

3. ANTECEDENTES

3.1 Importancia toxicológica de los metales

Los metales son un grupo de elementos que presentan propiedades físicas y químicas muy particulares. Estas características han sido aprovechadas en la fabricación de numerosos utensilios de uso cotidiano por el hombre y también los hace esenciales en la dieta de todos los seres vivos. Por esta razón, algunos metales son de gran importancia para los sistemas biológicos ya que pueden ser componentes enzimáticos o estructurales. Entre ellos tenemos a los llamados oligoelementos o micronutrientes, que son requeridos en pequeñas cantidades por plantas y animales y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital, aunque a concentraciones elevadas se vuelven tóxicos (Cu, Co, Mn, Zn, Ca). También pueden llegar a encontrarse metales pesados sin función biológica conocida pero a determinadas concentraciones en los seres vivos pueden provocar disfunciones en su organismo, ya que son altamente tóxicos debido a que poseen la propiedad de acumularse en los tejidos (Pb, Cd, As, Al, Hg, Cr) [Palacios-Hernández, 2005].

Generalmente los metales actúan en el organismo distribuyéndose en el cuerpo por medio del torrente sanguíneo y dependiendo de su habilidad para pasar a través de las membranas celulares, compiten con otras moléculas por sitios de unión a los que son afines. Los metales frecuentemente se concentran en un tejido u órgano específico y al ser metabolizados por lo regular se unen a enzimas, cambiando así la conformación molecular de éstas. También pueden unirse a otros sustratos y alterar la biodisponibilidad de componentes celulares importantes [Donkin *et al*, 2000].

Algunos metales de interés desde el punto de vista biológico que pueden formar parte de sistemas vivos y en algunos casos son importantes como contaminantes ambientales, se presentan a continuación:

3.1.1 Cobalto (Co)

El cobalto es un elemento que se encuentra de manera natural en el ambiente, que tiene propiedades similares a las del hierro y el níquel. El principal uso del cobalto metálico es en aleaciones para turbinas de aviones. Los compuestos de cobalto son usados como pigmentos en vidrio, cerámica y pinturas, como catalizadores en la industria del petróleo, como secadores de pintura, y como elementos traza usados como aditivos en la agricultura y la medicina. El cobalto puede ser liberado al ambiente por actividades humanas, así como por la erosión de rocas y suelo. Las fuentes antropogénicas primarias de cobalto en el ambiente se generan a partir de la quema de combustibles fósiles, del uso de lodos que contengan cobalto o fertilizantes de cobalto, y de las industrias que usen o procesen compuestos del mismo. El cobalto liberado a la atmósfera termina sobre el suelo o en el agua por deposición húmeda o seca [ATSDR, 2003].

La exposición de la población al cobalto ocurre a través de la inhalación o la ingestión de alimentos y agua contaminados. Se ha estimado que su ingesta en alimentos se encuentra en el rango de entre 5 a 40 $\mu\text{g}/\text{día}$. La exposición ocupacional al cobalto se presenta en trabajadores de la industria metalúrgica y en industrias tales como las minas de carbón, minas de metales, fundidoras y refinerías, en la fabricación de tintes y en la industria química. Las concentraciones de cobalto en el ambiente de la industria metalúrgica, soldadoras y trituradoras de metales oscila en un rango desde 1 a 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, rango que puede ser comparado con los niveles atmosféricos normales de 0.4–2.0 ng/m^3 . Este metal es esencial en el organismo al formar parte de la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) ; la dosis recomendada en la dieta es de 2.4 $\mu\text{g}/\text{día}$, la cual debe contener 0.1 μg de cobalto. Concentraciones traza de cobalto han sido determinadas en muchos tejidos del cuerpo, siendo más altas en el hígado [Baran, 1995].

Durante la exposición por inhalación a partículas que contienen cobalto, el primer blanco expuesto es el tracto respiratorio. La exposición ocupacional de seres humanos a cobalto metálico o aleaciones del mismo, ha reportado efectos respiratorios primarios, que incluyen disminución en la función pulmonar, asma, jadeo y disnea a niveles de exposición en un rango de 0.015 a 0.130 mg de Co/m^3 . Se cree que muchos de los efectos en tracto respiratorio pueden darse como resultado de la generación de oxidantes y radicales libres

por el ión cobalto. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que algunos de los efectos respiratorios, tales como el asma inducida por cobalto, son resultado de la inmunosensibilización al mismo [Donkin *et al*, 2000]. El efecto más notorio durante la exposición oral a cobalto en humanos parece ser un incremento en el número de eritrocitos (policitemia). Durante la exposición dérmica, el efecto más comúnmente observado es la dermatitis, que ha sido demostrada en un gran número de estudios en humanos, y probablemente es causada por una reacción alérgica al cobalto, que funciona como hapteno. Los estudios disponibles de los efectos carcinogénicos en sujetos expuestos por trabajo han reportado resultados positivos y negativos. La IARC ha clasificado al cobalto y a los compuestos de cobalto como posibles carcinógenos para humanos (Grupo 2B) [ATSDR, 2003].

Durante la exposición por inhalación, la absorción de compuestos de cobalto depositados en los pulmones parece estar relacionada con su solubilidad. Las partículas insolubles de cobalto generalmente son eliminadas por fagocitosis y/o transporte mucociliar, y así, presentan una baja absorción sistémica, ya que pueden ser disueltas dentro de los macrófagos alveolares [Kreyling *et al*, 1990]. Un mecanismo propuesto por el cual un metal pesado puede ejercer sus efectos, establece que el carburo de tungsteno, que es un buen conductor de electrones, facilita la oxidación del cobalto metálico a cobalto iónico (probablemente Co(II), transfiriendo electrones del átomo de cobalto al oxígeno molecular adyacente a la molécula de carburo de tungsteno) [Lasfargues *et al*, 1995; Lison *et al*, 1996]. El resultado es un incremento en la solubilidad del cobalto y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). También ha sido demostrado que las partículas de aleación pueden incrementar las concentraciones de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), en respuesta al estrés oxidativo [Rengasamy *et al*, 1999]. Ha sido demostrado que el cobalto genera ROS, incluyendo al radical anión superóxido *in vitro* e *in vivo* [Kawanishi, Inoue y Yamamoto 1994], probablemente por medio de reacciones similares a la de Fenton [Lloyd, Phillips y Carmichael, 1997].

También ha sido demostrado que el cobalto soluble altera la entrada de calcio a las células, funcionando como bloqueador de los canales de calcio inorgánico [Yamatani *et al*, 1998]. De esta forma, el cobalto puede afectar la transmisión neuromuscular debido a que se comporta como un antagonista del calcio [Weakly, 1973]. Además, los iones cobalto

pueden incrementar las probabilidades de daño a DNA cuando son coexpuestos con oxidantes *in vitro*, tales como la radiación UV o H₂O₂ [De Boeck *et al*, 1998]. Se piensa que el cobalto actúa al inhibir la reparación del DNA, particularmente en las etapas de incisión y polimerización [Asmuß, Mullenders y Hartwig, 2000], logrando esto a través de la interacción con las proteínas reparadoras de DNA y sus dedos de zinc [Sarkar, 1995].

Otro mecanismo potencial importante por el cual puede ejercer sus efectos es a través de su acción sobre el grupo hemo o enzimas que contengan dicho grupo. Se piensa que inhibe la síntesis de hemo *in vivo* actuando en al menos dos sitios diferentes en la ruta biosintética: en la síntesis de δ -aminolevulinato y la conversión de δ -aminolevulinato en hemo [De Matteis y Gibbs, 1977]. Esta actividad inhibitoria podría resultar en la formación de la protoporfirina de cobalto en lugar del hemo [Sinclair *et al*, 1979]. El tratamiento con cobalto también estimula la oxidación del hemo en muchos órganos, debido a la inducción de la hemooxigenasa [Sunderman 1987].

3.1.2 Zinc (Zn)

El zinc (Zn) se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y constituye aproximadamente un 0,02 % de la corteza terrestre. Adopta la forma de sulfuro (esfalerita), carbonato, óxido o silicato (calamina) de zinc, combinado con muchos minerales. La esfalerita, el principal mineral de zinc y fuente de al menos el 90 % del zinc metálico, contiene hierro y cadmio como impurezas. Casi siempre aparece acompañado de galena, el sulfuro de plomo, y ocasionalmente se encuentra asociado con minerales que contienen cobre u otros sulfuros metálicos básicos. También tiene aplicación en la fabricación de cosméticos, cementos de fraguado rápido, en la industria farmacéutica y como pesticida [ATSDR, 2005b].

Como componente biológico, el zinc es un nutriente esencial en humanos y animales, ya que es necesario para el funcionamiento de un gran número de metaloenzimas, tales como la alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, anhidrasa carbónica, leucina aminopeptidasa, superóxido dismutasa y la DNA y RNA polimerasa. El zinc es requerido para el metabolismo normal de ácidos nucleicos y proteínas, así como el crecimiento y división celular. También juega un papel esencial en el mantenimiento de la estructura de ácidos

nucleicos de los genes (mecanismo de acción de los dedos de zinc). La deficiencia de zinc ha sido asociada con dermatitis, anorexia, retraso en el crecimiento, cicatrización de heridas deficiente, hipogonadismo con disminución en la capacidad reproductiva, disminución en la función del sistema inmunológico y deficiencias en las funciones mentales. La dosis diaria recomendada para zinc es de 11 mg/día en hombres y de 8 mg/día en mujeres [IOM, 2002]. Son recomendadas dosis diarias más altas para las mujeres durante el embarazo y la lactancia (12 mg/día para mujeres embarazadas y lactantes) [IOM, 2002; WHO, 1996].

Los mecanismos homeostáticos naturales del organismo controlan la absorción de zinc en el tracto gastrointestinal [Davies, 1980]. Las personas con niveles nutricionales adecuados de zinc absorben aproximadamente 20–30% de todo el zinc ingerido. La absorción de zinc ocurre en todos los segmentos del intestino, aunque la proporción más grande se lleva a cabo en el duodeno. El mecanismo de absorción incluye la difusión pasiva y procesos mediados por transportadores que funcionan a bajas dosis, involucrando a una proteína intestinal rica en cisteína (CRIP) [Hempe y Cousins, 1992] que se une al zinc que entra a las células intestinales del lumen. Al igual que muchos otros metales, puede inducir la producción de metalotioneínas en las células de la mucosa intestinal, mismas que pueden tener la función de evitar la absorción en exceso de zinc por el organismo [Foulkes y McMullen, 1987]. La absorción por vía dérmica de zinc ocurre, pero su mecanismo no ha sido claramente definido. La absorción ha sido observada en pacientes quemados tratados con gasas preparadas con óxido de zinc. El pH de la piel, la cantidad de zinc aplicada, y el vehículo administrado con el zinc afecta la absorción de zinc por vía dérmica [Agren, 1991].

El zinc es uno de los elementos traza más abundantes en humanos. Es encontrado de manera natural en todos los tejidos y fluidos y es cofactor en alrededor de 300 sistemas enzimáticos. Aunado a esto, el músculo y el hueso contienen aproximadamente 90% de la cantidad total de zinc en el organismo (aproximadamente 60% y 30%, respectivamente). Los órganos que contienen mayor concentración de zinc son el hígado, tracto gastrointestinal, riñón, piel, pulmones, cerebro, corazón y páncreas [Bentley y Grubb, 1991]. También han sido detectadas altas concentraciones de zinc en la próstata, retina, y semen. Las concentraciones en los riñones y corazón muestran un pico elevado entre los 40 a 50 años de edad y después disminuyen [Forssen 1972].

El zinc está presente en el plasma sanguíneo, eritrocitos, leucocitos y plaquetas, aunque está localizado principalmente en eritrocitos (en los cuales el 87% está en la anhidrasa carbónica, el principal sitio de unión). Ha sido demostrado que la deficiencia de zinc disminuye la habilidad de los eritrocitos para resistir la hemólisis *in vitro*. En el plasma, la albúmina es el principal acarreador de zinc, junto con pocas cantidades de zinc unido a α -macroglobulina y aminoácidos. La albúmina unida a zinc representa la principal fuente metabólicamente activa de zinc. Además, es concentrado inicialmente en el hígado después de la ingesta y, posteriormente, es distribuido a través del organismo, siendo el hígado, páncreas, hueso, riñón y músculo, los principales sitios de almacenamiento [Giroux *et al*, 1976].

En cuanto a los mecanismos de toxicidad de zinc, la *fiebre del metal por humo* es el principal efecto observado en trabajadores expuestos a humo o polvo de óxido de zinc [Blanc *et al*, 1991], que aparece usualmente de 3-10 horas después de la exposición y los síntomas persisten durante 24-48 horas. Se desconoce la patogénesis exacta de la fiebre del metal por humo. Se piensa que es una respuesta del sistema inmune al óxido de zinc inhalado [Mueller y Seger 1985]. Ha sido sugerido que el óxido de zinc causa la inflamación del tracto respiratorio y la liberación de histamina o sus derivados. La exposición oral a cantidades elevadas de zinc ha causado anemia, disminución en las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y colesterol, y daño pancreático en humanos y animales [Allen *et al*, 1983].

3.1.3 Cadmio (Cd)

El cadmio no se encuentra en el ambiente como un metal puro, sino como un mineral en forma de óxido de cadmio, cloruro de cadmio, sulfato de cadmio o en asociación con zinc. Estos sólidos pueden disolverse en agua y se pueden encontrar pequeñas partículas de Cd en el aire. Los alimentos y el humo de cigarrillos pueden ser fuentes significativas de exposición a Cd para el público en general. La exposición por inhalación de altos niveles de óxido de cadmio por fumar o por polvo puede causar irritación severa al tejido respiratorio. Los síntomas son semejantes a los de la traqueobronquitis, neumonitis y edema pulmonar, pudiendo aparecer después de muchas horas de exposición; sin embargo, estos síntomas no

aparecen después de la inhalación de pequeñas cantidades. El riñón es el principal órgano afectado por la exposición tóxica a Cd por medio de inhalación, la afección se caracteriza por la presencia de proteínas de bajo peso molecular en la orina (proteinuria), irritación del epitelio gastrointestinal, náusea, vómito y diarrea. Cuando el Cd es ingerido en agua o alimentos, entra a la sangre después de su absorción por el estómago o intestino en forma de ión, siendo retenido por un gran número de órganos y eliminado lentamente (10-30 años) [Donkin *et al*, 2000]. Ha sido demostrado que el cadmio altera la composición de lípidos e incrementa su peroxidación [Gill *et al*, 1989] y que altera el metabolismo del cobre, zinc y hierro así como de selenio [Jamall y Smith, 1985].

Xu *et al* [1995] propusieron que en una etapa inicial en la toxicidad inducida por cadmio en testículos, ocurre la interferencia del ión cadmio con complejos proteicos de zinc que controlan la transcripción del DNA y como consecuencia las células son conducidas a la apoptosis. El atrapamiento del ión cadmio por las metalotioneínas (MT) (o un quelante) evita que el cadmio destruya a las proteínas transcripcionales dependientes de zinc. Muchos trabajos han indicado que las metalotioneínas complejadas con cadmio reducen su toxicidad y la capacidad del hígado para sintetizar metalotioneínas parece ser adecuada para unirse a todo el cadmio acumulado [Goyer *et al*, 1989]. Se ha sugerido que el daño renal ocurre por una concentración excesiva de cadmio, provocando que no se una eficientemente a las metalotioneínas para su eliminación [Sendelbach y Klaassen 1988].

Dorian, Gattone y Klaasen [1992a] evaluaron la distribución intrarrenal de metalotioneínas de cadmio radiomarcadas ($^{109}\text{CdMT}$) e inyectadas por vía intravenosa en machos de ratones Swiss a una dosis no tóxica para la nefrona (0.1 mg Cd/kg) y concluyeron que la nefrotoxicidad inducida por cadmio podría estar dada, en parte, por la toma preferencial de CdMT en los segmentos S1 y S2 de los túbulos proximales, que es el sitio en el que se ha reportado la nefrotoxicidad inducida por CdMT. En otro estudio, Dorian, Gattone y Klaasen [1992b] reportaron que esta toma preferencial de Cd por el riñón también fue observada después de la administración de diferentes dosis de [^{35}S]CdMT a ratas. Los estudios de autorradiografía por microscopía luminosa indicaron que el cadmio de CdMT se distribuye de manera preferente en los segmentos enroscados (S1 y S2) de los túbulos proximales, mientras que el cadmio presente en el CdCl_2 se distribuyó de la misma forma

en diferentes segmentos (enroscados y rectos) de los túbulos proximales. Sin embargo, la concentración de cadmio en el sitio de nefrotoxicidad en los túbulos proximales enroscados, fue mayor después de la administración de CdCl_2 que después de la administración de CdMT . Se encontró una concentración mayor de cadmio en las zonas apicales y basales de las células proximales después de la administración de CdCl_2 que después de la administración de CdMT . Dorian y Klaassen [1995] evaluaron los efectos de ZnMT sobre la toma renal y nefrotoxicidad de $^{109}\text{CdMT}$ y concluyeron que la ZnMT no solamente no es tóxica para riñón a una dosis tan elevada como $5 \mu\text{moles}$ de MT/kg , sino también puede proteger contra los efectos nefrotóxicos de CdMT sin disminuir la concentración renal de cadmio.

La concentración crítica de cadmio que puede producir algún tipo de disfunción en la corteza renal aún sigue siendo investigada. Si la concentración crítica de cadmio en la orina es de aproximadamente $5 \mu\text{g Cd/g}$ de creatinina o de $10 \mu\text{g Cd/g}$ de creatinina, corresponde a alrededor de 100 y $200 \mu\text{g}$ de cadmio/g de masa renal respectivamente y de esta forma dichas cantidades son discutidas. En un análisis, la concentración crítica que produce disfunciones en un 10% de la población susceptible podría ser de aproximadamente $200 \mu\text{g}$ de cadmio/g de masa renal; el 50% de la población susceptible podría experimentar disfunciones con una concentración en riñón de $300 \mu\text{g/g}$ de masa renal [Ellis, Cohn y Smith, 1985].

En su forma catiónica normal, como Cd(II) , este elemento presenta fuertes analogías con dos elementos esenciales, el Zn(II) y el Ca(II) . De alguna manera, estas analogías dan cuenta de sus principales efectos tóxicos. Por un lado, puede desplazar al zinc de algunos de sus sitios activos en metaloenzimas y por el otro, compite con el calcio en ciertos sistemas biológicos y también puede ser incorporado al hueso, ocupando los sitios de calcio en las hidroxapatitas biológicas. La dosis oral normal de Cd es de $5 \times 10^{-4} \text{ mg/kg}$ para fuentes de agua, en comparación a la dosis diaria en alimentos que es de $1 \times 10^{-3} \text{ mg/kg}$. La United States Environmental Protection Agency (USEPA) lo ha clasificado como un carcinógeno clase B1 (posible carcinógeno humano) sólo por inhalación [Donkin *et al*, 2000].

3.1.4 Plomo (Pb)

Es un metal encontrado en la corteza terrestre de manera natural. El Pb puede mezclarse con otros aniones para formar las conocidas sales de Pb. Estos compuestos son solubles en agua, mientras que el Pb elemental no lo es. Es usado en la producción de baterías, municiones, productos de metal y equipo médico y científico. La mayoría del Pb es movilizado en el ambiente como resultado de actividades humanas. La presencia de Pb en los seres humanos se debe a la inhalación o exposición por vía oral a partículas de Pb inorgánico. En niños, la dosis oral es absorbida en 50%, mientras que en adultos sólo en 15%. La muerte de niños por envenenamiento con Pb ocurre con niveles mayores de 125 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en sangre, quienes además exhiben encefalopatía severa. Muy bajos niveles de Pb (25-30 $\mu\text{g}/\text{dL}$) han sido asociados con efectos negativos en la capacidad de aprendizaje; además, se ha encontrado que un nivel de Pb en sangre de 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ está muy próximo al necesario para generar efectos tóxicos en obreros adultos expuestos al metal, por lo que la recomendación de exposición laboral máxima es de 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$.

El plomo afecta al sistema nervioso y endocrino, que contribuyen con la regulación de la resistencia vascular periférica y la producción de pulsaciones cardiacas [Vaziri y Sica 2004]. El plomo en las células se une a una gran variedad de proteínas, algunas de las cuales se encuentran implicadas en su toxicidad. Un rasgo histológico característico de la nefrotoxicidad de plomo es la formación de cuerpos intranucleares de inclusión en el túbulo proximal renal. Los cuerpos de inclusión contienen complejos de plomo con proteínas que pueden provocar un efecto intenso sobre la disposición intracelular de plomo en el riñón. El atrapamiento de plomo en los cuerpos intranucleares de inclusión puede limitar o prevenir interacciones tóxicas con otros blancos moleculares del plomo. Sin embargo, la identidad exacta de los complejos proteicos de plomo en los cuerpos de inclusión sigue siendo desconocida, así como el mecanismo de formación de los cuerpos de inclusión por sí mismo [Shelton y Egle, 1982].

El plomo también se une a las metalotioneínas pero no parece ser un inductor significativo de la proteína en comparación con cadmio y zinc [Waalkes y Klaassen, 1985]. *In vivo*, sólo una pequeña fracción del plomo en el riñón está unida a metalotioneínas y parece tener una afinidad de unión que es menor que la de Cd(II), pero mayor que la de Zn(II), [Nelson,

Atkin y Winge, 1985]. El plomo inhibe la captación de calcio en las mitocondrias aisladas de células renales y puede entrar a la mitocondria como sustrato por medio de un transportador de calcio [Kapoor *et al*, 1985]. Los deterioros del metabolismo oxidativo podrían contribuir con deficiencias en el transporte y con la degeneración celular; sin embargo, el papel exacto del plomo en la inducción de la nefrotoxicidad no ha sido totalmente esclarecido.

El plomo interfiere con la biosíntesis del hemo alterando la actividad de tres enzimas: ácido δ -aminolevulínico sintasa (ALAS), ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD) y ferroquelatasa. El plomo estimula de manera indirecta a la enzima mitocondrial ALAS que cataliza la condensación de glicina y succinil CoA para formar ALA. La actividad de ALAS cataliza la etapa limitante en la biosíntesis de hemo; el incremento en la actividad de ALAS ocurre a través de la inhibición de la represión por retroalimentación. El plomo inhibe a la metaloenzima citosólica coordinada con zinc ALAD que cataliza la condensación de dos unidades de ALA para formar porfobilinógeno. Esta inhibición es no-competitiva y ocurre por medio de la unión del plomo a los sulfhidrilos vecinos en el sitio activo de ALAD. El plomo puentea a los sulfhidrilos vecinos, mientras que el zinc, normalmente encontrado en el sitio activo, se une solo a uno de esos sulfhidrilos. La inhibición de ALAD y la inactivación de la represión por retroalimentación de ALAS resulta en la acumulación de ALA. Disminuye, de una manera no-competitiva, la actividad de la enzima mitocondrial coordinada con zinc ferroquelatasa, que cataliza la inserción de hierro (II) en el anillo de protoporfirina para formar el hemo. La inhibición de la ferroquelatasa puede ocurrir a través de la unión del plomo a los grupos sulfhidrilos vecinos del sitio activo. Otro mecanismo posible es por medio del deterioro en el transporte de hierro en la mitocondria, dado por ruptura de la estructura mitocondrial. Algunas otras enzimas de la ruta de biosíntesis de hemo contienen grupos sulfhidrilo simples dentro de sus sitios activos y no son tan sensibles a la inhibición, como lo son ALAD y ferroquelatasa [Goering, 1993]. El proceso de biosíntesis de hemo es ilustrado en la figura 1.

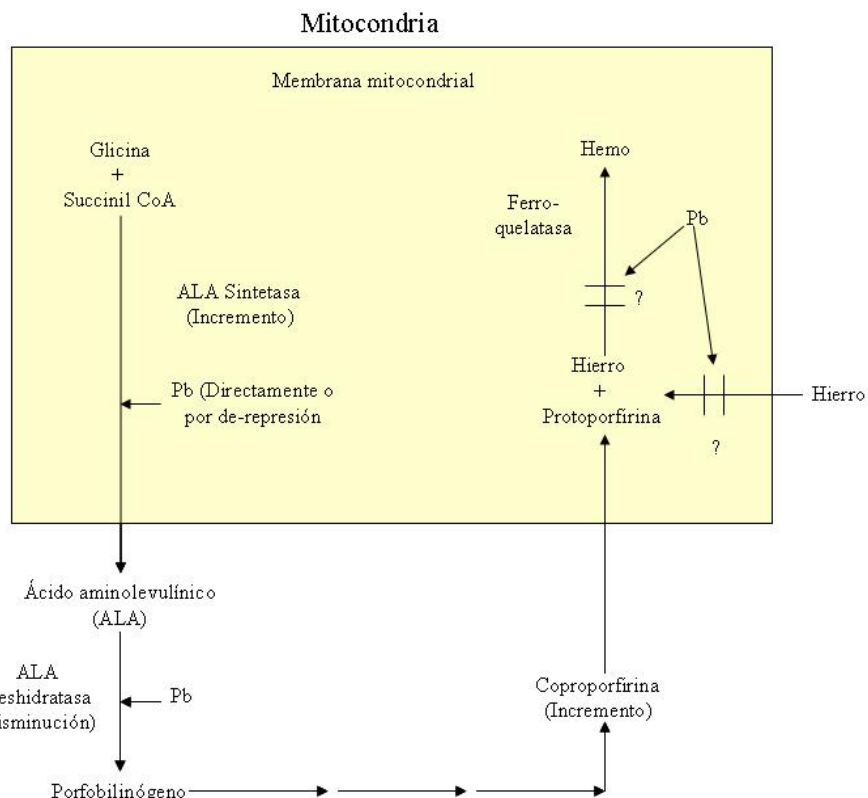


Figura 1. Efectos del plomo sobre la biosíntesis de Hemo [ATSDR, 2005a].

La inhibición de la ferroquelatasa por plomo resulta en la acumulación de protoporfirina IX, que está presente en los eritrocitos circulantes como protoporfirina complejada con zinc (ZPP), debido a la colocación de zinc, más rápida que la del hierro, en el anillo de porfirina. La ZPP es encontrada en las hendiduras del hemo de la hemoglobina y permanece ahí durante el tiempo de vida del eritrocito. Debido a que la acumulación de ZPP ocurre sólo en eritrocitos formados durante la presencia de plomo en médula ósea, este efecto es detectable en los eritrocitos circulantes aproximadamente durante 120 días. La interferencia tan marcada con la síntesis de hemo resulta en una reducción de la concentración de hemoglobina en sangre [EPA, 1986]. Además, el plomo puede afectar al sistema nervioso por múltiples mecanismos, y uno de los más importantes es su actividad biomimética de calcio y/o la ruptura de la homeostasis de calcio.

La vulnerabilidad particular del feto y los niños a la neurotoxicidad del plomo puede estar dada en parte por la inmadurez de la barrera hematoencefálica y por la pérdida de la afinidad del plomo para unirse a las proteínas en la astrogliá, la cual lo secuestra. Otra enzima alterada por el plomo es la calmodulina, el principal receptor intracelular de calcio

en eucariontes. Normalmente, el calcio induce un cambio conformacional en la calmodulina y convierte a la proteína a su forma activa; el plomo activa de manera inadecuada a la enzima.

El plomo también puede sustituir al zinc en algunas enzimas y en proteínas con dedos de zinc, las cuales coordinan uno o más cationes de zinc como cofactores. La sustitución de zinc por plomo en proteínas con dedos de zinc puede tener efectos significativos sobre la expresión *de novo* de las proteínas unidas y en algunos genes regulados transcripcionalmente para una proteína en particular. Ha sido sugerido que las múltiples respuestas a la exposición a plomo son ocasionadas por el plomo actuando sobre las proteínas de dedos de zinc encontradas en enzimas, canales y receptores [ATSDR, 2005a].

3.1.5 Cromo (Cr)

De acuerdo con la ATSDR [2000], el cromo es un elemento encontrado de manera natural en animales, plantas, rocas, suelo, cenizas volcánicas y gases. El cromo tiene estados de oxidación en un rango comprendido desde cromo (II) hasta cromo (VI). El cromo elemental [cromo(0)] no se encuentra de manera natural. Los compuestos de cromo son estables en estado trivalente en minerales como el ferrocromito. La forma hexavalente (VI) es el segundo estado más estable. Sin embargo, el cromo (VI) raramente aparece de manera natural, aunque usualmente es producido a partir de fuentes antropogénicas. Los compuestos de cromo trivalente, con excepción de las sales de acetato, nitrato y cloruro de cromo (III) hexahidratado, son generalmente insolubles en agua. Algunos compuestos hexavalentes, tales como el trióxido de cromo (o ácido crómico), y las sales metálicas de amonio y álcalis (p.e., sodio, potasio) de ácido crómico son rápidamente solubles en agua. Las sales metálicas alcalinas (p.e., calcio, estroncio) de ácido crómico son menos solubles en agua. Las sales de zinc y plomo de ácido crómico son prácticamente insolubles en agua fría. Los compuestos de cromo (VI) son reducidos a cromo (III) en presencia de materia orgánica reductora. Sin embargo, en afluentes naturales donde hay una baja concentración de materiales reductores, los compuestos de cromo (VI) son más estables [EPA, 1984]. En humanos y animales, el cromo (III) es un nutriente esencial que desempeña una función importante en el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos y proteínas incrementando la

actividad de la insulina [Anderson, 1981]. La forma biológicamente activa de cromo, denominada factor de tolerancia a la glucosa (GTF), es un complejo de cromo, ácido nicotínico y posiblemente aminoácidos (glicina, cisteína y ácido glutámico). Los humanos y animales son capaces de convertir los compuestos inactivos de cromo (III) inorgánico a formas fisiológicamente activas.

Aunque el cromo (III) ha sido reportado como un nutriente esencial, la exposición a niveles elevados por inhalación, ingestión o contacto dérmico puede causar algunos efectos perjudiciales a la salud. Es muy difícil distinguir entre los efectos causados por cromo (VI) y aquéllos causados por cromo (III), ya que cromo (VI) es rápidamente reducido a cromo (III) después de la penetración de membranas biológicas y en el ambiente gástrico. Sin embargo, mientras que cromo (VI) puede ser fácilmente transportado dentro de las células, cromo (III) es mucho menos capaz de cruzar membranas celulares. La reducción de cromo (VI) a cromo (III) dentro de las células puede ser un mecanismo importante para la toxicidad de compuestos de cromo, mientras que la reducción de cromo (VI) a cromo (III) fuera de las células es un mecanismo de protección mayor [Petrilli *et al*, 1986]. Dado que el punto de ebullición del cromo es extremadamente alto, es extraño encontrar cromo gaseoso. Más bien, el cromo en el ambiente se encuentra en forma de micropartículas suspendidas o disuelto en microgotas. El trióxido de cromo (VI) (ácido crómico) y los aerosoles de sales de cromo (VI) soluble pueden producir diferentes efectos en la salud a diferencia de los compuestos insolubles en forma de partículas. Por ejemplo, la exposición a trióxido de cromo (VI) resulta en un daño notorio a la mucosa nasal y en la perforación del septo nasal, mientras que la exposición a compuestos insolubles de cromo (VI) resulta en daños al tracto respiratorio inferior. [ATSDR, 2000].

No hay estudios que reporten la muerte en humanos después de la inhalación aguda de cromo o alguno de sus compuestos. Los valores de inhalación aguda de concentración letal al 50% (LC₅₀) en ratas para diferentes compuestos de cromo (VI) (cromato de sodio, dicromato de sodio, dicromato de potasio y dicromato de amonio) se encontraron en un rango de 29 a 45 mg de cromo (VI)/m³ para hembras y de 33 a 82 mg de cromo(VI)/m³ para machos. Los valores LC₅₀ para inhalación aguda de trióxido de cromo fueron de 87 y 137 mg de cromo (VI)/m³ para ratas hembras y machos, respectivamente [American Chrome and Chemicals, 1989]. La genotoxicidad de cromo está dada por la reducción

intracelular de cromo (VI) a cromo (III), la cual puede ser la forma genotóxica esencial de cromo. Paradójicamente, el cromo (III) no induce daño a DNA, aunque se una a éste *in vitro* e *in vivo*.

A diferencia de muchos carcinógenos químicos, la mayoría de la información sobre la carcinogénesis inducida por cromo se ha obtenido a partir de estudios epidemiológicos en seres humanos sobre trabajadores expuestos más que de estudios en animales. El cáncer de pulmón es considerado como un riesgo profesional para trabajadores expuestos a cromo (VI) en el sector industrial y comercial. Los estudios indican que los trabajadores en las industrias que usan cromo pueden estar expuestos a concentraciones de cromo dos veces mayores que la población en general. Existe una correlación positiva entre la dosis de cromo, expresada en función de la concentración y tiempo de exposición, y el riesgo relativo de desarrollar cáncer de pulmón, la cual ha sido calculada por ser mucho más de 30 veces mayor que la de los controles adecuados. Las formas principales de cáncer inducido por cromo son carcinomas de pulmón y en una menor proporción, carcinomas nasales y faríngeos. También hay algunas evidencias de incremento en el riesgo de desarrollar cáncer gastrointestinal [ATSDR, 2000].

La dosis de referencia diaria de cromo (III) por vía oral es de 1.0 mg/kg. La dosis de referencia diaria de cromo (VI) por vía oral es de 5×10^{-3} mg/kg. Cromo (VI) está clasificado como carcinógeno clase A (carcinógeno humano confirmado) sólo por la exposición por inhalación. Cromo (III) no está clasificado como carcinógeno por ninguna vía de exposición.

3.1.6 Cobre (Cu)

Es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, después del hierro y del zinc, y se ha identificado un número relativamente grande de metaloproteínas que lo contienen. También está asociado a sistemas y procesos que involucran la utilización del oxígeno por parte de sistemas biológicos, apareciendo en el transportador de oxígeno hemocianina, en diversas oxidasas y oxigenasas y en la superóxido dismutasa, además de estar presente en sistemas transportadores de electrones [ATSDR, 2004; Baran, 1995].

El cobre se encuentra presente en el organismo en cantidades que van de los 100 a 150 mg, ubicándose el 90% de esta cantidad en hígado, cerebro, pulmón, riñón y ovario. Participa en la formación de la hemoglobina y es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de huesos, tendones, tejido conectivo y el sistema vascular [Donkin *et al*, 2000]. La absorción del cobre ocurre en el estómago y en el intestino delgado. Esta absorción aparece facilitada por la presencia de ciertos aminoácidos y proteínas como las metalotioneínas específicas para cobre. El hígado es el centro del metabolismo del cobre y allí se genera la ceruloplasmina, que es la cuproproteína más abundante en el plasma y es la principal responsable del transporte de Cu en el organismo, además de algunos péptidos de bajo peso molecular. La alta labilidad del ión Cu(I) sugiere una etapa de reducción durante el proceso de liberación de cobre. Esto significa que el Cu(II) ligado a la ceruloplasmina sería reducido a Cu(I) e inmediatamente captado por un aceptor intracelular del ión cuproso. Posteriormente el cobre es incorporado en su forma reducida a alguna apoenzima, siendo fijado en la holoenzima en su estado cúprico, como consecuencia de su inmediata oxidación por oxígeno [Baran, 1995].

La carencia de cobre en el organismo es poco frecuente en personas que llevan una dieta balanceada. Se puede manifestar la ausencia de cobre en el organismo con anemias que van de moderadas a severas, edemas, desmineralización ósea, retardo en el crecimiento, anorexia y vulnerabilidad a infecciones. La habilidad del cobre para mantenerse en ciclo reversible entre un estado oxidado, Cu(II) y un estado reducido, Cu(I), es usada por cuproenzimas involucradas en reacciones redox. Sin embargo, es por esta propiedad del cobre que también es potencialmente tóxico ya que las transiciones entre Cu(II) y Cu(I) pueden resultar en la generación de radicales superóxido e hidroxilo [Camakaris *et al*, 1999]. Turnlund [1989] demostró que la absorción de cobre en el tracto gastrointestinal es inversamente proporcional a su ingesta en la dieta; cuando el cobre de la dieta se incrementa, la eficiencia en su absorción disminuye. A concentraciones en la dieta de 0.785, 1.68, y 7.53 mg/día (la ingesta permitida de cobre en la dieta es de 0.900 mg/día), el 56, 36, y 12%, respectivamente, del cobre radiomarcado fue absorbido.

No ha sido comprendido completamente cómo es regulada la absorción del cobre. Los estudios *in vitro* proveen la evidencia de que la toma de cobre por las células intestinales parece ser saturable [Arredondo, Uauy y González, 2000]. Hay evidencia de que el cobre se

difunde a través de la membrana de las células intestinales; sin embargo, es poco probable que este sea el único mecanismo de absorción. Es posible que transportadores de cobre recién identificados (hCtr1 y hCtr2) jueguen un papel en la regulación en la toma de cobre. La proteína Menkes (MNK), una proteína transmembranal a base de cobre tipo ATPasa, puede estar involucrada en el transporte de cobre a través de la membrana basolateral de las células intestinales [Pena, Lee y Thiele, 1999]. Cuando el cobre es liberado de las células intestinales, es transportado unido a albúmina e histidina al hígado por medio del sistema porta. El hígado juega un papel crítico tanto en la homeostasis de cobre como de sitio de almacenamiento para este metal, además de tomar parte en la ruta fisiológica para la excreción a través del sistema biliar [Tao *et al*, 2003].

En ratas saturadas de cobre, los lisosomas se vuelven alargados y más frágiles con disminución de la fluidez de la membrana [Myers *et al*, 1993]. Es especulado que la saturación de los lisosomas resulta en una acumulación de cobre en el núcleo con un posterior daño nuclear [Fuentealba, Haywood y Foster, 1989]. Ha sido sugerido que el exceso de cobre resulta en un daño oxidativo, incluyendo la peroxidación de lípidos. Sokol *et al* [1990] sugirieron que el daño oxidativo a la mitocondrias de los hepatocitos puede ser uno de los factores que inician el daño hepatocelular. Numerosos estudios han demostrado que las ratas pueden desarrollar tolerancia a altos niveles de cobre. Después de 3-5 semanas de saturación con cobre ocurre daño tisular y posteriormente los niveles de cobre comienzan a declinar y los tejidos comienzan a regenerarse. Se ha pensado que el mecanismo involucrado en el desarrollo de la tolerancia es el incremento en la síntesis de metalotioneínas [Evering *et al*, 1991].

Los estudios en monos, perros y hurones proveen fuertes evidencias de que el vómito inducido por cobre resultó de la estimulación del nervio vago. La vagotomía abdominal resultó en una disminución dramática en la aparición de vómito en perros y hurones expuestos por vía oral a sulfato de cobre y en monos que recibían vía oral o por inyección intravenosa sulfato de cobre [Fukui *et al*, 1994]. En monos, la administración de compuestos que bloquean a los receptores 5-HT₃ también resultó en una disminución de vómito después de la administración oral o intravenosa de sulfato de cobre (Fukui *et al*, 1993). En contraste, los represores de 5-HT₃ inhibieron la aparición de vómito en perros o hurones [Bhandari y Andrews, 1991] que recibieron una dosis oral de sulfato de cobre, pero

los compuestos que bloquean a los receptores 5-HT₄ inhibieron el vómito inducido por cobre. Fukui *et al.* [1994] sugirieron que el sulfato de cobre causó irritación gastrointestinal que resultó en la liberación de 5-HT y provocó vómito por activación de las vísceras abdominales aferentes a través de los receptores 5-HT₄.

3.2 Complejos de coordinación: Química Bioinorgánica

La Química Bioinorgánica es una rama interdisciplinaria de la Química que se ocupa tanto del estudio de los compuestos inorgánicos presentes en tejidos y fluidos biológicos como de sistemas inorgánicos (modelos) mediante los cuales se puede simular o reproducir en forma parcial o total el comportamiento químico de los sistemas naturales. Y, en última instancia, se trata de correlacionar la actividad biológica de un sistema inorgánico con las características estructurales, electrónicas y químicas del mismo. Si bien a través de estudios *in vitro* por lo general no se pueden reproducir exactamente el funcionamiento y las características de los complicados sistemas naturales, el análisis de modelos ha aportado, en muchos casos, información clave para dilucidar los mecanismos a través de los cuales ocurren muchos procesos biológicos fundamentales o acerca de la estructura de diversos sistemas metálicos presentes en los seres vivos [Baran, 1995].

Una parte importante de los modelos de estudio en la Química Bioinorgánica, lo constituyen los denominados complejos de coordinación. Un complejo de coordinación consta de una o más moléculas, denominadas ligantes (**L**), que rodean a un ión o átomo central metálico **Mⁿ⁺**, a través de la formación de un enlace covalente coordinado, así como de un contraión (anión o catión) que mantiene la neutralidad del compuesto, cuando esto es necesario. El número de ligantes alrededor del metal determina el número de coordinación (siendo los valores más comunes 4 y 6). La geometría del complejo depende de dicho número de coordinación y del estado de oxidación del metal. Estos parámetros definen, por tanto, la esfera de coordinación. A los ligantes que interactúan directamente con el ión metálico se les ubica en la esfera de coordinación interna, mientras que a los contraiones se les sitúa dentro de la esfera de coordinación externa. Una tercera esfera, constituye aquella donde interactúan las moléculas del solvente, conocida como esfera de solvatación. Casi la totalidad de los elementos metálicos tienen la capacidad de formar compuestos de

coordinación, en una gran variedad de estados de oxidación y números de coordinación [Cotton y Wilkinson, 2005].

En la práctica médica, los complejos de coordinación utilizados como fármacos han recibido atención limitada en comparación con los compuestos orgánicos, debido a que pueden llegar a ser tóxicos a elevadas concentraciones. Por ejemplo, la observación accidental de la inhibición en el crecimiento de tumores en presencia de ciertos complejos de Pt(II) tales como el *cis*-diclorodiaminoplatino o cisplatino, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], permitió desarrollar una serie de pruebas clínicas que condujeron a su eventual autorización para uso médico. Se cree que la acción anticancerígena del cisplatino resulta de la unión del Pt(II) al DNA al coordinarse con diferentes sitios posibles: los átomos de oxígeno de los grupos polifosfato, cargados negativamente, y/o los átomos de N y O de las bases nitrogenadas. Los estudios realizados *in vitro* con el cisplatino sugieren que el platino puede interactuar con el N1 y N7 de la adenina, el N3 de la citosina y el N7 de la guanina. Este último parece generar una unión especialmente fuerte e, incluso, esta base podría actuar como ligante bidentado del Pt(II) a través de N7 y O6 (Figura 2). Por otra parte, los complejos de hierro han sido y son utilizados en el tratamiento de anemia hipocrómica provocada por la deficiencia de hierro [Baran, 1995].

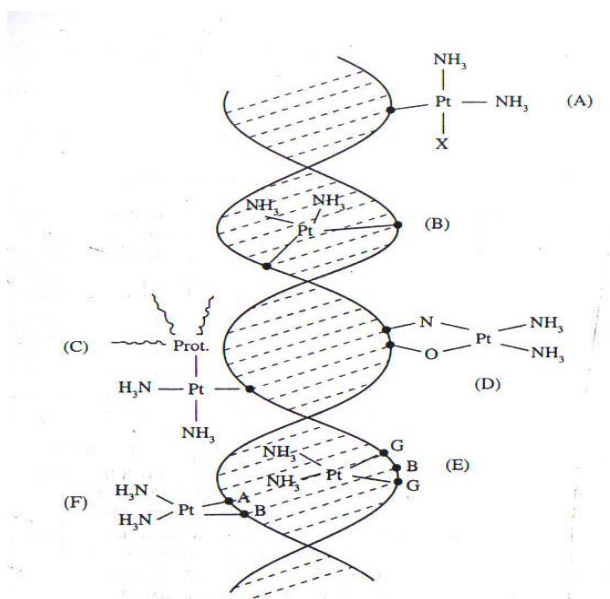
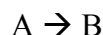


Figura 2. Representación esquemática de la interacción del cisplatino con el DNA: unión monofuncional (A); unión entre cadenas (B); unión DNA/proteína (C); unión a N7 y O6 de una guanina (D); unión a N7 de dos guaninas separadas por una tercera base (E); unión a dos bases diferentes (F) [Baran, 1995].

3.2.1 Actividad peroxidasa de complejos de coordinación

Con el objeto de establecer las definiciones precisas de velocidad de reacción y la acción de los catalizadores, es necesario considerar, como ejemplo clásico, la conversión del compuesto A en el compuesto B



Se puede definir la velocidad de reacción (V), en un momento dado, como la velocidad de formación del producto, en este caso B, o de la velocidad de consumo del sustrato A:

$$V = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{o} \quad V = - \frac{d[A]}{dt} \quad (1)$$

Las unidades de V son moles por litro por segundo $(\text{mol/L})\text{s}^{-1}$, si [B] o [A] indican la concentración molar de B o A. La transformación de cada molécula de A en B es un fenómeno independiente. Así pues, a medida que se consumen las moléculas de A, se reduce el número de moléculas que quedan para transformarse y la velocidad disminuye a medida que la reacción se va produciendo. Matemáticamente, expresamos este hecho afirmando que la velocidad de reacción es proporcional a [A]:

$$V = \frac{d[B]}{dt} = - \frac{d[A]}{dt} = k_1[A] \quad (2)$$

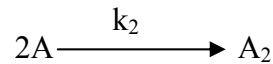
La constante k_1 se denomina constante de velocidad y para esta reacción tiene unidades de (segundos^{-1}) . La constante de velocidad proporciona una medida directa de la rapidez con la que se produce la reacción. Una k_1 elevada indica que la reacción es rápida y una k_1 pequeña indica una reacción lenta. Esta reacción se denomina reacción de primer orden, ya que su velocidad depende de la primera potencia de la concentración del reactante. Si se desea demostrar que una reacción es de primer orden o se desea determinar la constante de

velocidad, resulta más cómodo disponer de una ecuación que describa la forma en la que se modifica la concentración de A con el tiempo durante la reacción. Esta descripción puede obtenerse mediante la integración de la ecuación 2:

$$\int_{[A]_0}^{[A]} d \ln[A] = -k_1 \int_0^t dt \quad (3)$$

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k_1 t \quad (3a)$$

Una reacción de segundo orden se da siempre que dos moléculas entran en contacto para formar productos. Un ejemplo sencillo es:



La velocidad de esta reacción es proporcional a la segunda potencia de la concentración del reactante, ya que la reacción sólo puede producirse cuando colisionan dos moléculas. En esta ecuación, k_2 es la constante de velocidad de segundo orden. Tiene dimensiones de $(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$.

$$V = - \frac{d[A]}{dt} = -k_2[A]^2 \quad (4)$$

Un catalizador reduce la barrera de energía para una reacción, con lo que aumenta la fracción de moléculas que tiene la energía suficiente para alcanzar el estado de transición y de esta forma se logra que la reacción vaya más rápida en ambas direcciones. La presencia de un catalizador no tiene efecto alguno sobre la posición de equilibrio, puesto que la diferencia en las magnitudes de la barrera en las dos direcciones es exactamente la misma en presencia o no del catalizador [Mathews, Van Holde y Ahern, 2002]. Los catalizadores

no son alterados durante el proceso de la reacción ya que se encuentran presentes al final de la reacción en idéntica cantidad y en las mismas condiciones físicas y químicas en las que se encontraban al comienzo de la misma.

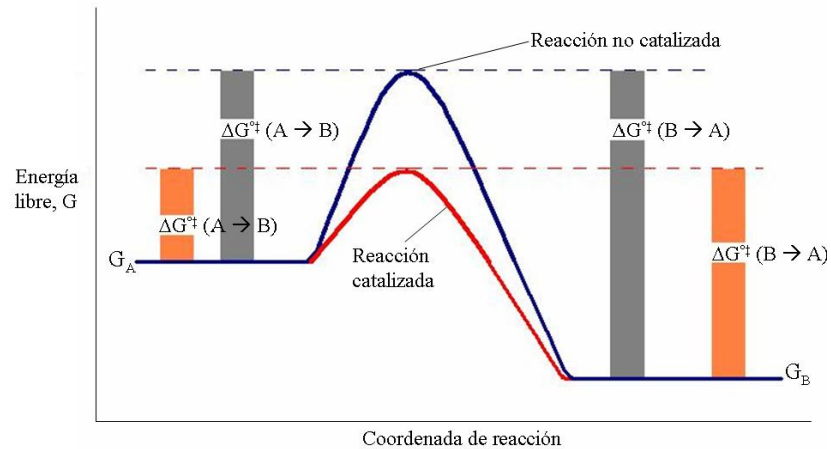


Figura 3. Efecto de un catalizador sobre la energía de activación. El catalizador reduce la energía libre estándar de activación, ΔG^\ddagger , con lo que hay más moléculas de reactante que poseen la energía necesaria para alcanzar el estado de transición disminuido [Mathews, Van Holde y Ahern, 2002].

Las enzimas son proteínas que catalizan una gran cantidad de reacciones biológicas. Como cualquier catalizador, las enzimas aumentan la velocidad de la reacción que facilitan, pero no afectan la constante de equilibrio de ésta. Su acción se produce por una disminución en la energía de activación de las sustancias reaccionantes. Las enzimas no son alteradas por la reacción, pero por ser proteínas, resultan termolábiles y sensibles a los cambios y variaciones del medio ambiente físico en que se hallen.

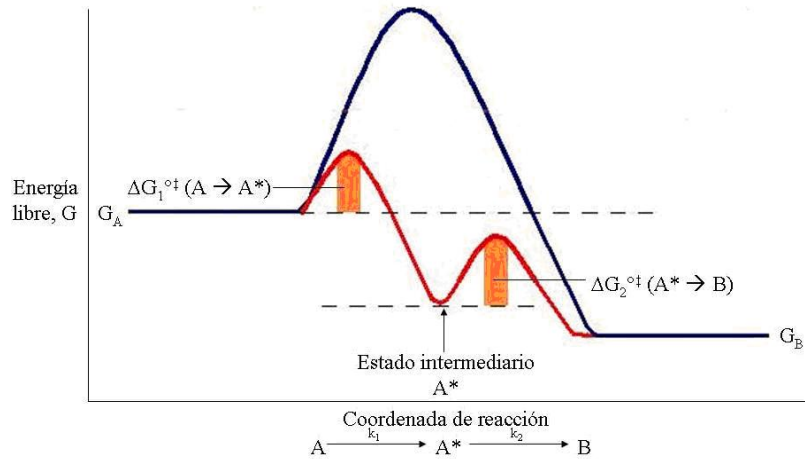


Figura 4. Importancia de los estados intermedios. Es frecuente que una enzima se una al sustrato en una conformación intermedia que asemeja al estado de transición pero con menor energía. Las energías de activación de la formación del estado intermedio y de la conversión del intermedio en el producto (ΔG_1^{\ddagger} y ΔG_2^{\ddagger} , respectivamente) son menores que la energía de activación de la reacción no catalizada [Mathews, Van Holde y Ahern, 2002].

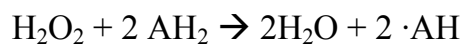
El equilibrio intermedio de una reacción química viene determinado por la Ley de Masas y el catalizador no hace sino disminuir el tiempo para encontrar el equilibrio, pero no lo altera ni lo modifica. Pero el equilibrio puede quedar estancado cuando la enzima o la cantidad de la enzima es igual a los elementos reaccionantes, como puede ocurrir a nivel celular. Usualmente se conoce que una enzima, acelera una reacción desde ambos términos de la ecuación, pero en términos experimentales, diferentes enzimas pueden catalizar procesos recíprocos, ya sea hidrolizando un compuesto y/o sintetizando otro. Además, una de las características más notables de las enzimas es su especificidad, interactuando únicamente con su sustrato. Si alguna enzima no tiene un sustrato de estructura definida, salvo algún tipo particular de enlace, presenta baja especificidad.

Una enzima que contiene un catión metálico como grupo prostético y cuya participación es esencial para el proceso catalítico, recibe el nombre de metaloenzima. Estas se clasifican en dos grupos: 1) aquellas en las que el metal está fuertemente unido a la proteína, y 2) aquellas que contienen al metal en forma fácilmente dissociable y son llamadas enzimas activadas por metales. Estas enzimas, para llevar a cabo su actividad catalítica, dependen de la participación de estructuras no proteicas o cofactores, que pueden actuar directamente en el proceso catalítico y en otras actúa como transportador transitorio de algún grupo funcional específico. El cofactor puede ser un ión metálico como Mg(II), Zn(II) o Cu(II), que cuando está fuerte y permanentemente unido a la proteína es realmente un grupo

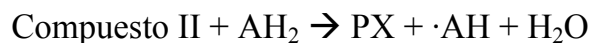
prostético, una molécula orgánica compleja como el difosfato de tiamina (derivado de la vitamina B₁) o un compuesto organometálico (derivados de la vitamina B₁₂). A este tipo de moléculas suele llamárseles coenzimas [Baran, 1995].

De todos los radicales existentes, resultan de especial interés las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de dichas especies, tales como los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como respuesta a estímulos externos e internos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, sin embargo, altas dosis o una eliminación inadecuada de ROS dan lugar al denominado estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas [Sánchez-Gaytán, 2005]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido o los radicales hidroxilo son conocidos por dañar componentes biológicos esenciales y por provocar daño a las membranas celulares. Estas especies reactivas están involucradas en la iniciación, propagación y mantenimiento de los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Los sistemas de defensa celular requieren mecanismos que inhiban a las ROS para proteger las membranas celulares y otros componentes celulares del daño oxidativo y por esto los seres vivos han desarrollado un gran número de mecanismos de defensa para sobrellevar este estrés oxidativo. Las *enzimas antioxidantes* son esenciales para las células aeróbicas, puesto que mantienen dentro de niveles aceptables las concentraciones de especies químicas conocidas como radicales libres, que se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas.

La función de las peroxidasas (PX) consiste esencialmente en la oxidación de sustratos orgánicos haciendo uso de H_2O_2 como agente reductor [English, 1995]. La reacción global que representa a la función realizada por las peroxidasas es escrita de la siguiente manera:



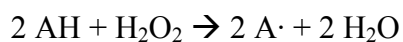
Donde AH_2 representa a una molécula de sustrato donador de hidrógeno generalizado. La reacción anterior puede ser desglosada en tres etapas de reacción, cada una representada por las siguientes ecuaciones químicas:



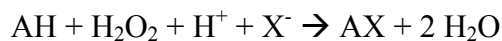
Las peroxidasas realizan una gran variedad de funciones biosintéticas y degradativas mediante el uso de compuestos tipo peróxido, en especial H_2O_2 , como oxidante [Carranza-Téllez, 2005]. Acorde a la secuencia homóloga de aminoácidos y a las características estructurales conocidas, las peroxidasas han sido agrupadas generalmente en tres superfamilias: la superfamilia de peroxidasas de plantas, la cual incluye tanto a las peroxidasas de hongos como también a algunas peroxidasas presentes en bacterias, la superfamilia de peroxidasas en animales y, por último, a una superfamilia de peroxidasas que no se ajusta a ninguna de las mencionadas anteriormente.

La superfamilia de peroxidasas de plantas es la familia más estudiada y además está dividida en tres clases: las peroxidasas con linaje procariótico, las peroxidasas de hongos y las peroxidasas secretorias clásicas de plantas. Cada una de estas clases es conocida como clase I, clase II y clase III, y ejemplos de cada una de estas son la citocromo c peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la peroxidasa de rábano, respectivamente [Bertini, *et al*, 2001]. La peroxidasa de rábano (*horse radish peroxidase*), en especial la isoenzima C (HRPC) representa el ejemplo clásico de la extensa variedad de peroxidasas secretorias en plantas [Howes *et al*, 1999]. La función biológica de las peroxidasas en particular es la oxidación monoelectrónica de sustratos como es el citocromo c, fenoles, aminos, lignina, etc. La especie activa responsable de estas reacciones ha sido propuesta como el compuesto I ($\text{O}=\text{Fe}(\text{IV})$ proteína•). Las reacciones catalizadas por peroxidasas pueden ser agrupadas dentro de cuatro categorías.

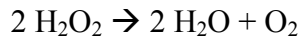
1) Deshidrogenación Oxidativa



2) Halogenación Oxidativa



3) Dismutación de H₂O₂



4) Reacción de transferencia de Oxígeno



[Colonna *et al*, 1999].

La importancia de las peroxidasas en la naturaleza está acentuada por su amplia distribución entre los organismos vivos y su multiplicidad en procesos fisiológicos. Sin embargo, no todas las peroxidasas conocidas contienen hemo (algunas utilizan vanadio o selenio, como la glutatión peroxidasa). Sin embargo, la gran mayoría poseen este grupo.

De esta forma, nuestro conocimiento acerca de la relación existente entre estructura y función, además de los mecanismos catalíticos de peroxidasas está basado en el trabajo realizado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). HRP es la peroxidasa con la especificidad más amplia para llevar a cabo un proceso de deshidrogenación oxidativa, siendo capaz de producir una gran variedad de compuestos útiles. Ésta es una hemoenzima de aproximadamente 40 000 Da y se encuentra en la raíz de la planta de rábano blanco. Aproximadamente el 18% de su peso es debido a la mitad de carbohidratos enlazados covalentemente (figura 4). La función biológica específica, el potencial de reducción del hierro y la naturaleza de los sustratos que pueden ser oxidados, están fuertemente determinados por las características estructurales de la proteína alrededor del grupo prostético [Sánchez-Gaytán, 2004]. La peroxidasa de rábano desempeña una función catabólica *in vivo* utilizando como sustrato la fitohormona ácido acético 3-indol, de ahí que esta hemoproteína sea considerada como una enzima importante en el crecimiento celular. La peroxidasa de rábano utiliza *in vitro* una gran variedad de fenoles aromáticos y aminas como donadores monoeléctricos con la finalidad de reducir los dos compuestos intermediarios implicados en la función catalítica que realiza.

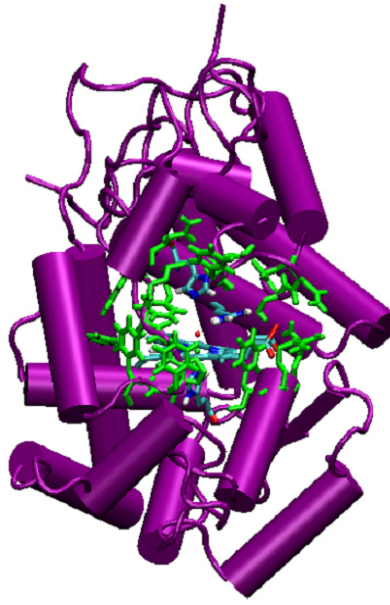


Figura 5. Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano. Los residuos del sitio activo son indicados en color verde [Armstrong, Tidor y Cheng, 2006].

De manera particular, son consideradas dos características principales como responsables de la especificidad de la función biológica: el fuerte carácter aniónico del ligante proximal al hierro, el cual tiene la capacidad de estabilizar estados de oxidación altos y la naturaleza hidrofílica de los residuos en el hueco distal. Aunado al correcto potencial de reducción para que se lleve a cabo la reacción de oxidación, la especificidad hacia diferentes sustratos también depende del arreglo estructural de la proteína, lo cual determina sitios específicos de enlace para sustratos y mediadores.

A pesar de que existe poca homología entre las peroxidosas, la coordinación del hierro y de la mayoría de los residuos en el sitio activo es completamente conservada en las peroxidosas secuenciadas hasta ahora. El hierro es invariablemente pentacoordinado, las cuatro posiciones ecuatoriales corresponden a los N del anillo porfirínico y la quinta posición corresponde a una histidina axial (Figura 6).

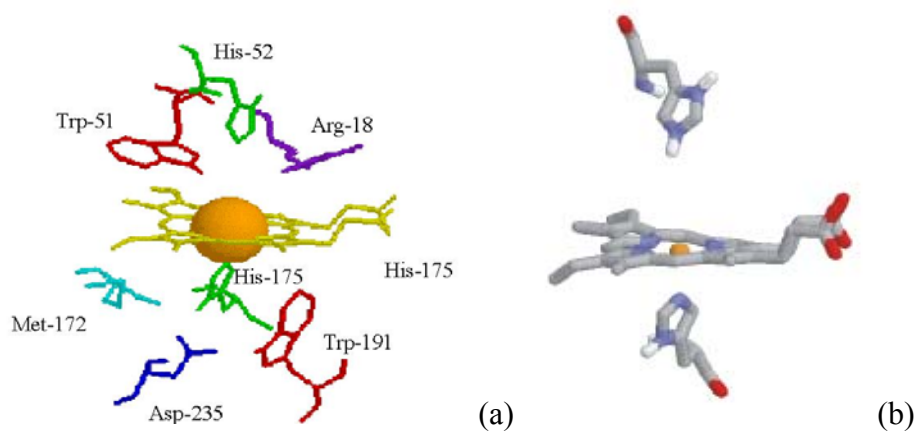


Figura 6. (a) Sitio activo de la Citocromo C oxidasa. (b) Sitio activo de la HRP [Carranza-Téllez, 2004; Armstrong, Tidor y Cheng, 2006].

Este residuo se caracteriza por tener un carácter aniónico debido a la presencia de un enlace de hidrógeno entre el N del anillo de una histidina (His) y de un residuo de ácido aspártico (Asp). Esta propiedad del ligante axial contribuye a disminuir el potencial de reducción negativo del hierro, lo cual estabiliza altos estados de oxidación, un requisito necesario para la estabilización de las especies activas conocidas como compuesto I y compuesto II. El estado pentacoordinado del hierro en las peroxidasas esta determinado por la presencia de un ligante histidinato axial fuerte, el cual empuja al hierro fuera del plano del hemo, lo cual evita que una molécula de agua se enlace en la otra posición axial, aunado a las propiedades de la cavidad distal ya que los residuos hidrofílicos estabilizan un considerable cúmulo de moléculas de agua, a través de una red de puentes de hidrógeno, la cual, junto con el enlace Fe-N₂, evita que una molécula de agua se coordine al hierro.

También la peroxidasa de rábano se caracteriza por la presencia de dos iones calcio, los cuales esencialmente desempeñan un papel estructural. Un sitio de enlace se localiza en el dominio de la parte proximal y está formado por ocho átomos de oxígeno proporcionados por la estructura de la cadena lateral de residuos. El ión calcio se encuentra fuertemente unido debido a que su sitio de enlace no es accesible para el volumen del solvente. El sitio de enlace de calcio distal, posee siete átomos de oxígeno suministrados por la estructura de la cadena lateral de aminoácidos y por dos moléculas de agua. Ambos iones calcio son relevantes para mantener la estructura del sitio activo. En realidad, ambos iones calcio se coordinan a los residuos correspondientes de las hélices que forman los sitios proximal y

distal. Además, un ligante de cada ión calcio corresponde al residuo inmediato que se sigue a la histidina distal y proximal, respectivamente [Carranza-Téllez, 2004].

3.2.1.1 Estudios previos de complejos de coordinación con actividad peroxidasa

Existen muy pocos estudios empleando diferentes compuestos de coordinación para la determinación de la actividad peroxidasa de los mismos. La mayoría de ellos han probado compuestos de coordinación con selenio, sin embargo, algunos otros han sido empleando metales de transición para reproducir la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano. Un ejemplo es el propuesto por Xiang-Guang *et al*, [2004], en el que se evaluaron las reacciones de hidroquinona con peróxido de hidrógeno que fueron catalizadas por los iones de metales de transición Cu(II), Fe(II), Fe(III), Co(II) y Mn(II) en solución acuosa a 25°C. Además, se sintetizaron dos complejos de cobre (bis(dimetilglioxima)cobre(II) y ioduro de 5,7,7,12,14,14-hexametil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradeca-4,11-dienatocobre(II)). Sus actividades catalíticas sobre esta oxidación fueron determinadas cinéticamente en solución acuosa y en una solución micelar de bromuro de cetiltrimetilamonio a 25°C. Se establecieron las ecuaciones cinéticas para la catálisis micelar y metalomicelar, respectivamente. Las micelas en CTAB incrementaron la velocidad de reacción debido a sus efectos electrostáticos y de concentración sobre los sustratos y/o intermediarios. Las metalomicelas exhibieron una actividad catalítica remarcable sobre esta reacción de oxidación, la cual es atribuida a los efectos del sitio activo y su microambiente. La presencia de co-ligantes de imidazol (o piridina) incrementa remarcablemente la actividad catalítica del complejo metálico en el sistema micelar en contraste con la disminución de la actividad del complejo en solución acuosa. Las metalomicelas podrían ser tratadas como modelos miméticos de peroxidasa.

En otro estudio realizado por Carranza-Téllez [2005], se sintetizó el ligante tipo “clip” piridinadicarbonil-bishistidina [PDC(His)₂], que fue complejado con Fe(III)-protoporfirina IX para evaluar su actividad peroxidasa en presencia de guayacol y peróxido de hidrógeno. Dicho complejo fue sintetizado en fase sólida y en fase líquida, y fue caracterizado por espectroscopía infrarroja, UV-VIS y de RMN de ¹H y ¹³C. Se observó en los espectros de UV-VIS para el complejo PDC(His)₂-Hemina, cambios que sugieren la presencia de una

mezcla de complejos con los estados de alto y bajo espín de Fe (III). El complejo PDC(His)₂-Hemina presenta actividad catalítica del tipo peroxidasa, mostrando una k_{cat} con un valor de 8.064×10^4 , siendo este menor en tres ordenes de magnitud que la k_{cat} reportada para la peroxidasa de Horseradish, pero mayor que la k_{cat} reportada para la mioglobina. Además, se obtuvo un cristal de ácido dipicolínico correspondiente a un nuevo ordenamiento supramolecular del mismo complejo. De esta forma, con este compuesto se logró reproducir el comportamiento espectroscópico de una peroxidasa obteniendo así un modelo funcional de dicha enzima.

3.2.2 Toxicidad de complejos de coordinación en modelos biológicos

3.2.2.1 Microorganismos

Como ya se mencionó, muchos complejos de coordinación son empleados como agentes antimicrobianos en la práctica médica o en la conservación de materiales aprovechando las características tóxicas del metal y/o del ligante. En un estudio realizado por Kasuga *et al*, [2003] se sintetizaron y caracterizaron por análisis elemental, termogravimétrico y térmico diferencial y por espectroscopía de IR y UV-VIS, doce complejos de Zn(II) con los ligantes tiosemicarbazona y carbazona, y además se obtuvieron siete estructuras moleculares de complejos de Zn(II) que fueron determinadas por difracción de rayos X (Figura 6). Las actividades antimicrobianas de los compuestos sintetizados fueron determinadas mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI) contra cuatro especies de bacterias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), dos de levaduras (*Candida albicans* y *Saccaromyces cerevisiae*) y dos de hongos (*Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum*). Los complejos coordinados en 5- y 6- con zinc y un ligante tiosemicarbazona tridentado (Hatsc), $[Zn(Hatsc)(OAc)]_n$, $[Zn(Hatsc)_2](NO_3)_2 \cdot 0.3H_2O$, $[ZnCl_2(Hatsc)]$ y $[Zn(SO_4)(Hatsc)(H_2O)] \cdot H_2O$ [Hatsc = 2-acetilpiridina(tiosemicarbazona)], mostraron actividad antimicrobiana contra los organismos probados y dicha actividad fue diferente de la observada con los ligantes libres o los compuestos iniciadores de Zn(II). Especialmente, el compuesto $[Zn(Hatsc)_2](NO_3)_2 \cdot 0.3H_2O$ mostró actividad antimicrobiana muy eficaz contra *P.*

aeruginosa y *C. albicans* y actividad antimicrobiana moderada contra *S. cerevisiae* y los dos hongos. Estos resultados contrastaron con los resultados obtenidos para los complejos coordinados en 5- y 6- con zinc y con una molécula de 2-acetilpiridina-⁴N-morfolinatiosemicarbazona, $[\text{Zn}(\text{mtsc})_2] \cdot 0.2\text{EtOH}$, $[\text{Zn}(\text{mtsc})-\mu-(\text{OAc}-\text{O}, \text{O}')]_n$ y $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2(\text{Hmtsc})]$ [$\text{Hmtsc} = 2\text{-acetilpiridina-}^4\text{N-morfolil tiosemicarbazona}$)] ya que estos últimos no mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias, levaduras y hongos. El complejo $[\text{Zn}(\text{SO}_4)(\text{Hatsc})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$, que fue isoestructural al complejo $[\text{ZnCl}_2(\text{Hatsc})]$, mostró una ligera actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram positiva *B. subtilis*. Los complejos 1:1 de zinc(II) con ligantes tiosemicarbazona pentadentados, $[\text{Zn}(\text{dmtsc})]_n$ y $[\text{Zn}(\text{datsc})]_n$ [$\text{H}_2\text{dmtsc} = 2, 6\text{-diacetilpiridina bis}^4\text{N-morfolil tiosemicarbazona}$) y $\text{H}_2\text{datsc} = \text{-diacetilpiridina bis(semicarbazona)}$], mostraron actividad antimicrobiana moderada contra bacterias. Con base en las estructuras de rayos X, se elucidó la correlación estructura-actividad para la actividad antimicrobiana, ya que las diferencias observadas entre los complejos de Zn(II) indicaron que un factor importante para las actividades antimicrobianas de los complejos de Zn(II) es su capacidad para formar puentes de hidrógeno intermoleculares por el menor volumen de los ligantes, en lugar del número de coordinación de los átomos donadores, la carga del complejo (neutro vs. catiónico), la solubilidad o la hidrofobicidad. Estas características sugirieron que los factores estructurales que regulan la actividad antimicrobiana son significativamente dependientes de los iones metálicos centrales.

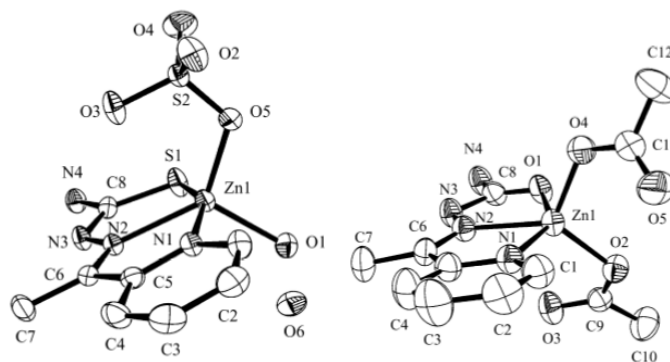


Figura 7. Estructura tridimensional de dos complejos representativos de Zn-tiosemicarbazona y Zn-semicarbazona [Kasuga *et al.*, 2003].

Nomiya *et al* [2004] sintetizaron y caracterizaron algunos complejos de Ag(I), Al(III) y Co(II) con 4-isopropiltropolona (hinokitiol), para determinar su actividad antimicrobiana. Los iones metálicos estuvieron coordinados por medio de dos átomos donadores de oxígeno no equivalentes del ligante hinokitiol (hino; C₁₀H₁₂O₂; 4-isopropiltropolona). Dicho ligante mostró actividad antimicrobiana en estudios previos. Además, el complejo dimérico de Ag(I) enlazado con oxígeno ([Ag(hino)]₂), el complejo monomérico de Al(III) [Al(hino)₃]•0.5H₂O y el complejo de Co(II) [Co(hino)₂]₂•H₂O fueron sintetizados y caracterizados por análisis elemental, termogravimétrico y térmico diferencial (TG/DTA), espectroscopía de infrarrojo de transformadas de Fourier (FTIR) y espectroscopía de RMN en solución (¹H y ¹³C). La estructura cristalina del complejo [Ag(hino)]₂ fue determinada por el análisis de Rietveld basado en los datos de difracción de rayos X en polvo (XPD), debido a que dicho complejo fue fotosensible y, en consecuencia, inestable, y las estructuras de los complejos [Al(hino)₃]•0.5H₂O y [Co(hino)₂]₂•H₂O fueron determinadas por un análisis sencillo de difracción de rayos X. Se comparó la actividad antimicrobiana de los complejos de Ag, Al y Co con hino, en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, entre otros microorganismos, con la de otros complejos metálicos con especies aniónicas de hino⁻ como ligante (M = Na, Li, Cs, Ca, V, Zn), y fue determinada con la técnica concentración mínima inhibitoria (CMI; µg mL⁻¹). La actividad antimicrobiana del complejo de Ag-hino se incrementó de manera significativa, mientras que en el caso de los demás complejos metálicos ésta se vio suprimida, comparada con la observada para las moléculas de Hhino neutro y las aniónicas de hino⁻. La actividad antimicrobiana observada en este mismo complejo fue comparable con la determinada para complejos de Ag(I) enlazada con oxígeno, ya que los ligantes por sí solos no mostraron tal actividad. De esta forma fue propuesto que la actividad antimicrobiana de los complejos de Ag(I) enlazados con oxígeno se debe a una interacción directa o complejación del ión de Ag(I) con ligantes biológicos como proteínas, enzimas y membrana, y los ligantes coordinados en el complejo de Ag(I) juegan el papel de transportadores del ión Ag(I) en el sistema biológico.

En otro estudio realizado por Carcelli *et al* [1995] se investigaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas de cinco 2,6-diacetilpiridina bis(acilhidrazonas) [acil: benzoil, H₂dapb; 2-aminobenzoil, H₂dapab; saliciloil, H₂daps; picolinoil, H₂dappc; 2-tenoil, H₂dapt) y de una serie de sus complejos de coordinación con cinco metales de transición

(Fe, Co, Ni, Cu y Zn) por la técnica CMI. También fue determinada la estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}(\text{dapt})]_2$, que estaba constituido por unidades diméricas en las cuales dos átomos de cobre presentan coordinación hexagonal. La determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* mostró que algunos de los complejos (Fe, Ni y Zn) exhibieron buena actividad contra bacterias Gram positivas. En varios casos, los complejos mostraron una actividad similar a la de los ligantes libres o reducida. Sólo se observó en los complejos de hierro que fueron más activos que los agentes quelantes involucrados. Además, ninguno de los complejos mostró actividad fúngica significativa. La genotoxicidad de los compuestos sintetizados fue determinada *in vitro* con el ensayo-rec (ensayo que evalúa las propiedades potenciales de los compuestos para dañar el DNA) en *Bacillus subtilis* y el ensayo de reversión en microsomas de *Salmonella*, probando los compuestos a concentraciones subletales en microsomas de hígado de rata. No se detectó daño a DNA en el ensayo-rec con *B. subtilis*. Finalmente, se observó que en la mayoría de los casos, las propiedades genotóxicas de los ligantes desaparecen cuando se encuentran complejados con metales.

En otro estudio realizado por Mohamed [2006] se reportó la síntesis y la caracterización por análisis elemental, IR, reflexión de sólidos, momento magnético, conductividad molar y análisis térmico (TGA), de algunos complejos metálicos derivados de 2,6-piridinacarboxaldehidobis(p-hidroxifenilimina) [ligante 1 (L_1)], y de 2,6-piridinadicarboxaldehidobis(o-hidroxifenilimina) [Ligante 2 (L_2)] (Figura 8). Se encontró que los complejos tenían la fórmula $[\text{MX}_2(\text{L}_1 \text{ o } \text{L}_2)] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, donde $\text{M} = \text{Fe}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{X} = \text{Cl}$ en el caso de los complejos de $\text{Fe}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II})$ y $\text{Cu}(\text{II})$, y Br en el caso de los complejos de $\text{Zn}(\text{II})$ y $n = 0-2.5$. Los datos de conductividad molar revelaron que los quelatos eran no-electrolitos. Los espectros de IR mostraron que los ligantes (o bases de Schiff) estaban coordinados a los iones metálicos de manera tridentada con sitios donadores NNN de la piridina-N y dos de azometina-N. De los espectros de reflexión de sólidos y magnéticos se encontró que la estructura geométrica de estos complejos fue de bipirámide trigonal (en el caso de los complejos de $\text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$) y octaédrica (en el caso de los complejos de $\text{Fe}(\text{II})$). El comportamiento térmico de estos quelatos muestra que los complejos hidratados pierden moléculas de agua de la hidratación en la primera etapa seguida inmediatamente por la salida del agua coordinada,

de aniones y ligantes (L_1 y L_2) en las etapas posteriores. Además de lo anterior, se determinó la actividad antimicrobiana de los ligantes sintetizados y sus complejos de coordinación contra las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y contra un hongo (*Candida* sp.). Los resultados obtenidos mostraron que los complejos metálicos fueron agentes antimicrobianos más poderosos que los ligantes orgánicos parentales contra una o más especies bacterianas. La actividad antimicrobiana notoria de los dos ligantes base de Schiff puede surgir a partir de los grupos piridil-N e hidroxilo, así como la presencia de dos grupos imino que son importantes al elucidar el mecanismo de las reacciones de transformación en sistemas biológicos. Además, al incrementar la concentración de los complejos en las pruebas se demostró que ésta juega un papel vital al incrementar el grado de inhibición del crecimiento. Es sugerido que los complejos que presentan actividad antimicrobiana pueden actuar sobre el microbio matándolo o inhibiendo su multiplicación bloqueando sus sitios activos.

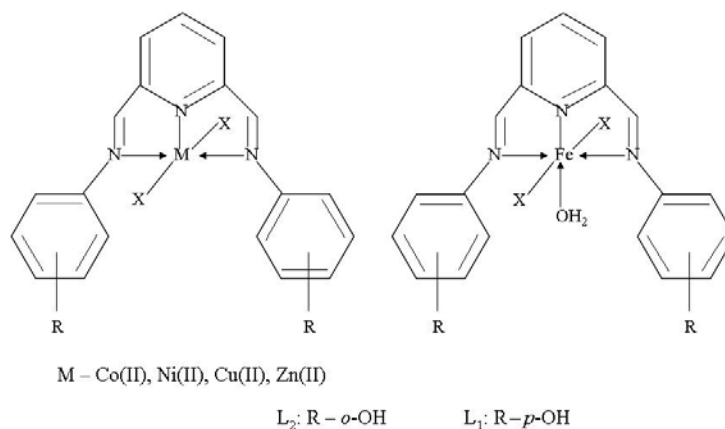


Figura 8. Estructura de los complejos L_1 y L_2 [Carcelli *et al.*, 1995]

Finalmente, Zamudio-Rivera *et al* [2005] sintetizaron y caracterizaron cinco compuestos organometálicos a base de Sn(IV), empleando como reactivos salicilaldehído, β -amino alcoholes y óxido de di-n-butilestano(IV) u óxido de difenilestano(IV). Todos los compuestos fueron caracterizados por IR, espectroscopía de RMN ^1H , ^{13}C y ^{119}Sn , y análisis elemental; además, los complejos de estaño fueron caracterizados por difracción de rayos X. Después de la caracterización estructural, todos los compuestos fueron probados *in vivo* contra *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Desulfovibrio longus*, y *Desulfomicrobium aspheronum*, para determinar su actividad antimicrobiana. Esto se logró midiendo la

toxicidad aguda de los complejos usando pruebas de toxicidad luminiscente en bacterias (LBT-Microtox), rastreando así su impacto. Dos de los compuestos mostraron un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias aeróbicas y anaeróbicas, sobre todo para el caso de *P. aeruginosa*. La variación en la efectividad de los compuestos antimicrobianos dependió de su permeabilidad en la pared celular bacteriana. Un posible mecanismo de acción, basado en la estructura química de los compuestos, involucra la formación de enlaces X-Sn (X = N_{bases púricas y pirimídicas}, O_{carboxilato}) en centros biológicos activos interfiriendo así con los procesos celulares normales.

3.2.2.2 Células de mamífero, sistemas subcelulares y modelos animales

La evaluación de la actividad de algunos complejos de coordinación en cultivos de células de mamífero y organelos, permiten la determinación la actividad citotóxica de los mismos, y además se ha logrado la obtención de fármacos que pueden ser empleados como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, estos compuestos suelen ser tóxicos de manera moderada o severa para los sujetos tratados y su actividad citotóxica es observada en muchos casos.

En un estudio realizado por Afrasiabi *et al* [2005] se sintetizaron y caracterizaron espectroscópicamente (difracción de rayos X, espectroscopía de IR, UV-VIS y RMN) dos complejos de Ni(II)-*o*-naftoquinona tiosemicarbazona y Ni(II)-naftoquinona semicarbazona (Figura 9). Además, se hizo la determinación de la actividad biológica de los ligantes y los complejos por ensayo citotóxico en la línea celular de cáncer de seno MCF-7, mediante el uso de sulforrodamina B, que es un compuesto que se adhiere únicamente a la membrana de las células vivas. La estructura determinada mediante el análisis de difracción de rayos X de los complejos metálicos sintetizados describió una coordinación octaédrica distorsionada con dos ligantes monodesprotonados tridentados. Los estudios de actividad anticancerígena *in vivo* revelaron que los derivados de semicarbazonas junto con sus complejos de Ni(II) fueron más activos en la inhibición de la proliferación celular que sus análogos tiosemicarbazonas, probablemente porque la complejación de los ligantes con Ni(II) ocasiona que estos compuestos sean más lipofílicos, y además de eso la complejación

del metal, al ser útil como vehículo para el ligante, podría permitir su activación como agente citotóxico.

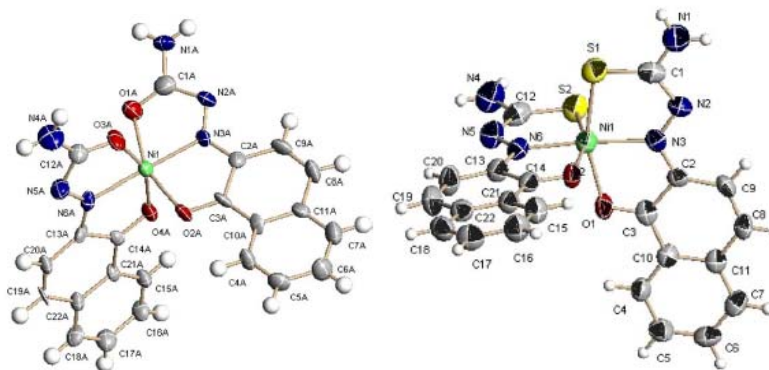


Figura 9. Estructura tridimensional de los complejos Ni-NQSC y Ni-NQTS [Afrasiabi *et al*, 2005].

Otro estudio realizado por Ainscough *et al* [1999] reportó la síntesis y caracterización de una serie de derivados de salicilaldehído benzoilhidrazonas, de sus complejos con Cu(II) y de una serie de complejos con los ligantes no sustituidos y diferentes metales de transición (Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(II), y Cr(III)). Se aplicó un análisis de citotoxicidad (uso de sulforrodamina B) a cada uno de los complejos sintetizados sobre la línea celular de cáncer de colon HCT-8. Un análisis sobre las relaciones cualitativas y cuantitativas entre estructura y actividad (QSARs) reveló que la toxicidad del ligante está estrechamente correlacionada con sus factores electrónicos y de transporte, y puede ser modelada tratando cada “cara” de la molécula como una unidad aislada. La actividad se incrementa cuando los sustituyentes en el anillo benzoil son aceptores de electrones, mientras que para el anillo de salicilaldehído es requerida una donación de electrones. La citotoxicidad de los complejos de Cu(II) fue mayor que la observada en los demás complejos con metales de transición.

Flood-Garibay [2006] sintetizó, caracterizó (espectroscopía IR, UV, Análisis Elemental, Momento Magnético, EPR y Conductividad), y evaluó la actividad biológica *in vitro* (ensayo de inhibición de la proliferación celular y tinción con Sulforrodamina B) en distintas líneas tumorales humanas [HeLa (carcinoma de cérvix), PC-3 (carcinoma de próstata), HCT-15 (adenocarcinoma rectal), y SKLU (adenocarcinoma de pulmón)], de compuestos pertenecientes a la familia de las Casiopeínas[®] (compuestos de coordinación del tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$, donde (N-N) = 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y (N-O) = α -

amino ácidos), a los que se les atribuye actividad anticancerígena. En el ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento celular se encontró que los compuestos ternarios de cobre sintetizados fueron activos en todas las líneas celulares probadas; mostrando una mayor actividad en la línea celular HeLa de acuerdo al análisis con sulforrodamina B. Igualmente se concluyó que los compuestos exhibieron una actividad mayor al cisplatino, que fue usado como control negativo para comparar la efectividad en la inhibición del crecimiento celular. Por otro lado se encontró que la actividad biológica de los compuestos se incrementa al aumentar la cadena lineal principal del α -aminoacidato coordinado en las líneas celulares PC-3 y HCT-15.

En otro estudio realizado por Marín-Hernández *et al* [2003], para elucidar algunos de los mecanismos subcelulares y bioquímicos de toxicidad de las Casiopeínas®, fueron expuestas a ellas mitocondrias y células. Se midió en mitocondrias aisladas de células de hígado, riñón y corazón de rata, y en células de hepatoma AS-30D, la tasa de respiración, el gradiente de protones y las actividades de las enzimas succinato (SDH) y 2-oxoglutarato deshidrogenasas (OGDH) y de la ATPasa. También fue determinada la tasa de respiración sensible a oligomicina y el contenido de ATP en las células de hepatoma AS-30D. Las Casiopeínas® (CS) II-gly y III-i (Figura 10) inhibieron las tasas de respiración estimulada por ADP y respiración no acoplada en mitocondria. La CS-II fue mucho más potente que la CS-III. La sensibilidad a la CS-II fue de 4-5 veces mayor en las mitocondrias incubadas con 2-oxoglutarato que con succinato. Así, a bajas concentraciones [≤ 10 nmol (mg de proteína)⁻¹; 10 μ mol) la CS-II alteró las funciones mitocondriales sólo cuando el 2-oxoglutarato estuvo presente, debido a una inhibición específica de la 2-OGDH. A altas concentraciones [≥ 15 nmol (mg de proteína)⁻¹], la CS-II indujo la estimulación de la respiración basal, seguida de una fuerte inhibición, la cual se correlacionó con un aumento de la dependencia de K⁺ y la liberación del citocromo C, respectivamente; el canal de K⁺ abierto induce una respuesta mitocondrial similar. Las mitocondrias de hígado, riñón y hepatoma mostraron una sensibilidad similar hacia la CS-II, mientras que las mitocondrias del corazón fueron más resistentes. La fosforilación oxidativa y el contenido de ATP también disminuyeron en las células tumorales en presencia de CS-II. De esta manera, los datos obtenidos mostraron que la CS-II puede interactuar directamente con las mitocondrias, ya sea de manera aislada o junto con las células intactas, induciendo una gran variedad de efectos en diferentes sitios,

los cuales causan la inhibición de la fosforilación oxidativa y, eventualmente, la inhibición de la síntesis de ATP, lo cual podría comprometer los procesos dependientes de energía tales como la división celular.

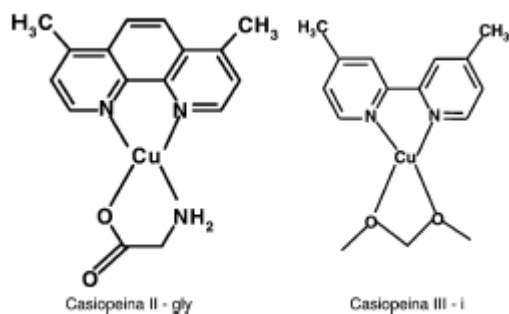


Figura 10. Estructura química de las Casiopeínas ® (Marín-Hernández *et al*, 2003)

Gracias a la evaluación de la toxicidad de complejos de coordinación sobre modelos animales se ha logrado obtener una perspectiva real de los efectos que dichos compuestos podrían tener sobre la salud humana, y además de lo anterior, se puede decidir el uso de tratamientos en pacientes con problemas tales como infecciones bacterianas y virales, problemas gastrointestinales y cáncer, entre otros casos. De Vizcaya-Ruiz *et al* [2003] evaluó la respuesta hematotóxica en ratas adultas causada por la administración de Casiopeína II (CII), que es un complejo de coordinación a base de Cu(II), al que se le atribuye actividad anticancerígena por inhibir el crecimiento de células HeLa (carcinoma cervical humano), CaLo (cáncer de colon) y de leucemia de roedores cepa L210. Se aplicaron 1, 3 y 5 mg/kg de CII a los animales por vía intravenosa y posteriormente se aplicaron 5 mg/kg de CII durante 5 y 15 días después de la primera dosis. Además de lo anterior, se hizo una citometría hemática y un análisis histopatológico del bazo para corroborar trastornos en el sistema hematopoyético. El principal efecto tóxico que fue atribuido a la administración de CII (dosis de 5 mg/kg) en las ratas fue una anemia hemolítica (concentración de hemoglobina reducida, glóbulos rojos y paquete celular total, acompañada por una leucocitosis neutrofílica muy evidente) a las 12 horas y 5 días después de la administración, atribuida a un daño directo sobre los eritrocitos. También se observó un incremento en el nivel de reticulocitos y la presencia de normoblastos en sangre periférica 5 días después de la administración indicando una respuesta eritropoyética

efectiva con recuperación a los 15 días. Además de lo anterior, se observó un incremento en el tamaño del bazo y una congestión de la pulpa roja con eritrocitos, que fue consistente con un aumento en la toma de eritrocitos dañados por el sistema reticuloendotelial observado por histopatología y microscopía electrónica. También se observó un incremento en la hemopoyesis extramedular a los 5 días como consecuencia de una respuesta eritropoyética regenerativa con una recuperación efectiva a los 15 días. Los cambios morfológicos en la celularidad del bazo fueron consistentes con la hematotoxicidad, principalmente dados por una reducción de la proporción pulpa roja/pulpa blanca, un incremento en el contenido de eritrocitos a las 12 horas y una infiltración de células nucleadas en la pulpa roja a los 5 días, con una tendencia hacia la recuperación a los 15 días después de la administración. El daño a los eritrocitos fue atribuido a la generación de radicales libres y al daño oxidativo en la membrana celular como resultado de la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la posible disociación del complejo CII.

3.2.3 Síntesis, caracterización y actividad biológica de complejos metal-antiinflamatorio.

Debido a la posibilidad de uso como antiinflamatorios muy potentes, o para determinar su efecto sobre sistemas biológicos, se han elaborado diferentes estudios con complejos de coordinación a base de fármacos antiinflamatorios. Kovala-Demertzi *et al* [1998] describieron diferentes complejos de coordinación con diclofenaco y los siguientes iones metálicos: Mn(II), Co(II) y Ni(II). Estos complejos fueron preparados con la reacción de la sal sódica del fármaco y las sales metálicas MnCl₂, CoCl₂ y NiCl₂•6H₂O. En este estudio se reportaron propiedades ópticas, EPR, infrarrojas y electroquímicas de los complejos sintetizados. Se aislaron especies hepta y hexacoordinadas en estado sólido para el complejo de Co(II). Para el complejo Ni(II) se aislaron especies tetra y hexacoordinadas, mientras que en solución de DMF o MeOH se observa la predominancia de especies hexacoordinadas para los complejos de Co(II) y Zn(II). También se determinó la capacidad de los complejos para catalizar la oxidación de 3,5-di-ter-butil-*o*-catecol a 3,5-di-ter-butil-*o*-quinona monitoreando la aparición de la quinona espectrofotométricamente. De esta forma, se reportó la correlación de la actividad catalítica con el potencial redox de estos

complejos, que podría aplicarse, en cierta forma, como su posible potencial antiinflamatorio.

En otro estudio realizado por Zhou *et al* [2000], se reportó la síntesis y la caracterización estructural y espectroscópica de complejos con zinc e indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético). Se obtuvieron complejos monoméricos y diméricos, y de esta forma este estudio fue el primer ejemplo de la forma monomérica y dimérica de la coordinación del grupo carboxilato con el átomo de zinc. Fue determinada la estructura cristalina de los complejos Zn-Indo con N, N-dimetilacetamida (DMA), piridina (Pyr), 1-metil-2-pirrolidinona (NMP), EtOH y MeOH como solventes ligantes, $[Zn_2(Indo)_4(DMA)_2] \cdot 2DMA$, **1**, $[Zn_2(Indo)_4(Pyr)_2] \cdot 2H_2O$, **2**, $[Zn_2(Indo)_4(NMP)_2]$, **3**, *cis*- $[Zn(Indo)_2(EtOH)_2]$, **4**, y *cis*- $[Zn(Indo)_2(MeOH)_2]$, **5**. Los complejos **1**, **2** y **3** cristalizaron en un grupo espacial triclinico $P\bar{1}$. Los tres complejos exhibieron estructuras de remo rodante. Los complejos **4** y **5** fueron isoestructurales, con un grupo espacial $C2/c$. El zinc se encuentra en la estructura en un eje biplegado y ambos complejos presentaron una estructura cis-octaédrica distorsionada. Posteriormente, Dillon *et al* [2003], para tratar de disminuir los problemas de irritación gastrointestinal que ocasionan los fármacos antiinflamatorios, sintetizaron complejos de Cu(II) y Zn(II) con indometacina y evaluaron su actividad antiinflamatoria *in vivo*, su actividad superóxido dismutasa (SOD) y las propiedades ulcerogénicas de los complejos sintetizados y el ligante IndoH libre. No se observó actividad SOD del ligante libre o del complejo $[Zn_2(Indo)_4(DMA)_2]$, pero el complejo $[Cu_2(Indo)_4(DMF)_2]$ inhibió la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) a un valor de IC_{50} de 0.23 μM . Los tres compuestos exhibieron actividad antiinflamatoria en ratas Sprague-Dawley a una dosis equivalente de IndoH de 10 mg/kg por vía oral. El grado de toxicidad (ulceraciones macroscópicas) en el estómago durante la administración oral de $[Zn_2(Indo)_4(DMA)_2]$ no fue significativamente distinto al de IndoH ($P= 0.78$). Las ulceraciones gástricas inducidas por $[Cu_2(Indo)_4(DMF)_2]$ fueron significativamente menores que las inducidas por IndoH o el complejo de Zn, pero significativamente mayores que las del grupo control ($P= 0.0013$). Las ulceraciones intestinales inducidas por $[Cu_2(Indo)_4(DMF)_2]$ o $[Zn_2(Indo)_4(DMA)_2]$ fueron aproximadamente 15 veces menores que las provocadas por IndoH. El complejo $[Cu_2(Indo)_4(DMF)_2]$ exhibió los resultados más

prometedores, ya que mostró actividad SOD y el menor daño gastrointestinal, además de actividad antiinflamatoria comparable con la de IndoH.

Vásquez-Árciga [2004] estudió la interacción entre tres iones metálicos (Al(III), Cd(II) y Pb(II)) y el fármaco analgésico y antiinflamatorio ácido acetilsalicílico (asp); los complejos evaluados se sintetizaron y caracterizaron mediante métodos de espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protón (^1H) y de carbono (^{13}C), y por cristalografía de rayos X (sólo en el caso de los complejos Cd-asp y Pb-asp). Se obtuvieron monocristales incoloros de los complejos de cadmio y de plomo, y sólidos amorfos, en el caso del complejo de aluminio. Solamente se obtuvo una especie discreta en el caso del complejo de cadmio, mientras que para plomo y (presumiblemente) para aluminio se obtuvieron especies poliméricas. La coordinación se dio a través del grupo carboxilato ($-\text{COOH}$) del AAS. Para el complejo $[\text{Cd}(\text{asp})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ los ligantes se coordinaron de manera que el carboxilato actuara como un ligante monodentado; en el caso del complejo $[\text{Pb}(\text{asp})_2(\text{H}_2\text{O})]_n$ los ligantes se coordinaron de forma diferente, uno fue mono- y el otro bidentado. Los resultados obtenidos por cristalografía de rayos X mostraron una geometría tetraédrica distorsionada para el complejo de cadmio, mientras que para el de plomo se determinó una geometría de tipo bipirámide trigonal, con un par electrónico inerte sobre el metal.

Para determinar la acción farmacológica de complejos metal-antiinflamatorio en procesos artríticos inducidos Palacios-Hernández [2005] inoculó *Mycoplasma fermentans* P-140 vía intra-articular en la rodilla de la pata trasera derecha de 29 conejos y posteriormente aplicó los siguientes tratamientos: ácido acetilsalicílico (asp), CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, AlCl_3 , CuCl_2 , complejo Cd-asp $[\text{Cd}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, complejo Pb-asp $[\text{Pb}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]_n$, complejo Al-asp $[\text{Al}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4)_n(\text{H}_2\text{O})_n]_n$, y complejo Cu-asp $[\text{Cu}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4)_2]_n$. Cada compuesto fue suministrado durante siete días y fueron efectuadas mediciones periódicas del perímetro de las articulaciones de ambas rodillas. Al término del experimento los animales fueron sacrificados. Únicamente los complejos Al-asp y Cu-asp mostraron una aparente actividad antiinflamatoria de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) que se aplicó a las mediciones de las articulaciones de las patas traseras después de la inoculación y la aplicación de los compuestos ($P < 0.05$), mientras que en el resto de los complejos (Pb-asp y Cd-asp) la actividad antiinflamatoria fue nula. Todos los complejos evaluados mostraron

actividad tóxica en riñón (Figura 11), que fue atribuida a una sobredosis de metal debida a la administración de las sales metálicas parentales y los complejos de coordinación metal-asp. Dicha actividad se manifestó mediante la formación de depósitos superficiales de los complejos en la corteza renal.



Figura 11. Lesiones en los riñones de los animales de los subgrupos tratados con sales metálicas y complejos metal-asp [Palacios-Hernández, 2005]

El complejo Cd-asp mostró actividad tóxica en músculo, manifestándose mediante la aparición de abscesos en la zona de aplicación de CdCl_2 y Cd-asp, ya que la vía de administración de dicho compuesto fue intramuscular por su solubilidad en solución fisiológica (los complejos Al-asp, Cu-asp y Pb-asp se suministraron por vía oral debido a su insolubilidad); esto pudo deberse a que el Cd es un agente tóxico muy agresivo, capaz de inducir la aparición de sarcomas en los animales a los que les es suministrado algún compuesto a base de este metal (Figura 12). Finalmente, los animales tratados con los complejos Pb-asp y Al-asp mostraron problemas de hemólisis.

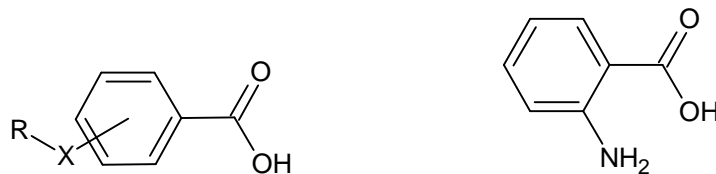


Fig. 12. Abscesos en los animales tratados con el complejo Cd-asp [Palacios-Hernández, 2005]

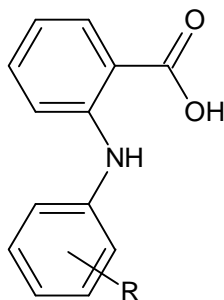
3.3 Generalidades sobre los antranilatos

3.3.1 Farmacocinética

Estos agentes son derivados N-aril sustituidos del ácido antranílico (Figura 13), el cual es por sí mismo un derivado bioisostérico del ácido salicílico. Estos agentes retienen las propiedades ácidas que son características de los salicilatos; sin embargo, se debe hacer notar que mientras que el ácido mefenámico y el ácido meclofenámico son derivados del ácido antranílico el diclofenaco es derivado del ácido 2-arilacético. Los fenamatos más activos tienen pequeños sustituyentes alquilo o halógenos en la posición 2', 3' y/o 6' del grupo funcional amino (el meclofenamato es 25 veces más potente que el mefenato). Entre los fenamatos N-aril bisustituidos los derivados 2', 3' son más activos sugiriéndose así que los sustituyentes en las posiciones 2', 3' sirven para forzar al anillo N-aril fuera de coplanaridad con el ácido antranílico. Así su efecto estérico es propuesto por ser importante en la efectiva interacción de los fenamatos sobre el sitio de inhibición en ciclooxigenasa.



Estructura general de los AINES Ácido antranílico



Estructura general de los antranilatos

Figura 13. Estructura general de los antranilatos como AINEs [Boctor, 1986].

Los antranilatos poseen principalmente actividad antiinflamatoria, algunos son analgésicos y antipiréticos, y son no selectivos a ciclooxigenasa (COX). Son usados como analgésicos suaves y ocasionalmente para tratar enfermedades inflamatorias. El meclofenamato es usado para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), sin embargo su utilidad es limitada por un gran número de reacciones adversas que incluyen náusea y vómitos, diarrea, ulceraciones, dolor de cabeza, somnolencia y trastornos hematopoyéticos.

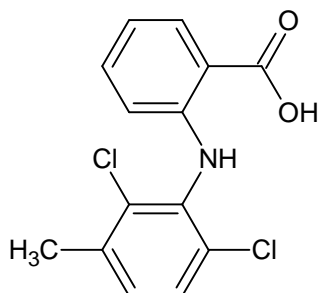


Figura 14. Ácido meclofenámico (ácido (2-[(2,6-dicloro-3-metil-fenil)amino]benzoico).

Los antranilatos son perfectamente absorbidos por el tracto gastrointestinal produciéndose niveles elevados en plasma a las 2-4 horas post-ingesta, aunque el meclofenamato (Figura 13) es más lipofílico que otros antranilatos y es absorbido rápidamente. El ácido meclofenámico es metabolizado por oxidación del grupo *orto*-metilo y la oxidación del anillo seguida por una eventual glucuronidación. Todos los antranilatos son eliminados muy eficientemente, de hecho, los antranilatos y sus metabolitos muestran excreción más balanceada que otros AINEs, y una gran fracción de éstos es eliminada en las heces (Figura 15) [DeRitter, 2002].

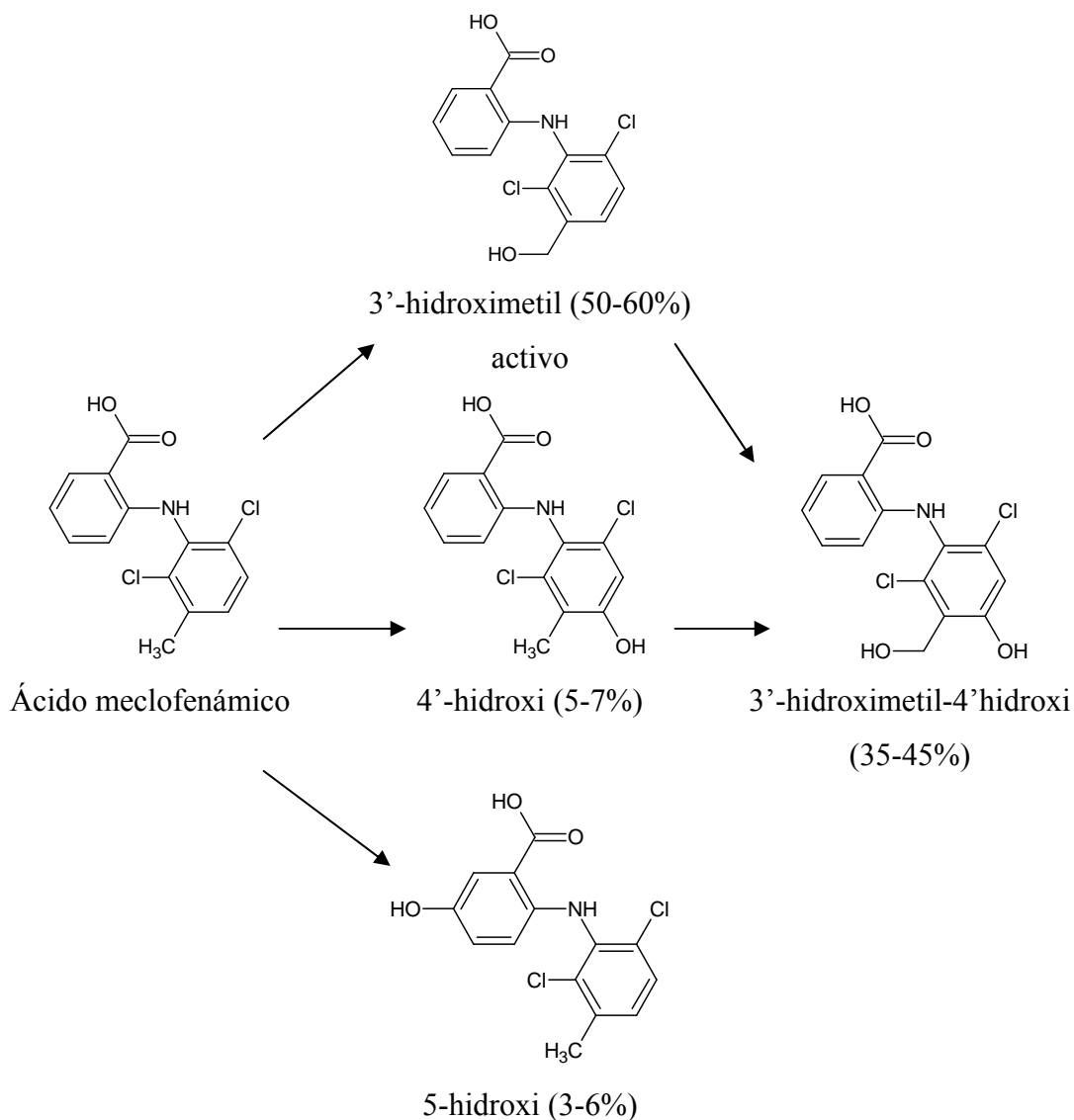


Figura 15. Metabolitos de los antranilatos, tomando como ejemplo al ácido meclofenámico [DeRuitter, 2002].

3.3.2 Toxicidad

No existen muchos reportes sobre efectos tóxicos específicamente del ácido meclofenámico. Sin embargo, y de manera general, los efectos tóxicos del grupo de los antranilatos muchas veces han sido sobre enfatizados. En común con muchos otros fármacos, la fenilbutazona fue introducida a dosis terapéuticas superiores a lo necesario, con el inevitable flujo de reportes de reacciones tóxicas en la literatura mundial. En cuatro estudios, los ácidos mefenámico y flufenámico son agentes antiinflamatorios y antipiréticos

relativamente suaves, usados regularmente para el tratamiento de desórdenes reumáticos donde otros fármacos pueden ser inefectivos o tóxicos. La dosis recomendada para el ácido mefenámico es de 500 mg inicialmente y, seis horas después, de 250 mg por vía oral. Puede causar diarrea en alrededor del 10-20% de los pacientes y ocasionalmente en algunos de ellos provoca anemia hemolítica; el salpullido y la dispepsia pueden ocurrir pero no son comunes. En algunos pacientes el tiempo de coagulación puede ser retardado. El ácido flufenámico es administrado por vía oral en dosis de 100 mg. También puede causar diarrea y en algunos casos dispepsia [Mason *et al*, 1967].

En un estudio realizado por Franson *et al* [1980] las fosfolipasas A₂ dependientes de calcio fueron purificadas y aisladas de plaquetas humanas, de macrófagos alveolares de conejo y de leucocitos polimorfonucleares peritoneales, y se mantuvieron activas en un rango de pH entre neutral y alcalino, y fueron inhibidas al 50% por 75 μ M de indometacina en presencia de 5.0 mM de Ca(II) previamente adicionado. El meclofenamato sódico y el flufenamato sódico también fueron inhibidores; la sensibilidad a la inhibición estuvo en función de la concentración de Ca(II). La dosis que provocó el 50% de inhibición (ID₅₀) con el meclofenamato sódico fue de 0.4 mM en presencia de 2 mM de Ca(II) adicionado. Así, la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A₂ por fármacos antiinflamatorios no esteroideos por medio del antagonismo de Ca(II) puede contribuir de manera significativa con el mecanismo de acción del fármaco.

Muchos AINEs provocan problemas en algunos pacientes debido a su toxicidad gástrica, en hígado y medula ósea, que puede resultar en sangrado gastrointestinal, ulceración daño hepático fulminante, hepatitis, granulocitosis o anemia aplásica. Se ha determinado que los AINEs forman radicales pro-oxidantes cuando son metabolizados por peroxidases presentes en los tejidos. Así el glutatión (GSH), y/o ascorbato cooxidados por cantidades catalíticas de AINEs y peróxido de hidrógeno en presencia de alguna peroxidasa. Durante la cooxidación de GSH y NADH, ocurre también la toma de oxígeno y su activación. Además, la formación de los productos de oxidación de los AINEs es prevenida durante la cooxidación indicando que ésta involucra un ciclo redox del primer producto radical del fármaco. El orden de efectividad catalítica prooxidante de los fenamatos y los ácidos arilacéticos evaluados fue ácido mefenámico/ácido tolfenámico/ácido flufenámico, ácido meclofenámico o diclofenaco. La difenilamina, la fracción en común de todos estos AINEs

fue un prooxidante más activo para la cooxidación de NADH y ascorbato que aquellos AINEs en los que se sugiere que la oxidación de la difenilamina del fármaco para un catión y/o radical nitróxido fue responsable de la acción prooxidante del fármaco. El orden de efectividad catalítica encontrado para los derivados de la sulfonamida fue sulfafenazol/sulfisoxazol> dapsona> ácido sulfanílico> procainamida> sulfametoxazol> sulfadiazina> sulfadimetoxina, mientras que la sulfanilamida, sulfapiridina o nimesulida no mostraron actividad prooxidante. Aunque la indometacina tuvo una ligera actividad prooxidante, su principal metabolito *in vivo*, la N-desclorobenzoil indometacina, tuvo actividad prooxidante significativa. La aminoantipirina, el principal metabolito *in vivo* de la aminopirina o dipirona mostró también mayor actividad prooxidante que sus fármacos parentales. De esta forma la hipótesis que fue planteada en este trabajo fue que los radicales de AINEs y/o el estrés oxidativo resultante inicia el proceso citotóxico que conduce a la toxicidad observada [Galati *et al*, 2002].