



Síntesis y caracterización de complejos bimetálicos de iones divalentes con efecto inhibidor de la replicación de virus herpes simple

Synthesis and characterization of bimetallic complexes of divalent ions with inhibitory effect of herpes simplex virus replication

Gerardo Alonso-Torres¹, Luz Cecilia López-Ureta², Rigoberto González-Rodríguez³

¹ Tecnológico Nacional de México / ITJMMPyH - Campus Zapopan, Jalisco, México.

¹ Tecnológico Nacional de México / ITJMMPyH - Campus Lagos de Moreno, Jalisco, México.

¹ Tecnológico Nacional de México / ITJMMPyH - Campus Mascota, Jalisco, México.

Recibido: 20-11-2019

Aceptado: 10-12-2019

Autor correspondal: rigoberto.gonzalez.rodriguez@gmail.com

Resumen

Los virus del herpes simple (VHS) son patógenos que infectan hombres y animales causando una amplia variedad de estados de enfermedad, existen dos tipos el VHS-1 y el VHS-2. A nivel mundial más de 3.700 millones de personas tienen infección por VHS-1 y cerca de 417 millones por VHS-2. El VHS está bien distribuido en todo el mundo, con más de 23 millones de casos nuevos por año. En general, los tratamientos médicos actuales de la infección por VHS se centran en el tratamiento episódico con agentes tópicos o agentes antivirales orales, a base de aciclovir, cidofovir y foscarnet, que llegan a tener efectos adversos considerables, sin que a la fecha se tenga una cura definitiva. Se han reportado tratamientos para infecciones por VHS en humanos que consisten en composiciones químicas basadas en complejos quelantes metálicos. En el presente estudio, se desarrolló una estrategia metodológica para sintetizar a nivel laboratorio un complejo bimetálico de EDTA y iones divalentes Zn^{2+} y Cu^{2+} respectivamente. La molécula sintetizada de $ZnCu[EDTA].6H_2O$ se caracterizó fisicoquímicamente y por espectroscopía IR y se concluyó que puede ser usada en el tratamiento de infección por VHS ya que la liberación controlada de los iones metálicos posee capacidad de inhibir la replicación del VHS.

Palabras clave: virus herpes simple, complejo quelante bimetálico, EDTA, catión divalente.

Abstract

Herpes simplex virus (HSV) are pathogens that infect men and animals causing a wide variety of disease states, there are two types HSV-1 and HSV-2. Worldwide, more than 3,700 million people have HSV-1 infection and about 417 million have HSV-2. HSV is well distributed worldwide, with more than 23 million new cases per year. In general, current medical treatments for HSV infection are focused on episodic treatment with topical agents or oral antiviral agents, based on acyclovir, cidofovir and foscarnet, which have considerable adverse effects, without having to date A definitive cure Treatments for HSV infections in humans that consist of chemical compositions based on metal chelating complexes have been reported. In the present study, a methodological strategy was developed to synthesize at a laboratory level a bimetallic complex of EDTA and divalent ions Zn^{2+} and Cu^{2+} respectively. The synthesized molecule of $ZnCu[EDTA].6H_2O$ was characterized physicochemically and by IR spectroscopy and it was concluded that it can be used in the treatment of HSV infection since the controlled release of metal ions has the ability to inhibit HSV replication.

Keywords: Herpes simplex virus, bimetallic chelating complex, EDTA, divalent cation.

Introducción

Los virus del herpes simple son patógenos ubicuos adaptados al huésped que causan una amplia variedad de estados de enfermedad. Existen dos tipos: virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2). Ambos están estrechamente relacionados, pero difieren en epidemiología. El HSV-1 se asocia tradicionalmente con la enfermedad orofacial, mientras que el HSV-2 se asocia tradicionalmente con la

enfermedad genital. Sin embargo, la localización de la lesión no es necesariamente indicativa del tipo viral (Ayoade & Todd John, 2018).

El VHS pertenece al grupo alfa herpesvirus, está envuelto y tiene 160 nm de diámetro con un genoma de ADN lineal de doble cadena. La homología de secuencia global entre VHS-1 y VHS-2 es aproximadamente del 50%. VHS-1 tiene tropismo por epitelio oral, mientras que VHS-2 tiene tropismo por epitelio genital. La infección por VHS está mediada por la unión a través de receptores ubicuos a las células, incluidas las neuronas sensoriales, lo que conduce al establecimiento de la latencia (Schiffer & Corey, 2015).

Según datos de la OMS (2017), se estima que 3.700 millones de personas menores de 50 años (67%) tienen infección por VHS-1 a nivel mundial y cerca de 417 millones de personas de 15 a 49 años (11%) en todo el mundo tienen infección por VHS-2. HSV está bien distribuido en todo el mundo, con más de 23 millones de casos nuevos por año. Se ha documentado un aumento en la seroprevalencia de los anticuerpos contra VHS-2 en todo el mundo (incluidos los Estados Unidos) en los últimos 20 años (Schiffer & Corey, 2015).

En general, el tratamiento médico de la infección por el virus del herpes simple (VHS) se centra en el tratamiento antiviral específico. Si bien los mismos medicamentos son activos contra VHS-1 y VHS-2, la ubicación de las lesiones y la cronicidad (primaria o reactivación) de la infección determinan la dosis y la frecuencia de la medicación. Es importante tener en cuenta que las infecciones por VHS potencialmente mortales en pacientes inmunodeprimidos y la encefalitis por VHS requieren altas dosis de aciclovir intravenoso, que a menudo se inicia empíricamente (Cohen & Powderly, 2004).

Las infecciones por VHS resistentes al aciclovir a menudo se observan en pacientes inmunocomprometidos (p. Ej., Pacientes con infección por VIH). Las opciones de tratamiento incluyen cidofovir y foscarnet, pero ambos son muy nefrotóxicos (Schiffer & Corey, 2015). Las opciones para infecciones recurrentes por VHS incluyen ningún tratamiento (para episodios poco frecuentes) o tratamiento episódico con agentes tópicos o agentes antivirales orales. La terapia supresora a largo plazo, que puede continuarse hasta por un año, también es una opción. Se ha informado un beneficio modesto con recurrencias más bajas utilizando este método (Baker & Eisen, 2003).

Si bien hasta la fecha no hay una cura definitiva para la infección por el VHS, existen fundamentalmente dos estrategias terapéuticas para el manejo de las recidivas del herpes genital: terapia episódica, para tratar los brotes cuando ocurren (Le Cleach, et al., 2014) y la terapia supresiva, para intentar prevenir futuros brotes (González-González, 2003).

La terapia episódica se pone en práctica cuando se presentan los síntomas de un brote. Con el tratamiento de las recidivas se administra un fármaco antivírico por vía oral durante varios días, generalmente de 3 a 5, y se pretende acortar la duración del episodio e intentar aliviar los síntomas de la infección, aunque no altera la frecuencia de las recurrencias (Le Cleach, et al., 2014).

En otros estudios se han reportado tratamientos para infecciones por VHS en humanos que consisten en composiciones químicas basadas en complejos quelantes metálicos. Se ha utilizado un tratamiento tópico

con un quelante metálico divalente de un polisulfato de xilano sustituido con iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , y Zn^{2+} unido a un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (Australia Patente n° 5,514,667, 1996), y también se han desarrollado agentes formadores de quelatos y aminoácidos esenciales o sus derivados que se encuentran acomplejados con iones metálicos bivalentes, aunque su tratamiento es por periodos de 12 a 15 días no ha resultado del todo eficaz para controlar la infección por VHS (OMPI (PTC) Patente n° WO1996006639A3, 1994). En otro estudio se desarrolló un procedimiento para inhibir la replicación y expresión génica del HSV por medio de la aplicación de una molécula ARN enzimática, sin embargo el tratamiento es largo y el uso de ARN es complejo (Boulder, Colo. Patente n° 5,972,699, 1999).

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se propone una metodología para la síntesis de una nueva molécula a base de un complejo bimetalico de iones divalentes con efecto inhibidor de la replicación del VHS, de liberación controlada, sostenida y con menos efectos adversos y con mayor eficacia que los existentes en el mercado.

Materiales y métodos

Para la realización de esta investigación se desarrolló una metodología de cinco etapas:

Etapas 1- Identificación de moléculas y principios activos de baja citotoxicidad.

Se llevó a cabo una revisión de la literatura sobre de principios activos que inhiben la replicación del virus herpes simple 1 y 2, de los cuales se eligieron metales de transición divalentes como Zn^{2+} y Cu^{2+} . Posteriormente se identificaron y seleccionaron moléculas que puedan liberar principios activos como los compuestos de coordinación o quelatos, como son el glicolato, citrato, edetato, malato o gluconato; se decidió emplear el ácido etilendiaminotetracético (H_4EDTA)

Etapas 2- Síntesis química de edetato bimetalico Zn (II)-Cu (II)

$\text{ZnCu}[\text{EDTA}].6\text{H}_2\text{O}$. Se colocaron 2.92 g del ácido etilendiaminotetracético H_4EDTA ACS, 99.4-100% (Sigma-Aldrich®) en 200.57 mL de agua bidestilada en aparato de destilación, la mezcla se llevó a una temperatura de 60°C con agitación vigorosa constante sobre una plancha de calefacción, en seguida se agregaron 0.80 g de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Sigma-Aldrich®) y se dejó reaccionar por 60 minutos. Posteriormente, a la mezcla resultante se le adicionaron 1.08 g de ZnCO_3 (Sigma-Aldrich®) en pequeñas porciones y se dejó reaccionar a 60°C por 60 min.

Etapas 3- Separación y purificación

El producto resultante de la etapa 2 se dejó enfriar hasta una temperatura de 25°C y se adicionaron 50 mL de metanol frío PS, 99.8% (Panreac®) para acelerar la precipitación de cristales. Se dejó reposar por 24 horas y se procedió a separar el precipitado formado mediante filtración al vacío y posterior lavado con agua bidestilada y enseguida se llevó a un horno de secado (Novatech®) a 60°C hasta peso constante.

Etapa 4- Determinación de principios activos liberados a diferentes valores de pH.

Se desarrolló un modelo químico-matemático asistido por computadora con fundamento en los equilibrios simultáneos ácido-base de moléculas complejas. Se elaboraron curvas de distribución de las especies del H₄EDTA, el pH, y las especies formadoras de complejos auxiliares y enmascarantes, como se observa en la figura 1.

$$K_{MY} = \frac{[MY]}{[MY]C_T}$$

Donde C_T es la concentración total de Y, α es la fracción de Y dependiente del pH.

Así, α se calculó a distintos pH según:

$$\alpha = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{[H^+]^4 + k_1[H^+]^3 + k_1 k_2[H^+]^2 + k_1 k_2 k_3[H^+] + k_1 k_2 k_3 k_4}$$

Donde $k_1 k_2 k_3 k_4$ son las constantes de acidez del EDTA.

Para los dos cationes metálicos implicados en el diseño metodológico, los logaritmos de las respectivas constantes de estabilidad (β) se definieron como:

$$\beta = \frac{[M(EDTA)^{-2}]}{[M^{+2}] [EDTA^{-4}]}$$

Posteriormente se graficó el pM (-log[M]) en función del volumen del titulante (EDTA) agregado y se calcula α que es la fracción de Y dependiente del pH.

Finalmente, se realizaron valoraciones complejométricas sucesivas del complejo bimetálico a concentraciones de 0.100, 0.200, 0.500 y 1.00 mol/L en función del pH.

Etapa 5- Caracterización espectroscópica del compuesto

Los espectros infrarrojos del compuesto bimetálico obtenido a valores de pH tamponados a 3.16 y 11.71 respectivamente, se registraron con espectrofotómetro FT-IR, Thermo Scientific® Nicolet iS5 en el rango espectral entre 4000 y 400 cm⁻¹ usando la técnica de pellets de KBr.

Resultados y discusión

Mediante la metodología propuesta en la investigación se logró sintetizar una nueva molécula biocompatible de fórmula $ZnCu[EDTA].6H_2O$ que posee propiedades antivirales, ya que tiene la capacidad de liberar los cationes Zn^{2+} y Cu^{2+} de manera controlada y sostenida a rangos de pH en las células en las que se produce la infección por VHS. Como se mencionó en los antecedentes, es bien conocido que los iones Zinc (II) y Cobre (II) así como otros metales de transición a bajas concentraciones inhiben la replicación de este tipo de virus sin causar citotoxicidad en células sanas.

De acuerdo al modelo químico matemático empleado, que se aprecia en la figura 1, se pudo determinar los logaritmos de las constantes de estabilidad de los dos cationes metálicos, siendo 16.50 para Zinc (II)

y 18.8 para Cobre (II). Esto significa que en el sistema Cu (II) / Zn (II) el catión de cobre (II) puede ser quelado preferentemente por EDTA, mientras que el zinc (II) permanece como contra-catión, fuera de la esfera de coordinación, lo que indica la estabilidad del complejo formado.

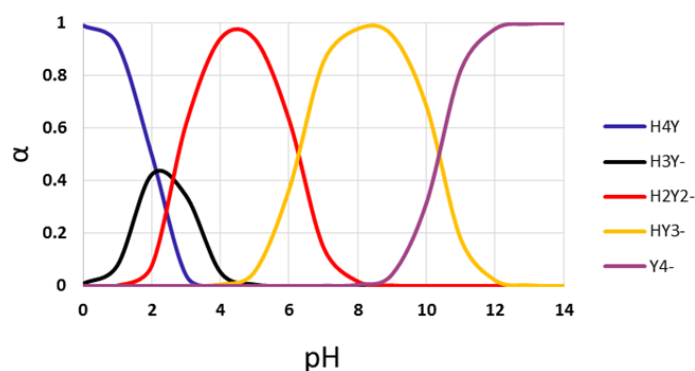


Figura 1 Distribución de especies del ácido H₄EDTA en función del pH.
Fuente: Los autores

El efecto de liberación controlada por el pH de los cationes bivalentes se debe a la distribución de especies que genera la protonación del agente quelante. Este comportamiento típico se muestra en la figura 2, de donde se dedujo que las especies que contienen EDTA⁴⁻ no están disponibles a todos los rangos de pH, es decir, en todos los rangos de pH se tendrán disponibles iones Zn²⁺ para inhibir la replicación del virus VHS y se potencializa dicho efecto en el rango de pH donde se disocian iones Cu²⁺, explicándose el efecto que puede tener la molécula de ZnCu[EDTA].6H₂O.

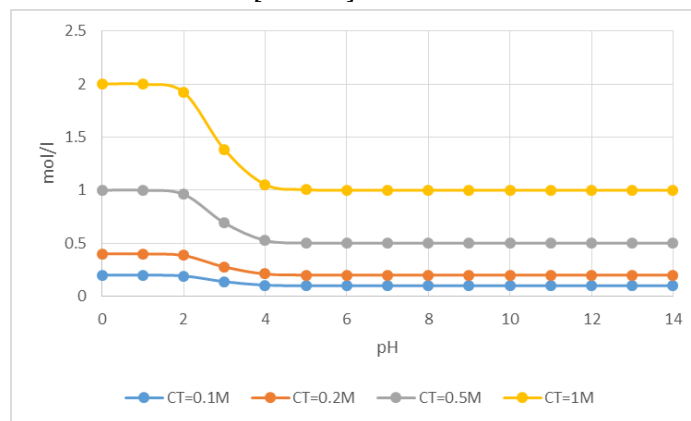


Figura 2. Liberación de sustancias activas en función del pH
Fuente: Los autores

Los efectos antivirales del Zn²⁺ se deben a que las glicoproteínas que contiene la envoltura o revestimiento de VHS están conformadas por residuos de las células destruidas que quedan después de la infección son reactivas frente a las sales con Zn²⁺. Por otra parte, el Cu²⁺ actúa directamente sobre el ADN viral. Siendo así que los efectos antivirales de la molécula se den por dos mecanismos diferentes. Por un lado, el Zn²⁺ se enlaza a las glicoproteínas de la envoltura del virus impidiendo así su penetración y por otra parte cuando se libera Cu²⁺ se modifica el ADN del virus. Ambos mecanismos inhiben la replicación tanto del VHS-1 y VHS-2.

Los espectros de infrarrojo del complejo $ZnCu[EDTA].6H_2O$ a dos diferentes valores de pH fueron, como se esperaba, muy similares. En la figura 3 se muestran los espectros IR del complejo a pH 3.16 y a pH 11.71 respectivamente

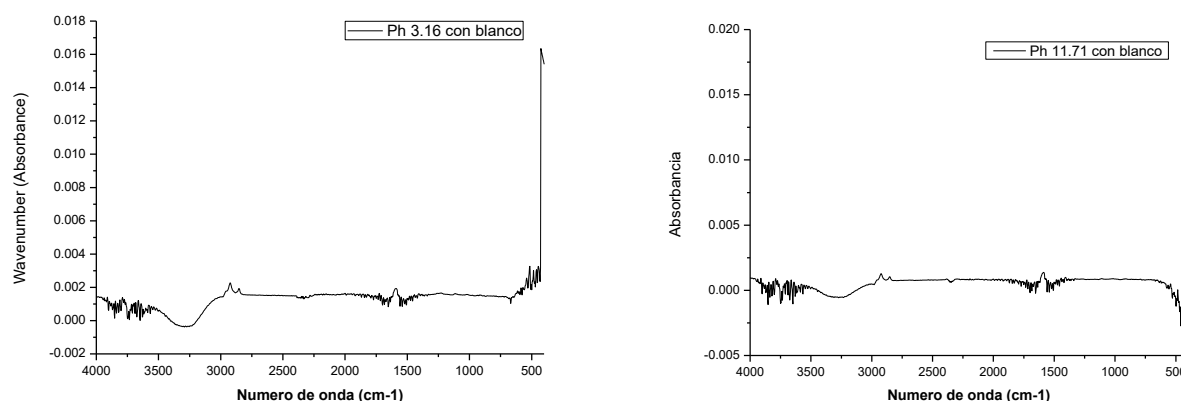


Figura 3. Espectros de absorción IR para el compuesto $ZnCu[EDTA].6H_2O$ a pH tamponado de 3.16 (izquierda) y a pH 11.71 (derecha)

Fuente: Los autores

Se observó en la región cercana al visible las diferencias entre los dos espectros. A pH alcalino las especies predominantes son Zn^{2+} y $Cu[EDTA]^{2-}$ por lo que de 750 a 500 cm^{-1} se puede observar un decremento de la absorbancia que correspondería a la presencia de enlace covalente coordinado entre el EDTA y los iones Cu^{2+} , mientras que a pH ácido se observa un aumento de la absorbancia a las mismas frecuencias lo que explica en gran parte, cómo se predijo, la liberación de iones Cu^{2+} , ya que el cobre (II) presenta coloraciones azules debido a los enlaces de coordinación que forma con el agua.

La infección de VHS en diferentes células huésped es independiente del pH, sin embargo, la replicación del virus se afecta por la presencia de los principios activos (Cu^{2+} y Zn^{2+}) que ocasionan cambios a nivel molecular de las glicoproteínas de la envoltura del virión, lo que impide la penetración del virus en células sanas. Esto se debe a que las células huésped y el virus necesitan determinada estructura de las glicoproteínas, y al verse esta alterada, se impide la fusión célula-virus.

De esta forma, el compuesto de fórmula $ZnCu[EDTA].6H_2O$ se mantiene sin disociar completamente en un medio fisiológico normal, es decir, en la piel sin infección de VHS. Cuando el VHS se activa, el pH en donde se localiza la superficie de las células infectadas cambia. El compuesto $ZnCu[EDTA].6H_2O$ se difunde a través de la dermis hasta llegar a las células donde se disocia casi en su totalidad liberando así los principios activos (Cu^{2+} y Zn^{2+}), debido a que el intervalo de pH de las células infectadas de VHS es variable. Así, el compuesto $ZnCu[EDTA].6H_2O$ permite la liberación dual de principios activos de forma predecible y controlada.

Si bien es cierto que existen estudios clínicos estandarizados y controlados para una gran variedad de sales de cobre y de zinc investigadas desde hace décadas, en nuestro caso aún no se han desarrollado estudios a ese nivel para el compuesto $ZnCu[EDTA].6H_2O$

Conclusiones

Existen actualmente diversas sustancias químicas con acción antiviral empleadas en el campo farmacéutico y médico para el control y prevención de la infección de VHS. Las composiciones químicas basadas en complejos quelantes metálicos, así como aquellos basados en moléculas de ARN enzimático, han resultado ser en muchos de los casos, una buena opción de tratamiento de infección por VHS, sin embargo, su efectividad no ha sido la esperada y los costos de producción son elevados.

La experiencia adquirida con el desarrollo del presente proyecto, permite obtener composiciones de uso farmacéutico basados en complejos bimetálicos con cationes divalentes con efecto inhibitor de la replicación del VHS, específicamente se logró sintetizar y caracterizar parcialmente la molécula $ZnCu[EDTA].6H_2O$, que puede ser una excelente alternativa al tratamiento de la infección por VHS en periodos de tiempo relativamente cortos y con mayor eficacia, sin la necesidad de usar antiinflamatorios, ARN u otros agentes antivirales.

El impacto social y económico que puede generar el desarrollo del compuesto $ZnCu[EDTA].6H_2O$ está enfocado a contribuir a la estrategia mundial de la OMS contra las infecciones de transmisión sexual, incluidas las producidas por VHS, ya que se sabe que 67% de la población mundial está infectada por algún serotipo de VHS, por lo que se han propuesto acelerar el desarrollo de vacunas y microbicidas de aplicación tópica, que desempeñarán un papel esencial en la prevención de estas infecciones en el futuro. La metodología propuesta para la síntesis de la molécula utilizada en la investigación es relativamente sencilla y fácil de aplicar, por lo el impacto económico y de innovación al sector farmacéutico resulta atractivo.

Por último, cabe señalar que el proyecto se encuentra en fase química de desarrollo del fármaco y su caracterización fisicoquímica; el siguiente paso, será abundar en su estado físico, estructura química, peso molecular, solubilidad en agua y en lípidos, punto de fusión y de ebullición, densidad, pKa, espectros infrarrojo y ultravioleta, espectrometría de masas y RMN, termolabilidad, fotosensibilidad y estabilidad en disolución o en presencia de humedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henríquez (TecMM) por el apoyo económico recibido y el uso de sus instalaciones. También desean expresar su agradecimiento al Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara por las facilidades brindadas para los estudios de caracterización fisicoquímica y espectroscopía de IR.

Referencias bibliográficas

Ayoade, O. F., & Todd John, R. (01 de marzo de 2018). *Herpes simple*. Obtenido de Medscape: <https://emedicine.medscape.com/article/218580-overview#a4>

- Bacanu, S. A., Lonescu, L., Sorin, R., & Tomas, S. T. (1994). *OMPI (PTC) Patente n° WO1996006639A3*.
- Baker, & Eisen. (2003). *Cutis. Valacyclovir para la prevención del herpes labial recurrente: 2 estudios doble ciego, controlados con placebo*. 71 (3): 239-42.
- Cohen, & Powderly. (2004). *Medicamentos para las infecciones por herpesvirus*. Nueva York: Enfermedades infecciosas. 2da Ed. Vol. 2.
- Cullis-Hill, D. (1996). *Australia Patente n° 5,514,667*.
- Draper, K. G. (1999). *Boulder, Colo. Patente n° 5,972,699*.
- González-González, S. (2003). *Terapias supresivas en el herpes simple*. Dermatología CQM.
- Le Cleach, L., Trinquart, L., G., D., Maruani, A., Lebrun-Vignes, B., Ravaud, P., & Chosidow, O. (2014). *Oral antiviral therapy for prevention of genital herpes outbreaks in immunocompetent and nonpregnant patients*. Cochrane Database of Systematic Reviews.
- Schiffer, J. T., & Corey, L. (2015). New Concepts in Understanding Genital Herpes. *Urinary Tract Infections*, 458-464.