N)(acac)]NO ₃
Casiopeína III-s	[Cu(N-N)(salal)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5-R-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína X	[Cu _x (N-N) _x (péptido) _x](NO ₃) _x

Acac: acetilacetato, **salal:** salicilaldehidato, **N-O:** alfa-L-aminoacido, **N-N:** diimina sustituida

3.3.2 CASIOPEÍNAS® Y LA QUÍMICA ASOCIADA A SU CENTRO METÁLICO

En la actualidad, varios de estos compuestos han sido evaluados en diferentes modelos experimentales, tanto “*in vitro*” [3] como “*in vivo*” [3, 4], los cuales han demostrado su actividad antiproliferativa [5], citotóxica [4], genotóxica [6] y antitumoral [3]. Aunque el mecanismo de acción para inducir la muerte celular aún no se ha elucidado, se sabe que por las propiedades de estos compuestos desencadenan señales que inducen apoptosis [4, 7]. Se propone que en células



tumorales las **Casiopéínas**[®] induzcan la muerte celular como consecuencia de una o varias señales, las cuales pueden tener origen en interacciones con el DNA, la generación de toxicidad mitocondrial o por la formación directa de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas señales, de forma aislada o en conjunto, podrían conducir a la reacción antiproliferativa observada para estos compuestos en células tumorales [54]. Ver figura 22.

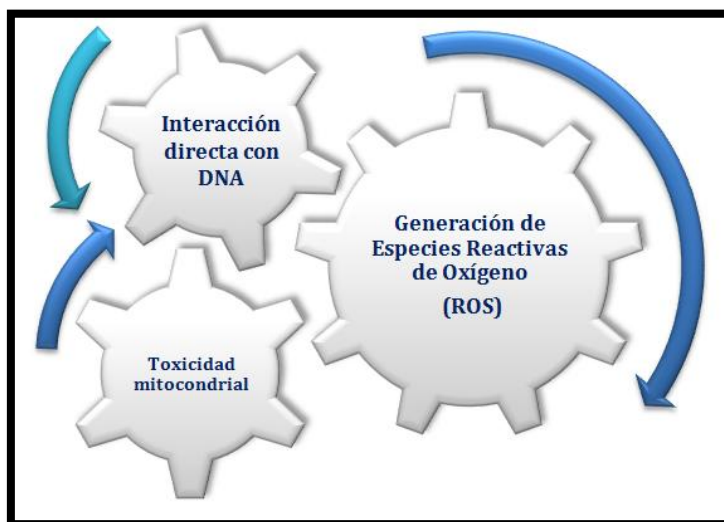


Figura 22. Blancos de estudio de Casiopéínas[®] para estudiar su mecanismo de acción para inducir apoptosis.

Dentro de la química de las **Casiopéínas**[®] es de interés, para comprender el mecanismo de acción que lleva a las células a apoptosis, estudiar las posibles interacciones de esta familia de compuestos con biomoléculas específicas de una célula, como por ejemplo, evaluar interacciones con el DNA, glutatión, y con especies reactivas de oxígeno, por mencionar algunas. Por otra parte, se sabe que el centro metálico, en conjunto con sus ligantes, brinda a las **Casiopéínas**[®] propiedades electroquímicas, las cuales se deben considerar para proponer posibles reacciones del tipo oxido-reducción con biomoléculas, lo que pudiera modificar algún equilibrio químico de interés biológico, como por ejemplo, la modulación de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno en una célula.



Tabla 2. Potenciales de media onda para las Casiopeínas® que se utilizaron en este trabajo [5].

Casiopeínas®	E _{1/2} [V vs ENH]
Casiopeína II gly	0.147
Casiopeína III Ea	0.139
Casiopeína IV gly	0,141*
Casiopeína III ia	0.119

*Valor obtenido por comunicación personal.

Al considerar que uno de los intereses para el grupo de investigación de estos compuestos es estudiar cómo modulan las especies reactivas de oxígeno, cabe señalar que por las propiedades electroquímicas de las **Casiopeínas®** reportadas en la tabla 2 se puede proponer que sus potenciales electroquímicos se encuentran dentro del intervalo que favorece la dismutación del radical superóxido, tal y como se ha reportado para distintos tipos de enzimas SOD. Ver figura 23.

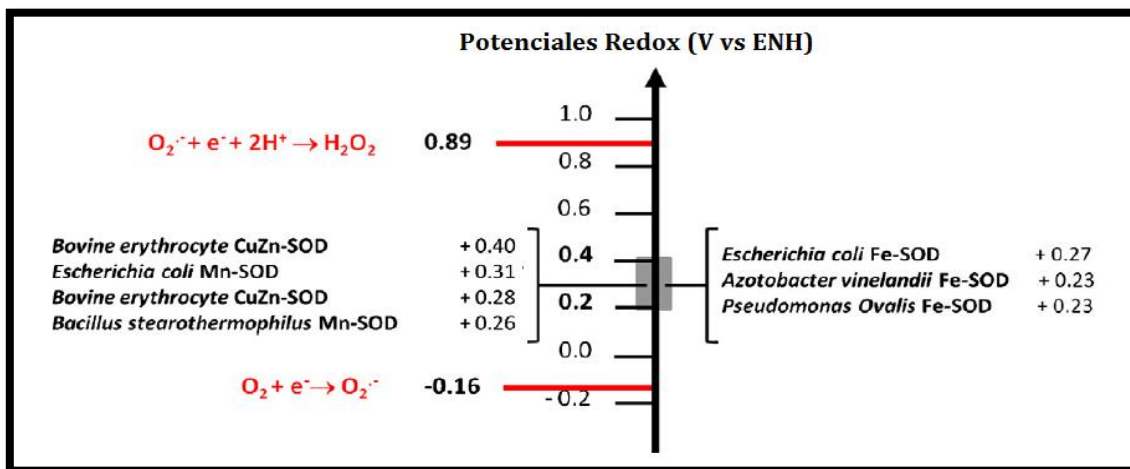


Figura 23. Diagrama unidimensional de potenciales redox de enzimas SOD y de la dismutación del radical superóxido. Tomada y modificada de Irazo, O., 2011 [12].

Por tal motivo, los compuestos que podrían tener la capacidad de dismutar al $O_2^{\bullet -}$ se les puede proponer una posible actividad biomimética tipo Superóxido dismutasa, como es el caso de las **Casiopeínas®**.

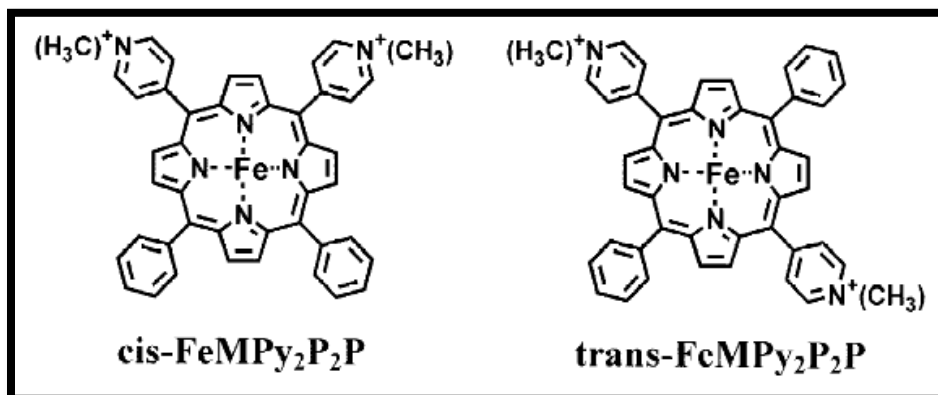
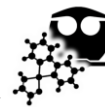


Figura 24. Compuestos con actividad SOD y antitumoral. Tomada de Kasugai, N., 2002 [57].

En la literatura se han propuesto algunos compuestos con actividad SOD que han presentado actividad citotóxica, como es el caso de los compuestos, mostrados en la *figura 24*, propuestos por el grupo de investigación del Dr. Kubota y colaboradores [57]. Lo que se propone para estos compuestos con actividad biomimética tipo SOD es que al ser el H₂O₂ uno de los productos generados por la catálisis, esta especie aumente el estrés oxidante en la célula. El peróxido de hidrogeno es una especie reactiva de oxígeno neutra, y menos reactiva que el radical superóxido, sin embargo, al ser una molécula no polar, puede trasportarse a través de membranas y aumentar la posibilidad de que en la célula interaccione con Fe^{II} o algún otro donador de electrones que realice una reacción tipo Fenton y generar como resultado al radical hidroxilo, provocando así un mayor daño en la célula por estrés oxidante y ser esta la razón que podría llevar a la célula a su muerte [58, 59]. Lo que se puede debatir de esta propuesta es que no se han sintetizado compuestos con un mecanismo elucidado donde la actividad tipo SOD sea solo la responsable de la muerte celular, además de que la actividad de la enzima SOD se tiene catalogada como un mecanismo de citoprotección cuando la célula se encuentra en estrés oxidante [9].



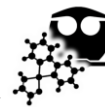
4. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. JUSTIFICACIÓN

El potencial de media onda de la **Casiopeína II gly**, **Casiopeína III Ea**, **Casiopeína IV gly** y **Casiopeína III ia** se encuentra dentro del intervalo que favorece la dismutación del radical superóxido ($-0.16 < E_{1/2} < 0.89$ V/ENH); por lo cual, es de importancia conocer ensayos que confirmen la actividad tipo SOD de estos compuestos de coordinación.

4.2. HIPÓTESIS

El sistema **Xa-XO-NBT** se puede usar para evaluar la actividad biomimética tipo SOD de la **Casiopeínas[®] II gly, III Ea, IV gly y III ia**.



4.3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Estudiar la utilidad del sistema **Xa-XO-NBT** para evaluar la posible actividad SOD de las **Casiopeínas[®]**.

Objetivos particulares

- Estudiar con los sistemas **Xa-XO** y **Xa-XO-NBT** las siguientes **Casiopeínas[®]**:

Casiopeína II gly... [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato)] NO₃

Casiopeína III Ea... [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato)] NO₃

Casiopeína IV gly.. [Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (glicinato)] NO₃

Casiopeína III ia..... [Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)] NO₃

- Evaluar la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa por **Casiopeínas[®]** “*in vitro*” con el sistema **Xa-XO**.
- Determinar las CI50's de la enzima Xantina Oxidasa de **Casiopeínas[®]** “*in vitro*” con el sistema **Xa-XO**.
- Estudiar la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa por **Casiopeínas[®]** en presencia de Catalasa en el sistema **Xa-XO**.
- Estudiar la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa por **Casiopeínas[®]** en presencia de Catalasa desnaturalizada en el sistema **Xa-XO**.
- Estudiar la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa por **Casiopeínas[®]** en presencia de Manitol en el sistema **Xa-XO**.
- Estudiar la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa por **Casiopeínas[®]** en presencia de EDTA en el sistema **Xa-XO**.
- Estudiar si las **Casiopeínas[®]** muestran una actividad biomimética tipo SOD con el sistema **Xa-XO-NBT**.



5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 REACTIVOS

A continuación, en las tablas 3, 4 y 5, se presentan los reactivos utilizados para este trabajo.

Tabla 3. Enzimas utilizadas en este trabajo.

Enzimas	Unidades	Distribuidor
Xantina Oxidasa de leche bovina	Una unidad convertirá 1 μM de xantina a ácido úrico por minuto a pH 7,5 y a 25°C	Sigma-aldrich
Catalasa de hígado bovino	Una unidad descompone 1 μM de H_2O_2 por minuto a pH 7 y a 25°C	Sigma-aldrich

Tabla 4. Reactivos utilizados en este trabajo.

Reactivo (Nombre comercial)	Formula	Distribuidor
HEPES Pureza: 99.5%	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico] $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	Sigma-aldrich
Xantina Pureza: 99%	2,6-Dihidroxipurina $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$	Sigma-aldrich
Sal disódica dihidrata de EDTA Pureza: 99.45	Sal disódica del ácido etilendiaminotetraácetico dihidratado $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-aldrich
Manitol Pureza: $\geq 98\%$	D-Manitol $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	Sigma-aldrich
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_6\text{Cl}_2$	Sigma-aldrich
Sosa (lentejas) Pureza: $\geq 97\%$	Hidróxido de sodio NaOH	Sigma-aldrich
Nitrato de cobre hemi(pentahidratado) Pureza: 99.99%	Nitrato de cobre hemi(pentahidratado) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$	Sigma-aldrich

Tabla 5. Casiopeínas[®] estudiadas en este trabajo.

Casiopeínas [®] (Nombre comercial)	Formula	PM g/mol
Casiopeína II gly	[Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato)] NO ₃ •H ₂ O	443.90
Casiopeína III Ea	[Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato)] NO ₃ •H ₂ O	450.94
Casiopeína IV gly	[Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (glicinato)] NO ₃ •H ₂ O	420.07
Casiopeína III ia	[Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)] NO ₃ •H ₂ O	426.92

Los reactivos fueron utilizados sin una purificación adicional de su presentación comercial.

Para el caso de las **Casiopeínas[®]**, estas fueron sintetizadas y purificadas por la Dra. María Elena Bravo Gómez de acuerdo a la síntesis reportada en la patente.

5.2 EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 PARA LA ENZIMA XANTINA OXIDASA (IC50)

Para poder estudiar la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa asociada a compuestos de cobre(II) se montó el sistema de reacción Xa-XO, el cual consiste en colocar la enzima XO en presencia de xantina y diferentes concentraciones de los compuestos a estudiar, en un sistema abierto (aeróbico) durante un periodo de incubación de 20 minutos y un pH de 7.4 impuesto por un buffer de HEPES a temperatura ambiente, para así obtener el espectro de absorción y el máximo de absorbancia del ácido úrico generado en las mencionadas condiciones.



Tabla 6. Soluciones stock

Reactivos	Concentraciones
Solución acuosa de buffer de HEPES a pH=7.4	50 mM
Solución acuosa de xantina	1.5mM en solución de HEPES 50 mM y pH 7.4
Soluciones acuosas de Casipeínas [®] y Cu(NO ₃) ₂ en HEPES a pH 7.4 para evaluar la inhibición de la enzima XO	6 uM
	15 uM
	25 uM
	50 uM
	100 uM
	300 uM
	1000 uM
Solución acuosa de Xantina Oxidasa	0.0128 unidades/mL

Debido a que los compuestos de cobre evaluados en este trabajo presentan máximos de absorción en la región UV del espectro, fue necesario preparar un blanco para cada concentración de compuesto usada. En las siguientes tablas se muestran la composición de los blancos y sistemas experimentales que se prepararon para cada Casiopeína[®] y Cu(NO₃)₂, a los que se les realizó la medición espectrofotométrica. Ver tabla 7 y 8.



Tabla 7. Blancos usados para cada concentración de compuestos de cobre(II) en el seguimiento espectrofotométrico del ácido úrico.

Microlitros colocados de cada reactivo para usarse como "blancos" en cada concentración de compuesto de Cobre(II) estudiada. Volumen final = 1mL								
	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3	Blanco 4	Blanco 5	Blanco 6	Blanco 7	Control negativo
1.- HEPES 50 mM en uL	800	800	800	800	800	800	800	900
2.- Xantina 1.5mM en uL	100	100	100	100	100	100	100	100
3.- Solución* 6 uM	100	----	----	----	----	----	----	----
4.- Solución* 15 uM	----	100	----	----	----	----	----	----
5.- Solución* 25 uM	----	----	100	----	----	----	----	----
6.- Solución* 50 uM	----	----	----	100	----	----	----	----
7.- Solución* 100 uM	----	----	----	----	100	----	----	----
8.- Solución* 300 uM	----	----	----	----	----	100	----	----
9.- Solución* 1000 uM	----	----	----	----	----	----	100	----

* Soluciones de Casiopeínas[®] y Cu(NO₃)₂



Tabla 8. Sistemas experimentales usados para cada concentración de compuesto de cobre(II) en el seguimiento espectrofotométrico del ácido úrico.

Microlitros colocados de cada reactivo para usarse como "sistemas experimentales" en cada concentración de compuesto de Cu(II) estudiada.								
Volumen final = 1mL								
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Control Positivo
1.- HEPES 50 mM en uL	400	400	400	400	400	400	400	500
2.- Xantina 1.5mM en uL	100	100	100	100	100	100	100	100
3.- Solución* 6 uM	100	---	---	---	---	---	---	---
4.- Solución* 15 uM	---	100	---	---	---	---	---	---
5.- Solución* 25 uM	---	---	100	---	---	---	---	---
6.- Solución* 50 uM	---	---	---	100	---	---	---	---
7.- Solución* 100 uM	---	---	---	---	100	---	---	---
8.- Solución* 300 uM	---	---	---	---	---	100	---	---
9.- Solución* 1000 uM	---	---	---	---	---	---	100	---
10.- XO en uL	400	400	400	400	400	400	400	400
20 minutos de incubación a partir de agregar la enzima XO								

* Soluciones para cada Casiopeínas[®] y Cu(NO₃)₂

Una vez que se realizaron las mediciones espectrofotométricas en el UV-VIS, se recopilaron los datos que correspondieron a la absorbancia en la longitud de onda de 294 nm (atribuida al ácido úrico generado) en el sistema para cada concentración del compuesto de cobre empleada. Ver figura 25 y26.

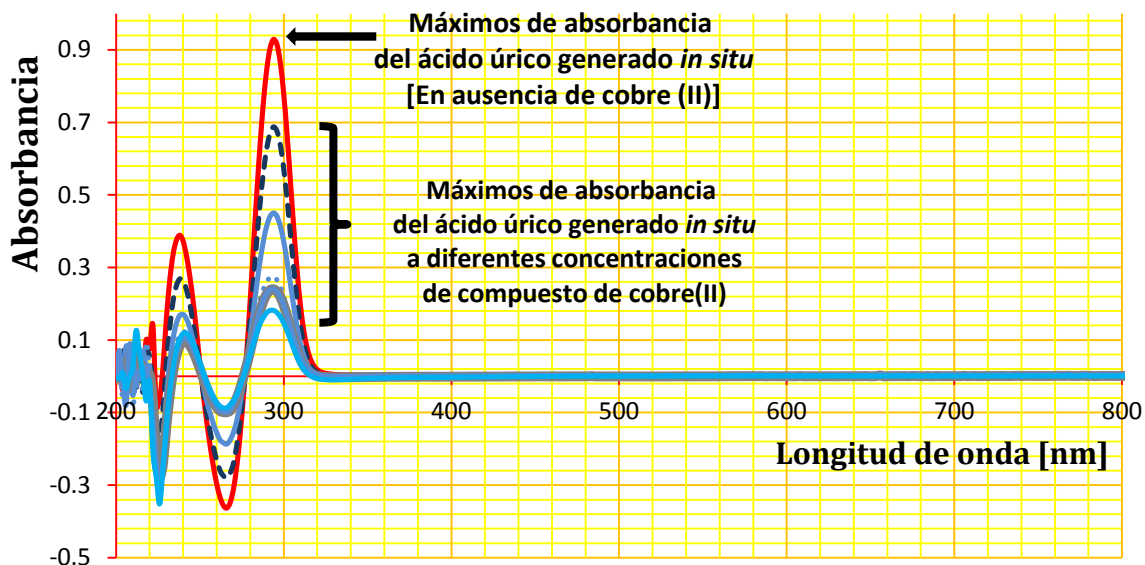


Figura 25. Espectro de absorción para el estudio de la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa por la presencia de diferentes concentraciones de compuesto de cobre (II). Se observa el máximo de absorbancia del ácido úrico en 294 nm, mismo que decrece en presencia de inhibidores de esta enzima.

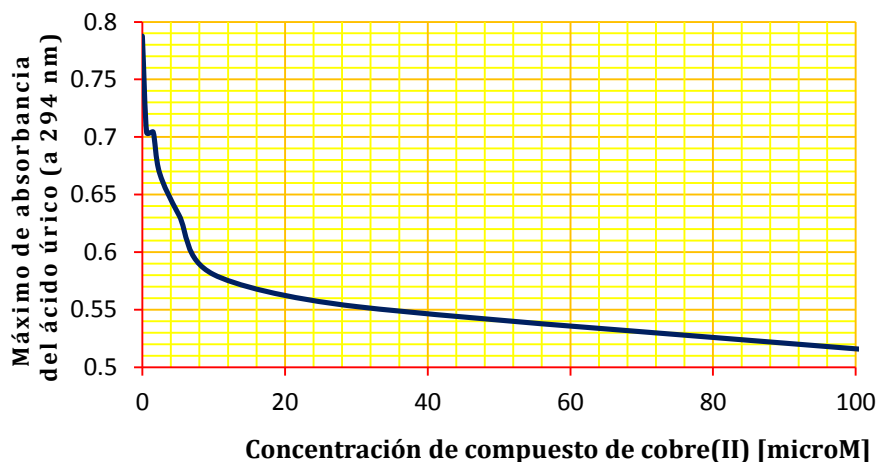


Figura 26. Máximos de absorbancia del ácido úrico generado para cada concentración del compuesto de cobre empleada



Posteriormente, con los valores obtenidos de las absorbancias de ácido úrico a 294 nm para cada concentración de compuesto de cobre se calculó el porcentaje generado de éste de acuerdo a la ecuación 1, tomando de referencia la absorbancia máxima del control positivo, el cual corresponde al sistema Xa-XO en ausencia de compuesto de cobre. Ver figura 27.

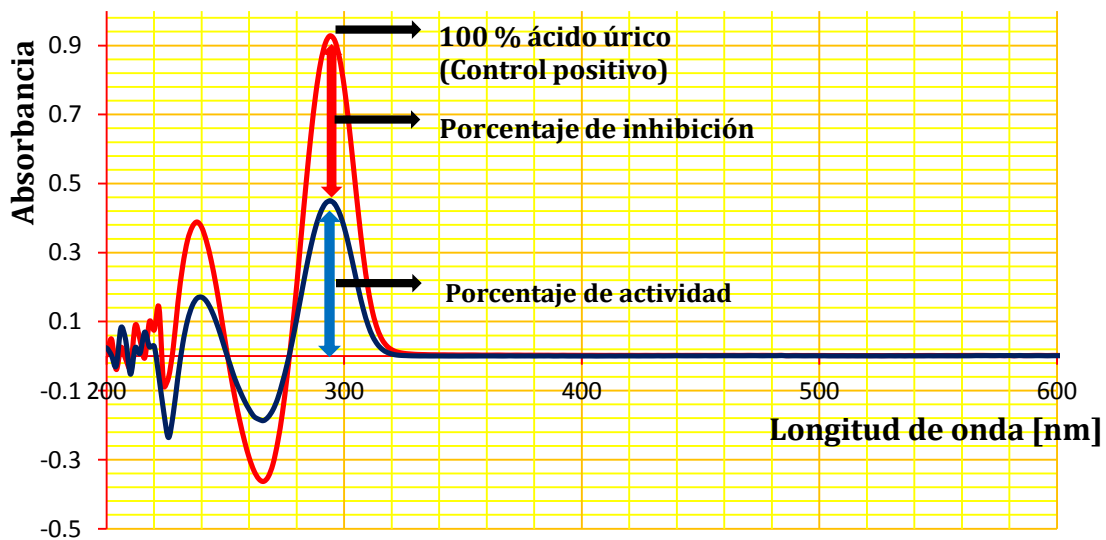


Figura 27. Representación gráfica del porcentaje de inhibición, porcentaje de actividad y control positivo

$$\% \text{ ácido úrico} = \frac{A^{\lambda=294}}{A_{100\% \text{ ác.úrico}}^{\lambda=294}} \times 100 \quad \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

Con la ecuación 2 se calculó la inhibición de la enzima XO con los datos obtenidos.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ ácido úrico} \quad \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$



Una vez que se obtuvieron los valores del porcentaje de inhibición de cada concentración de compuesto cúprico, se elaboraron curvas dosis-respuesta (porcentaje de inhibición en función del logaritmo de la concentración de compuesto cúprico). Ver figura 28.

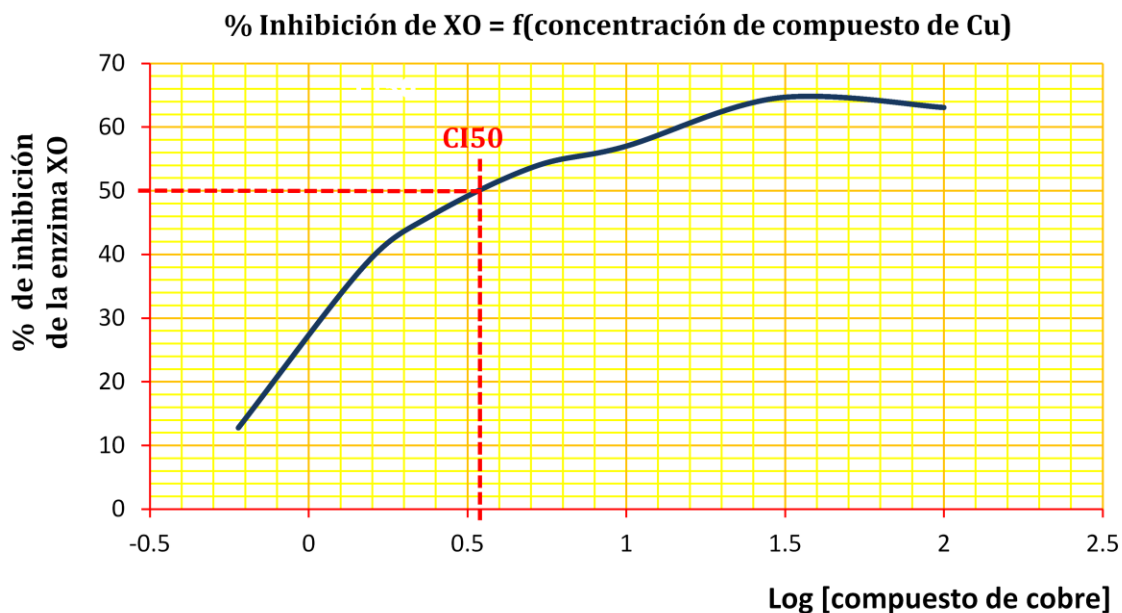


Figura 28. Curva dosis-respuesta para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI50)

Finalmente, la curva dosis respuesta obtenida se ajustó a una sigmoide, para posteriormente, con ayuda del ORIGIN [60], calcular la concentración inhibitoria 50 (CI50) de cada compuesto de cobre(II) estudiado, interpolando el valor en la curva ajustada.



5.3 SISTEMAS TIPO XANTINA-XANTINA OXIDASA

Para estudiar si la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa era por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas directamente por **Casiopeínas**[®] “*in situ*”, o por interacciones de la enzima XO con los mencionados compuestos de coordinación, se decidió montar sistemas tipo **Xa-XO** en presencia de una determinada concentración de **Casiopeínas**[®] y de diferentes compuestos, como fue el caso de la **Catalasa** con el fin de retirar del medio H_2O_2 , el cual se conoce de la literatura como un inhibidor de la enzima XO [61] así como también un reactivo de la reacción de Fenton [11]; **Catalasa desnaturalizada** para relacionar la actividad catalítica de la Catalasa activa con la de la XO; **manitol** para retirar del medio el radical hidroxilo en caso de ser generado y **EDTA** para evitar una interacción del cobre de las **Casiopeínas**[®] con la enzima XO. El sistema de reacción se preparó de la misma forma que en los experimentos anteriores para obtener el espectro de absorción y el máximo de absorbancia del ácido úrico generado en las mencionadas condiciones. Las concentraciones de los compuestos de cobre(II) que se usaron fueron del mismo orden de magnitud, siendo para la Casiopeína IV gly y la Casiopeína III ia sus CI_{50} (3,07 μM y 5.4 μM respectivamente), mientras que para la Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea se definió usar 5 μM .

Tabla 9. Casiopeínas[®] estudiadas

Casiopeínas[®]	Concentraciones en el sistema de reacción
Casiopeína IV gly	3.07 uM
Casiopeína III ia	5.40 uM
Casiopeína II gly	5.00 uM
Casiopeína III Ea	5.00 uM

Tabla 10. Soluciones stock

Reactivos	Concentraciones
Buffer de HEPES a pH=7.4	50 mM
Solución de xantina	1.5mM en solución de HEPES 50 mM y pH 7.4
Solución de Xantina Oxidasa	0.0128 unidades/mL
Catalasa	905.6 unidades/mL
Catalasa desnaturalizada	0.05 g/mL
Manitol	15 mM
EDTA	1 mM
Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea	50 uM
Casiopeína IV gly	30 uM
Casiopeína III ia	54 uM

Las siguientes tablas muestran la composición de los blancos y sistemas experimentales que se prepararon para cada Casiopeína[®] y que se les realizó la



medición espectroscópica en el UV-VIS. El orden en el que se enumeran los reactivos corresponde al orden en el que se adicionaron.

Tabla 11. Blancos usados para cada concentración de compuesto de cobre(II) en el seguimiento espectrofotométrico del ácido úrico

Microlitros colocados de cada reactivo para usarse como "blancos" en cada Casiopeína [®] estudiada.								
Volumen final = 1 mL								
	Blanco EDTA Casiopeína	Blanco Manitol Casiopeína	Blanco Cat Casiopeína	Blanco Cat-des Casiopeína	Blanco Casiopeína	Blanco	Blanco EDTA	Blanco Cat
1.- HEPES 50 mM en uL	700	700	700	700	800	900	800	800
2.- Xa 1.5 mM en uL	100	100	100	100	100	100	100	100
3.- Solución stok* de Casiopeína[®] en uL	100	100	100	100	100	----	----	----
4.- EDTA 1 mM en uL	100	----	----	----	----	----	100	----
5.- Manitol 15 mM en uL	----	100	----	----	----	----	----	----
6.- Cat en uL	----	----	100	----	----	----	----	100
7.- Cat-des en uL	----	----	----	100	----	----	----	----

* Las soluciones usadas para cada Casiopeína se muestran en la tabla 10



Tabla 12. Sistemas experimentales usados para cada concentración de Casiopeína® en el seguimiento espectrofotométrico del ácido úrico

Microlitros adicionados de cada reactivo para usarse como "blancos"								
Volumen final = 1mL								
	Xa/XO EDTA Casiopeína	Xa/XO Manitol Casiopeína	Xa/XO Cat Casiopeína	Xa/XO Cat-des Casiopeína	Xa/XO Casiopeína	Xa/XO	Xa/XO EDTA	Xa/XO Cat
1.- HEPES 50 mM en uL	300	300	300	300	400	500	400	400
2.- Xa 1.5 mM en uL	100	100	100	100	100	100	100	100
3.- Solución stok* de Casiopeína® en uL	100	100	100	100	100	-----	-----	-----
4.- EDTA 1 mM en uL	100	-----	-----	-----	-----	-----	100	-----
5.- Manitol 15 mM en uL	-----	100	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6.- Cat en uL	-----	-----	100	-----	-----	-----	-----	100
7.- Cat-des en uL	-----	-----	-----	100	-----	-----	-----	-----
8.- XO en uL	400	400	400	400	400	400	400	400
20 minutos de incubación a partir de agregar la enzima XO								

* Las soluciones usadas para cada Casiopeína se muestran en la tabla 10

Con los valores obtenidos de las absorbancias de ácido úrico a 294 nm para cada concentración de compuesto de cobre se calculó el porcentaje generado de esta especie de acuerdo a la ecuación 1, tomando de referencia la absorbancia máxima del control positivo (el cual es el espectro de absorbancia del sistema donde no se colocó compuesto de cobre). Finalmente, se representaron en gráficas de barras el porcentaje de ácido úrico producido con respecto al control para cada sistema realizado.



5.4 USO DEL SISTEMA ENZIMÁTICO Xa-XO-NBT PARA COMPUESTOS QUE INHIBEN A LA ENZIMA XO

Para poder estudiar de forma cualitativa una posible actividad SOD para las **Casiopéínas**[®] se montó el sistema de reacción Xa-XO-NBT, el cual consiste en colocar la enzima XO en presencia de xantina en una concentración de Casiopéína[®] a la cual se conoce el porcentaje de inhibición de la enzima XO. Las condiciones de pH, tiempo de incubación, y concentraciones de **Casiopéínas**[®] para estos sistemas son las mismas que las usadas en los “sistemas tipo Xa-XO”; con la variante de que ahora se midió la absorbancia en una longitud de onda de 560 nm, la cual corresponde a la señal de formazán generado “*in situ*”.

Tabla 13. Soluciones stock

Reactivos	Concentraciones
Solución acuosa de buffer de HEPES a pH=7.4	50 mM
Solución acuosa de xantina	1.5mM en solución de HEPES 50 mM y pH 7.4
Solución acuosa de NBT en HEPES	1 mM
Casiopéína II gly y Casiopéína III Ea	50 uM
Casiopéína IV gly	30 uM
Casiopéína III ia	54 uM

Las siguientes tablas muestran la composición de los blancos y sistemas experimentales que se prepararon para cada Casiopéína[®] y a los que se les realizó la medición espectroscópica en el UV-VIS. El orden en el que se enumeran los reactivos corresponden a al orden que se adicionaron.



Tabla 14. Blancos usados para cada concentración de compuesto de cobre(II) en el seguimiento espectrofotométrico de formazán

Microlitros colocados de cada reactivo para usarse como “blancos” en cada Casiopeína® estudiada.					
Volumen final = 1mL					
Clave usada	Xa/NBT Contol negativo**	Xa/NBT Casiopeína IV gly 3.07 uM	Xa/NBT Casiopeína III ia 5.40 uM	Xa/NBT Casiopeína II gly 5.00 uM	Xa/NBT Casiopeína III Ea 5.00 uM
1.- HEPES 50 mM en uL	600	500	500	500	500
2.- Xa 1.5 mM en uL	100	100	100	100	100
3.- NBT 1mM en uL	300	300	300	300	300
4.- Solución stok* de Casiopeína® en uL	----	100	100	100	100

* Las soluciones usadas para cada Casiopeína se muestran en la tabla 13

** Se realizó un control negativo para cada Casiopeína®



Tabla 15. Sistemas experimentales usados para cada concentración de Casiopeína® en el seguimiento espectrofotométrico del ácido úrico

Microlitros colocados de cada reactivo para usarse como “sistemas experimentales” para cada Casiopeína® estudiada. Volumen final = 1mL					
	Xa/NBT Control Positivo**	Xa/NBT Casiopeína IV gly 3.07 uM	Xa/NBT Casiopeína III ia 5.40 uM	Xa/NBT Casiopeína II gly 5.00 uM	Xa/NBT Casiopeína III Ea 5.00 uM
1.- HEPES 50 mM en uL	200	100	100	100	100
2.- Xa 1.5 mM en uL	100	100	100	100	100
3.- NBT 1mM en uL	300	300	300	300	300
4.- Solución stock* de Casiopeína® en uL	----	100	100	100	100
5.- XO en uL	400	400	400	400	400

* Las soluciones usadas para cada Casiopeína se muestran en la tabla 13

** Se realizó un control positivo para cada Casiopeína®

Con los valores obtenidos de las absorbancias de formazán en 560 nm para cada concentración de **Casiopeínas®** se calcula el porcentaje generado de éste de acuerdo a la ecuación 3, tomando de referencia la absorbancia máxima del control positivo, el cual es el espectro de absorbancia del sistema donde no se colocó compuesto de cobre. Finalmente, se hicieron gráficas de barras del % de formazán generado para cada sistema realizado.

$$\% \text{ Formazán} = \frac{A^{\lambda=560}}{A^{\lambda=560}_{100\% \text{ Formazán}}} \times 100 \quad \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$



6. RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA PARA DISTINTOS COMPUESTOS DE COBRE(II)

En la *figura 29* se observa el porcentaje de inhibición de la enzima XO en función de las concentraciones de los compuestos de cobre con el sistema **Xa-XO**, donde se puede observar dos grupos de **Casiopéinas®**: las que logran superar el 50% de inhibición de la enzima XO (Casiopéina IV gly y Casiopéina III ia) y las que no lo alcanzan (Casiopéina II gly y Casiopéina III Ea).

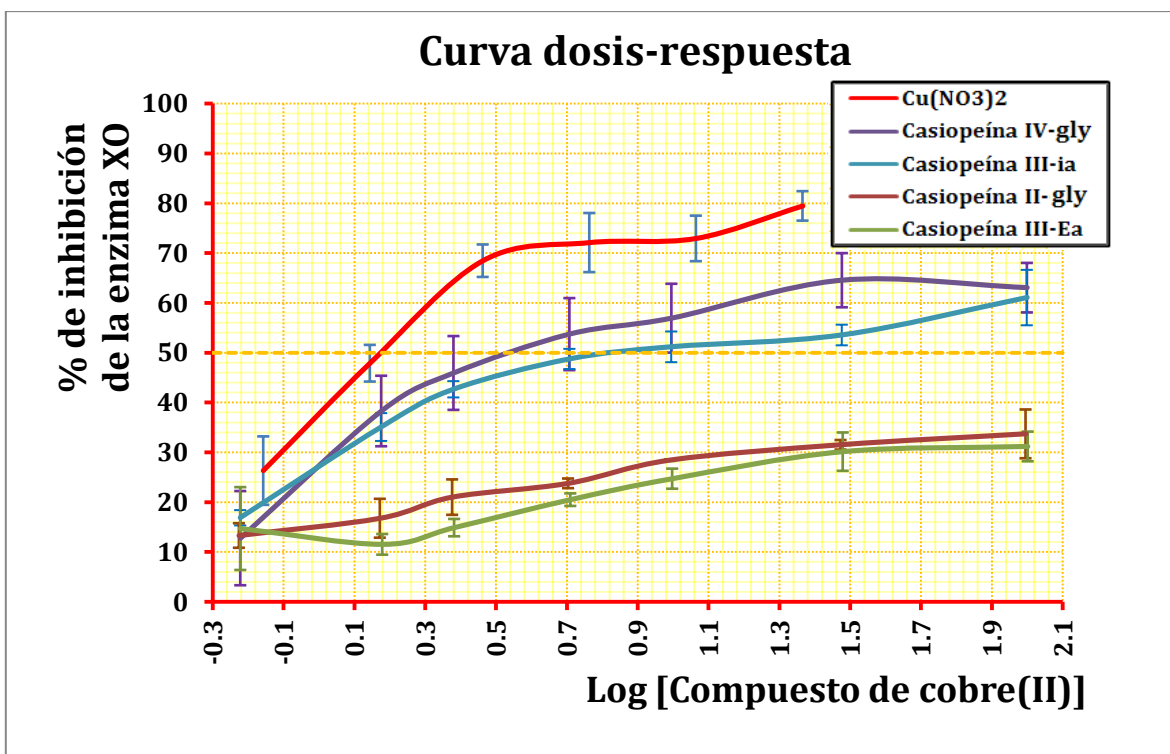


Figura 29. Curva dosis-respuesta para determinar la concentración **CI50** de los distintos compuestos de cobre(II) estudiados. Los resultados se muestran como el promedio de muestras independientes por triplicado con sus barras de error correspondientes a la desviación estándar.



En la tabla 16 se muestran los valores calculados de las CI50 de la enzima Xantina Oxidasa.

Tabla 16. Concentración inhibitoria cincuenta de compuestos de cobre(II) para la enzima Xantina Oxidasa.

Compuesto de cobre (II)	CI50 [uM]
Cu(NO ₃) ₂	1,45 ± 0.15
Casiopeína IV gly	3,07± 3.10
Casiopeína III ia	5,40± 2.80
Casiopeína II gly	No alcanza el 50% de inhibición de la XO
Casiopeína III Ea	No alcanza el 50% de inhibición de la XO
Cu(NO ₃) ₂ [62]	1,24
Alopurinol [62]	10,34

6.2 EXPERIMENTOS PREVIOS PARA EVALUAR CONTROLES POSITIVOS EN ENSAYOS DEL TIPO XA-XO CON CATALASA, MANITOL Y EDTA

Para montar los sistemas del tipo Xa-XO en los que se colocó Catalasa, manitol y EDTA se decidió realizar un estudio previo para observar si se modifica la actividad catalítica de la enzima XO en presencia de EDTA, manitol y Catalasa.

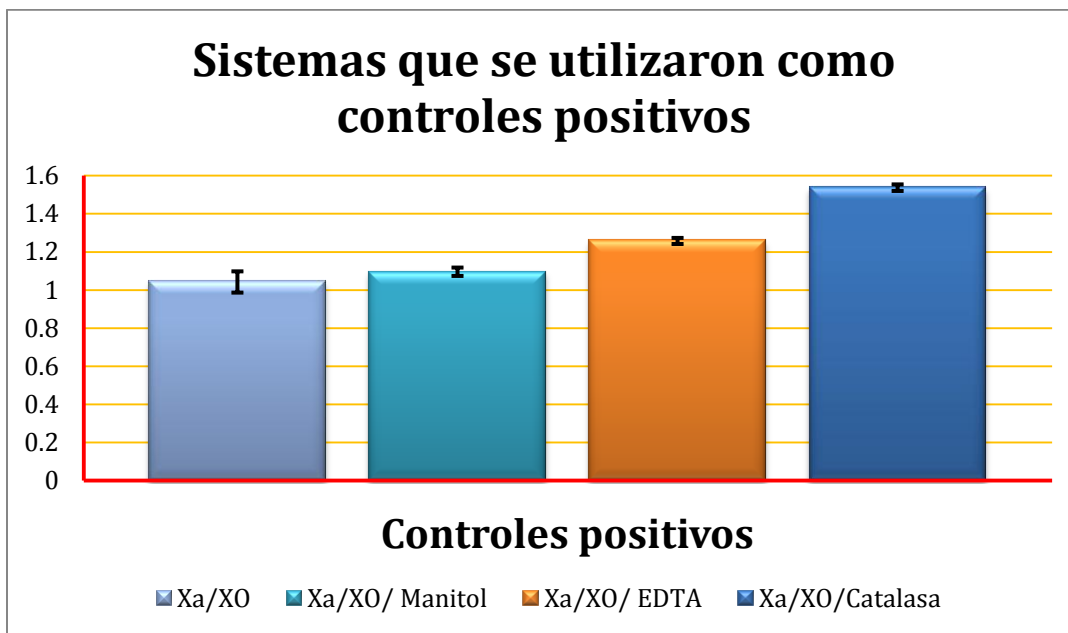


Figura 30. Comparación entre controles positivos. Los resultados se muestran como el promedio de muestras independientes por triplicado con sus barras de error correspondientes a la desviación estándar.

De la *figura 30* podemos observar que en presencia de manitol no varió la actividad catalítica de la enzima XO, por lo que para los ensayos con manitol se utilizó como control positivo el sistema Xa-XO.

Para el caso del EDTA se observó un aumento de la actividad de la enzima XO. Por tal motivo, se consideró tomar un control positivo con EDTA (Xa-XO-EDTA) para los ensayos que se realizaron en presencia de esta especie.

Un caso similar es el ensayo con Catalasa, dónde también se observa un incremento de la actividad de la enzima XO. Por tal motivo, en los sistemas donde se utilizó Catalasa se realizó como control positivo el sistema Xa-XO-Catalasa.



6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA PARA SISTEMAS TIPO Xa-XO A UNA CONCENTRACIÓN FIJA DE CASIOPEÍNAS®

Para estudiar la inhibición de la enzima XO se montaron los siguientes sistemas:

- **Xa-XO-Manitol:** En este sistema se pretendió consumir el radical hidroxilo en caso de ser originado “*in situ*” por una posible reacción tipo Fenton. Lo que se observó fue que no disminuyó el efecto inhibitorio de la enzima XO por las **Casiopeínas®**. Con esto se infiere que la inhibición no es por la generación del radical hidroxilo. Ver figura 31.

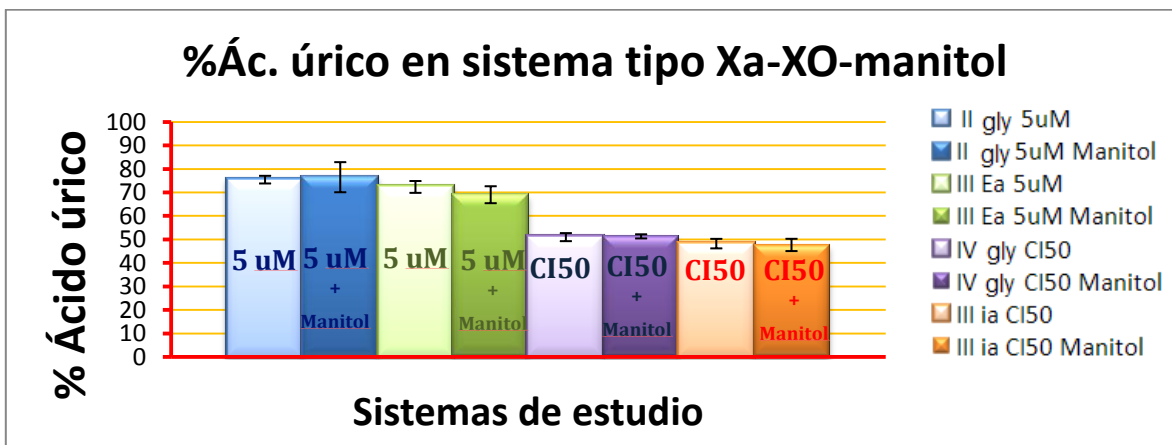


Figura 31. Sistemas tipo Xa-XO-manitol para Casiopeínas®. Los resultados se muestran como el promedio de muestras independientes por triplicado con sus barras de error correspondientes a la desviación estándar.

- **Xa-XO-Catalasa:** Con este sistema se planteó evitar la generación del radical hidroxilo en el medio de reacción con la presencia de Catalasa, la cual consumiría el H₂O₂ y truncaría de esta manera la reacción tipo Fenton, así como también se disminuiría el efecto inhibitorio que tiene la presencia del H₂O₂ en la enzima XO. En los resultados se observó que persistió la inhibición de la XO en presencia de **Casiopeínas®** con lo que se infiere que



la inhibición no es por la generación del radical hidroxilo, lo cual apoya a lo observado en el sistema Xa-XO-manitol.

Posteriormente, se desnaturalizó a la enzima Catalasa y se montó el sistema **Xa-XO-Catalasa desnaturalizada** para comparar y estudiar si la inhibición de la XO observada en el sistema con Catalasa variaba al desactivar la actividad catalítica de esta. Con los resultados se observó que al desnaturalizar a la Catalasa aumentó la actividad de la XO. Con esto se sugiere que las diferencias de la inhibición de la XO entre los sistemas con catalasa y catalasa desnaturalizada se pueden atribuir a posibles interacciones del cobre de las **Casiopéinas**[®] con algunos de los residuos de aminoácidos de la parte proteica de la catalasa, los cuales quedan expuestos más fácilmente al desnaturalizar la enzima. *Ver figura 32.*



Figura 32. Sistemas tipo Xa-XO-Catalasa/catalasa-desnaturalizada para Casiopéinas[®]. Los resultados se muestran como el promedio de muestras independientes por triplicado con sus barras de error correspondientes a la desviación estándar.

- **Xa-XO-EDTA:** Al colocar en el sistema EDTA se observó que la actividad de la enzima XO se recupera totalmente, indicándonos que al bloquear todos los sitios posibles de interacción del cobre de las **Casiopéinas**[®] con este ligante, permite que no pueda interaccionar este centro metálico con la XO, permitiendo que la actividad catalítica de XO no se modifique por estos



compuestos. Con este ensayo se podría proponer que la inhibición se debe por interacciones en sitios de la enzima con alta afinidad por el cobre, logrando así que pierda su actividad catalítica la enzima XO. Ver figura 33.



Figura 33. Sistemas tipo Xa-XO-EDTA para Casiopeínas[®]. Los resultados se muestran como el promedio de muestras independientes por triplicado con sus barras de error correspondientes a la desviación estándar.

6.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE UNA POSIBLE ACTIVIDAD TIPO SOD DE CASIOPEÍNAS[®]

Considerando el porcentaje de inhibición de la enzima XO a diferentes concentraciones de Casiopeínas[®], se realizó un estudio para determinar de forma cualitativa, si estos compuestos podrían presentar una actividad biomimética tipo SOD. Para ello, se montó el sistema Xa-XO-NBT en presencia las Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea a una concentración 5 uM; las Casiopeína IV gly y Casiopeína III ia se colocaron en sus correspondientes CI50 de la enzima XO (3,07 uM y 5,4 uM respectivamente).

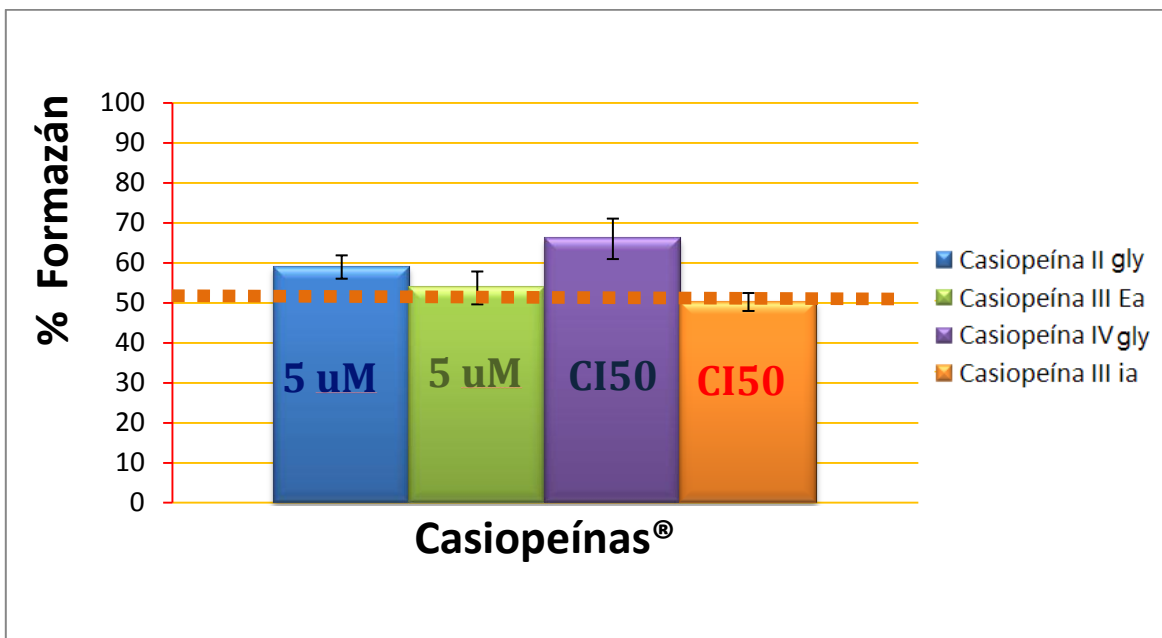


Figura 34. Sistemas tipo Xa-XO-NBT para Casiopeínas®. Los resultados se muestran como el promedio de muestras independientes por triplicado con sus barras de error correspondientes a la desviación estándar.

Para la interpretación de los resultados mostrados en la *figura 34* se debe considerar que para el sistema Xa-XO-NBT la señal de formazán indica, de forma indirecta, la presencia del radical superóxido, de tal modo que se puede discutir lo siguiente:

- Para la Casiopeína II gly se encontró una disminución de la cantidad de formazán de un $\approx 40\%$. Si consideramos que este compuesto inhibe a la enzima XO a esa concentración en un $\approx 22\%$ se podría considerar que el restante 18% de la disminución de formazán es posiblemente por una actividad tipo SOD. Un caso similar se observa para la Casiopeína III Ea, donde se podría suponer que, considerando que la inhibición de la enzima XO es $\approx 20\%$, un $\approx 27\%$ de disminución de la cantidad de formazán podría deberse por una actividad tipo SOD.
- Para la Casiopeína IV gly se encontró una disminución de la cantidad de formazán de $\approx 34\%$. Si consideramos que este compuesto en la



concentración empleada inhibe a la enzima XO en un 50%, se propone que el no llegar a un 50% la disminución de formazán se debe a que la Casiopeína IV gly se encuentra involucrado en otro mecanismo de reacción y no solo inhibiendo a la enzima XO o dismutando el radical superóxido (como por ejemplo, coordinándose al formazán u oxidándolo de nuevo a NBT).

- Para la Casiopeína III ia se encontró una disminución de formazán del $\approx 50\%$. Si consideramos que este compuesto inhibe a la enzima XO, a la concentración empleada, en un 50%, se puede inferir que la disminución de la señal de formazán es solo efecto de la inhibición de la enzima XO.



7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que la Casiopeína II gly, la Casiopeína III Ea, la Casiopeína IV gly y la Casiopeína III ia inhiben a la enzima Xantina Oxidasa “*in vitro*”, lo cual no es un resultado novedoso obtenido para compuestos de coordinación, ya que trabajos como los de Yu-Guang muestran que compuestos donde el centro metálico corresponde a átomos de cobre, níquel y manganeso inhiben a la enzima XO [62].

Lograr explicar la inhibición de la XO por compuestos de metales de transición es un tema de interés para el quehacer científico, tal como lo demuestran los trabajos de Madhu Sudan y Apurtba Kumar quienes estudiaron al cobre(II) como metal que inhibe a la enzima XO. Estos investigadores demuestran que el cobre puede tener interacciones con la parte proteica de la enzima y traer como consecuencia la modificación de su actividad catalítica [53]. Los estudios cinéticos que realizaron logran esclarecer que la naturaleza de la inhibición de la XO con cobre(II) es no competitiva [52]. Más detalladamente, los trabajos de Mahanz sugieren que las interacciones de la enzima XO con átomos de cobre pueden lograr modificaciones en la estructura activa de la enzima, causando así alteraciones en la estructura secundaria de esta, específicamente en los sitios donde se encuentran los cofactores de molibdeno y la molécula de FAD, provocando así la inhibición de la XO [51].

Para estudiar la naturaleza de la inhibición de la enzima XO por **Casiopeínas**[®], se consideró que se podría llevar a cabo una reacción tipo Fenton como una reacción secundaria en el sistema, donde la generación del radical hidroxilo pudiera causar la inhibición a través de reacciones de oxidación [61], por tal motivo se colocó manitol con el fin de atrapar este radical. Los resultados demostraron la ausencia



del radical hidroxilo, lo cual se confirmó al colocar Catalasa en el sistema, para retirar del medio el H_2O_2 generado “*in situ*”, el cual es un reactivo de la reacción de Fenton e inhibidor de la enzima XO [61]. Al colocar Catalasa desnaturalizada se observó un aumento de la actividad de la enzima XO, sin llegar al 100%, comparado con el ensayo donde se colocó Catalasa activa, esto sugiere que las diferencias de la inhibición de la XO entre los dos sistemas se pueden atribuir a posibles interacciones del cobre de las **Casiopeínas**[®] con residuos de aminoácidos de la parte proteica de la catalasa, demostrado así la no especificidad de la inhibición de la enzima XO por **Casiopeínas**[®]. Finalmente se diseñó un ensayo donde se colocó EDTA para evitar la interacción del cobre de las **Casiopeínas**[®] con la XO, con lo que se demostró que dicha interacción es la responsable de la inhibición de la enzima XO. Este trabajo demuestra una inhibición de la enzima XO no específica, donde los sitios de coordinación del centro metálico disponibles de las **Casiopeínas**[®] son importantes para efectuar la mencionada inhibición, lo cual se asemeja a lo reportado en la literatura para compuestos de cobre(II) [51-53].

Sin embargo, la inhibición de la enzima XO por **Casiopeínas**[®] no fue la misma para los cuatro compuestos estudiados, ya que se observó una mayor inhibición con los compuestos que tienen en su estructura al ligante diimina 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina frente a los compuestos con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, lo que sugiere que el ligante secundario de estos compuestos no contribuye considerablemente en el efecto inhibitorio de la enzima XO como lo hace el ligante correspondiente a la diimina aromática; este fenómeno ya se ha observado en diferentes estudios *in vitro*, en donde la diimina determina el nivel de actividad, tal como lo demuestra el estudio QSAR de estos metalofármacos donde la diimina es determinante en la modulación de la actividad antiproliferativa [5]. Este fenómeno puede generar diferencias significativas en su nivel de potencia y eficacia para determinadas respuestas en ensayos, y la inhibición de la XO no es la excepción. Los valores de las CI50 calculadas muestran que el $Cu(NO_3)_2$ logra una inhibición del 50% de la



enzima con una menor concentración (1.45 μM) que las calculadas para las **Casiopeínas**[®], lo que sugiere que la presencia de ligantes modifica la potencia de los compuestos de cobre(II) en la inhibición de la XO. La Casiopeína IV gly es un compuesto con mayor potencia (CI50= 3.07 μM) que la Casiopeína III ia (CI50= 5.4 μM). Por otro lado, para la Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea no se reportan valores de CI50 por no alcanzar el 50% de inhibición en el intervalo de concentraciones evaluadas (de 0.6 μM a 100 μM), por lo que su eficacia es menor, comparadas con los compuestos que tienen 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en su estructura.

Extrapolando los resultados de este trabajo sobre las **Casiopeínas**[®] se puede decir que es de suma importancia seguir conociendo los posibles sistemas biológicos que pueden ser desacoplados por estos compuestos de coordinación de cobre(II), donde se tiene que tomar en consideración que estos metalofármacos interactúan con otras biomoléculas distintas a los blancos terapéuticos propuestos, debido a la afinidad de su centro de cobre a ciertos residuos de aminoácidos, lo que podría conllevar a disminuir la dosis efectiva durante su transporte al sitio de interés o explicar algunos efectos secundarios al ser administrados como fármacos.

Por otro lado, estudiar el sistema Xa-XO-NBT permite catalogarlo como un sistema complejo, donde los resultados que se obtienen pueden corresponder a falsos positivos que se pueden evitar con las consideraciones previas, sugeridas en la literatura, al montar este ensayo. El fundamento de la técnica es seguir la presencia del radical superóxido de forma indirecta por medio de un colorante redox para determinar CI50 del radical superóxido, sin embargo, esto solo nos indica el consumo de este radical o la ausencia en su generación, donde el considerar la dismutación catalizada por los compuestos evaluados no siempre será cierto.

Más específicamente, los resultados del sistema **Xa-XO-NBT** con **Casiopeínas**[®] sugirieron que los compuestos cuyo ligante corresponde a la 4,7-dimetil-1,10-



fenantrolina logran una disminución de la presencia del radical superóxido en el sistema que no se puede atribuir completamente a la inhibición de la enzima XO, lo que sugiere que podría deberse a una posible actividad SOD. Para los compuestos que tienen como ligante a la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina la disminución del radical superóxido se puede explicar por la inhibición que genera en la enzima XO. Es de resaltar, que el buscar un sistema donde solo se pueda estudiar la dismutación del radical superóxido por **Casiopeínas**[®] podría ayudar a entender las condiciones que favorecen esta reacción termodinámicamente viable (tal y como se predice por los potenciales electroquímicos) y el mecanismo por el que se llevaría a cabo la dismutación.

Finalmente, este trabajo puede sugerir que en un sistema biológico, como es la célula, la dismutación del radical superóxido no se vería favorecida en presencia de proteínas, ya que es cinéticamente más viable la interacción de **Casiopeínas**[®] con residuos de aminoácidos de proteínas que a favorecer una actividad biomimética SOD, tal y como se observó en este trabajo.



8. CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se demostró la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa “*in vitro*” por **Casiopeínas**[®] bajo el sistema **Xa-XO**. Los resultados muestran que los compuestos análogos con el ligante 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina tienen una mayor eficacia en la inhibición de la enzima XO en contraste con los que tienen 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en el intervalo de concentraciones empleadas, donde la Casiopeína IV gly alcanza una inhibición del 50% de la enzima con una concentración de 3.07 uM, mientras que la Casiopeína III ia con una concentración de 5.4 uM. Para la Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea no se reportan valores de CI50 por no alcanzar el 50% de inhibición en el intervalo de concentraciones evaluadas (de 0.6uM a 100 uM).

La inhibición de la enzima XO encontrada fue del tipo no específica, donde se descartó que se debiera por la generación “*in situ*” del radical hidroxilo y H₂O₂. La naturaleza de la inhibición se justifica por la afinidad del centro metálico de las **Casiopeínas**[®] a átomos donadores de la parte proteica de la enzima.

Al montar el sistema **Xa-XO-NBT** para las **Casiopeínas**[®] los resultados sugirieron que los compuestos cuyo ligante corresponde a la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina logran una disminución de la presencia del radical superóxido en el sistema que no se puede justifica como consecuencia de la inhibición de la enzima XO, lo que sugiere que se debe a una posible actividad SOD. Para los compuestos que tienen como ligante a la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina la disminución del radical superóxido se explicó por la inhibición que genera en la enzima XO en las concentraciones empleadas. A su vez, podemos mencionar que a pesar que la actividad tipo SOD es termodinámicamente viable para las **Casiopeínas**[®], en sistemas complejos



donde se encuentren proteínas, se verá favorecido las reacciones de coordinación a residuos de aminoácidos de la materia proteica presente frente a la posible actividad catalítica SOD.

Finalmente podemos concluir que el sistema **Xa-XO-NBT** no se puede usar para evaluar la actividad SOD de las Casiopeína IV gly, Casiopeína III ia, Casiopeína II gly y Casiopeína III Ea.

Como perspectivas a este trabajo se podría plantear continuar con la búsqueda de sistemas que puedan esclarecer si las **Casiopeínas**[®] cuentan con una actividad tipo SOD importante para un sistema biológico.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz-Azuara, L., **United States Patent 1996, vol. 5,576,326.**
2. Ruiz-Azuara, L., **United States Patent 1992, vol. RE 35,458.**
3. Carvallo-Chaigneau, F., Trejo-Solis, C., Gomez-Ruiz, C., Rodriguez-Aguilera, E., Macias-Rosales, L., Cortes-Barberena, E., Cedillo-Pelaez, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V. y Constantino-Casas, F., **Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo.** Biometals, 2008. **21**(1): p. 17-28.
4. Trejo-Solis, C., Palencia, G., Zuniga, S., Rodriguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S.T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sanchez, A., Moreno-Garcia, M.E., Cruz, A., Bravo-Gomez, M.E., Ruiz-Ramirez, L., Rodriguez-Enriquez, S. y Sotelo, J., **Cas Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms.** Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 563-74.
5. Bravo-Gomez, M.E., Garcia-Ramos, J.C., Gracia-Mora, I. y Ruiz-Azuara, L., **Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeinas).** Journal of Inorganic Biochemistry, 2009. **103**(2): p. 299-309.
6. Serment-Guerrero, J., Cano-Sanchez, P., Reyes-Perez, E., Velazquez-Garcia, F., Bravo-Gomez, M.E. y Ruiz-Azuara, L., **Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas.** Toxicology in vitro, 2011. **25**(7): p. 1376-84.



7. Mejia, C. y Ruiz-Azuara, L., **Casiopeinas II gly and IIIa induce apoptosis in medulloblastoma cells**. Pathology and Oncology Research, 2008. **14**(4): p. 467-72.
8. Kachadourian, R., Brechbuhl, H.M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I. y Day, B.J., **Casiopeina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells**. Toxicology, 2010. **268**(3): p. 176-83.
9. Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., **Free radicals in biology and medicine**. 4a ed, 2007, Oxford: Oxford University Press. 851 p.
10. Alemon-Medina, R., Bravo-Gomez, M.E., Gracia-Mora, M.I. y Ruiz-Azuara, L., **Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeina IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells**. Toxicology in vitro, 2011. **25**(4): p. 868-73.
11. Winterbourn, C.C., **Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction**. Toxicology Letters, 1995. **82–83**(0): p. 969-974.
12. Iranzo, O., **Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: A balance between different factors**. Bioorganic Chemistry, 2011. **39**(2): p. 73-87.
13. Sutherland, M.W. y Learmonth, B.A., **The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase**. Free Radical Research, 1997. **27**(3): p. 283-9.
14. Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V. y Koleva-Kolarova, R., **Copper in the human organism**. Trakia Journal of Sciences, 2011. **9**(1): p. 88-98.
15. Pelmeshchikov, V. y Siegbahn, P.E.M., **Copper-Zinc Superoxide Dismutase: Theoretical Insights into the Catalytic Mechanism**. Inorganic Chemistry, 2005. **44**(9): p. 3311-3320.
16. McCord, J.M. y Edeas, M.A., **SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision**. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2005. **59**(4): p. 139-42.



17. Menander-Huber, K.B., Edsmyr, F. y Huber, W., **Orgotein (superoxide dismutase): A drug for the amelioration of radiation-induced side effects**. Urological Research, 1978. **6**(4): p. 255-257.
18. Esco, R., Valencia, J., Coronel, P., Carceller, J.A., Gimeno, M. y Bascón, N., **Efficacy of orgotein in prevention of late side effects of pelvic irradiation: A randomized study**. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 2004. **60**(4): p. 1211-1219.
19. **Orgotein**, in *Meyler's side effects of drugs: The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*, Aronson, J.K., Editor 2006, Elsevier: Amsterdam. p. 2640-2641.
20. De Benito, V., De Barrio, M., De Lopez-Saez, M.P., Ordoqui, E., Prieto-Garcia, A., Sainza, T. y Baeza, M.L., **Anaphylactic shock caused by impurities in orgotein preparations**. Allergol Immunopathol (Madr), 2001. **29**(6): p. 272-5.
21. Okamoto, K., **Inhibitors of xanthine oxidoreductase**. Nihon Rinsho, 2008. **66**(4): p. 748-53.
22. Liu, J.C., Guo, G.C., Huang, J.S. y You, X.Z., **Different oxidation states of copper(I, I/II, II) thiocyanate complexes containing 1,2,4-triazole as a bridging ligand: syntheses, crystal structures, and magnetic properties of 2-D polymer $Cu^I(admtrz)SCN$, linear trinuclear $[Cu_2^I Cu^{II}(admtrz)_6(SCN)_2](ClO_4)_2$, and triangular trinuclear $[Cu_3^{II}(admtrz)_4(SCN)_3(\mu^3-OH)(H_2O)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ ($admtrz = 4\text{-amino-3,5-dimethyl-1,2,4-triazole}$)**. Inorganic Chemistry, 2003. **42**(1): p. 235-43.
23. Williams, R.J.P. y Fraústo da Silva, J.J.R., **The distribution of elements in cells**. Coordination Chemistry Reviews, 2000. **200-202**(0): p. 247-348.
24. Casas-Fernández, J.S., Moreno-Martínez, V., Sánchez-González, Á., Sánchez-López, J.L. y Sordo-Rodríguez, J., **Química Bioinorgánica**. 1a ed, editorial Síntesis 2002, España. 343.
25. Rayner-Canham, G., **Química Inorgánica Descriptiva**. 2da. ed, editorial Educación, P.2000, México. 624.
26. Harris, D.C., **Análisis químico cuantitativo**. 2001: Reverté.



27. Berners-Price, S. y Webb, J., **Preface applications of bioinorganic chemistry**. Coordination Chemistry Reviews, 1996. **151**(0): p. ix-xi.
28. Deschamps, P., Kulkarni, P.P., Gautam-Basak, M. y Sarkar, B., **The saga of copper(II)-L-histidine**. Coordination Chemistry Reviews, 2005. **249**(9-10): p. 895-909.
29. Peng, R., Li, M. y Li, D., **Copper(I) halides: A versatile family in coordination chemistry and crystal engineering**. Coordination Chemistry Reviews, 2010. **254**(1-2): p. 1-18.
30. Barceloux, D.G., **Copper**. Journal of Toxicology-Clinical Toxicology, 1999. **37**(2): p. 217-30.
31. Møller, L.B., Mogensen, M. y Horn, N., **Molecular diagnosis of Menkes disease: Genotype-phenotype correlation**. Biochimie, 2009. **91**(10): p. 1273-1277.
32. Crisponi, G., Nurchi, V.M., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S. y Faa, G., **Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology**. Coordination Chemistry Reviews, 2010. **254**(7-8): p. 876-889.
33. Pearson, R.G., **Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles**. Journal of Chemical Education, 1968. **45**(9): p. 581.
34. Williams, R.J.P., **Chemical selection of elements by cells**. Coordination Chemistry Reviews, 2001. **216-217**(0): p. 583-595.
35. Jaouen, G., **Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine**. 2006: John Wiley & Sons.
36. Eckermann, A.L., Feld, D.J., Shaw, J.A. y Meade, T.J., **Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers**. Coordination Chemistry Reviews, 2010. **254**(15-16): p. 1769-1802.
37. Koppenol, W.H., **Names for inorganic radicals (IUPAC recommendations 2000)**. Pure and Applied Chemistry, 2000. **72**: p. 437-446.
38. Powers, K.M., Oberley, L.W. y Domann, F.E., **The Adventures of Superoxide Dismutase in Health and Disease: Superoxide in the**



- balance oxidants in Biology**, Valacchi, G. y Davis, P.A., Editors. 2008, Springer Netherlands. p. 183-201.
39. Ray, P.D., Huang, B.-W. y Tsuji, Y., **Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling**. Cellular Signalling, 2012. **24**(5): p. 981-990.
 40. Stohs, S.J. y Bagchi, D., **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions**. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **18**(2): p. 321-336.
 41. Koppenol, W.H., **The centennial of the Fenton reaction**. Free Radical Biology and Medicine, 1993. **15**(6): p. 645-651.
 42. Saleh, F.S., Rahman, M.R., Okajima, T., Mao, L. y Ohsaka, T., **Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes**. Bioelectrochemistry, 2011. **80**(2): p. 121-127.
 43. Jones, D.P., **Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance**, in *Methods in enzymology*, Sies, H. y Packer, L., Editors. 2002, Academic Press. p. 93-112.
 44. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M., **Lehninger principles of biochemistry**. 2005, New York: W.H. Freeman.
 45. Harrison, R., **Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?** Free Radical Biology and Medicine 2002. **33**(6): p. 774-97.
 46. Hille, R., **The mononuclear molybdenum enzymes**. Chemical Reviews, 1996. **96**(7): p. 2757-2816.
 47. DeLano, W.L., **PyMOL v0.99**, 2006.
 48. Kessenich, C.R., **Uric acid and gout**. Nurse Practitioners, 2011. **36**(3): p. 11-2.
 49. Vázquez-Mellado, J., Espinoza, J., Hernández-Garduño, A.G., Lino-Pérez, L. y Burgos-Vargas, R., **El diagnóstico y tratamiento de la gota en la ciudad de México**. Revista de investigación clínica, 2003. **55**: p. 621-628.



50. Kumar, R., Darpan, Sharma, S. y Singh, R., **Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey**. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2011. **21**(7): p. 1071-108.
51. Hadizadeh, M., Keyhani, E., Keyhani, J. y Khodadadi, C., **Functional and structural alterations induced by copper in xanthine oxidase**. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2009. **41**(7): p. 603-617.
52. Mondal, M.S., Sau, A.K. y Mitra, S., **Mechanism of the inhibition of milk xanthine oxidase activity by metal ions: a transient kinetic study**. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000. **1480**(1-2): p. 302-310.
53. Sau, A.K., Mondal, M.S. y Mitra, S., **Interaction of Cu²⁺ ion with milk xanthine oxidase**. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1544**(1-2): p. 89-95.
54. Bravo-Gomez, M.E. y Ruiz-Azuara, L., **Metals in cancer treatment**, in *New approaches in the treatment of cancer* 2010, Nova science publishers: New York. p. 139-172.
55. Ruiz-Azuara, L. y Bravo-Gomez, M.E., **Copper compounds in cancer chemotherapy**. Current Medicinal Chemistry, 2010. **17**(31): p. 3606-15.
56. Bravo-Gómez, M.E., **Estudio QSAR de quelatos mixtos de cobre(II) [Cu(N-N) (acetilacetato)]NO₃ y [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃** in *Facultad de Química, UNAM* 2009, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 144.
57. Kasugai, N., Murase, T., Ohse, T., Nagaoka, S., Kawakami, H. y Kubota, S., **Selective cell death by water-soluble Fe-porphyrins with superoxide dismutase (SOD) activity**. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002. **91**(2): p. 349-355.
58. Huang, R., Wallqvist, A. y Covell, D.G., **Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action**. Biochemical Pharmacology, 2005. **69**(7): p. 1009-39.



59. Gupte, A. y Mumper, R.J., ***Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment.*** Cancer treatment reviews, 2009. **35**(1): p. 32-46.
60. ***OriginPro 8 SR0***, 2007, OriginLab Corporation.
61. Terada, L.S., Leff, J.A., Guidot, D.M., Willingham, I.R. y Repine, J.E., ***Inactivation of xanthine oxidase by hydrogen peroxide involves site-directed hydroxyl radical formation.*** Free Radical Biology and Medicine, 1991. **10**(1): p. 61-68.
62. Li, Y.-G., Shi, D.-H., Zhu, H.-L., Yan, H. y Ng, S.W., ***Transition metal complexes (M=Cu, Ni and Mn) of Schiff-base ligands: Syntheses, crystal structures, and inhibitory bioactivities against urease and xanthine oxidase.*** Inorganica Chimica Acta, 2007. **360**(9): p. 2881-2889.