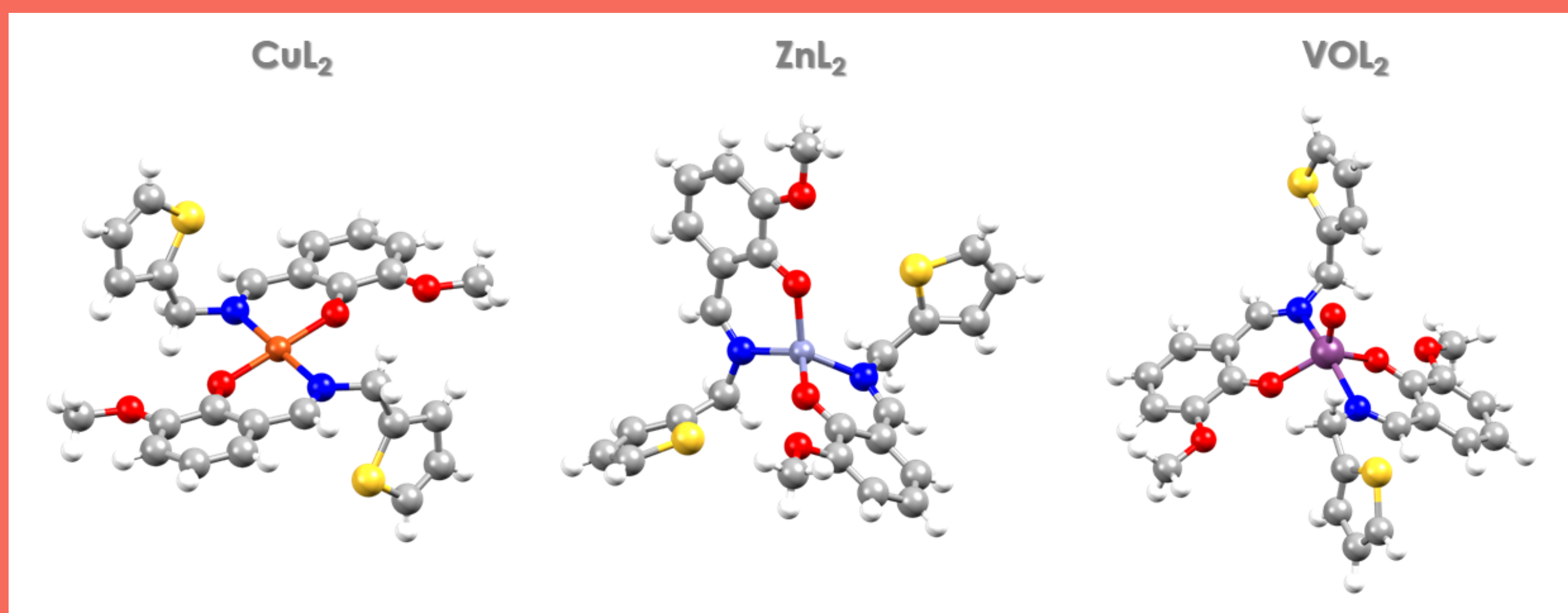


INTRODUCCION



Estructuras de los complejos optimizadas con DFT y que sirvieron de punto de partida para los estudios de interacción con ADN.

Fig 1. Estructuras de los complejos

Resultados previos (María R. Rodríguez et al., *New J. Chem.*, 2019, 43, 11784-11794; María R. Rodríguez et al., *New J. Chem.*, 2019, 43, 7120-7129) mostraron diferencias en la actividad de complejos de Cu(II), Zn(II) y VO(IV) con un ligando derivado de o-vanillin y tiofeno (Figura 1) frente a células tumorales. A fin de indagar sobre posibles mecanismos de citotoxicidad y explicar las mencionadas diferencias, se realizaron ensayos de interacción con ADN y modelado molecular.

RESULTADOS



ENSAYOS DE INTERACCION

Los ensayos de capacidad de clivaje se realizaron mediante electroforesis en gel de agarosa con SC-ADN plasmídico. El análisis de intensidades de las bandas mostró que sólo CuL₂ presenta actividad nucleasa significativa.

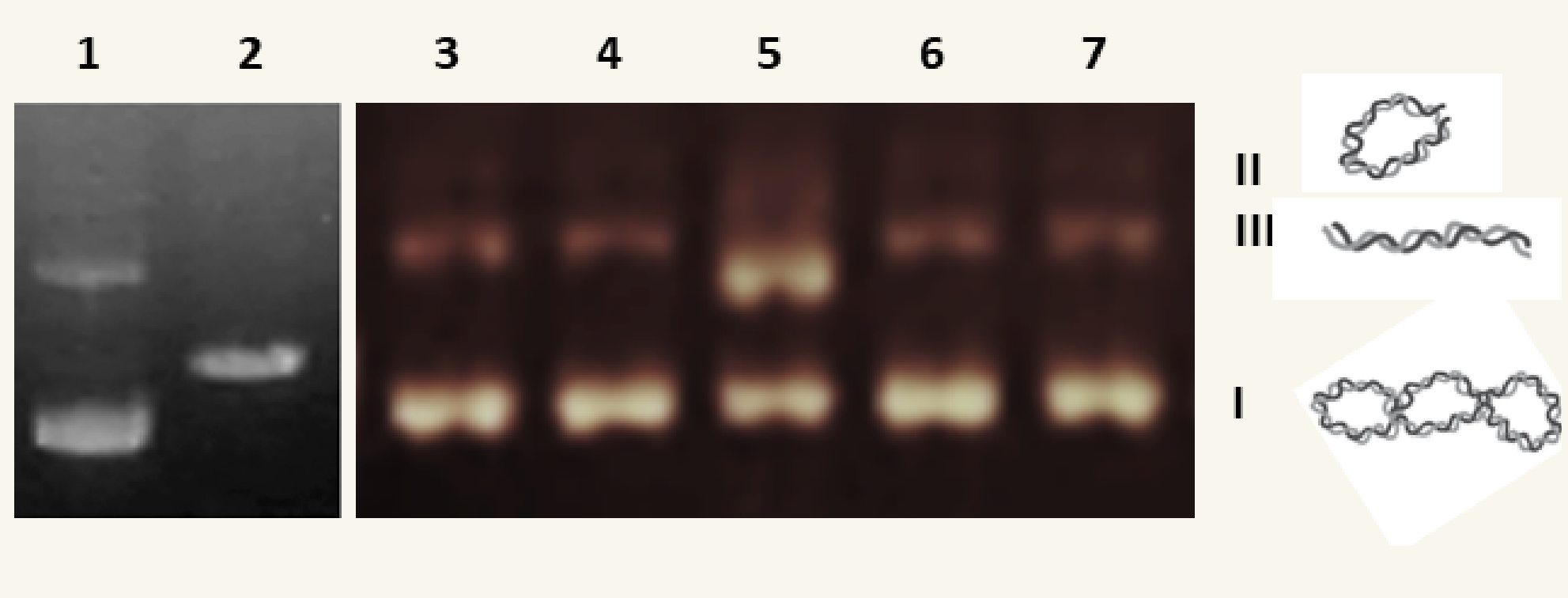


Fig 2. Ensayos de clivaje de ADN

Plasmido 0.3 µg por carril, ligando y complejos 100 µM. Carriles: 1 plasmido natural pGL3; 2 plasmido tratado con XbaI; 3 control (plasmido en DMSO); 4 HL; 5 CuL₂; 6 VOL₂; 7 ZnL₂.



MODELADO MOLECULAR

Con el fin de modelar las diferencias de clivaje, empleando docking molecular se generaron poses del ligando (HL) y de los tres complejos sobre una estructura de dodecámero de DNA (PDB ID 1BNA).

Mejores poses del ligando y sus complejos obtenidas por docking molecular sobre el dodecámero de ADN (gris): HL (azul) y CuL₂ (verde) en surco menor, VOL₂ (cian) y ZnL₂ (rosa) en surco mayor.

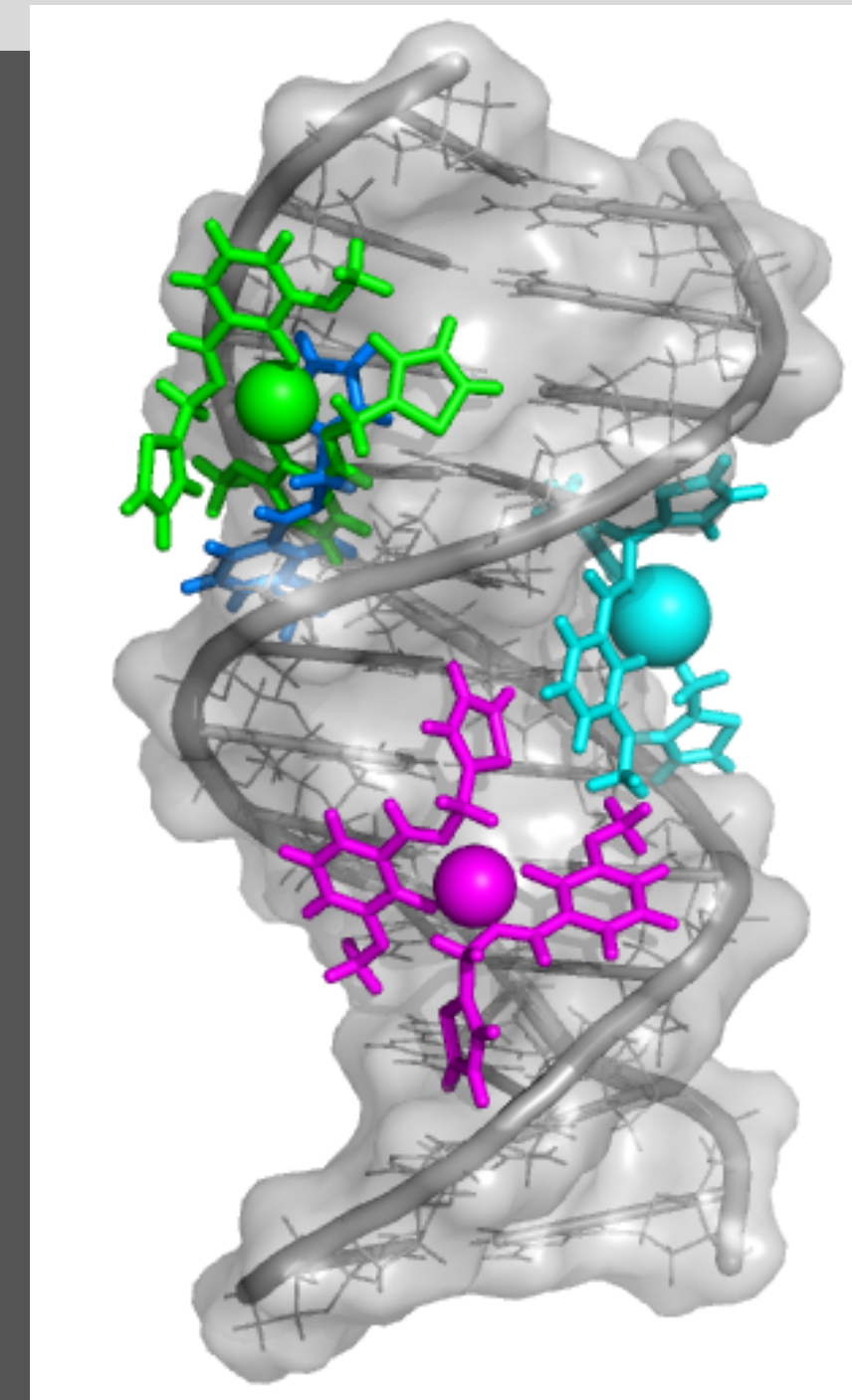


Fig 3. Sitios de interacción

METODOLOGIA

Preparación de estructuras
Las estructuras de partida del ligando HL y el complejo VOL₂ fueron realizadas con Avogadro, mientras que para los complejos CuL₂ y ZnL₂ se utilizó sus estructuras de rayos X.

Luego fueron optimizadas con el modelo B3LYP/def2-TZVP implementado en ORCA. La estructura del dodecámero de ADN fue preparada con CHIMERA.

Docking molecular
Se utilizó el programa HEX 8.1 con función paramétrica 3D con los parámetros por defecto. Fueron descartadas las poses cercanas a los extremos para evitar posibles efectos de contorno.

Simulaciones de dinámica molecular
La topología de los sistemas fue preparada con Leap. Amber14SB fue el campo de fuerzas empleado, mientras que los complejos metálicos fueron parametrizados con MCPB.py. Ambos programas se encuentran incluidos en el paquete AmberTools. Se utilizó solvatación explícita con el modelo de agua TIP3P.

Los pasos de minimización (1x10⁵ pasos), calentamiento y simulación de equilibración/producción (NPT, 300K, 15ns, paso 1fs) fueron realizadas con NAMD2.

Cálculos de MM/GBSA
Las energías de interacción con el modelo *generalized* Born fueron estimadas con el script MMPBSA.py, con parámetros igb=2.

Cálculos LIE (linear interaction energy)
Fueron obtenidas con el programa CAPE.

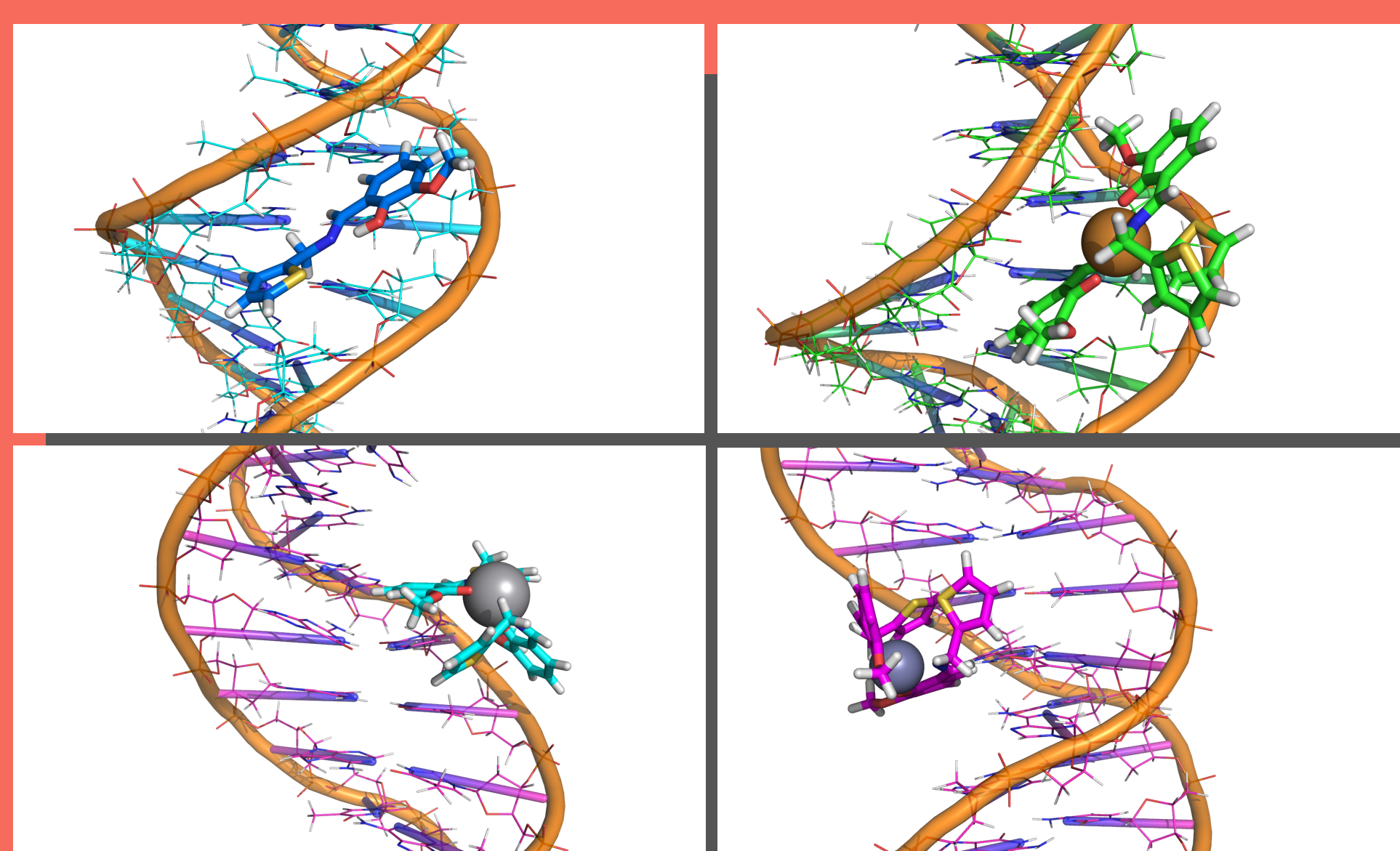


Fig 4. Detalle de interacción con ADN

HL (azul) y CuL₂ (verde) en surco menor, VOL₂ (cian) y ZnL₂ (rosa) en surco mayor.

| Compuesto | MM/GBSA | LIE |
|------------------|-------------|-------|
| HL | -15.9 (4.8) | -5.9 |
| CuL ₂ | -32.4 (9.0) | -10.1 |
| VOL ₂ | -28. (15.) | -5.2 |
| ZnL ₂ | 39.7 (11.) | -3.5 |

Tabla 1. Energías de enlace de HL y sus complejos metálicos con el dodecámero de ADN calculados con MM/GBSA y LIE. Valores en kcal mol⁻¹, desviación estándar entre paréntesis.

Simulaciones de dinámica molecular fueron aplicadas sobre las poses mejor clasificadas. Los resultados mostraron que HL y CuL₂ se ubican en el surco menor, mientras que ZnL₂ y VOL₂ lo hacen en el surco mayor.

Las energías de unión calculadas mediante simulaciones de dinámica molecular y el modelo MM/GBSA asignaron una mayor afinidad del complejo de Cu(II) e inestabilidad de la unión de los complejos de Zn(II) y VO(IV) (Tabla 1).

CONCLUSIONES

La alta afinidad de CuL₂ y su capacidad de clivaje de ADN podría explicar su actividad citotóxica. De acuerdo con el análisis espectroscópico, los complejos conservan en solución la geometría del entorno de coordinación determinada para el sólido. La capacidad intercalante del complejo de Cu(II) puede asociarse a su planaridad.