

Actividad anticancerígena y estudio del mecanismo de acción de $[\text{Cu}(\text{dmp})_2]^+$

Levín V., Pedro,^a M. Carolina Ruiz,^b Ignacio E. León,^{b*} Luis Lemus.^{a*}

pedro.levin@usach.cl; luis.lemus@usach.cl;

^aFacultad de Química y Biología, ^bCentro de Química Inorgánica

^aUniversidad de Santiago de Chile, ^bUniversidad Nacional de la Plata

*Investigadores orientadores

Resumen

En este trabajo presentamos el estudio de la actividad anticancerígena del compuesto de coordinación correspondiente a $[\text{Cu}^I(\text{dmp})_2]^+$, (donde dmp = 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) en líneas celulares correspondientes a cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7), pulmón (A549) y hueso (MG-63), mediante estudios de MTT y el mecanismo de acción.

Los resultados indican que $[\text{Cu}^I(\text{dmp})_2]^+$ presenta una alta actividad anticancerígena en concentraciones micro-molar (μM), en dosis menores a las necesarias para el caso del metalofármaco comercial *cisplatino*. Así también, estudios de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular indican una alta generación de estas especies, indicando un mecanismo de acción mediante la generación de estrés oxidativo.

Debido a que la interacción y daño del ADN celular es uno de los principales mecanismos de acción de los metalofármacos, estudios de electroforesis en gel fueron realizados para evaluar la capacidad de generar la ruptura de ADN extracelular, evidenciando que el compuesto es capaz de generar la ruptura del ADN, actividad que se ve incrementada en presencia de H_2O_2 .

Finalmente, con el fin de identificar la especie reactiva de oxígeno responsable de la ruptura de ADN, experimentos en electroforesis en gel con inhibidores de radicales fueron realizados en conjunto con experimentos de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Los resultados indican que la principal especie responsable del daño al ADN corresponde al radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$, especie que presenta una alta capacidad oxidante, lo que estaría en concordancia con el mecanismo de acción intracelular.

Palabras clave: Química medicinal, nucleasas artificiales, especies reactivas de oxígeno, quimioterapia.

Introducción

Los iones metálicos cumplen un rol crucial en los sistemas vivos, participando en diversos procesos biológicos que son de vital importancia para el correcto funcionamiento del organismo. Las propiedades químicas y físicas de estos iones metálicos, tales como la amplia gama de números y geometrías de coordinación, los estados de oxidación disponibles, las características termodinámicas y cinéticas, en conjunto con las propiedades intrínsecas del ión metálico catiónico permiten la unión e interacción con diversas biomoléculas, como también, con pequeñas moléculas que son esenciales para la vida (Santini *et al.*, 2013).

Una de las áreas de la ciencia que investiga la estrecha relación existente entre iones metálicos y biomoléculas corresponde a la química bioinorgánica. Así también, la química inorgánica medicinal es un área específica enfocada al estudio y aplicación de la bioinorgánica para su uso en terapia y diagnóstico de enfermedades (Bruijninx y Sadler 2008).

Hoy en día existe un creciente interés en el desarrollo de nuevos fármacos para el

tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

En la actualidad, el metalofármaco más reconocido y que ha ampliado significativamente el área de la química inorgánica medicinal, corresponde al cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino(II)), comercializado como Platinol®. El mecanismo de acción de este compuesto de coordinación es vía unión al ADN, con la consecuente inhibición de los procesos de replicación del ADN en las células cancerígenas (Reedijk, 2003).

No obstante, y a pesar de su éxito farmacológico en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, el cisplatino presenta diversas desventajas, siendo algunas de ellas su baja solubilidad en agua, resistencia intrínseca o adquirida, así como efectos secundarios que incluyen nefrotoxicidad, neurotoxicidad y náuseas, lo que limita su uso (Soares Fontes *et al.*, 2000)

Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos de coordinación que posean una actividad farmacológica frente a las células cancerígenas, pero que a la vez disminuyan daños colaterales asociados a la quimioterapia. Así como también,

nuevos mecanismos de acción que permitan disminuir la resistencia a los fármacos suministrados.

En esta línea, compuestos de coordinación que tengan la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son potenciales candidatos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer mediante quimioterapia (Jungwirth et al., 2011), debido a la gran capacidad de daño celular que pueden generar estas especies reactivas. En este sentido, el cobre es uno de los iones metálicos que ha sido ampliamente utilizado como alternativa para la generación de metalofármacos, debido a las conocidas propiedades redox que le permite participar en reacciones del tipo fenton, que generan ROS.

El cobre presenta algunas ventajas por sobre metales como el Pt para su uso como agente terapéutico. Por ejemplo, a diferencia del Pt, el Cu está presente en todos los organismos vivos y participa en diversos procesos biológicos, por lo que se presume que tiene menos probabilidades de ser tóxico para el organismo sano en comparación a los iones metálicos no esenciales como el Pt, reduciendo así los efectos secundarios (Marzano, Pellei, Tisato & Santini, 2009). Otro factor importante es la abundancia de Cu por sobre la de Pt y otros metales

preciosos, lo que se traduce en menores costos en el desarrollo del metalofármacos y su comercialización.

Han sido numerosos los compuestos en base a Cu(II) que han sido explorados en la actualidad para quimioterapia del cáncer, siendo los ligandos polipiridínicos y sus derivados ampliamente utilizados para modular las propiedades farmacológicas de los complejos de cobre (Ruiz-Azuara & E. Bravo-Gomez, 2010).

Por ejemplo, estudios realizados a partir de 1980 sobre la actividad del complejo cuproso $[Cu^{II}(\text{phen})_2]^+$ (phen=1,10-fenantrolina), demostraron la capacidad de este para provocar la escisión del ADN (actividad nucleasa) debido a su inestabilidad redox y consecuente oxidación por O_2 con generación de ROS, propiedad que se expresa en la actividad anticancerígena de este compuesto.

Sin embargo, el análogo $[Cu^I(\text{dmp})_2]^+$ (dmp = 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) no evidenció la misma propiedad de ruptura de ADN, lo cual se debería a la estabilidad redox del complejo, quien presenta un potencial desfavorable para la oxidación por O_2 . La estabilización del estado de oxidación +1 en $[Cu^I(\text{dmp})_2]^+$ se debe al impedimento estérico causado por los grupos metilo en posiciones 2 y 9 de la fenantrolina, el cual dificulta la geometría

cuadrado-plana, condición necesaria para alcanzar el estado de oxidación +2.

Las investigaciones que indagan sobre las potencialidades del complejo $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ como nucleasa artificial frente a la ruptura de ADN son limitadas, principalmente por la premisa de su estabilidad redox.

Esto ha llevado a considerar que éste complejo sólo posee afinidad electrostática por el biopolímero aniónico, sabiéndose además que los ligandos fenantrolínicos pueden intercalarse parcialmente en el surco menor de la doble hélice de ADN (Ni, Lin & Kokot, 2006), lo cual podría inducir a una modificación estructural del ADN, pero no su ruptura.

Estudios recientes publicados en literatura, así como estudios realizados en nuestro grupo de investigación en conjunto con la Universidad Nacional de la Plata, han mostrado que el complejo $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]\text{ClO}_4$ presenta una elevada actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares cancerígenas (Al Hageh et al., 2018).

Estos resultados son difíciles de explicar considerando solamente la propiedad de unión del complejo cuproso a la biomolécula. Una de las explicaciones a la alta actividad anticancerígena de este compuesto, estaría relacionada con la

capacidad del compuesto de participar en reacciones redox que involucren la formación de especies ROS, las que pueden ser efectivas a muy baja concentración. En este sentido, sería necesaria como primera instancia la oxidación del complejo a su forma cúprica mediado por O_2 . La propuesta de un posible mecanismo del tipo Fenton para el par $\text{Cu}(\text{I})/\text{O}_2$ debe considerar además la recuperación del complejo oxidado a su estado de oxidación +1 (reducción del complejo cúprico).

La “auto-reducción” del complejo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ en solventes polares como acetonitrilo ha sido informada con anterioridad (Itoh, Kishikawa, Suzuki & Takagi, 2005) y ha sido justificada por el hecho de que los grupos metilo del ligando no soportan una geometría plana entorno al cobre (II), forzando su esfera de coordinación a un tetraedro y consecuentemente gatillando la reducción del centro metálico. Al respecto, no existe información sobre el mecanismo por el cual el cobre se reduce, así como tampoco sobre la especie que se debe oxidar en solución.

La formación de la especie reducida $[\text{Cu}(\text{dmp})_2]^+$ (de color rojo intenso) a partir de la disolución de cristales del complejo cúprico (de color verde), ha sido observada en nuestro laboratorio cuando acetonitrilo es usado como solvente. Esto

nos permite suponer que agua presente en el solvente sin tratar podría estar reaccionando con el complejo provocando su reducción, la cual sería favorecida por el impedimento estérico del ligando antes mencionado. La reacción entre Cu(II) y agua podría gatillar una serie de reacciones que involucren la generación de especies ROS como el radical $\text{OH}\cdot$, lo cual contribuiría a entender la inesperada actividad citotóxica que el complejo posee.

En este trabajo se presenta el estudio de la actividad anticancerígena de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$, con el fin de correlacionar la capacidad citotóxica con las propiedades estructurales de los compuestos de coordinación. Así también se presentan indicios del mecanismo de acción en la muerte celular de estos compuestos, con la detección de la generación de ROS intracelular. Así también se muestra la capacidad de generar la ruptura de ADN extracelular y el mecanismo de acción mediante electroforesis en gel. Finalmente, resultados de EPR confirman que los compuestos $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ generan radical $\text{HO}\cdot$ al reaccionar con H_2O_2 y agua respectivamente, siendo probablemente el radical $\text{HO}\cdot$ la especie responsable de la capacidad citotóxica de los compuestos de coordinación bajo estudio.

Objetivos

- 1- Sintetizar y caracterizar los compuestos de coordinación de Cobre, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$.
- 2- Estudiar y comparar la actividad antitumoral de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ y la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno intracelular.
- 3- Evaluar y comparar la capacidad de generar la ruptura de ADN plasmidial de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$, así como también determinar el mecanismo de acción.
- 4- Detectar la especie reactiva de oxígeno responsable de la ruptura de ADN.

Materiales y Métodos

Materiales. Los reactivos $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ hidratado (Sigma-Aldrich), Na_2CO_3 monohidratado $\geq 99\%$ (Merck), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (dmp) $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich), tetrabutilamonio perclorato (TBAP) para análisis electroquímico $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), ferroceno 98% (Fc, Sigma-Aldrich) se utilizaron tal como se recibieron. La síntesis de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{ClO}_4)$ (Liang et al., 2000),

$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ hexahidratado y $[\text{Cu}(\text{phen})_2](\text{ClO}_4)_2$ (Schilt & Taylor, 1959), fueron realizadas siguiendo los procedimientos descritos en la literatura.

Para el estudio de electroforesis, ADN plásmido pBR322 de *E. coli* ER2272 (1 ng/ μl) en solución buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, New England Biolabs), enzima de restricción *Eco RI* (20,000 unidades/ml, New England Biolabs), buffer TAE 50x (Tris-acetato, EDTA de grado ultrapuro, Amresco), mezcla de azul de bromofenol, cianol de xileno (polvo liofilizable, Sigma-Aldrich) y agente revelador de ácido nucleico GelGreen 10.000X (Biotium) y superóxido Dismutasa de eritrocitos bovinos $\geq 3,000$ unidades/mg de proteína (Sigma-Aldrich) se usaron tal como se recibieron.

Los solventes utilizados corresponden a: acetonitrilo p.a. 99,9% (Merck), etanol p.a. 99,5% (Merck), éter etílico p.a. 99,7% (Merck), ácido perclórico 70% (HClO_4 , Mallinckrodt), acetonitrilo- d^3 $\geq 99,8\%$ (CD_3CN , Sigma-Aldrich) y agua mili-q (18 M Ω .cm). Acetonitrilo seco fue obtenido siguiendo el procedimiento informado (Williams & Lawton, 2010).

Métodos. Los compuestos $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2](\text{ClO}_4)$ (Gill, Arora, Singh, Bakshi & Chauhan, 1991) y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$ (Leandri et al.,

2018) se sintetizaron mediante la adaptación de los métodos informados.

Cristalografía de rayos-X de monocristal fue realizada en un difractor Bruker Kappa X8-APEX-II a 120(2) K, usando radiación Mo-K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) y una combinación de escaneos ω y φ de $0,7^\circ$. Los datos fueron corregidos por absorción y efectos de polarización para determinar el grupo espacial de los cristales estudiados. La estructura se resolvió mediante métodos de fase intrínseca y se expandió rutinariamente.

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de los compuestos de coordinación de Cobre, se realizaron ensayos de viabilidad celular por métodos de reducción del compuesto Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT por sus siglas en inglés) mediante espectroscopía UV-Vis. Los estudios se realizaron en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7), pulmón (A549) y hueso (MG-63). La actividad citotóxica se expresa en valores de IC_{50} .

La capacidad de ruptura de ADN de los complejos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando plásmido pBR322. La escisión del ADN se determinó mediante la conversión del plásmido superenrollado (forma I) en plásmido cortado (forma II).

Diferentes concentraciones de los complejos $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2](\text{ClO}_4)$, y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2](\text{ClO}_4)_2$ se prepararon en acetonitrilo, luego se añadieron 2 μl de estas soluciones a 6 μl de agua conteniendo ADN plasmídial (335 ng, en tampón Tris-HCl 10 mM) para obtener una concentración final de ADN de 64 μM y diferentes relaciones de [pares de bases]/[complejo]. El plásmido lineal (forma III) se obtuvo usando la enzima de restricción *Eco RI*.

Las muestras se incubaron durante 2 o 24 h y luego se añadieron 2 μl de buffer de carga 6X (30% de glicerol, 0,25 de azul de bromofenol y 0,25% de cianol de xileno). Las soluciones se cargaron en gel de agarosa (1,2%) y se utilizó TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0) como solución buffer. Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V durante 2 h. El gel se incubó luego durante 20 min en una solución acuosa que contenía 5 μL del agente revelador GelGreen™ (10.000X en agua) y luego se utilizó un transiluminador (BluView Transilluminator, BIOLOGIX, modelo 03-6200) a 470 nm y se digitalizó.

Para obtener información sobre el mecanismo a través de del cual se genera la ruptura de ADN, la concentración de ADN y los complejos se mantuvieron constantes y las muestras se incubaron durante 2 h con diferentes inhibidores de

especies reactivas de oxígeno. Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO, 25%), manitol (200 mM), azida de sodio (NaN_3 , 20 mM), superóxido dismutasa (SOD, 625 U mL^{-1}) y yoduro de potasio (KI, 20 mM). Además, se añadió peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente redox externo para evaluar la actividad nucleasa de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2](\text{ClO}_4)$.

Con el fin de detectar la capacidad de formación del radical $\text{HO}\cdot$ de los compuestos de coordinación $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2]^{2+}$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$, se realizaron experimentos de resonancia paramagnética electrónica utilizando como sonda 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO por sus siglas en inglés).

Resultados y Discusión

Síntesis y caracterización de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$.

Los compuestos fueron caracterizados mediante técnicas como espectroscopía de RMN- ^1H para el caso de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, mientras que $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ fue caracterizado mediante la obtención de la estructura cristalina. El espectro de RMN- ^1H muestra las señales esperadas para la formulación propuesta (fig. 1A), mostrando sólo un patrón de señales para el ligando dmp coordinado al centro metálico, mientras que la estructura cristalina de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$, confirma la

formulación propuesta, con un quinto ligando correspondiente a CH_3CN .

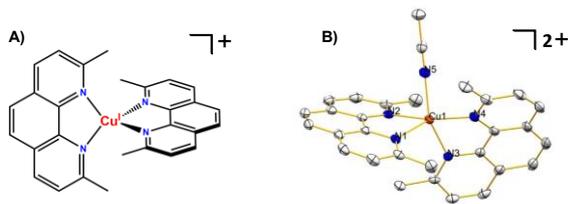


Figura 1. Esquema del catión $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ y estructura cristalina determinada en este trabajo del complejo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$.

Estudio de la actividad citotóxica de los compuestos en estudio.

Los resultados obtenidos mediante ensayo de MTT evidencian que los compuestos $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ presentan un valor de IC_{50} a concentraciones más bajas que el análogo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ en casi todas las líneas celulares estudiadas (tabla 1). Esto estaría explicado por la mayor capacidad de generar especies reactivas de oxígeno intracelular, lo que consecuentemente, genera un desbalance redox, provocando la muerte celular. Esto fue corroborado mediante la determinación de ROS a nivel celular, detectando en las líneas celulares MG-63 y MDA-231 un nivel más alto de ROS en todas las concentraciones testeadas en comparación a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ (fig. 2).

Tabla 1: Valores de IC_{50} en diferentes líneas celulares de los compuestos bajo estudio.

Línea celular	$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$
MDA-MB-231	1,098	1,951	5,115
MG-63	3,770	3,077	3,111
MCF-7	3,313	2,999	6,010
A549	3,052	1,943	3,346

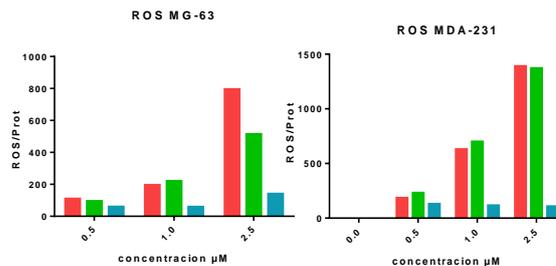


Figura 2. Niveles de ROS detectados en células cancerígenas para $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ (rojo) $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ (verde) y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ (celeste).

Actividad nucleasa de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$

El complejo $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ ha sido ampliamente estudiado en el pasado por McMillin y colaboradores como un agente de unión al ADN (Tamilarasan, Ropartz & McMillin, 1988). McMillin informó que el complejo $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ exhibe una pequeña actividad nucleasa contra el ADN (Liu, Meadows & McMillin, 1993), en comparación al complejo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ (o $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ después de ser reducido a Cu(I)) que ha sido ampliamente estudiado como nucleasa artificial.

Se ha indicado que la poca actividad de la nucleasa del compuesto con el ligando dmp se debe a la presencia de los grupos metilo en las posiciones 2 y 9, lo que

aumenta el potencial de oxidación en comparación con $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (0,58 V vs NHE en agua para $[\text{Cu}(\text{dmp})_2]^+$ y 0,08 V vs NHE para $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (Wende, Lüdtke & Kulak, 2014). Sin embargo, hasta el momento, a pesar de la baja actividad nucleasa que se informa, este comportamiento no ha sido estudiado en profundidad, así como tampoco el mecanismo de acción a través del cual se genera la ruptura del ADN.

Los resultados de nuestros estudios, en concordancia con lo informado por McMillin, muestran que el complejo exhibe una pequeña actividad nucleasa en ausencia de agentes redox externo en las condiciones de estudio (Fig. 3A).

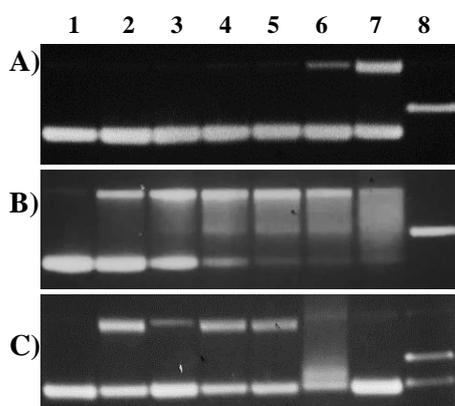


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de pBR322 (64,4 μM , 335 ng) con $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$. A) sin agente redox externo, y B) con 50 μM de H_2O_2 como agente oxidante a diferentes concentraciones de complejo. Línea 1: control de ADN (forma I), líneas 2-7: 2,15, 4,3, 10,7, 20,5, 64,4 μM y 0,64 mM de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$. C) $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ 0,64 mM con diferentes secuestrantes de radicales, línea 1: control de ADN (forma I), línea 2: $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ 0,64 mM, línea 3: DMSO 25% v/v, línea 4: manitol 200 mM. línea 5: NaN_3 20 mM. línea 6: SOD, línea 7: KI 20 mM. Línea 8: control lineal de ADN. Tiempo de incubación: 2 ha 25 ° C.

La Figura 3A muestra la capacidad de convertir el plásmido superenrollado (forma I) al plásmido mellado (forma II) a diferentes concentraciones de complejo. En una relación de 1:1 de pares de bases y complejo (línea 6) es posible observar plásmido mellado, que es más evidente en una proporción de 1:10 (línea 7).

La actividad nucleasa puede ser explicada debido a la oxidación del $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ por el oxígeno molecular en las soluciones, lo que podría generar algunas especies de oxígeno reactivo (ROS) responsables de la escisión del ADN. La actividad de la nucleasa aumenta marcadamente al agregar el agente oxidante H_2O_2 (ver figura 3B), evidenciado por una mayor intensidad de la banda asociada al ADN cortado en una de sus hebras. Este resultado podría corroborar la implicación de un mecanismo oxidativo en la ruptura del ADN, como el caso de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$, debido a que la presencia de H_2O_2 , genera la oxidación del compuesto a $\text{Cu}(\text{II})$, en conjunto con la generación de ROS.

Para corroborar la implicación de la generación de una especie de oxígeno reactivo en el mecanismo de escisión, se utilizaron diferentes inhibidores de radicales, como DMSO y manitol para el radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$, NaN_3 para oxígeno singlete $^1\text{O}_2$, SOD para radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ y KI para H_2O_2 (ver figura 3C).

Los resultados muestran que, aunque la adición de manitol no inhibió la escisión del ADN, se inhibió casi por completo por la presencia de DMSO (figura 3, línea 3), lo que indica la participación del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) en el mecanismo de escisión de ADN. Por otro lado, la presencia de NaN_3 no provoca la inhibición de la ruptura, descartando la formación de $^1\text{O}_2$ y su participación en la escisión del ADN.

En el caso de la incubación con SOD, se observa una mayor degradación del DNA, que se explica por la generación de H_2O_2 y O_2 a partir de la dismutación del radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) por la acción de la enzima SOD. Esto indica que el radical superóxido también está involucrado en el mecanismo de escisión del ADN, sin embargo, debido a su bajo poder oxidante (en comparación con otras especies reactivas de oxígeno) no correspondería a la especie responsable de la escisión del ADN, si no a una especie que posteriormente permite la formación de peróxido de hidrógeno y luego la formación del radical $\text{HO}\cdot$.

Esto se corrobora al observar una inhibición completa de la escisión del ADN mediante la adición de KI, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en O_2 y H_2O , inhibiendo la reacción del peróxido de hidrógeno con el compuesto para generar el radical $\text{HO}\cdot$.

Con los resultados obtenidos, se demuestra que el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo están involucrados en la escisión del ADN, siendo la última especie, el radical $\text{HO}\cdot$, la especie responsable de la escisión del ADN debido a su alto poder oxidante.

Por otro lado, se ha informado que la reducción del complejo cúprico $[\text{Cu}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ depende de la concentración de agua presente en disolventes como el acetonitrilo,⁶ por lo tanto, la capacidad de nucleasa de $[\text{Cu}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ también ha sido evaluado.

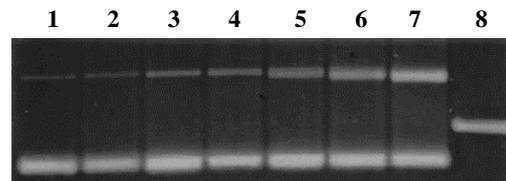


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del plasmidio pBR322 64,4 μM (335 ng) con $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$. Línea 1: control del plásmido superenrollado. Líneas 2-7, 2: 2,15 μM , 3: 4,3 μM , 4: 10,7 μM , 5: 20,5 μM , 6: 64,4 μM , 7: 0,64 mM. de complejo.

Cuando el complejo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ se incubó con ADN durante 2 h, no hubo evidencia de fragmentación del ADN del plasmidio. Sin embargo, cuando se incubó $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ durante un período de 24 h, se observa la generación de ADN cortado, cuya intensidad de banda aumenta a medida que aumenta la concentración del complejo (figura 4). Este comportamiento puede deberse a la

reducción de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ a $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ mediado por el agua, con la consecuente generación de especies reactivas de oxígeno, debido a la posterior oxidación de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$.

Para evaluar el mecanismo de reducción de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ en presencia de agua, se realizaron experimentos de EPR con *spin-trapping*. Para detectar la especie radical que se forma, se usó 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido, DMPO, como *spin-trap*, especie conocida por formar un aducto de larga vida, para detectar radicales centrados en oxígeno mediante EPR. Para comparar, también se realizaron experimentos de EPR con $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ en presencia de H_2O_2 .

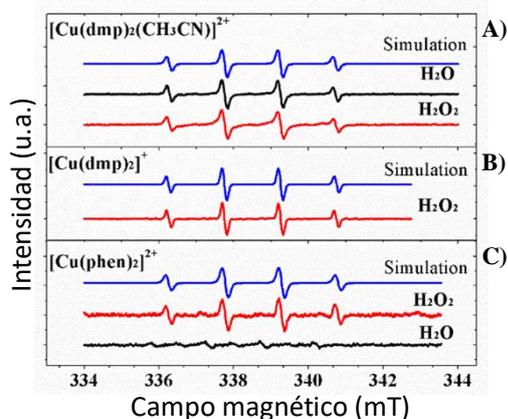


Figura 5. Espectros de EPR experimental a temperatura ambiente de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ (A), $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ (B) y $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ (C), en presencia de la sonda DMPO en acetonitrilo/agua (línea negra) y con H_2O_2 (línea roja). El espectro de EPR simulado para el aducto DMPO- $\text{HO}\cdot$ se muestra en la línea azul.

El experimento EPR *spin-trapping* muestra que el complejo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ en presencia de agua y DMPO exhibe la

resonancia de cuarteto característica del aducto DMPO- $\text{HO}\cdot$ ($a_N = 15,00$ G, $a_H = 14,80$ G) (figura 5A). Esto indica que, junto con la reducción de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ a $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, algunas especies se generan debido a la oxidación del agua (H_2O_2 u O_2) y debido a la posterior oxidación de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, se genera finalmente el radical $\text{HO}\cdot$. De forma similar, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ en presencia de H_2O_2 genera el aducto correspondiente a DMPO- $\text{HO}\cdot$ (figura 5B), que explica la alta actividad nucleasa de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ observada mediante la técnica de electroforesis en la presencia de H_2O_2 , debido a la formación del radical $\text{HO}\cdot$.

Interesante es la no observación de algunas especies radicalarias en el caso de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ en presencia de agua (figura 5C), al contrario del caso de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$, que corrobora que las imposiciones estéricas de los grupos metilo en las posiciones 2 y 9 del fragmento de fenantrolina, desencadenan la reducción a $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ en presencia de agua. Por otro lado, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ en presencia de H_2O_2 genera, como en los casos anteriores, el aducto DMPO- $\text{HO}\cdot$ (figura 5C).

Conclusiones

La alta citotoxicidad de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2](\text{ClO}_4)$ en diferentes líneas de células cancerígenas se debe a la generación de

especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular. Así también se demostró que $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ genera la ruptura de ADN extracelular en ausencia de agentes redox externos, cuya actividad nucleasa se ve incrementada significativamente en presencia de H_2O_2 , lo que podría indicar que el ADN celular es uno de los blancos de acción de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$, los resultados de electroforesis en gel con inhibidores de especies reactivas de oxígeno indican que a especie responsable de la ruptura del ADN corresponde principalmente al radical hidroxilo, HO^\bullet .

Así también, se demostró que el mecanismo de acción implicaría la recuperación de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dmp})_2]^+$ a partir del compuesto cuproso $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$, cuya reducción es mediada por agua, lo que estaría favorecido por las imposiciones estéricas del ligando. Experimentos de EPR demostraron que la reducción de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ en presencia de agua generan de igual manera el radical HO^\bullet .

Bibliografía

Bruijninx, P., & Sadler, P. (2008). New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion In Chemical Biology*, 12(2), 197-206. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.11.013.

Gill, D., Arora, K., Singh, B., Bakshi, M., & Chauhan, M. (1991). Transport properties of copper(I) perchlorates in mixed solvents. Part 2.—Conductance and viscosity measurements of bis(2,9-dimethyl-1, 10-phenanthroline)copper(I) perchlorate in binary solvent mixtures containing acetonitrile. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 87(8), 1159-1162. doi: 10.1039/ft9918701159.

Jungwirth, U., Kowol, C., Keppler, B., Hartinger, C., Berger, W., & Heffeter, P. (2011). Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 1085-1127. doi: 10.1089/ars.2010.3663.

Leandri, V., Daniel, Q., Chen, H., Sun, L., Gardner, J., & Kloo, L. (2018). Electronic and Structural Effects of Inner Sphere Coordination of Chloride to a Homoleptic Copper(II) Diimine Complex. *Inorganic Chemistry*, 57(8), 4556-4562. doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b00225.

Liang, H., Karlin, K., Dyson, R., Kaderli, S., Jung, B., & Zuberbühler, A. (2000). Dioxygen-Binding Kinetics and Thermodynamics of a Series of Dicopper(I) Complexes with Bis[2-(2-pyridyl)ethyl]amine Tridendate Chelators Forming Side-On Peroxo-Bridged Dicopper(II) Adducts. *Inorganic*

Chemistry, 39(26), 5884-5894. doi: 10.1021/ic0007916.

Chemistry, 17(31), 3606-3615. doi: 10.2174/092986710793213751.

Liu, F., Meadows, K., & McMillin, D. (1993). DNA-binding studies of Cu(bcp)₂⁺ and Cu(dmp)₂⁺: DNA elongation without intercalation of Cu(bcp)₂⁺. *Journal Of The American Chemical Society*, 115(15), 6699-6704. doi: 10.1021/ja00068a029.

Santini, C., Pellei, M., Gandin, V., Porchia, M., Tisato, F., & Marzano, C. (2013). Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chemical Reviews*, 114(1), 815-862. doi: 10.1021/cr400135x.

Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., & Santini, C. (2009). Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry*, 9(2), 185-211. doi: 10.2174/187152009787313837.

Schilt, A., & Taylor, R. (1959). Infra-red spectra of 1:10-phenanthroline metal complexes in the rock salt region below 2000 cm⁻¹. *Journal Of Inorganic And Nuclear Chemistry*, 9(3-4), 211-221. doi: 10.1016/0022-1902(59)80224-4.

Ni, Y., Lin, D., & Kokot, S. (2006). Synchronous fluorescence, UV-visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA. *Analytical Biochemistry*, 352(2), 231-242. doi: 10.1016/j.ab.2006.02.031.

Soares Fontes, A., Bandarage, R., Farrell, N., Qu, Y., Rauter, H., & Kelland, L. (2000). Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of Trifunctional Dinuclear Platinum Complexes: Comparison of Effects of Geometry and Polyfunctionality on Biological Activity. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 43(16), 3189-3192. doi: 10.1021/jm990536z.

Reedijk, J. (2003). New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 100(7), 3611-3616. doi: 10.1073/pnas.0737293100.

Tamilarasan, R., Ropartz, S., & McMillin, D. (1988). Luminescence studies of copper phenanthrolines in aqueous media: colloids and DNA complexes. *Inorganic Chemistry*, 27(23), 4082-4084. doi: 10.1021/ic00296a002.

Ruiz-Azuara, L., & E. Bravo-Gomez, M. (2010). Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. *Current Medicinal*

Wende, C., Lüdtke, C., & Kulak, N. (2014). Copper Complexes of N-Donor Ligands as

Artificial Nucleases. *European Journal Of Inorganic Chemistry*, 2014(16), 2597-2612. doi: 10.1002/ejic.201400032

Williams, D., & Lawton, M. (2010). Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *The Journal Of Organic Chemistry*, 75(24), 8351-8354. doi: 10.1021/jo101589h.