

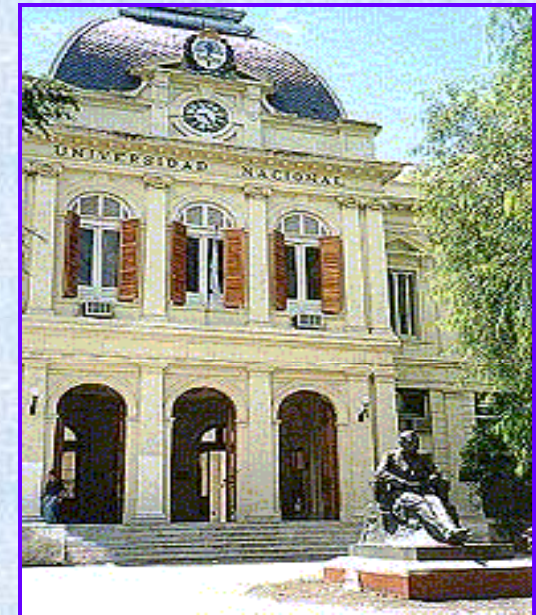
**Red iberoamericana de
investigación y desarrollo de
fármacos basados en
compuestos metálicos.**

Programa CYTED red 209RT0380

Coordinadora Dra. Dinorah Gambino

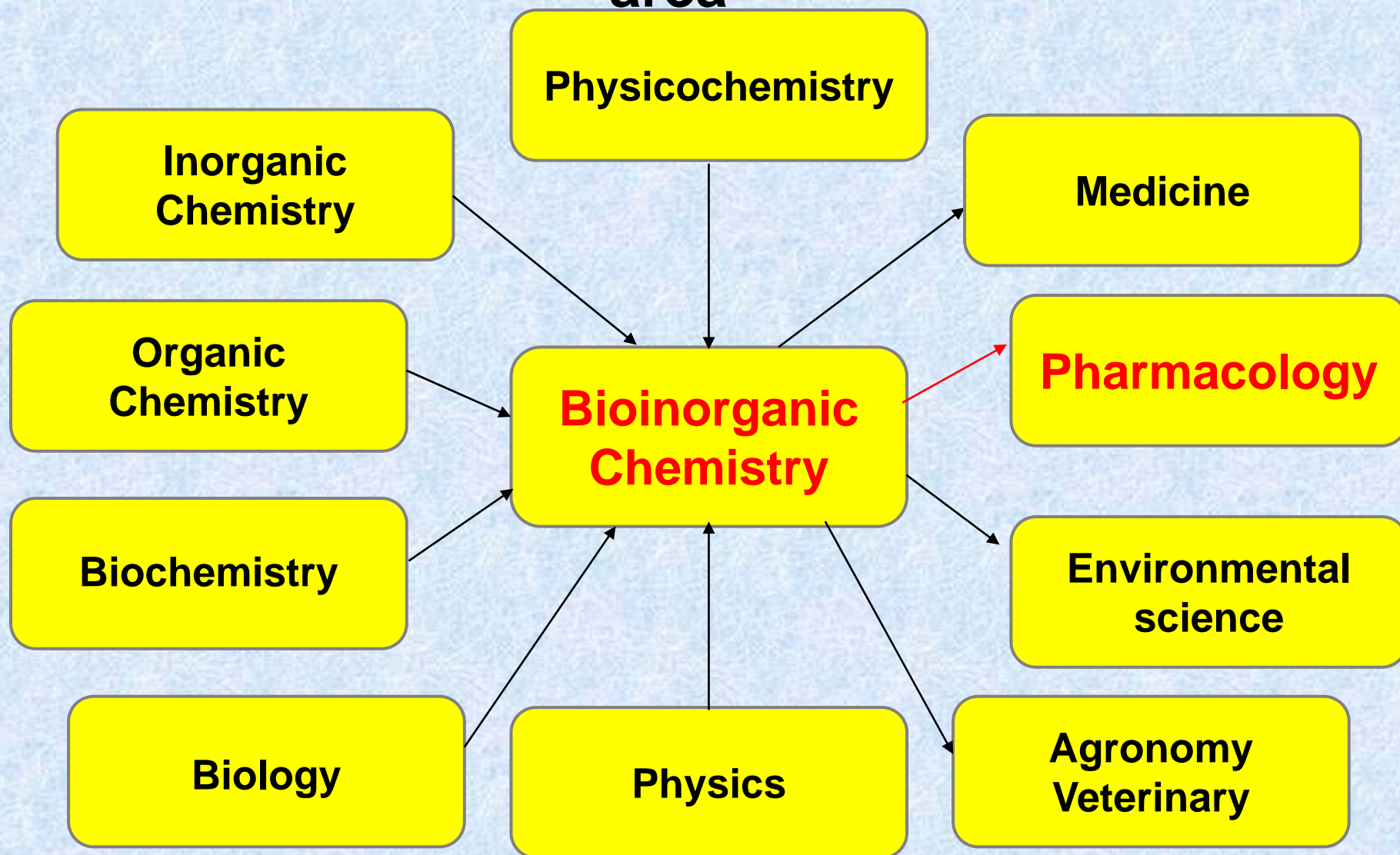
Desarrollo de fármacos de base metálica: Técnicas biológicas de evaluación

Susana B. Etcheverry



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata, Argentina
UNLP

Bioinorganic Chemistry: an interdisciplinary area



Formación de complejos metálicos

- ❖ **Activación/inhibición enzimática y obtención de efectos enzima-miméticos**
- ❖ **Mejoramiento de la biodisponibilidad**
- ❖ **Aumento de la estabilidad de la forma activa de una droga**
- ❖ **Disminución de los efectos colaterales**
- ❖ **Disminución de la resistencia hacia una droga**
- ❖ **Cambio en los efectos farmacológicos**
- ❖ **Obtención de compuestos activos por vía oral**

Usos de la Química Bioinorgánica en Medicina

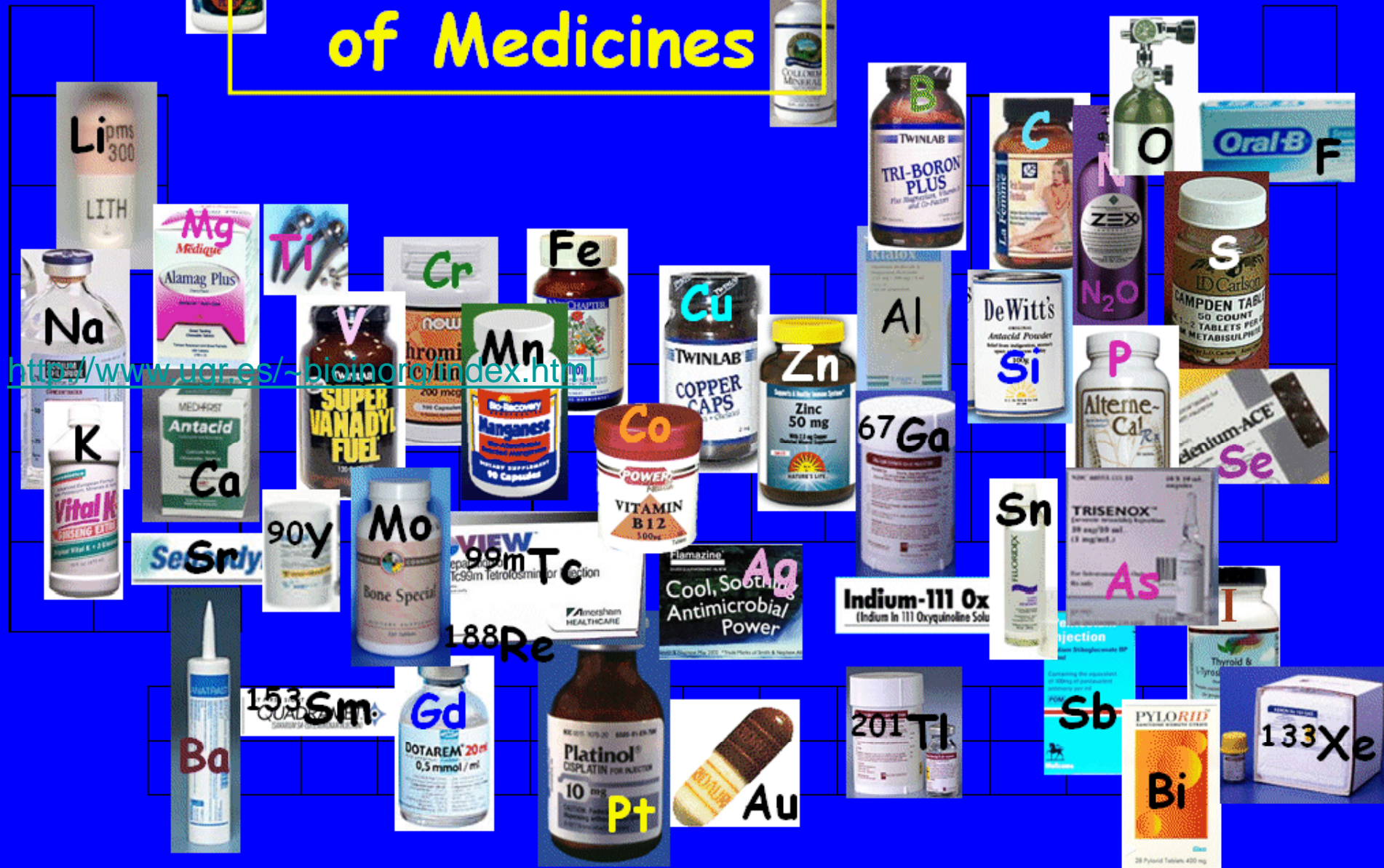
- 1. Obtención de drogas para mejorar la homeostasis de los iones en el organismo.**
- 2. Obtener drogas basadas en metales en las cuales el metal es clave en el mecanismo de acción**

Aplicaciones farmacocinéticas

Aplicaciones quimioterapéuticas

Aplicaciones al diagnóstico por imágenes

A Periodic Table of Medicines



<http://www.uar.es/~bioinora/index.html>

<http://www.uar.es/~bioinora/index.html>

Experimental Scheme

-Selection and/or chemical modifications of interesting biological ligands or substances with pharmacological activity-
-Bioactivity of free ions, free ligands and the complexes in cell cultures.

Phase I
Synthesis and characterization
Solution studies: stability determinations
Physicochemical characterization

Phase II
Bioactivity
II1. In cell free systems
a) ALP
b) SOD and catalase
c) DNA cleavage-Nuclease activity.

Phase II
Bioactivity
II.2 *Screening of bioactivity in cell cultures*

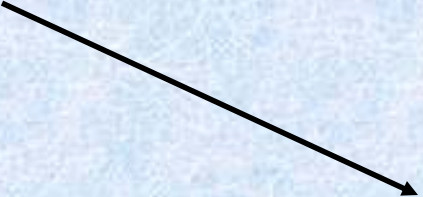
**Selection and/or chemical modifications of interesting biological ligands or substances with pharmacological activity-
-Bioactivity of free ions, free ligands and the complexes in cell cultures.**

**PHASE I
Chemistry**

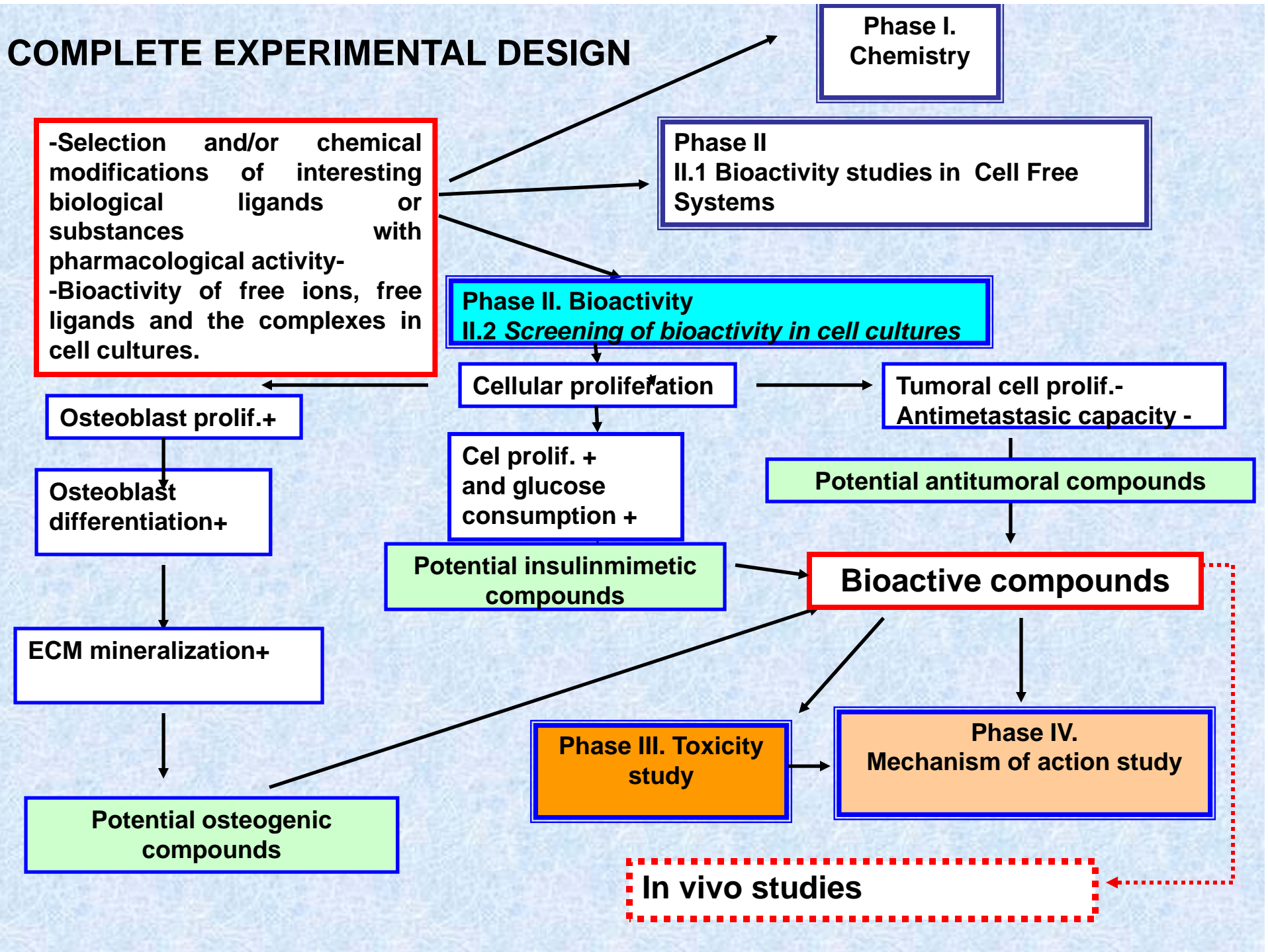
**Phase II.1
II.1 Bioactivity studies in Cell Free Systems.**

**Phase II
Bioactivity
II.2 *Screening of bioactivity in cell cultures***

Cellular proliferation



COMPLETE EXPERIMENTAL DESIGN



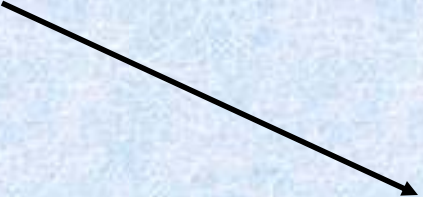
**Selection and/or chemical modifications of interesting biological ligands or substances with pharmacological activity-
-Bioactivity of free ions, free ligands and the complexes in cell cultures.**

**PHASE I
Chemistry**

**Phase II.1
II.1 Bioactivity studies in Cell Free
Systems.**

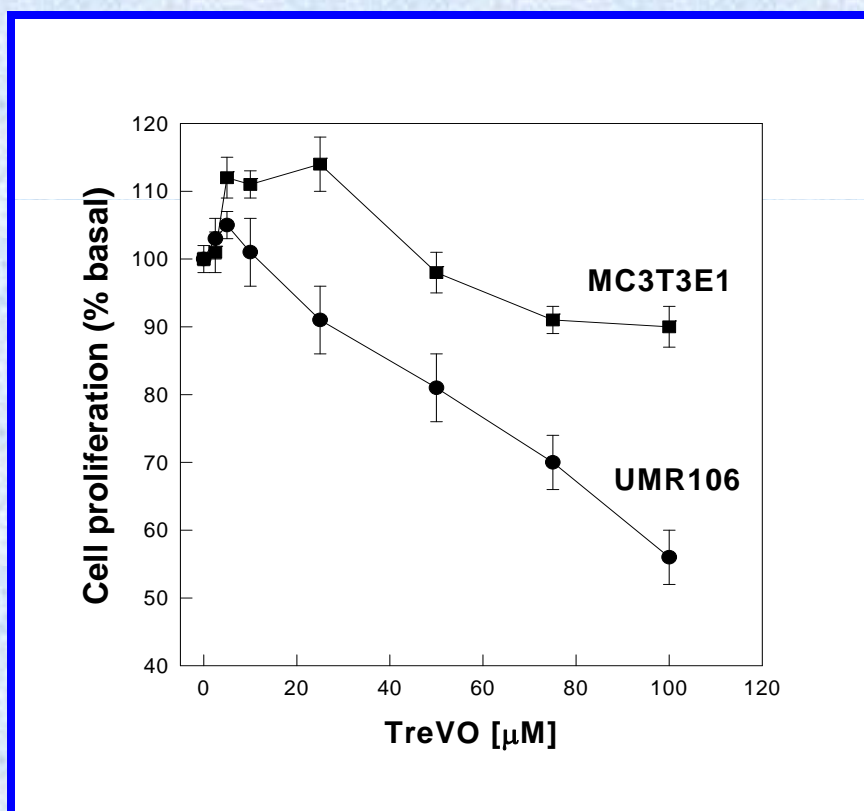
**Phase II
Bioactivity
II.2 *Screening of bioactivity in cell cultures***

Cellular proliferation

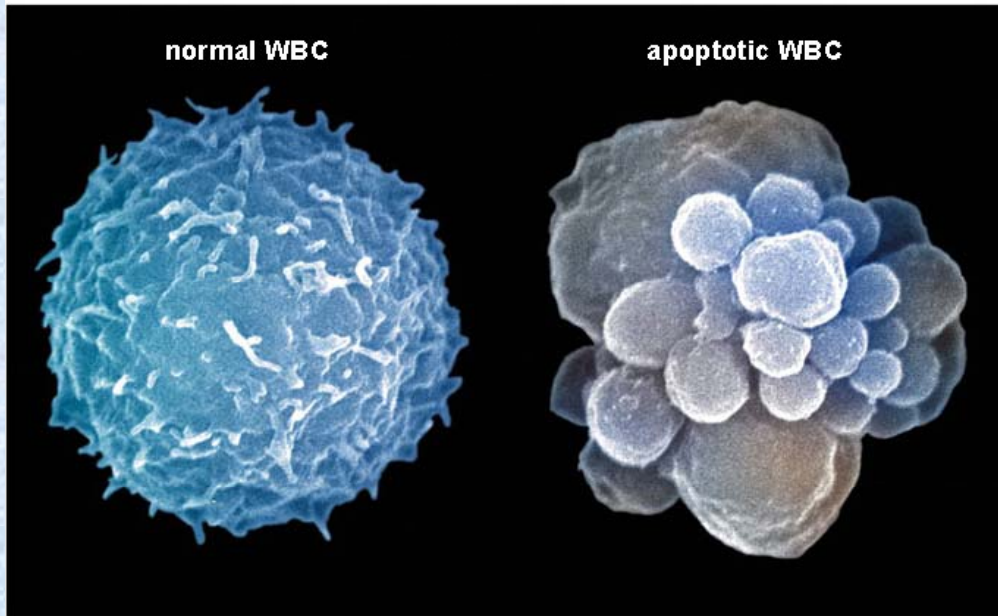


CELLULAR PROLIFERTION

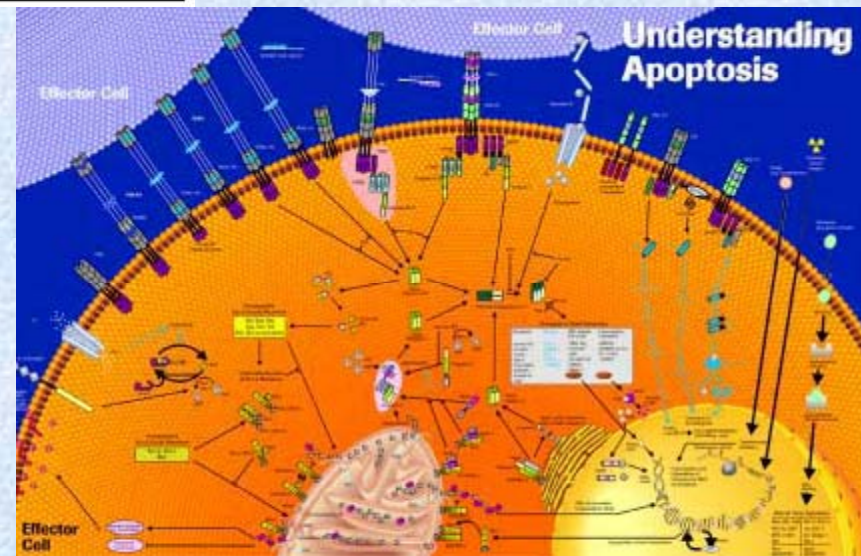
Osteoblasts



Barrio DA, Williams PAM, Cortizo AM, Etcheverry SB.
J Biol Inorg Chem. 8: 459-469, 2003.



MUERTE CELULAR



Importancia de la muerte celular

La muerte celular juega un rol crucial para el desarrollo de plantas y animales

En un humano adulto en buen estado de salud, billones de células mueren en médula ósea e intestino cada hora.

Tipos de muerte celular

La muerte celular puede ocurrir a través de dos procesos diferentes:

Programados o **accidentales**

**El más común de los
mecanismos de muerte
programada es la **APOPTOSIS****

y

**el más común de los mecanismos
accidentales es la **NECROSIS****

NECROSIS

Necrosis (muerte celular “accidental”) es un proceso **patológico** que ocurre cuando las células son expuestas a **serios insultos físicos o químicos**

APOPTOSIS

Apoptosis: muerte celular “normal o programada”) es el proceso fisiológico por el cual células no deseadas o que no son útiles son eliminadas durante el desarrollo y otros procesos biológicos normales

La apoptosis es una forma de muerte celular que está regulada genéticamente.

La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de animales como de plantas pluricelulares



Diferencias entre **Necrosis** y **Apoptosis**

Características morfológicas

Características bioquímicas

Características moleculares

Características morfológicas

Necrosis

Pérdida de la integridad de la membrana celular

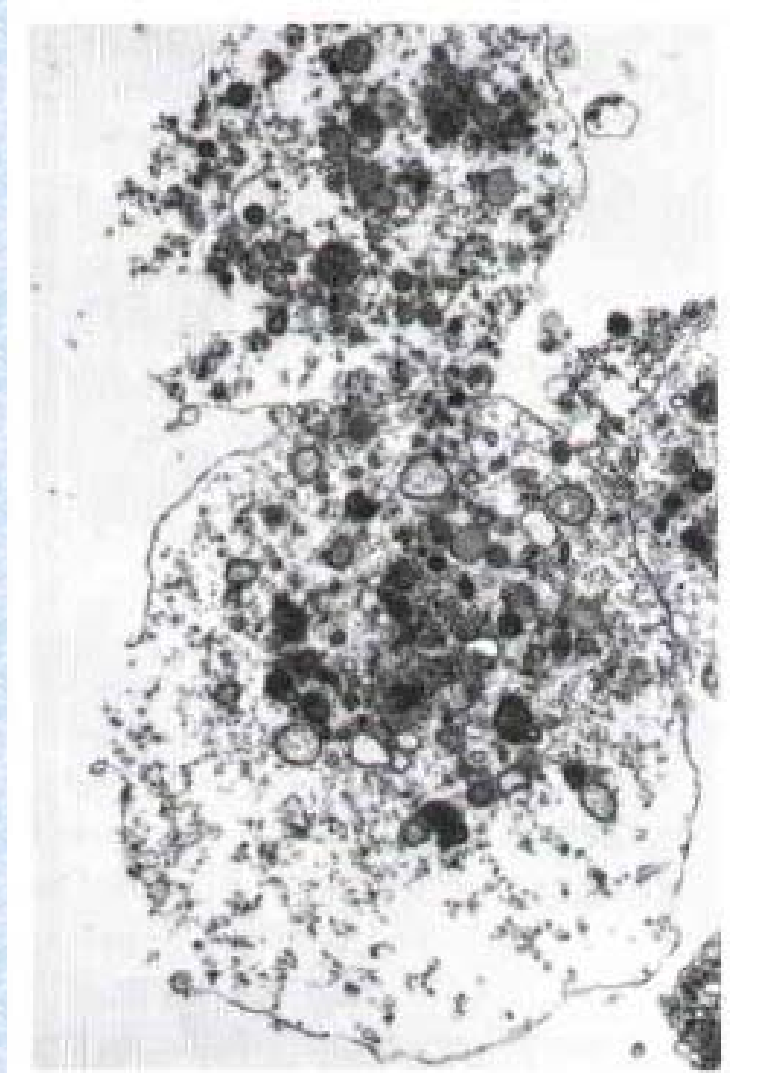
Comienza con hinchazón del citoplasma y las mitocondrias

Finaliza con lisis celular total

Disintegración de organelas

Involucra células vecinas y macrófagos, generando una **respuesta inflamatoria**

Micrografía electrónica de una célula necrótica

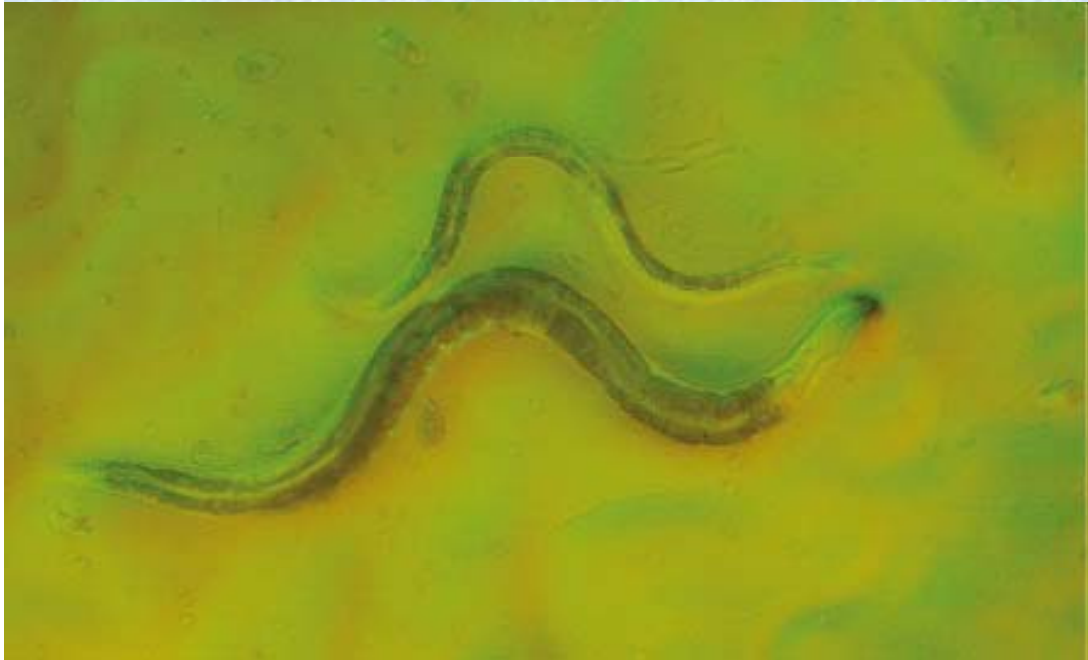


(C)

Muerte celular programada

La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de plantas como de animales pluricelulares

Nematode *Caenorhabditis elegans*



Estudios genéticos que identificaron los primeros genes de muerte celular programada

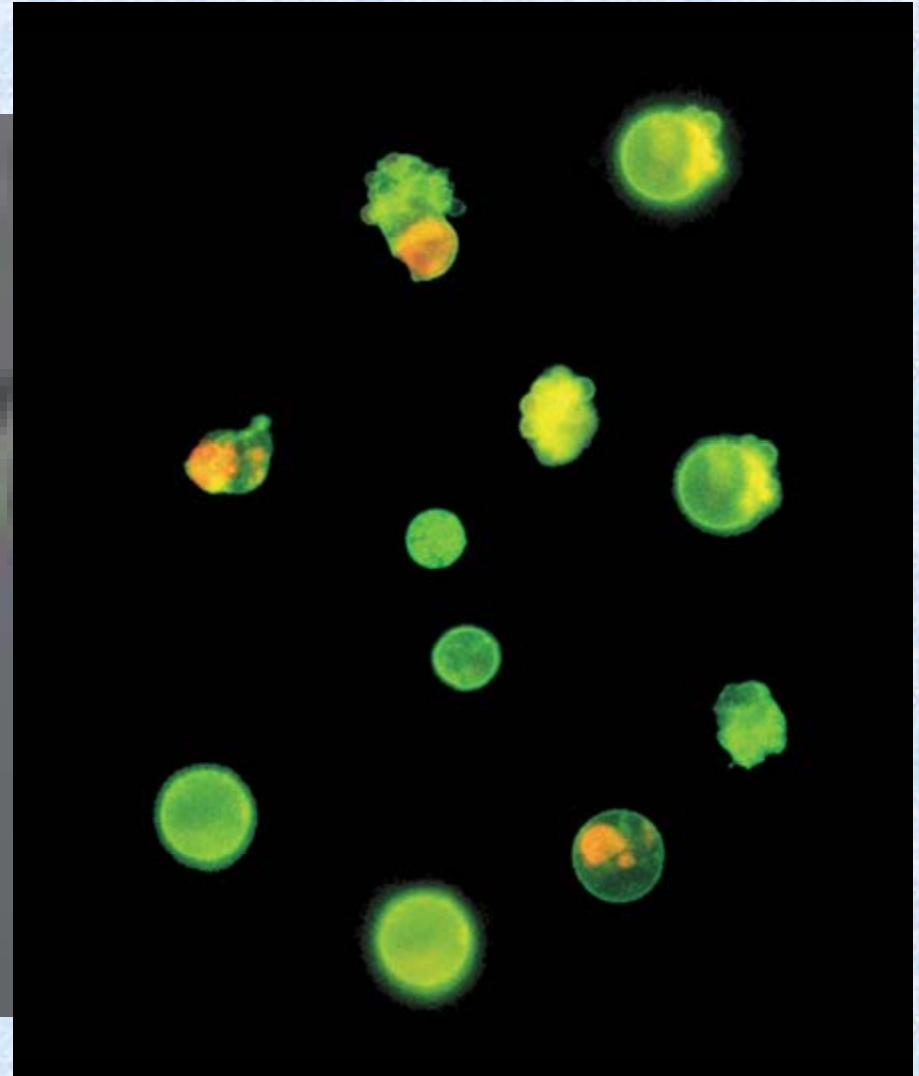
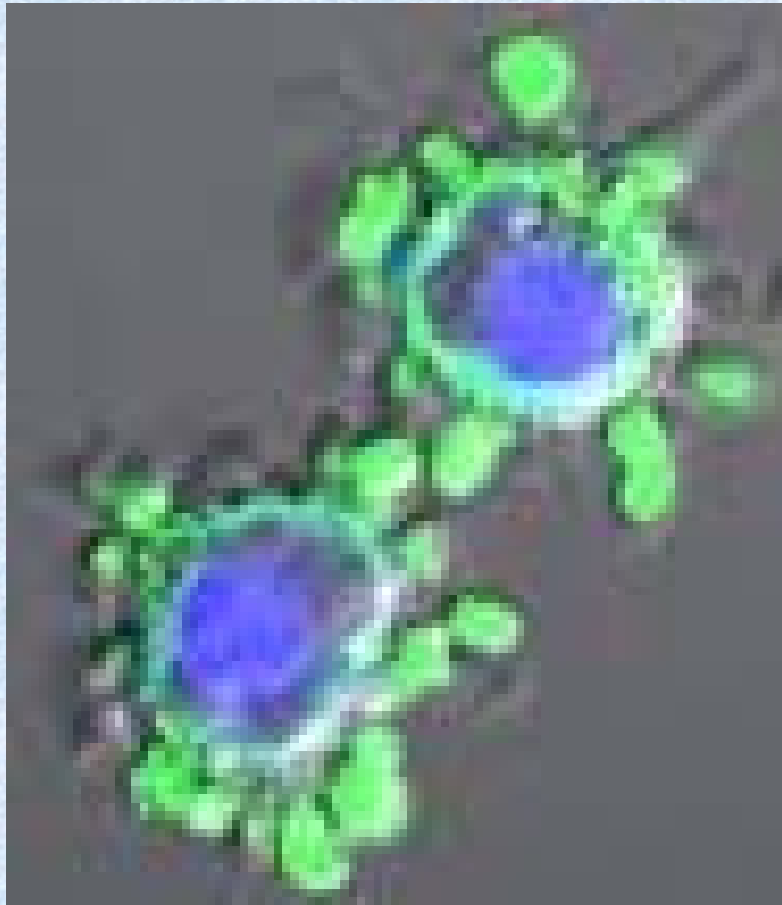


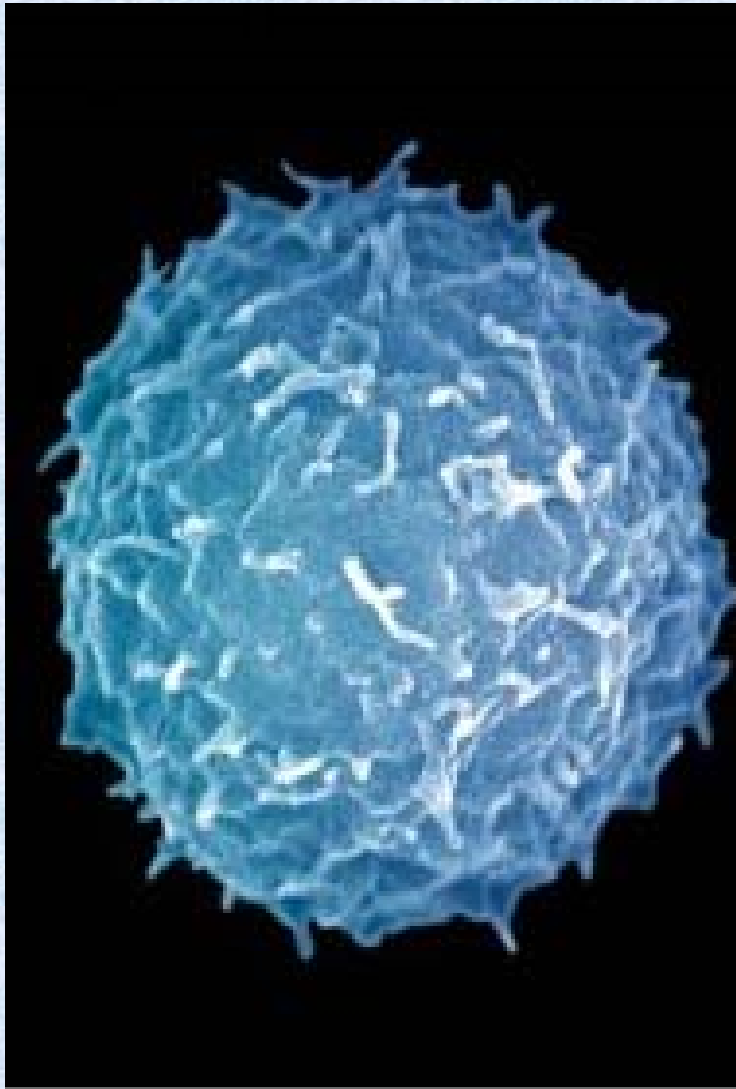
Apoptosis

**“Burbujas” de la membrana celular,
pero sin pérdida de la integridad**

- Agregación de la cromatina en la membrana nuclear
- Finaliza con fragmentación celular en pequeños cuerpos
- Formación de vesículas unidas a membrana (cuerpos apoptóticos)
- Las mitocondrias se tornan permeables debido a la formación de poros involucrando a proteínas de la familia bcl-2

Células apoptóticas





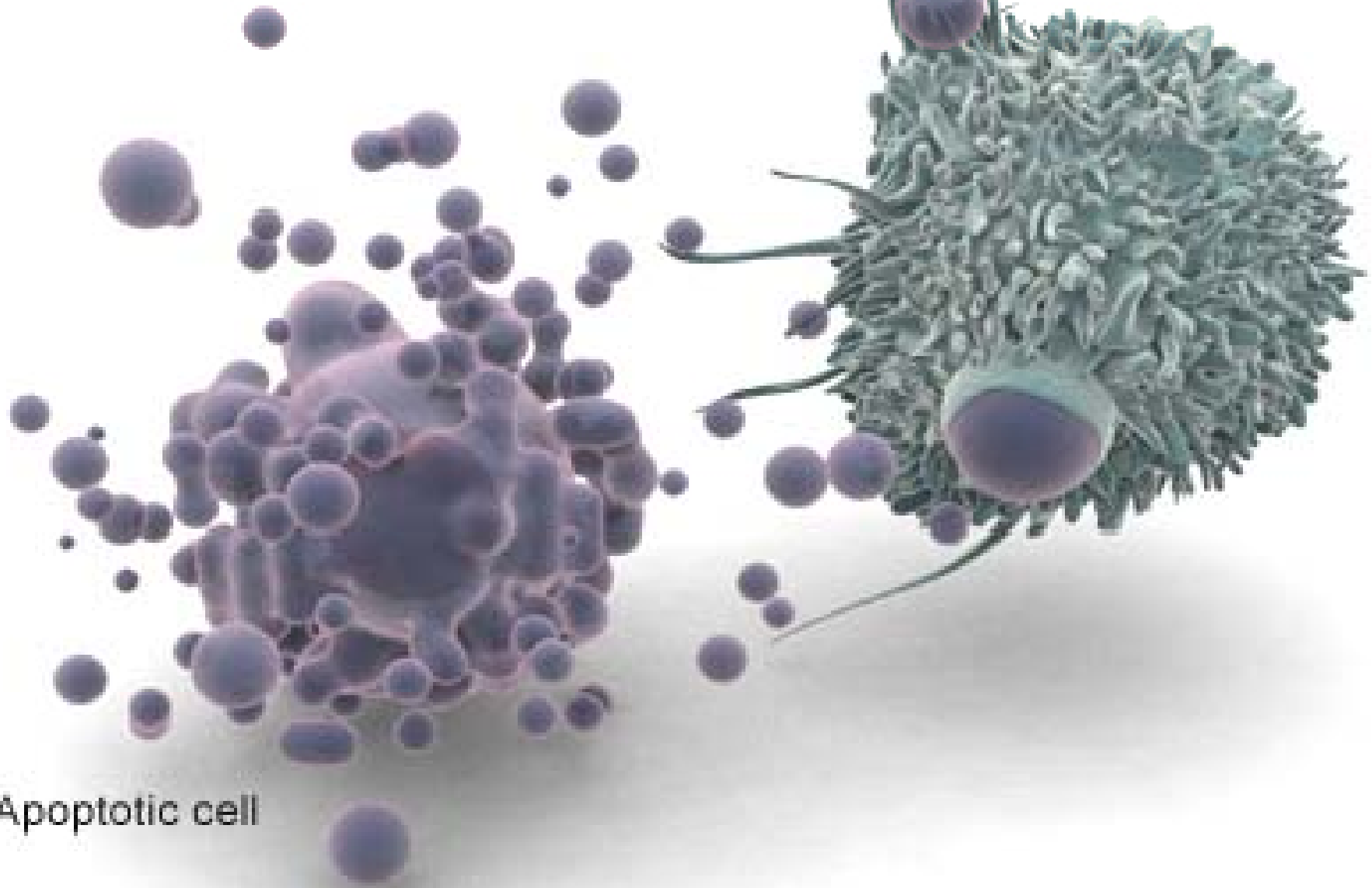
Glóbulo blanco



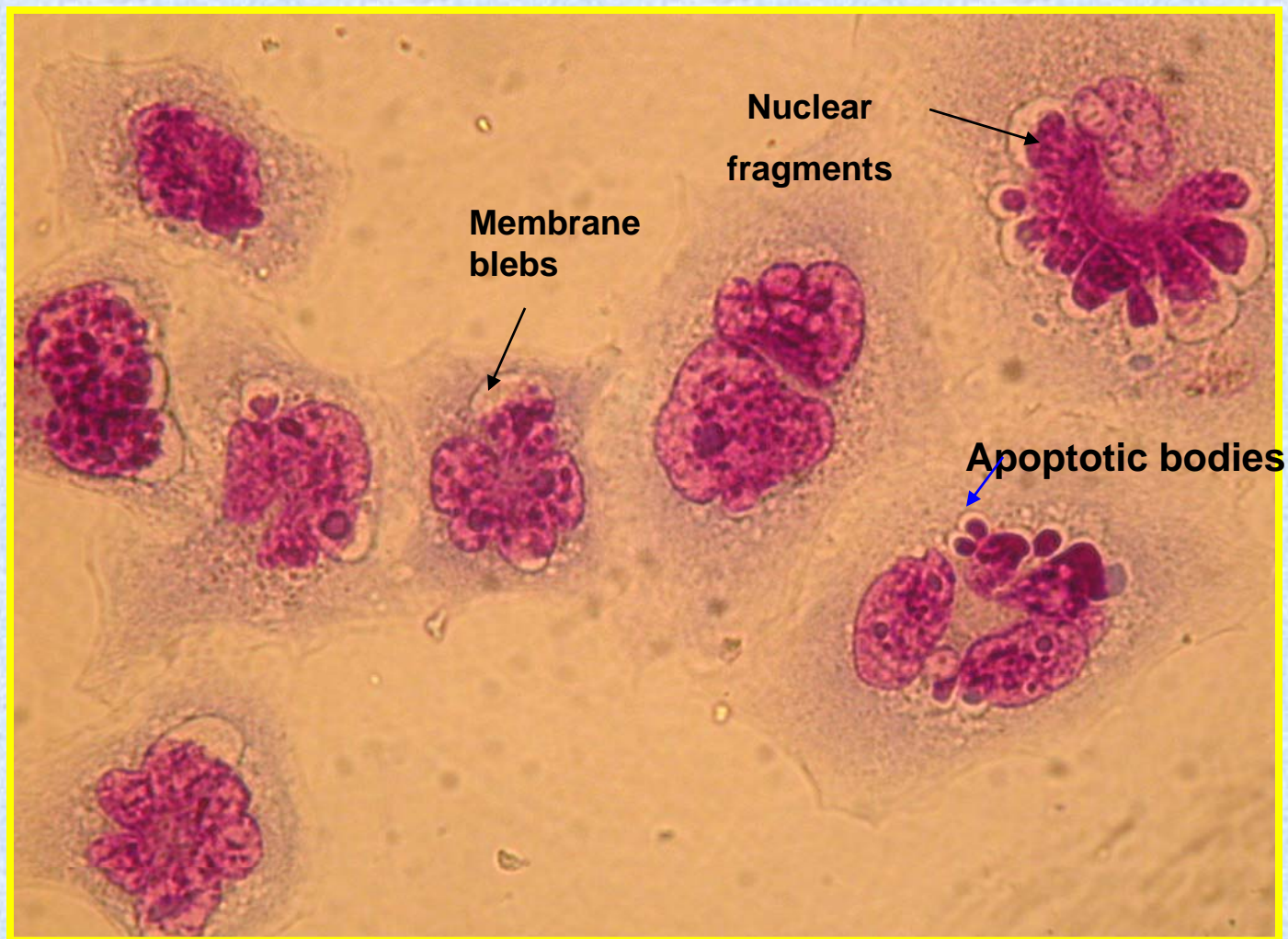
**Glóbulo blanco en
apoptosis**

Final stage of apoptosis

White blood cell

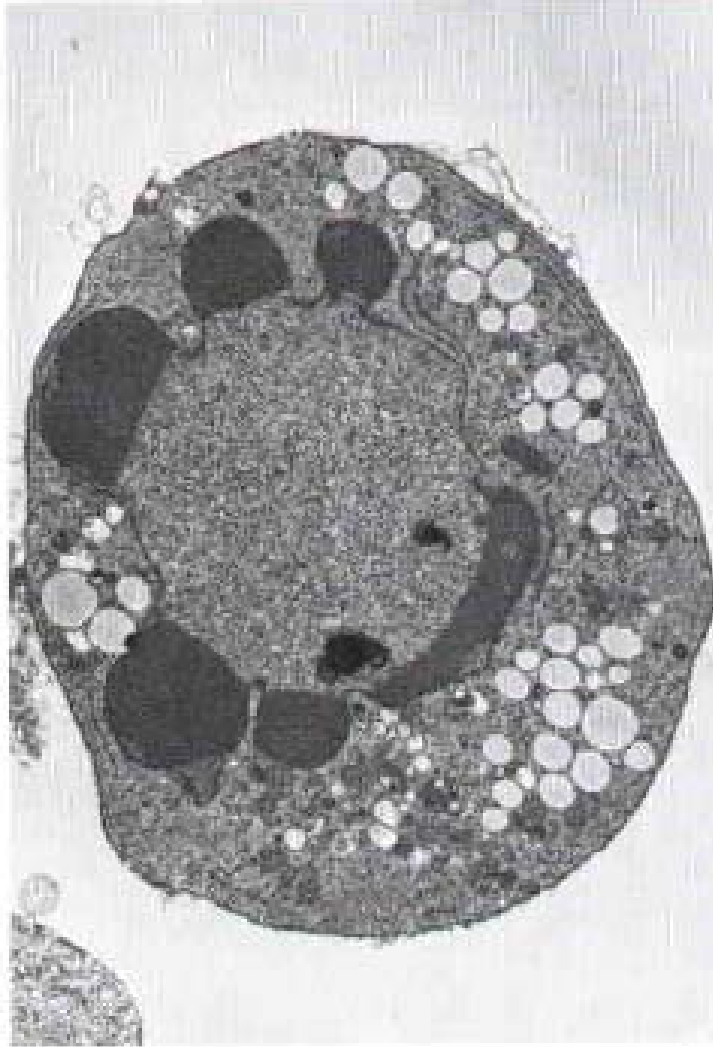


Apoptotic cell



Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PAM. J Biol Inorg Chem 13: 435-447, 2008

Células apoptóticas



(A)

10 μm

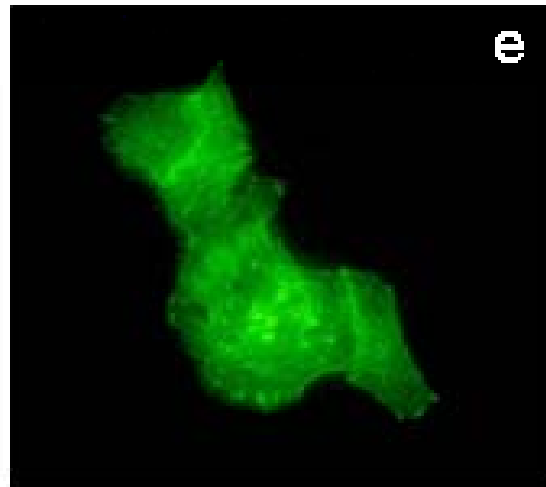
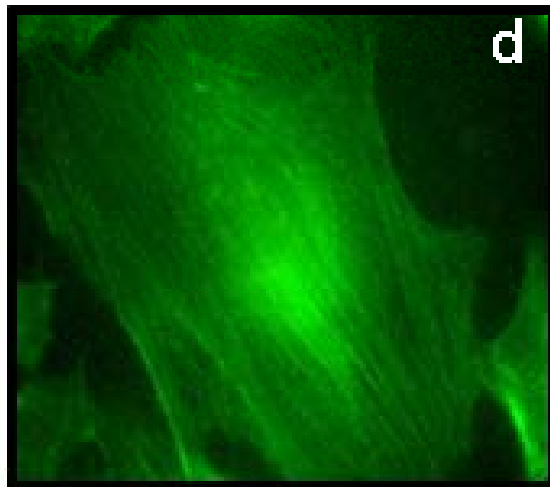
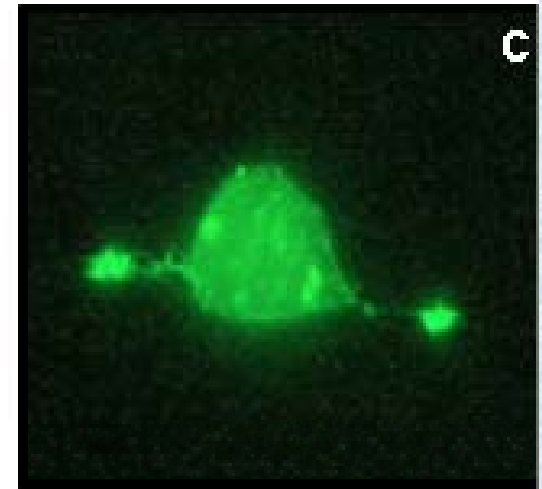
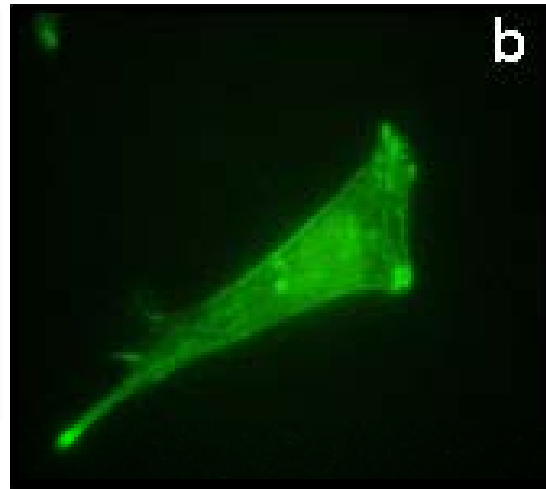
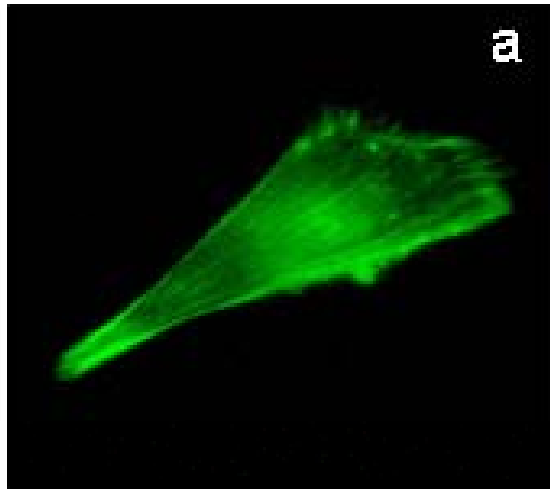


(B)

engulfed dead cell

phagocytic cell

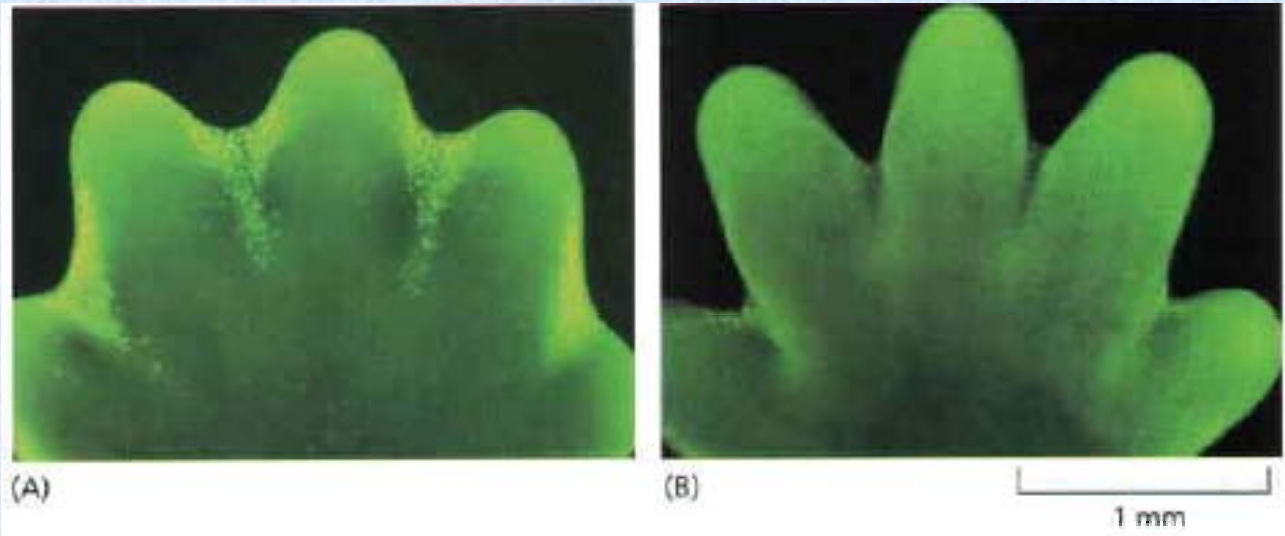
Alteración del citoesqueleto



Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB.
Med Chem 6: 9-23, 2010

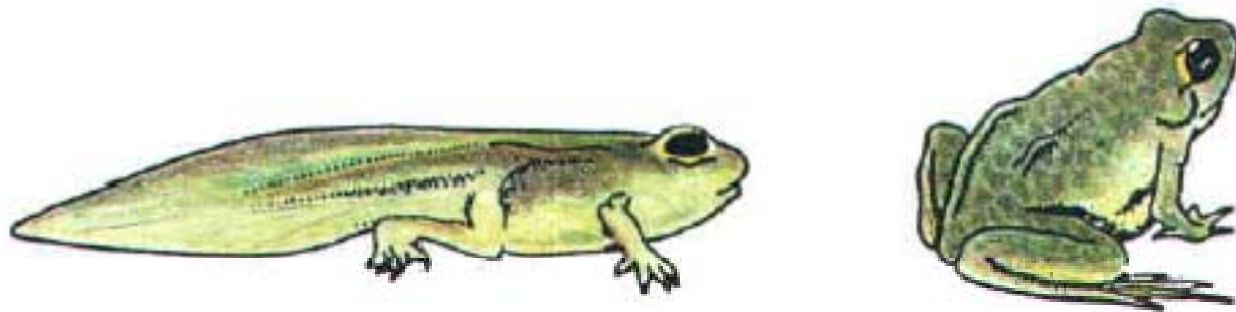
Procesos apoptóticos

Desarrollo del
pie de ratón

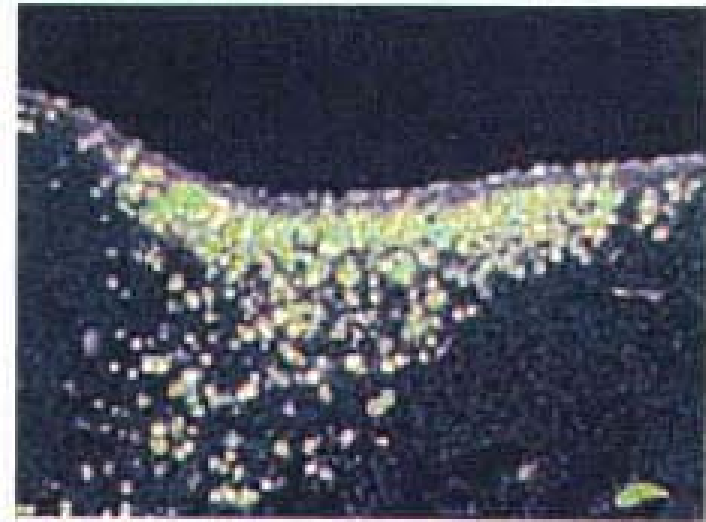


Metamorfosis
en anfibios

APOPTOSIS



Desaeeollo de pie de ave



(B)

Cada día, en cualquiera de nosotros, se produce el suicidio de alrededor de 10 mil millones de células por **apoptosis, siendo esto necesario para el normal desarrollo del organismo**

Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis.

Cambios bioquímicos y moleculares de la apoptosis

- **Clivage del ADN cromosómico en grandes fragmentos**
- **Cambios en la membrana plasmática (externalización de fosfatidilserina)**
- **Pérdida del potencial de membrana mitocondrial**

time (hr)

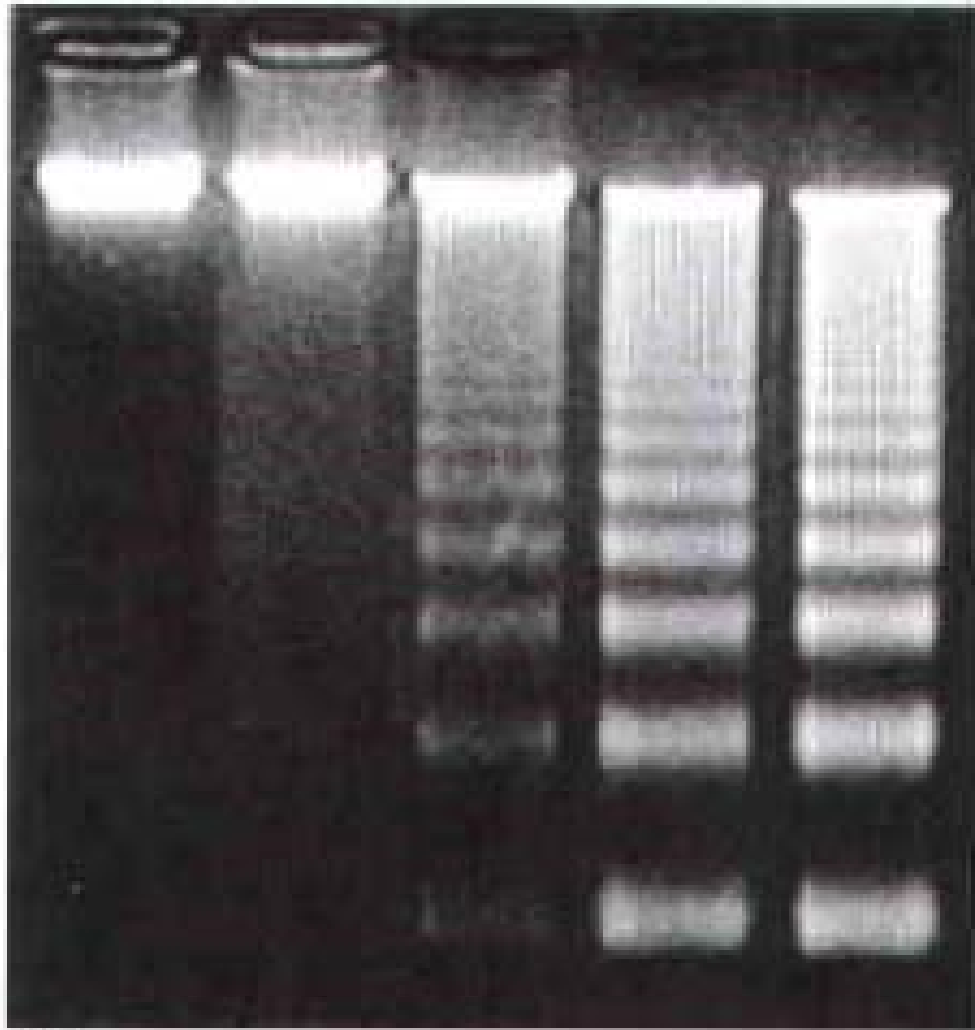
0

1

3

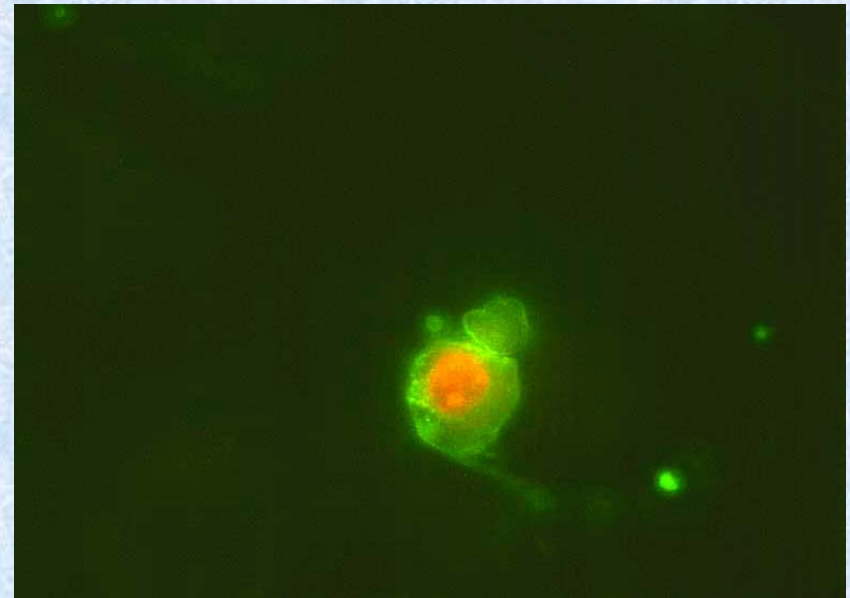
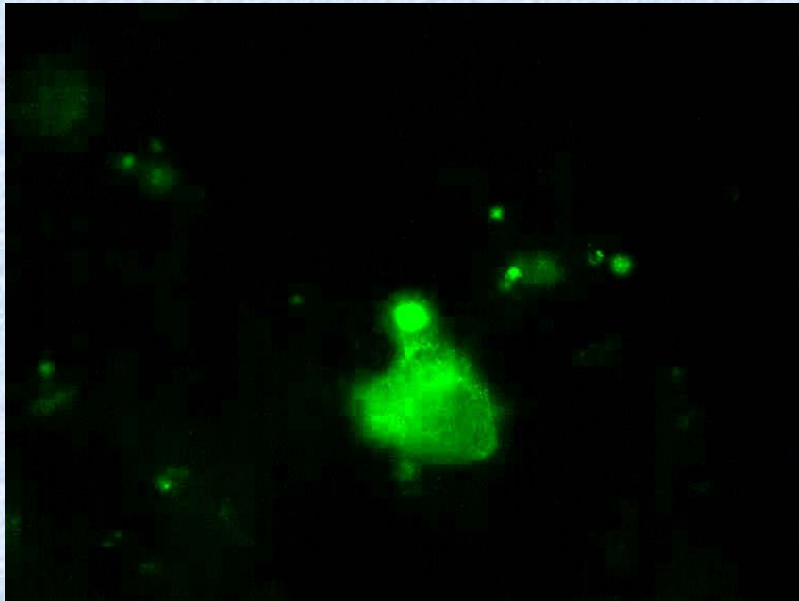
6

12



(A)

APOPTOSIS y NECROSIS



Molinuelo MS, Barrio DA, Cortizo AM, Etcheverry SB. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 163-172, 2004.

Potencial de membrana mitocondrial

Permite que ciertas sondas fluorescentes con alta afinidad por las mitocondrias metabólicamente activas sean capaces de retener esos colorantes mostrando alta intensidad de fluorescencia. Las mitocondrias de células apoptóticas retienen menos esas sondas y disminuye la intensidad de fluorescencia,

REGULACION DE LA APOPTOSIS

APOPTOSIS

❖ **Vía extrínseca**

❖ **Vía intrínseca**

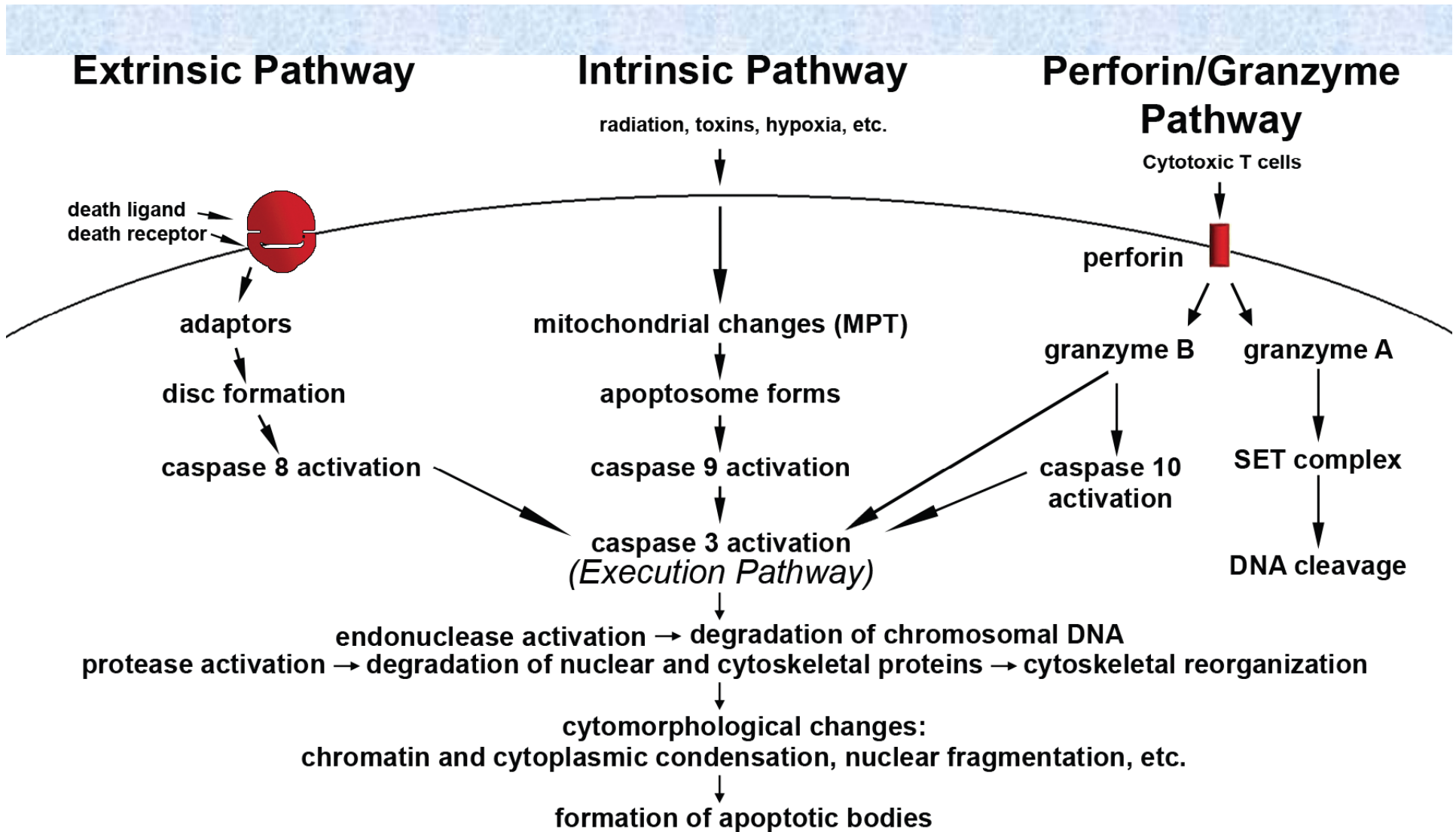
**La vía apoptótica extrínseca
activa receptores de membrana
tales como:**

Fas

TNF

Porinas

**La vía intrínseca está mediada por
eventos mitocondriales**



Para ambas vías la apoptosis depende de una cascada proteolítica intracelular que es mediada por caspasas

CASPASAS

Las caspasas son una familia de proteasas que tiene **cisteína** en su sitio activo y clivan proteínas específicas en sitios determinados que poseen **ácido aspártico**

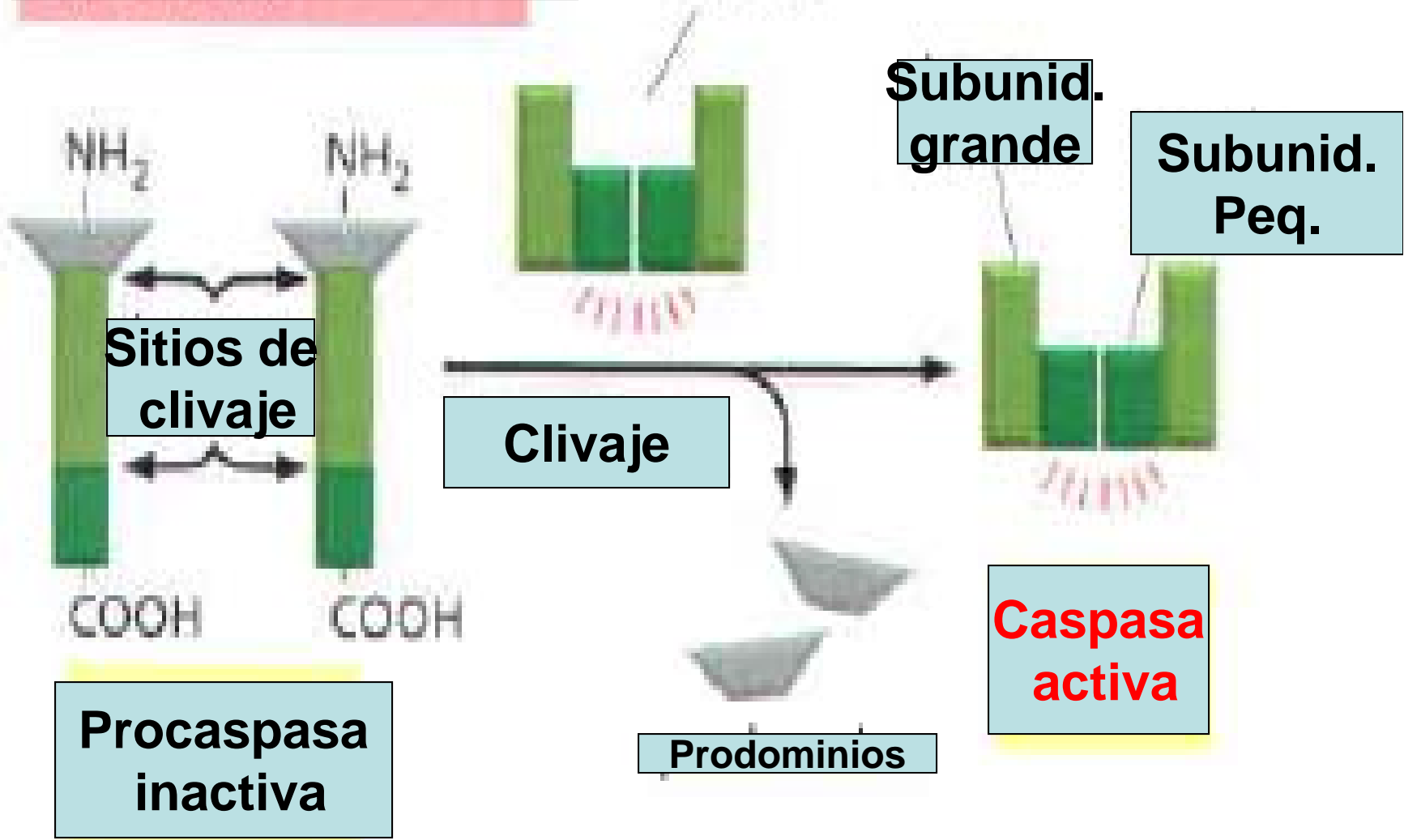
ACTIVACION DE CASPASAS

PROCASPASAS

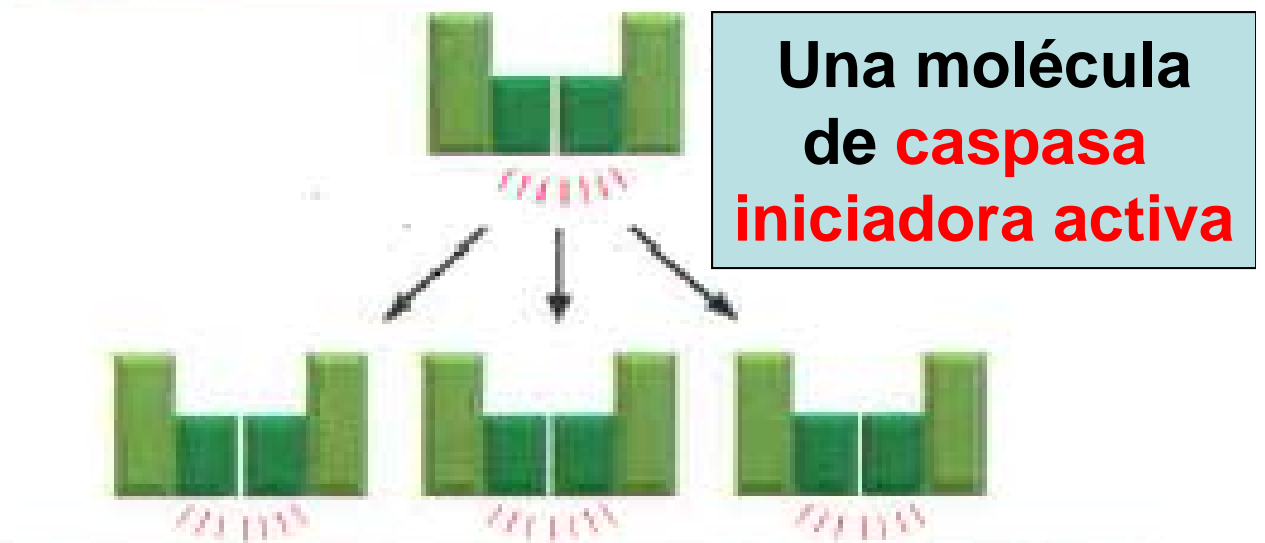
Las caspasas se sintetizan en todas las células como precursores inactivas o procaspasas, las que se activan por clivaje proteolítico

(A) **Activación de procaspasa por clivaje**

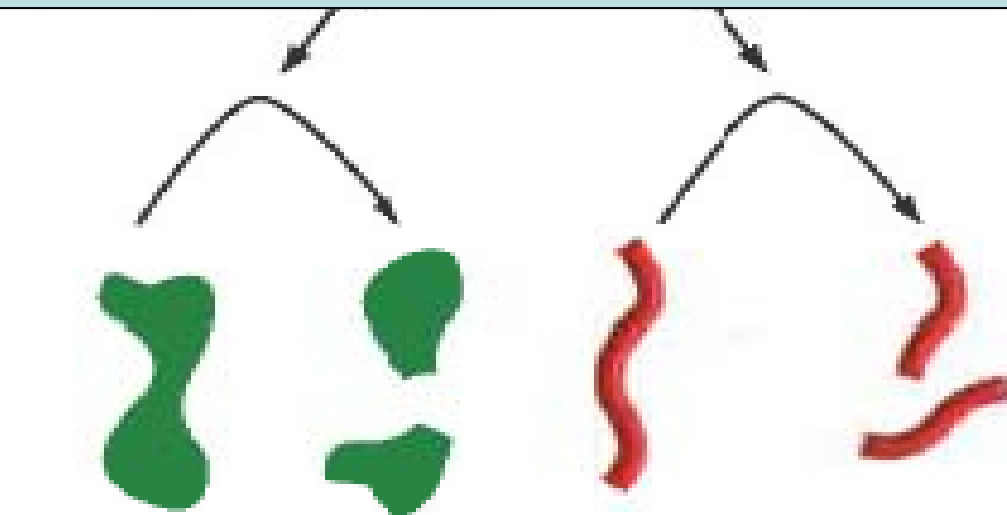
Caspasa activa



Cascada de las caspasas



Muchas moléculas de caspasas ejecutoras



Clivaje de prot. del citoesqueleto

Prot. nucleares

***Targets* de caspasas ejecutoras activadas**

Diversas proteínas o estructuras celulares tales como:

Proteínas nucleares

***DNA-dependent enzyme* o endonucleasa, que al activarse cliva el DNA nuclear**

Componentes del citoesqueleto y de las proteínas de adhesión que vincula a cada célula con sus vecinas

Caspasas humanas

Involucradas en la inflamación

Caspasa 1 (ICE), 4, 5

Involucradas en apoptosis

- ❖ **Caspasas iniciadoras (2,8,9,10)**
- ❖ **Caspasas ejecutoras (3, 6, 7)**

Inicio de la apoptosis

En todas las células, la maquinaria de las caspases está siempre lista para actuar. Sólo se requiere un disparador del proceso.

Cómo se activa la primera procaspasa?

Las caspasas iniciadoras presentan un gran prodominio que contiene un dominio reclutador de caspasas (CARD)

Ese dominio CARD les permite unirse a **proteínas adaptadoras y forma un **complejo activo** cuando la célula recibe un estímulo apoptótico.**

Una vez en el complejo, las caspasas iniciadoras están muy próximas unas de otras y lo que es suficiente para activarlas. Ellas se clivan unas a otras y el proceso se torna **irreversible**

INHIBIDORES DE LA VÍA EXTRÍNSECA

Muchas células producen proteínas inhibitorias que pueden actuar intracelularmente o extracelularmente para restringir la vía extrínseca

Receptores decoy de superficie: tienen un dominio de unión al ligando pero no tienen un dominio de muerte

Los *decoy* pueden unir el ligando pero no pueden activar la muerte celular. Por eso son **inhibidores competitivos de muerte celular**

Vía intrínseca de apoptosis

Depende de las mitocondrias



Vía intrínseca

Las células activan la apoptosis desde adentro de las células.

Es respuesta a injuria, daño en el ADN, falta de oxígeno, de nutrientes o de señales de supervivencia extracelulares

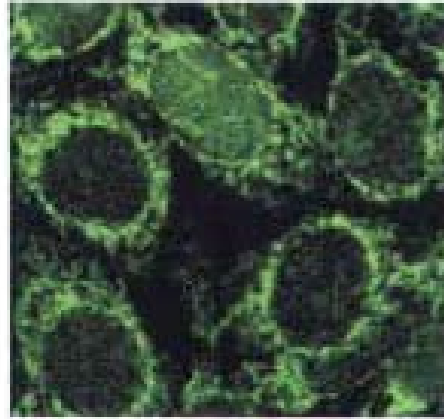
Vía intrínseca

Se activa por alteración de la membrana mitocondrial y liberación al citosol de proteínas u otros compuestos mitocondriales, por ej el **citocromo C**, que activan intrínsecamente la cascada proteolítica de caspasas

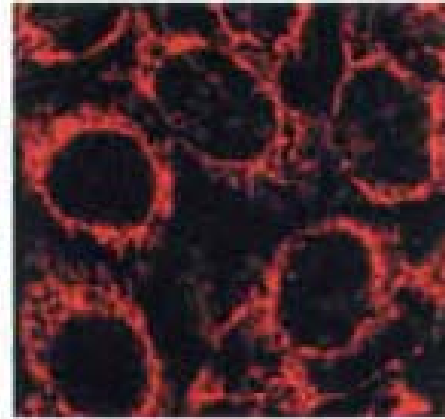
Vía intrínseca

(A) CONTROL

cytochrome-c-GFP



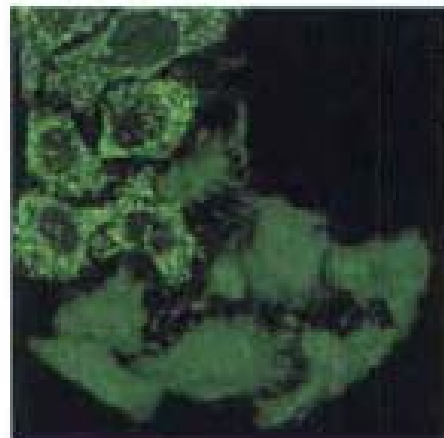
mitochondrial dye



10 μ m

(B) UV TREATED

cytochrome-c-GFP



anti-cytochrome c



25 μ m

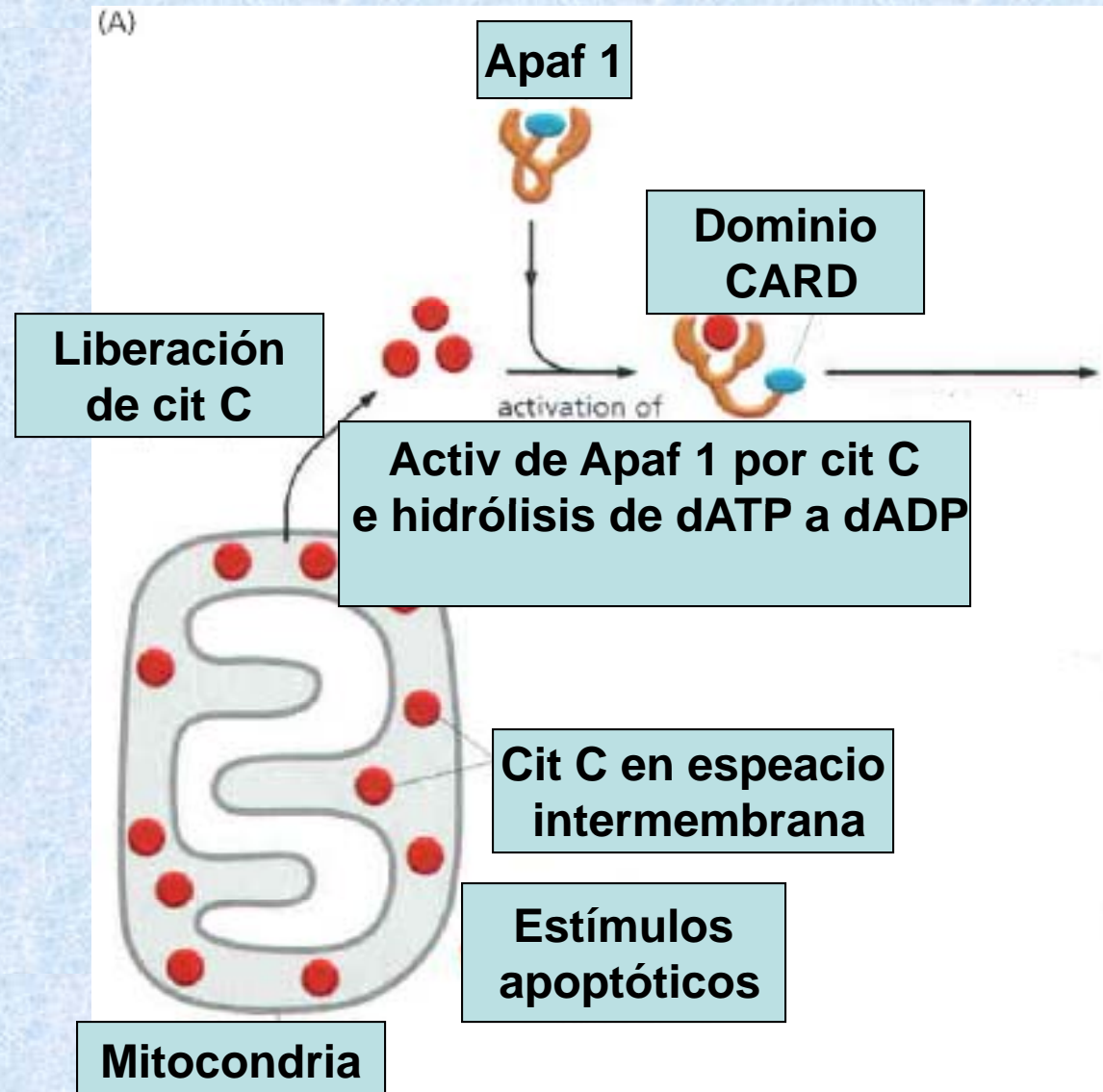
Cuando el citocromo C se libera al citosol cambia su función completamente

Se une a una proteína adaptadora de un activador de caspasas llamada Apaf1

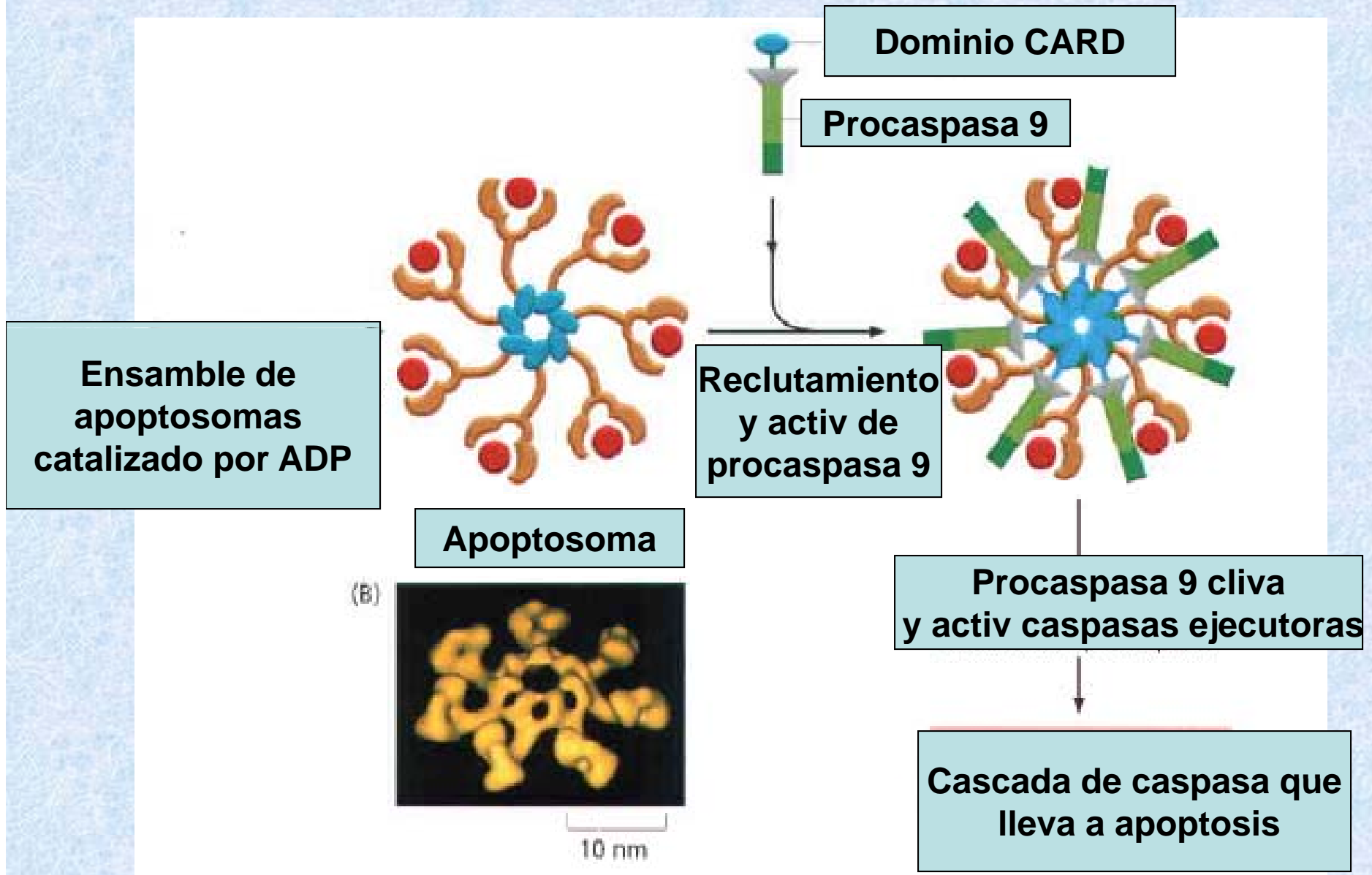
Apaf1 oligomeriza en un heptámero llamado apoptosoma

Los Apaf1 en el apoptosoma reclutan algunas de las procaspasas iniciadoras (procaspasa 9), que se activan por proximidad de unas con otras en el apoptosoma

Vía intrínseca

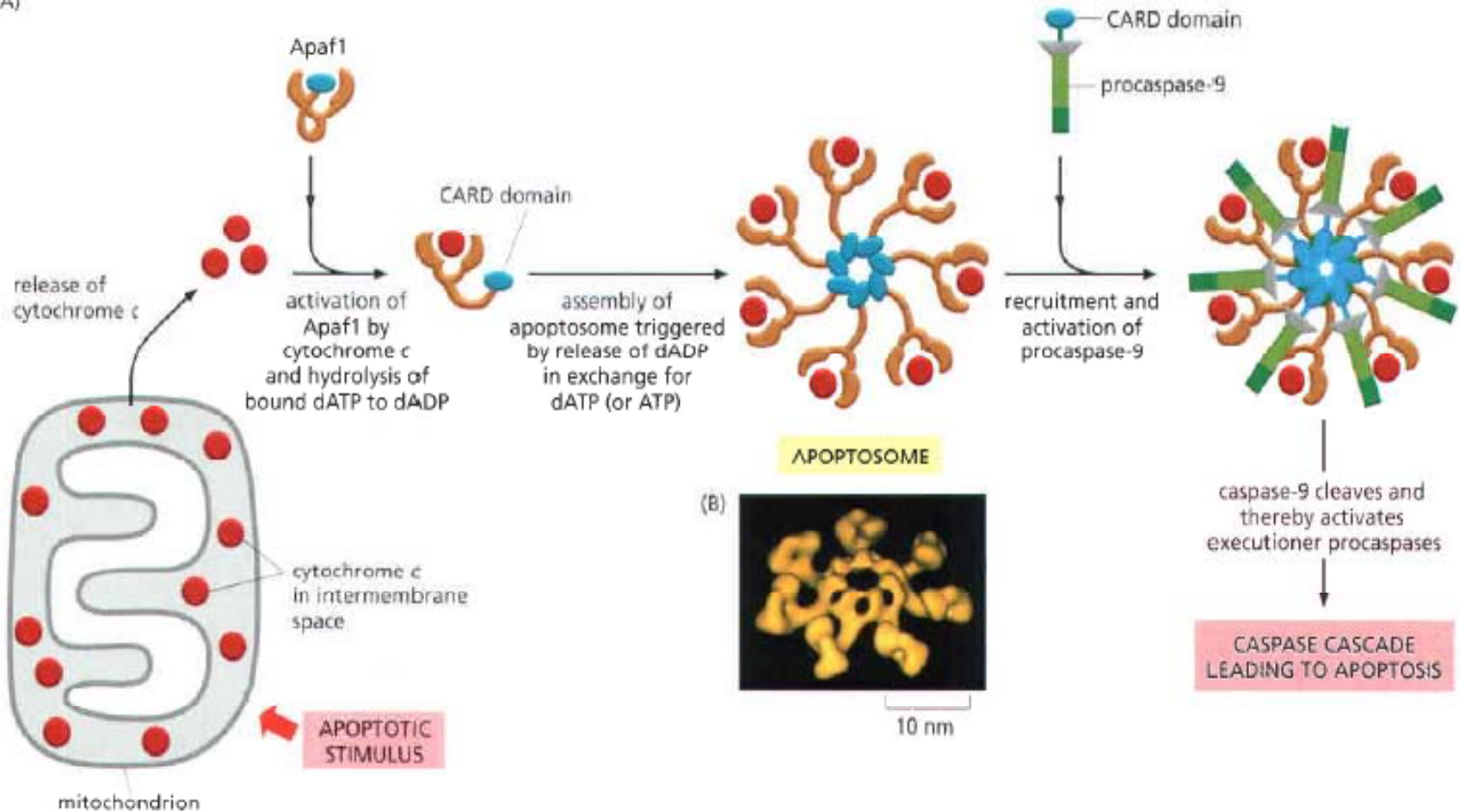


Vía intrínseca



VIA INTRINSECA

(A)



VIA EXTRINSECA + VIA INTRINSECA

En algunas células, la vía extrínseca puede reclutar la vía intrínseca a fin de amplificar la señal apoptótica para matar las células.

Esto se realiza mediante un conjunto de proteínas de la familia *Bcl2*

Importancia de la regulación de la vía apoptótica intrínseca

La vía apoptótica intrínseca está finamente regulada a fin de asegurar que las células se matarán a sí mismas sólo cuando sea absolutamente necesario

Proteínas Bcl2

Proteínas de la familia *Bcl2* regulan la vía intrínseca de la apoptosis

REGULACION DE LA APOPTOSIS

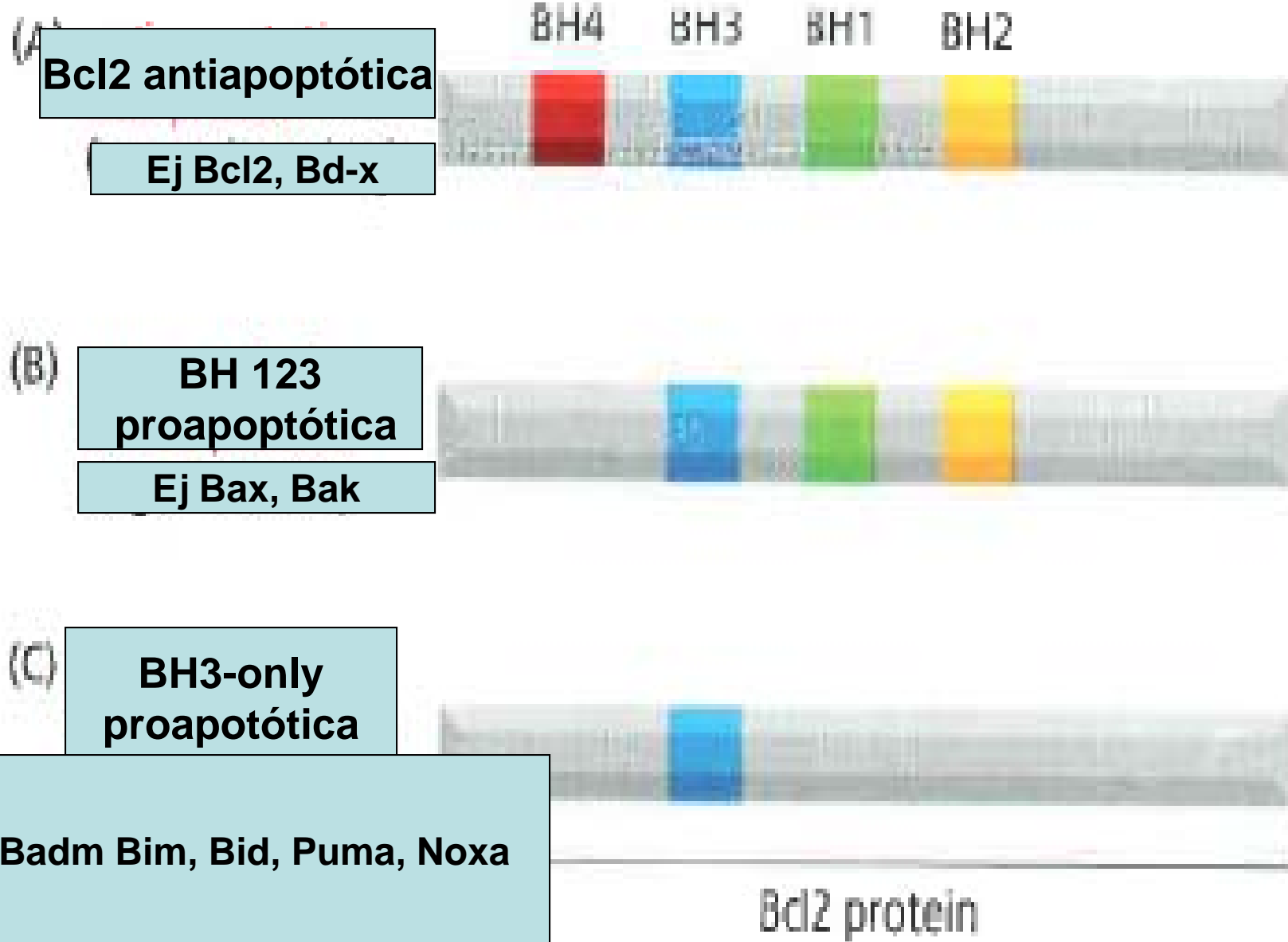
Bcl-2 es el miembro fundador de la familia Bcl-2 de proteínas reguladoras de la apoptosis.

Estas proteínas gobiernan el potencial de la membrana mitocondrial externa y su permeabilidad (MOMP) y pueden ser **pro-apoptóticas (Bax, BAD, Bak y Bok entre otras) o **anti-apoptóticas** (incluyendo Bcl-2, BCL-xL, y Bcl-w, entre un conjunto).**

Algunas proteínas Bcl2 son proapoptóticas y promueven la vía intrínseca induciendo la liberación de cit C al citosol, mientras otras Bcl2 son antiapoptóticas e inhiben esa liberación

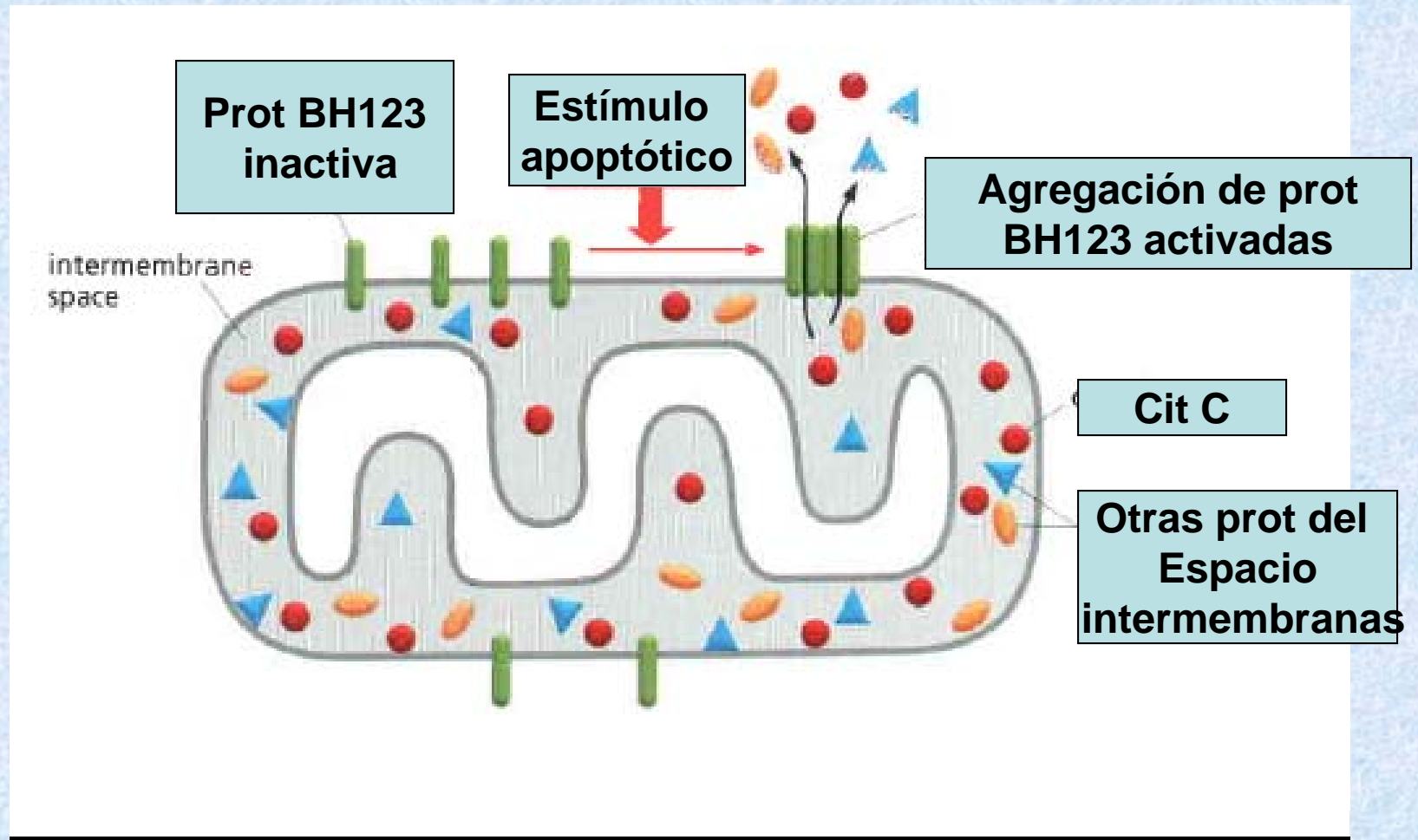
El balance entre estas dos clases de Bcl2 determina si una célula vive o muere por la vía intrínseca de la apoptosis

Familia de proteínas reguladoras Bcl2



Cuando un estímulo apoptótico dispara la vía intrínseca, las proteínas proapoptóticas BH123 se activan y se agregan para formar oligómeros en la membrana externa de las mitocondrias y estimulan la liberación de cit C y otras proteínas mitocondriales.

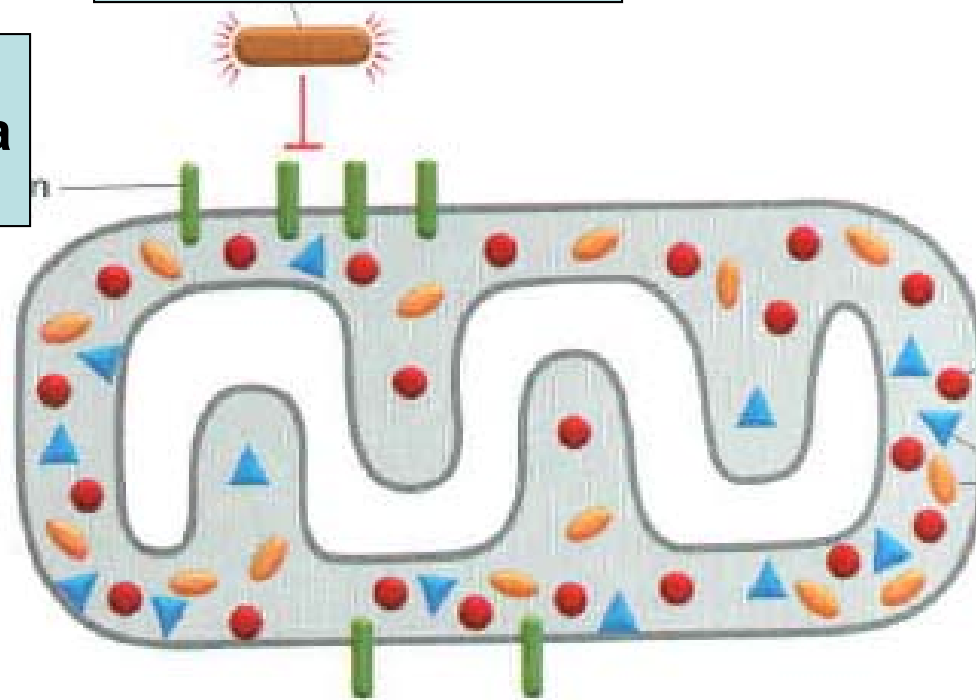
Rol de BH123, proteína Bcl2 proapoptótica en relación a la activación de la vía intrínseca



Vía intrínseca inactiva

Bcl2 activa

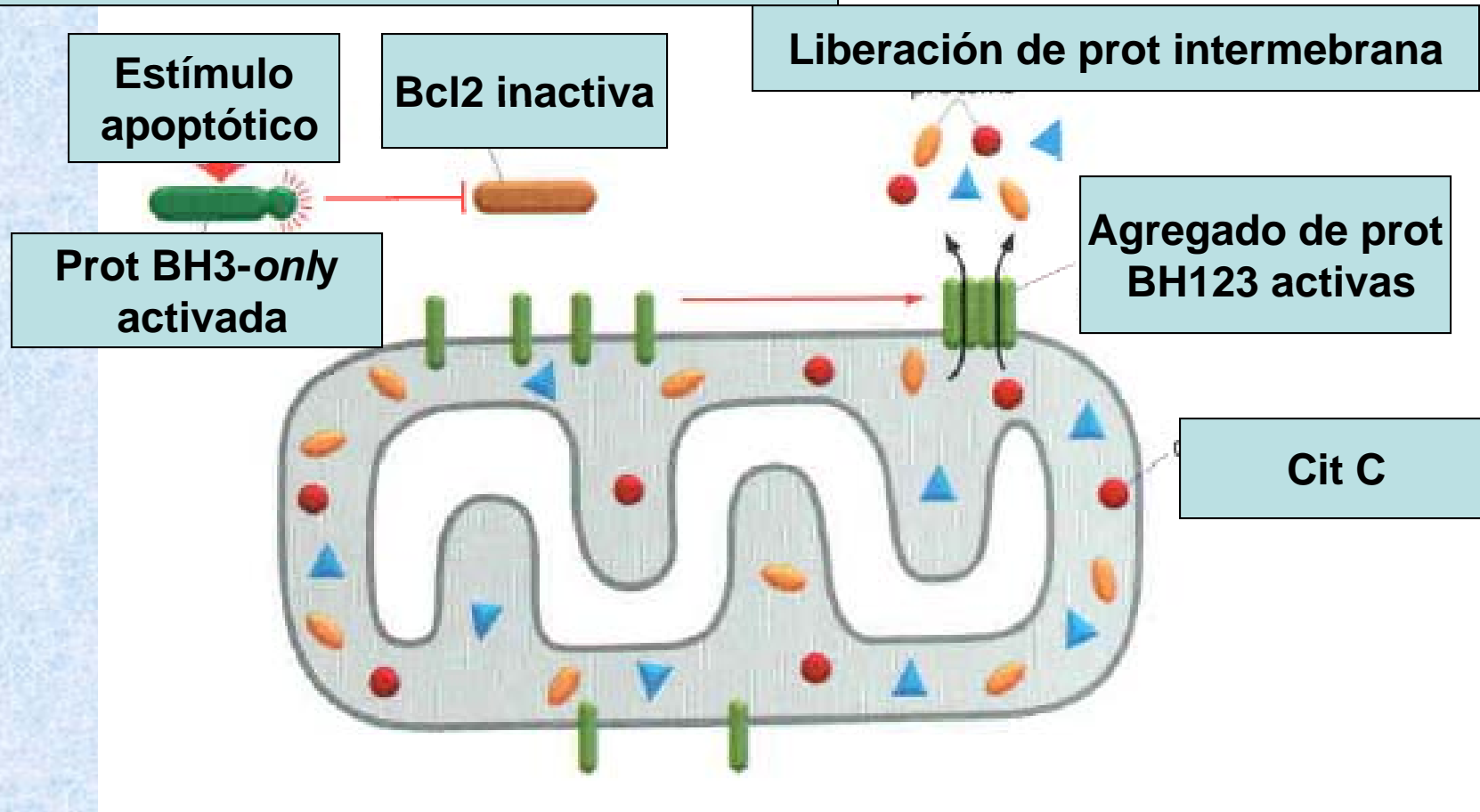
BH123 inactiva



Cit C

Otras proteínas intermembrana

Activación de la vía intrínseca



Inhibidores de caspasas (IAPs)

Descubiertos por primera vez en células de insectos infectadas por baculovirus

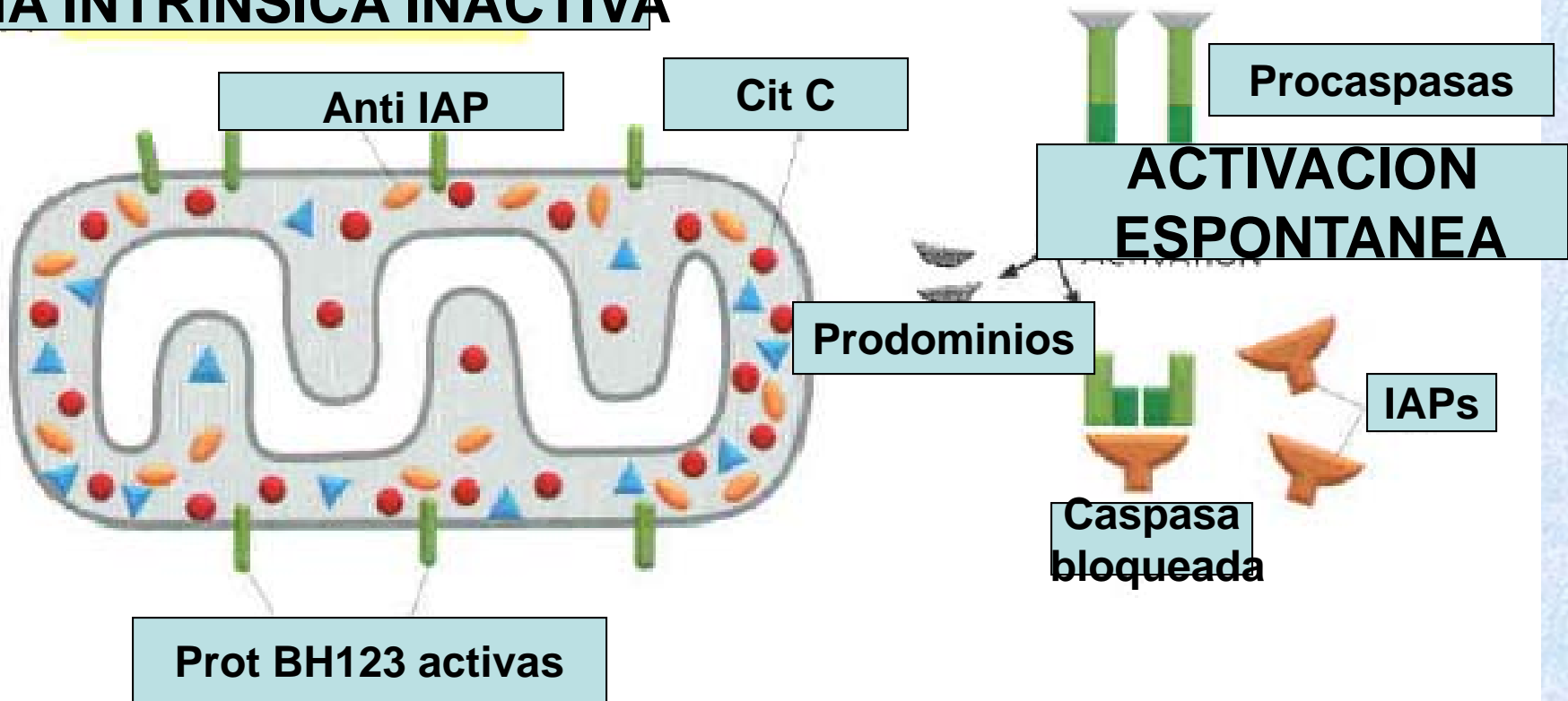
La mayoría de las células de mamíferos pueden sintetizar IAPS



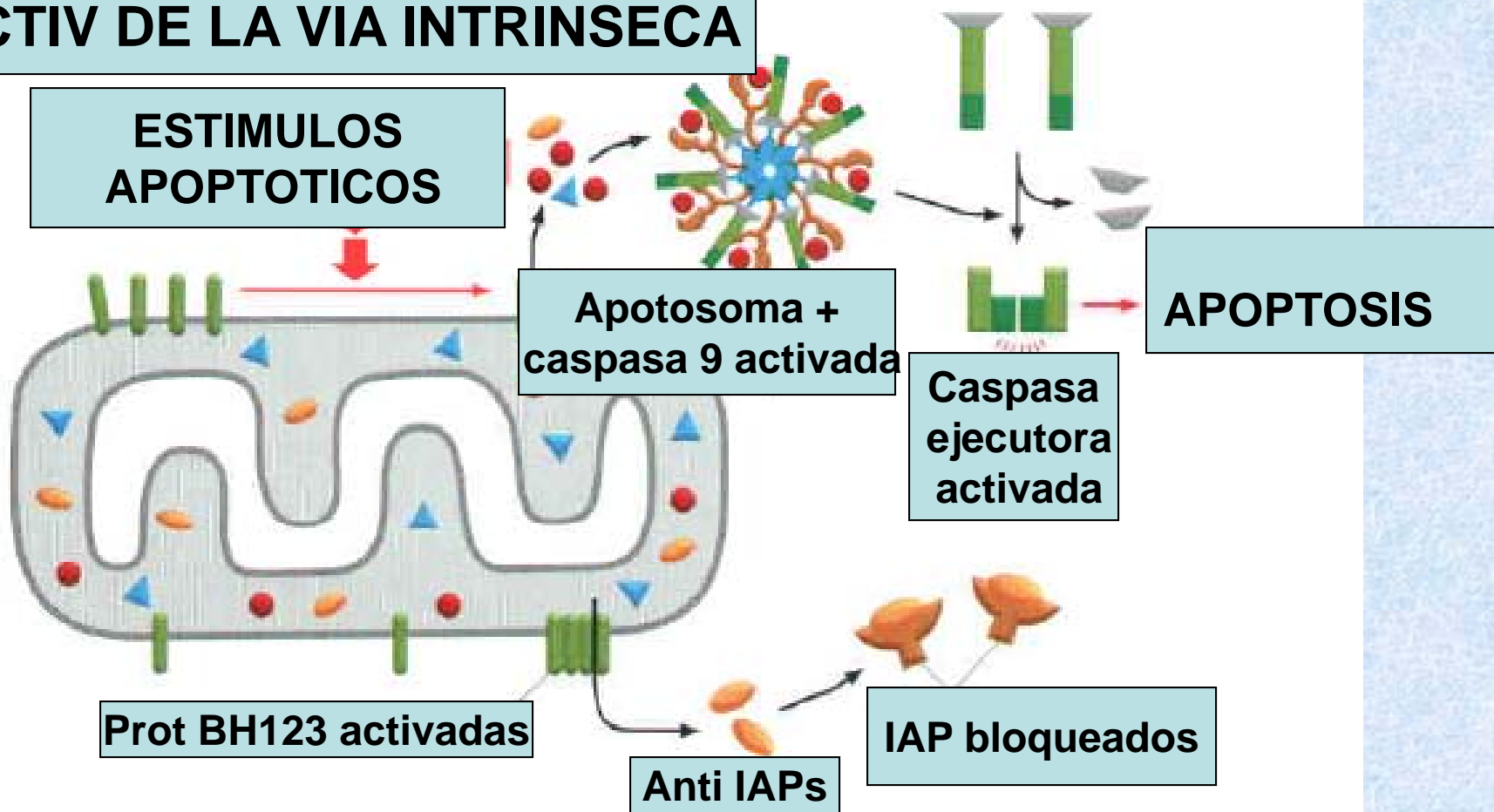
Inhibidores de apoptosis (IAPs)

En ausencia de estímulos apoptóticos los IAPs inhiben la activación espontánea de las procaspasas

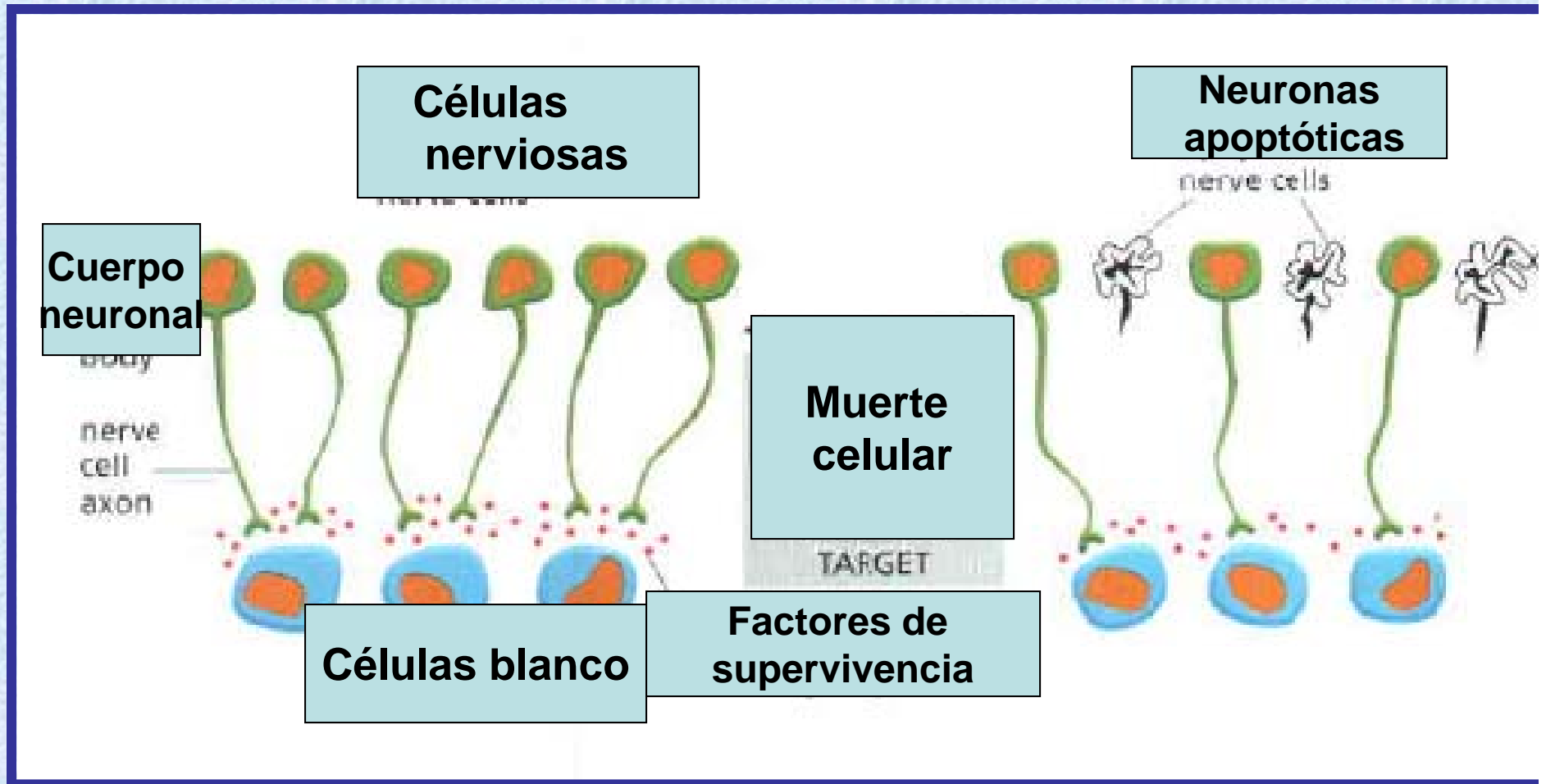
VÍA INTRÍNSICA INACTIVA



ACTIV DE LA VIA INTRINSECA



Rol de factores de supervivencia extracelulares en ajustar el número de células funcionales en el sistema nervioso



Apoptosis y p53

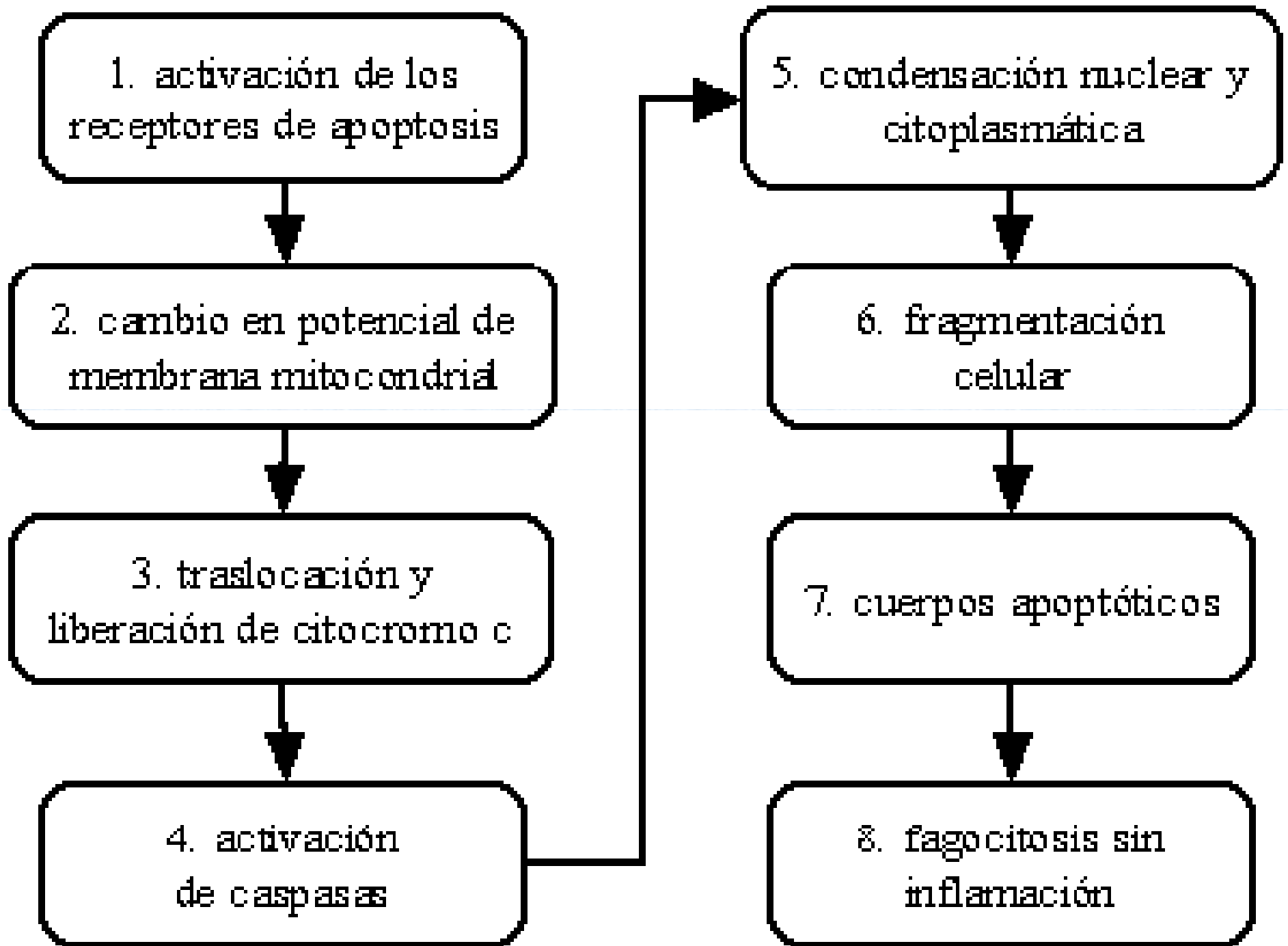
El gen p53 o tp53, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica un factor de transcripción nuclear


Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño al ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor de tumor que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular.

Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53).



La entrada en apoptosis es el último mecanismo protector, si el daño en el ADN es irreparable, para evitar la proliferación de las células que contienen ADN anormal. p53 activa la expresión de genes pro-apoptosis, como **Bax** o **PUMA**. Sin embargo, no está claro cómo decide la célula si debe reparar su ADN o entrar en apoptosis.

Aparentemente p53 presenta mayor afinidad por los promotores de los genes de reparación del ADN que por los promotores de los genes pro-apoptosis, de manera que primero se activa la reparación del ADN. Pero si ésta no es efectiva y p53 continúa acumulándose, se activarían los genes pro-apoptosis.






***Nuestro
agradecimiento a la
Dra Dinorah Gambino
por su gran esfuerzo
en la coordinación de
esta Red CYTED***



***y a la Dra Lena Ruiz
Azuara y su grupo de
trabajo por la
organización de este
curso de la Red
CYTED en la UNAM***





Gracias a todos por su atención