

UNIVERSIDAD DE CHILE  
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**“ESTUDIO FISCOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DE UNA SERIE DE COMPLEJOS METÁLICOS CON LIGANDOS BIOACTIVOS CONTRA *Trypanosoma cruzi* Y CÉLAS NEOPLÁSICAS”.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Química**

**Por:**

**JEANNETTE DE LOS ANGELES TOLOZA GONZÁLEZ**

**Directores de Tesis**

**DR. CLAUDIO OLEA AZAR**

**DR. JUAN DIEGO MAYA**

**SANTIAGO-CHILE**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

**JEANNETTE DE LOS ANGELES TOLOZA GONZÁLEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día.....de ..... de 2014.

**Directores de Tesis:**

Dr. Claudio Olea Azar

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Diego Maya

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Nicolás Yutronic (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Norbel Galanti

\_\_\_\_\_

Dra. Carolina Aliaga

\_\_\_\_\_

Dr. Fernando Godoy

\_\_\_\_\_

Durante esta tesis se contó con el financiamiento de las siguientes becas otorgadas por:

**CONICYT**

Beca Doctorado Nacional N°24121578

Beca Apoyo de Tesis (2012-2013)

Extensión Beca Doctoral (2013)

**Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile**

Beca Rebaja de Arancel (2010-2015)

Beca MECESUP (2011)

## DEDICATORIA

Este proyecto es dedicado a mi mamita quien desde el cielo sé que me cuida y protege. A mis padres, lo cuales me han enseñado perseverancia y esfuerzo a base de su propio ejemplo y a mi hija, el regalo más grande que Dios me pudo dar.

*"La vida es aquello que sucede mientras planeamos el futuro."*

*-John Lennon"*

## AGRADECIMIENTOS

Tengo tanto que agradecer, que la verdad no sé si existan las palabras y la cantidad de papel necesario para plasmar mis sinceros agradecimientos para con todos.

Intentaré sintetizar, ordenar y escribir lo más brevemente posible mis emociones. Comenzaré agradeciendo a Dios por permitirme, llegar hasta aquí.

Como alguna vez escuche, el hombre no es una isla, y así es. Todos necesitamos ayuda para lograr algo, así que comenzaré agradeciendo a mis padres, Jorge y Elsa, que me apoyaron en todo, entregándome las herramientas físicas y psicológicas para lograr todo lo que me proponga, su ayuda incondicional es fundamental en mi vida. A mis hermanos Cindy y Ángel que de una forma u otra, aportaron también en este gran proyecto, así como también a mi Nana y mis primas Erika e Ivania que estuvieron presentes también en todo este proceso.

Por otra parte, mis compañeros de laboratorio que con su alegría y buena onda, permitían mantener un ambiente cálido, lleno de amistad y disponible para cualquier ayuda. Sin ellos, este proyecto, no conllevaría tan agradables recuerdos. Gracias por todo, Alejandra, Benjamín, Francisco, Roberto, Carolina y como toda promesa es deuda, una mención especial para Michel Lapier, el cual a muchos de nosotros no introdujo al mundo de la biología con la mejor disposición del mundo. Agradezco a tu madre porque crió a un gran hombre, buen amigo y servicial, sé que junto a Karen, serás un gran padre; Gaspard, un niño con mucha suerte de tenerlos.

Dentro del ambiente académico, tengo que agradecer a 2 profesores muy importantes en este proceso, mis directores de tesis. Que aprovecho de disculparme por tantas rabias pasadas. Comenzaré con el Dr Claudio Olea, el cual desde pregrado confió en mis capacidades y me entrego los conocimientos necesarios para llegar hasta aquí, por su docencia por vocación y profesión, nos enseñó a todos mucho más que conocimientos, nos entregó apoyo y consejos acertados en el momento oportuno, aún recuerdo su frase cuando le conté sobre mi embarazo “Había tenido un día desagradable, tu noticia me arreglo el día”. Gracias profesor, por cada consejo y detalle para conmigo y sobre todo su apoyo en cada etapa de este proceso y en cada etapa de mi vida.

El otro profesor, al cual me refiero es el Dr. Juan Diego Maya, el cual es la persona más ocupada que conozco, pero aun así siempre se hace un espacio en la agenda para atenderte, le agradezco profundamente sus

interminables revisiones de escrito, y sus metódicos consejos. Afortunadamente, también tengo grabada una par de frases de él, pero me quedará con esta “Mándale un trabajo a una persona ocupada y lo hará antes que una desocupada”.

Otra mención honrosa en mi vida académica es el profesor Norbel Galanti, que siempre estuvo accesible y en pro del alumno. Y la profesora Lucía Otero, la cual confió en mí, invitándome a trabajar en su grupo, además de responder todas mis dudas, incluso en horarios fuera de lo normal, gracias por todo a ambos.

Actualmente, vivo en una etapa de mi vida en la que formé una familia, la cual me hace muy feliz. Que conllevan también una incondicional ayuda, sobre todo con el cuidado de mi hija y el apoyo en los momentos de caídas. Me refiero en particular a mis suegros Ester y Juan, que además de apoyarnos en todo, cuidan de mi hija con mucho amor, lo que me da la tranquilidad necesaria para salir a trabajar cada día. Así también agradezco a la persona que me hace feliz cada día, apoyándome cuando caigo y festejando con mis logros, Juan Fabián. Un gran partner, que va al lado tuyo dándole para adelante gracias por tu amor y por ser un gran padre.

Es importante mencionar también a mis amigas de la vida, que en cantidad no son muchas, pero con su apoyo es más que suficiente. Comenzaré con mi comadre (Evelyn), la que con sus historias y forma de ver la vida, llena de alegría el lugar en el que se encuentre. Enseñándome lo que es importante en la vida y que las decisiones que uno toma, te persiguen y hay que aceptarlas sin chistar. Por otro lado está Jocelyn, que al pasar los años, ha estado presente en los diferentes pasos a lo largo de mi vida, como amiga, como tía de mi hija con gran preocupación y además como apoyo en todo lo que la pueda necesitar.

Ahora en que me pongo a desglosar mi ambiente, para no olvidar agradecer a nadie, veo que soy una persona afortunada, rodeada de gente buena y alegre.

## Tabla de contenido

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE ECUACIONES</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
BIOINORGÁNICA .....	14
COMPLEJOS METÁLICOS QUE INTERACTÚAN CON EL ADN.....	17
COMPLEJOS METÁLICOS COMO INHIBIDORES ENZIMÁTICOS .....	24
COMPLEJOS METÁLICOS QUE GENERAN RADICALES LIBRES .....	27
<b>SELECTIVIDAD</b> .....	<b>32</b>
<b>RUTENIO, PALADIO Y PLATINO COMO METALES DE INTERÉS EN BIOINORGÁNICA</b> .....	<b>35</b>
RUTENIO .....	35
PLATINO .....	37
PALADIO.....	40
<b>CÁNCER Y CHAGAS</b> .....	<b>42</b>
ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	42
CÁNCER .....	46
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>55</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>55</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>57</b>
VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	57
ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA DE ESPÍN ELECTRÓNICO .....	58
SPIN TRAPPING.....	60
ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN CÉLULAS SANAS, CÉLULAS TUMORALES Y PARÁSITOS.....	61
EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS COMPLEJOS EN LA CRUZIPAÍNA .....	64
INDUCCIÓN DE APOPTOSIS .....	65
<b>RESULTADO Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>ESTUDIOS QUÍMICOS</b> .....	<b>69</b>
ESTUDIO ELECTROQUÍMICO .....	69
<i>Rutenio</i> .....	72
<i>Paladio</i> .....	73
<i>Platino</i> .....	75
ESTUDIOS DE RESONANCIA DE ESPÍN ELECTRÓNICO.....	86

<i>Rutenio</i> .....	86
<i>Paladio</i> .....	88
<i>Platino</i> .....	91
ESTUDIO DE SPÍN TRAPPING .....	96
<b>ENSAYOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>99</b>
ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN MODELO CÉLULA SANA, MODELO DE CÉLULA TUMORAL Y PARÁSITOS.....	99
ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE CRUZIPAÍNA .....	103
INDUCCIÓN DE APOPTOSIS.....	105
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>112</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>117</b>
<b>PAPERS</b> .....	<b>124</b>
<b>CONGRESOS</b> .....	<b>125</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>126</b>



## ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1: Razón Ipa/lpc</i> .....	58
<i>Ecuación 2: Índice de Selectividad</i> .....	63
<i>Ecuación 3: Porcentaje inhibición de la cruzipaína</i> .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Funciones de iones metálicos de importancia biológica</i> .....	14
<i>Tabla 2 :Complejos metálicos de uso médico</i> .....	15
<i>Tabla 3: Parámetros electroquímicos para los complejos y sus ligandos libres</i> .....	77
<i>Tabla 4: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) de los complejos de paladio</i> .....	89
<i>Tabla 5: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) de los complejos de platino</i> .....	92
<i>Tabla 6: Efecto citotóxico de los complejos y sus ligandos sobre los modelos celulares</i> .....	100
<i>Tabla 7: Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática en cruzipaína de los complejos y sus ligandos libres</i> .....	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aplicaciones de la Bioinorgánica.....	16
Figura 2: Estructura del cis-diaminodicloroplatino (II) o cisplatino (CPT).....	18
Figura 3: Intercambio de los iones cloruro por las moléculas de agua.....	18
Figura 4: Diferentes sitios de enlace del platino con la bases purínicas del ADN, G=guanina, A= adenina <sup>12</sup> .....	19
Figura 5: Modificaciones estructurales en el ADN, en presencia del cisplatino <sup>13</sup> .....	20
Figura 6: Complejo de paladio (II) con ligando de tiocarboxamida [Pd(Cl)(L)(PPh <sub>3</sub> )] <sup>14</sup> .....	21
Figura 7: PTA (1,3,5 triaza- 7 -fosfaadamantano).....	22
Figura 8: Representación a grandes rasgos de la apoptosis <sup>21</sup> .....	23
Figura 9: Esqueleto básico de la tiosemicarbazona.....	25
Figura 10: Mecanismo de inhibición de la cruzipaína, por derivados de la tiosemicarbazona <sup>28</sup> .....	26
Figura 11: Generación del radical superóxido.....	28
Figura 12: Generación del radical hidroxilo.....	29
Figura 13: N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina o nifurtimox(Nfx) <sup>30</sup> .....	30
Figura 14: Complejos estudiados por nuestro grupo <sup>16; 33; 34</sup> .....	31
Figura 15: Representación de la selectividad de los complejos de rutenio <sup>35</sup> .....	33
Figura 16: Selectividad del Rapta-C, debido al ligando PTA <sup>36</sup> .....	34
Figura 17: Algunos complejos de rutenio en etapa II de los ensayos clínicos.....	36
Figura 18: Complejo de rutenio con actividad tripanocida <sup>33</sup> .....	37
Figura 19: Complejos de platino aprobados a nivel mundial, como quimioterapia contra el cáncer.....	38
Figura 20: Complejos de platino estudiados contra el T.cruzi <sup>43</sup> .....	39
Figura 21: Complejos de paladio con actividad anticancerígena <sup>14</sup> .....	41
Figura 22: Tripanosoma cruzi.....	43
Figura 23: Fármacos utilizados para el tratamiento del Mal de Chagas.....	45
Figura 24: Características distintivas del cáncer <sup>47</sup> .....	47
Figura 25: Las características distintivas del cáncer como dianas terapéuticas <sup>47</sup> .....	48
Figura 26: Compuestos a Estudiar.....	52
Figura 27: Identificación de las partes activas de los complejos a estudiar.....	53
Figura 28: Reducción del MTT a Formazán, técnica MTT.....	61
Figura 29: Representación del citómetro y entrega de resultados.....	68
Figura 30: Ligando HTN.....	69
Figura 31: Voltamograma Cíclico de ligando libre TN,.....	70
Figura 32: Voltamograma cíclico del complejo 1 Ru-1', en color negro y del ligando 1', color rojo y punteado; TBAP (100Mm) en DMSO y a una velocidad de barrido de 2000mV s <sup>-1</sup> .....	72
Figura 33: Voltamograma cíclico del complejo 5 Pd-1', en color negro y del ligando 1', color rojo y punteado; TBAP (100Mm) en DMSO y a una velocidad de barrido de 2000mVs <sup>-1</sup> .....	73
Figura 34: Voltamograma cíclico del complejo 9 Pt-1'.....	75
Figura 35: Mecanismo electroquímico de los complejos de rutenio.....	80
Figura 36: Mecanismo electroquímico de los complejos de paladio.....	81
Figura 37: Mecanismo electroquímico de los complejos de platino.....	82
Figura 38: Voltamograma y estructura del complejo de rutenio.....	83

Figura 39: Voltamogramas junto a la estructura de los complejos de paladio y platino.....	84
Figura 40: Espectro de espín electrónico del complejo 1 Ru-1', donde en negro se presenta el espectro experimental y en rojo el simulado.....	86
Figura 41: Ligando libre 5- nitrofurano derivado de tiosemicarbazona.....	87
Figura 42: Espectro del espín electrónico del complejo 5 Pd-1', en negro se presenta el espectro experimental y el rojo el espectro simulado.....	88
Figura 43: Espectro del espín electrónico del complejo 9 Pt-1', en negro se presenta el espectro experimental y el rojo el espectro simulado.....	91
Figura 44: Complejos 1 Ru-1', 5 Pd-1' y 9 Pt-1' con sus respectivas constantes de acoplamiento hiperfino y las de su ligando 1' correspondiente.....	93
Figura 45: Reacción de generación de radicales libres tóxicos, en medio biológico <sup>59</sup> .....	95
Figura 46: Espectro experimental para los espín-aductos generados en parásitos intactos de T. cruzi (Cepa Dm28c) a temperatura ambiente.....	96
Figura 47: Reacción entre el radical hidroxilo con el solvente DMSO.....	97
Figura 48: Mecanismo de descomposición del atrapador DMPO debido al radical hidroxilo.....	98
Figura 49: Detección de cambios morfológicos durante la apoptosis, traslocación de la fosfatidilserina <sup>21</sup> .....	106
Figura 50: Efecto de complejos TF como Ru, Pd, Pt sobre la exposición de fosfatidilserina en células HL60.....	107
Figura 51: Estructura de la cromatina <sup>65</sup> .....	109
Figura 52: Bioquímica de la fragmentación de la cromatina y el patrón de escalera exhibido en la electroforesis en gel <sup>21</sup> .....	109
Figura 53: Electroforesis en gel de agarosa, representativa para todos los complejos.....	110

## RESUMEN

Gracias al descubrimiento de las aplicaciones anticancerígenas del cisplatino, el interés por estos compuestos y sus propiedades ha aumentado, dando altas expectativas en la farmacéutica. En esta tesis se propuso que complejos de paladio, platino o rutenio poseen una acción doble, antineoplásica y tripanocida, a través de la presencia de dos ligandos bioactivos diferentes: 5 nitrofurano derivados de tiosemicarbazonas y PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano). Para verificar esta posibilidad, se realizaron estudios fisicoquímicos y biológicos de los complejos, entregando alentadores resultados. En voltametría cíclica se observó una disminución en el potencial medio de la generación del radical nitro, lo que se traduce en una facilidad en generar dicho radical. En el estudio por espectroscopía de resonancia de espín electrónico, se caracterizó los complejos, siendo los de paladio y platino los de menor deslocalización, comparado con los de rutenio. Con respecto a los estudios biológicos, estos mostraron que ciertos complejos presentan un valor de  $IC_{50}$  inferior al del ligando libre contra tripomastigotes y células neoplásicas, sin afectar su selectividad. Por otra parte, también se realizaron estudios de inhibición de cruzipaína e inducción de apoptosis. Aunque la inhibición de cruzipaína no fue significativa, se observó una tendencia que correlaciona con los demás resultados. Además, los complejos estudiados mostraron resultados que sugieren una muerte celular por inducción de apoptosis, lo que los hace atractivos como potenciales antineoplásicos.

## SUMMARY

Thanks to the studies of the anticancer applications of cisplatin, the interest in these compounds and their properties has increased significantly, delivering high expectations for pharmacopeia. In this thesis it is proposed that complexes of palladium, platinum and ruthenium have a double action, antineoplastic and trypanocidal, by the presence of two different bioactive ligands: 5 nitrofuryl, a thiosemicarbazone derivate and PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane).

To verify this possibility, physicochemical and biological studies were performed on the complexes, providing encouraging results. In cyclic voltammetry studies, the results showed a decrease in the half potential of the nitro radical generation, which in turns translates in an easy production of that radical. In the studies of palladium and platinum complexes the electron paramagnetic resonance spectroscopic studies showed that the radical was more localized than ruthenium. With regard to biological studies, they showed that certain complexes, presented an  $IC_{50}$  value lower than the free ligand against trypanomastigotes and neoplastic cells, without affecting its selectivity. Although cruzipain inhibition was not significant, a trend was observed that correlates with the other results. Moreover, the results obtained for the complexes studied in this work suggest cellular death by apoptosis induction. This makes these compounds particularly attractive as potential antineoplastic agents.

## INTRODUCCIÓN

### Bioinorgánica

Tradicionalmente, las ciencias biológicas se han asociado a la química orgánica, debido a que en los seres vivos predominan básicamente los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Lamentablemente, este concepto dio lugar a la creencia de que los elementos y compuestos inorgánicos no tienen un papel relevante en los procesos vitales y que solo los compuestos orgánicos son esenciales para los seres vivos. No obstante, la mayoría de los elementos inorgánicos con importancia biológica se presentan en cantidades muy pequeñas y sólo a partir de los años 80, se desarrollaron las técnicas y metodologías adecuadas para detectar su presencia en los organismos, incluso determinar sus funciones biológicas<sup>1;2</sup>.

Así, tenemos una gran cantidad de compuestos inorgánicos con funciones definidas, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Funciones de los iones metálicos con su función biológica.

<b>Ión Metálico</b>	<b>Función Biológica</b>
Na (I)	Balance osmótico
Fe (II)	Transporte de oxígeno
Mg (II)	Fotosíntesis
Zn (II)	Estructura ósea

En la actualidad, los compuestos inorgánicos también han sido introducidos como sondas de diagnóstico o tratamientos farmacológicos, siendo un área de desarrollo en la actualidad.

Sin embargo, el descubrimiento del cisplatino, en 1964, por Barnett Rosenberg<sup>3</sup>, ha marcado un hito en el estudio de la química inorgánica aplicada en medicina. Desde ese entonces, existe una gran aceptación por los compuestos inorgánicos con fines medicinales, los cuales han demostrado excelentes propiedades farmacológicas. En la tabla 2 se dan a conocer algunos ejemplos.

Tabla 2 : Complejos metálicos de uso médico.

<b>Compuestos</b>	<b>Metal</b>	<b>Uso clínico</b>
Cisplatino	Pt (II)	Cáncer
Auranofina	Au (I)	Artritis Reumatoide
Carboplatino	Pt (II)	Cáncer
Salicilato de bismuto	Bi (III)	Úlcera
Sulfadiazina de plata	Ag (I)	Antibiótico

Todo lo anterior llevó al nacimiento de una nueva rama de la química, centrada en el estudio de funciones e interacciones de elementos y compuestos inorgánicos en los sistemas biológicos, la Bioinorgánica.

Esta área de la ciencia, al explorar dichos sistemas, tiene un gran potencial para el diseño de nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico, representadas en la figura 1.

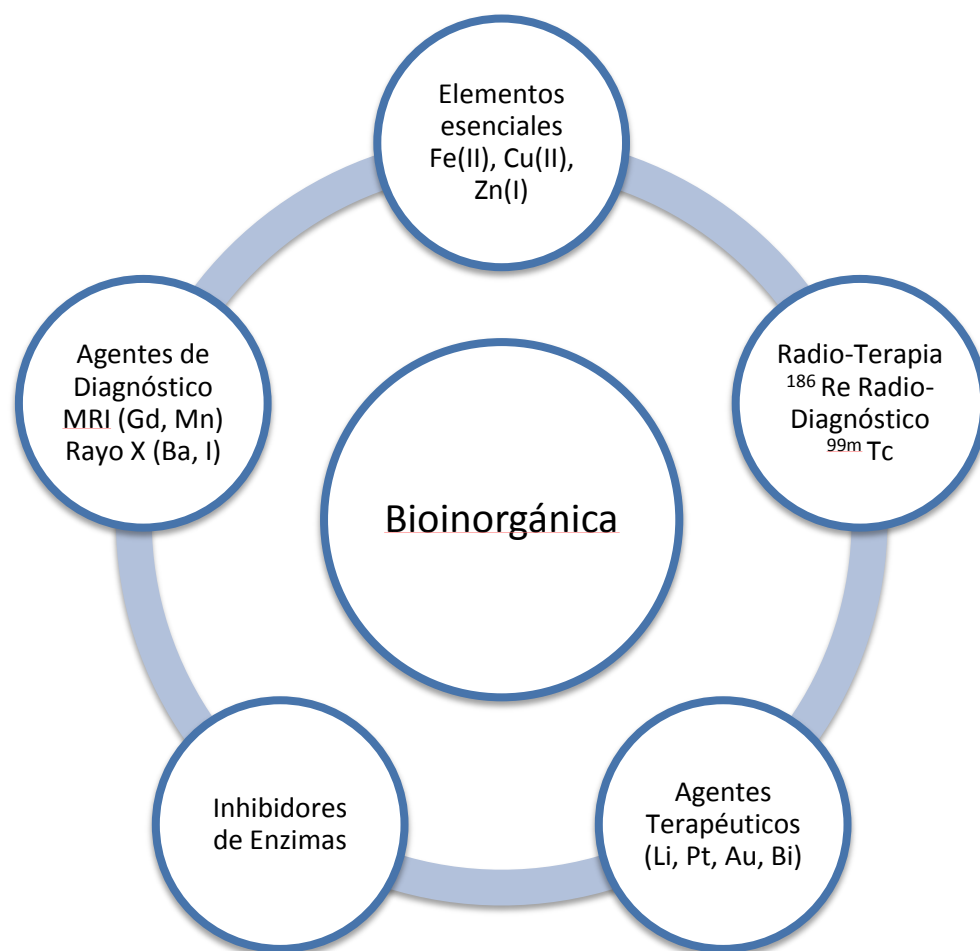


Figura 1: Aplicaciones de la Bioinorgánica.

Específicamente, los complejos que poseen metales de transición y ligandos bioactivos mejoran sus propiedades físico-químicas y biológicas, como por ejemplo: la potencia farmacológica, la toxicidad, la solubilidad, la estabilidad química y la lipofilia<sup>4</sup> Por lo que se apuesta a una sinergia entre el fragmento metálico y ligando con actividades biológicas estudiadas, llegando así a producir complejos con múltiples mecanismos de acción<sup>5</sup>, los que podrían obtener potenciales aplicaciones medicinales.



Se ha reportado que los complejos metálicos tienen actividades antiproliferativas, antimicrobianas, antiparasitarias y antivirales, así como también actividad antioxidante <sup>6; 7; 8; 9</sup>. Estas actividades se explican porque este tipo de complejos tienen la capacidad de interactuar con el ADN, dañándolo; inhibiendo enzimas específicas, importantes para la actividad biológica de la célula; o bien, generando intermediarios producto de su metabolismo, como por ejemplo radicales libres, los que afectan de manera general la supervivencia de las células <sup>10</sup>.

En el ámbito médico, las expectativas hacia los complejos metálicos con ligando bioactivos son altas. Por esta razón, actualmente se estudian diversas estrategias para sintetizar complejos metálicos con ligandos bioactivos, de una forma más racional, generalmente dirigidas hacia un blanco biológico de interés.

### **Complejos metálicos que interactúan con el ADN**

Poseen la propiedad de interactuar con el ADN mediante el ligando o el ión metálico central. Un claro ejemplo de este tipo de compuestos es el cisplatino (figura 2), complejo de platino usado como tratamiento de varios tipos de cáncer. Este complejo es considerado como el compuesto de coordinación más importante con actividad anticancerígena.

Su actividad biológica fue descubierta mediante el estudio del efecto de un campo eléctrico en la división celular de la bacteria *E. coli*, utilizando una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y electrodos de platino. Durante el transcurso del experimento las bacterias dejaron de dividirse, perdiendo la habilidad de replicar

su ADN. Al investigar las causas de este comportamiento se concluyó que se debía al compuesto *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], que se había formado en la solución<sup>11</sup>

Tomando en cuenta que el cáncer es una patología que conlleva un proceso de división celular descontrolada, se decidió estudiar el efecto de este compuesto en tumores sólidos de ratas, entregando excelentes resultados.

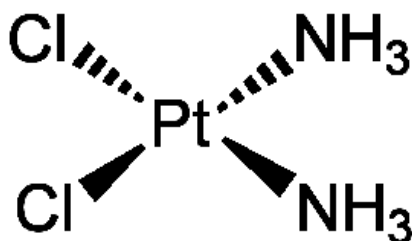


Figura 2: Estructura del *cis*-diaminodichloroplatino (II) o cisplatino (CPT).

Diversos estudios han contribuido a dilucidar el mecanismo de acción del cisplatino, el cual estaría mediado por la interacción con el ADN<sup>12</sup>. El cual, comienza con la hidrólisis de los enlaces Pt-Cl, formando acuoderivados, [Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (figura 3) . Especies altamente reactivas que tienden a sustituir sus moléculas de agua por otro ligandos, más nucleofílicos<sup>13</sup>.

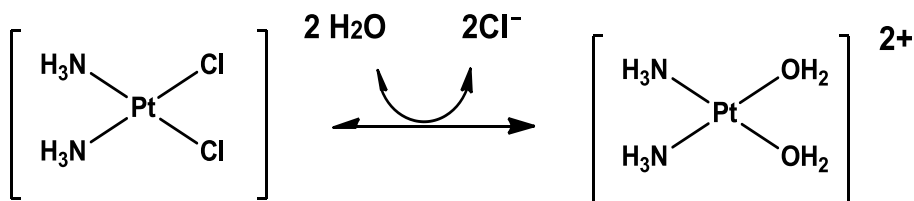


Figura 3: Intercambio de los iones cloruro por las moléculas de agua.

En el ADN, la presencia del nitrógeno 7 del anillo imidazol de la purina en las bases nitrogenadas, con alta densidad electrónica las convierte en potenciales ligandos nucleofílicos. El resultado de esta interacción son uniones intracatenarias (guanina- guanina) e intercatenarias (guanina-adenina), como se observa en la figura 4. La formación de estos aductos modifica la estructura de doble hélice del ADN (figura 5), bloqueando la replicación y la transcripción, que finalmente deriva en la muerte celular.



Figura 4: Diferentes sitios de enlace del platino con la bases purínicas del ADN, G=guanina, A= adenina<sup>13</sup>.

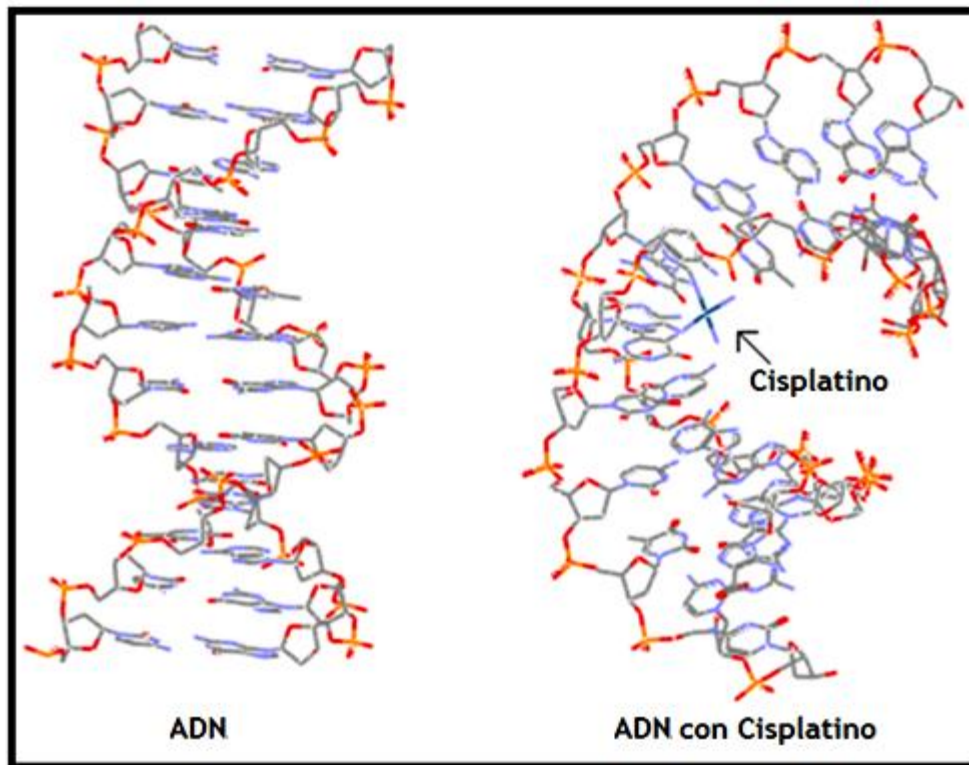


Figura 5: Modificaciones estructurales en el ADN, en presencia del cisplatino<sup>14</sup>.

El cisplatino es uno de los fármacos líder contra el cáncer y es ampliamente utilizado, aunque posee limitaciones pues produce reacciones adversas graves como náuseas, neurotoxicidad y nefrotoxicidad. Esta última es la que provoca una limitación en la dosis de administración, además de la resistencia al fármaco que se produce en algunos casos. Por estas razones, se propone sustituir este fármaco con otras alternativas menos tóxicas.

Así, se comienzan a sintetizar y estudiar nuevos complejos con metales de transición, ya que desempeñan un papel importante en la química del ácido nucleico, produciendo cambios estructurales en el ADN.

Un ejemplo de este estudio es el complejo de paladio (II) con ligando de tiocarboxamida  $[\text{Pd}(\text{Cl})(\text{L})(\text{PPh}_3)]^{15}$ , presentada en la figura 6, que demostró una alta interacción intercalante con el ADN, exhibiendo una excelente actividad anticancerosa *in vitro*, sobre células HeLa, MCF-7 y NIH-373, mayor que el cisplatino.

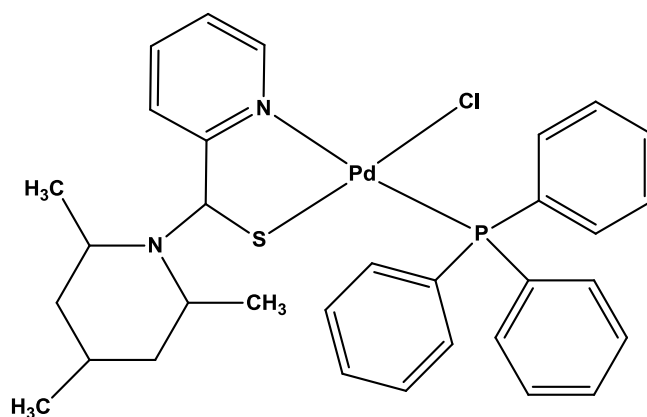


Figura 6: Complejo de paladio (II) con ligando de tiocarboxamida  $[\text{Pd}(\text{Cl})(\text{L})(\text{PPh}_3)]^{15}$ .

Por otra parte, se ha descrito también un ligando que posee la capacidad de protonarse en condiciones fisiológicas, lo que al formar parte del complejo facilita el acercamiento de este con el ADN: el 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano o PTA. En la figura 7 se presenta su estructura.

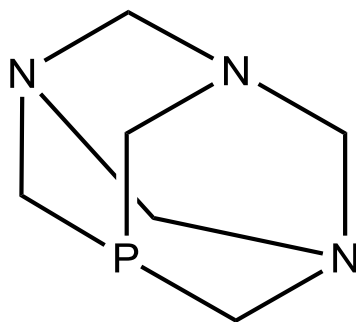


Figura 7: PTA (1,3,5 triaza- 7 -fosfaadamantano).

Esta molécula es una fosfina hidrófila, que tiene la capacidad de aumentar la solubilidad en agua de los complejos, de los que forma parte. Además, entrega un enlace fósforo metal que permite la formación de complejos altamente estables, incluso bajo condiciones menos favorables como las *in vivo*.

Estudios en que el PTA fue ligando común en varios complejos metálicos (cobre, plata, oro y rutenio), se demostró una buena actividad anticancerígena, que luego de interactuar con el ADN, provocaban muerte celular por apoptosis<sup>16; 17; 18; 19</sup>.

Dentro de este contexto, resulta interesante describir brevemente el proceso de la apoptosis y su beneficio en el tratamiento del cáncer.

La palabra apoptosis se comenzó a utilizar en el año 1972 por Kerr y Currie, para indicar un tipo de muerte celular que conllevaba una serie de cambios sucesivos (figura 8), en los cuales no se pierde la integridad de la membrana celular, por lo que no desencadena respuesta inflamatoria<sup>20</sup>.

Los cambios sucesivos que se producen en el proceso apoptótico se resumen a continuación:

En primer lugar, las células se encogen y pierden el contacto con las células vecinas. Luego, el retículo endoplasmático liso se fusiona con la membrana plasmática; sin embargo, el resto de los organelos permanece intacto. A continuación, la fosfatidilserina presente en la cara interna de la membrana plasmática se trasloca hacia el exterior, y sucesivamente, la cromatina se condensa acumulándose en la periferia.

Un cambio utilizado como marca bioquímica para reconocer apoptosis es la fragmentación nuclear por las endonucleasas endógenas, que rompen la cromatina en fragmentos oligonucleosomales de entre 180 - 200pb. Luego la membrana plasmática cambia su apariencia, adquiriendo circunvoluciones. Y como resultado de todo este proceso, aparecen los cuerpos apoptóticos que son reconocidos por los macrófagos, lo que los fagocitan<sup>21</sup>.

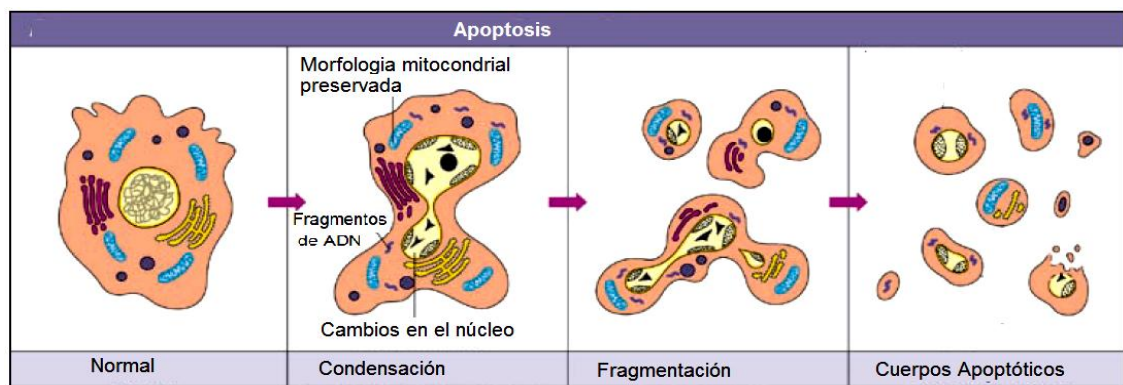


Figura 8: Representación a grandes rasgos de la apoptosis<sup>22</sup>.

La importancia de la apoptosis en el tratamiento del cáncer se basa en su directa relación con las células tumorales, debido a que una célula normal posee la característica fundamental de tener un periodo de vida definido, a diferencia de las células cancerosas que adquieren una cierta inmortalización; proceso opuesto a la apoptosis. Desafortunadamente, además de multiplicarse indefinidamente, poseen la habilidad de invadir otros tejidos estableciendo nuevas colonias (metástasis). Por lo que la apoptosis determina la capacidad reguladora que posee la célula para programar su propia muerte en beneficio del sistema.<sup>23</sup>

### **Complejos metálicos como inhibidores enzimáticos**

Estos complejos poseen la capacidad de inhibir enzimas específicas, con el fin de controlar los procesos biológicos que las involucran. Como por ejemplo, complejos de rutenio,  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ , (areno=*p*-cimeno), que inhiben la actividad de glutatión-S-transferasa<sup>24</sup>, o complejos cobalto con ligandos de 2 – hidroxiacetofenona- N-metil- *p* toluenosulfonilhidrazona, que inhiben la actividad de anhidrasa carbónica<sup>25</sup>. Cabe mencionar también a los complejos metálicos con ligando de tiosemicarbazona, que han demostrado actividad contra diversas enzimas, incluyendo tioredoxina reductasa, glutatión reductasa, ribonucleótido reductasa, involucradas en la fisiopatología de las neoplasias<sup>26</sup>. Además, tienen actividad contra cisteínas proteasas como la cruzipaína del *Trypanosoma cruzi*, entregándole a este tipo de complejos metálicos acciones antiproliferativas y antiparásitarias.



La inhibición de cruzipaina es una estrategia tripanocida, debido a que esta enzima participa en los procesos infectivos del protozoo *T. cruzi*, cuando ingresa a las células de sus hospederos mamíferos para producir la enfermedad de Chagas. De hecho, la cruzipaina es un factor de virulencia importante en la infección por *T. cruzi* pues esta enzima facilita la penetración del tripomastigote (forma morfológica infectiva) a las células a través de un proceso complejo de activación de señales intracelulares, relacionadas con el sistema de kininas endógenas, que son sustrato de cruzipaina<sup>27</sup>.

Se ha propuesto a la tiosemicarbazona, estructura presentada en la figura 9, como un prometedo inhibidor de cruzipaina, con mínima toxicidad y propiedades físicas favorables, como la lipofilia y bajo peso molecular. Además, es un compuesto no peptídico, lo que mejoraría su posible biodisponibilidad<sup>28</sup>.

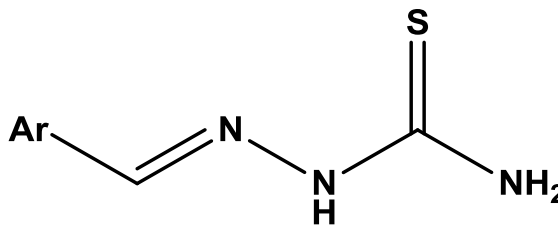


Figura 9: Esqueleto básico de la tiosemicarbazona.

La tiosemicarbazona es capaz de inhibir la cruzipaina al unirse al sitio activo de la enzima. Esta inhibición se logra formando un enlace covalente entre el residuo Cys 25 y el carbono del tiocarbonilo, y mediante la transferencia de

un protón desde el residuo His159 al azufre del tiocarbonilo<sup>29</sup>, como se representa en la figura 10.

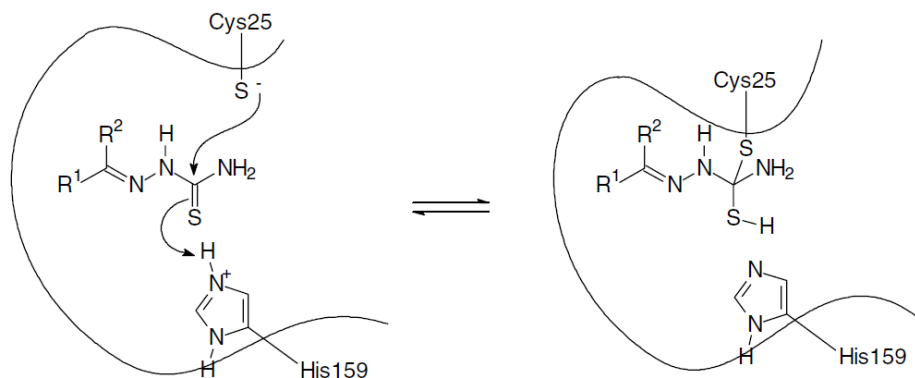


Figura 10: Mecanismo de inhibición de la cruzipaina, por derivados de la tiosemicarbazona<sup>29</sup>.

Por otra parte las tiosemicarbazonas también constituyen una clase de ligandos, ya que posee en su estructura átomos donores como el nitrógeno y el azufre, además de una tautomería tiona-tiol la cual presenta formas resonantes (figura 11) que junto con la facilidad de desprotonar el nitrógeno imino, pueden comportarse como ligandos monodentados, bidentados (tanto aniónicos como neutros) y tridentados, lo que las convierte en un prometedor ligando<sup>30</sup>.

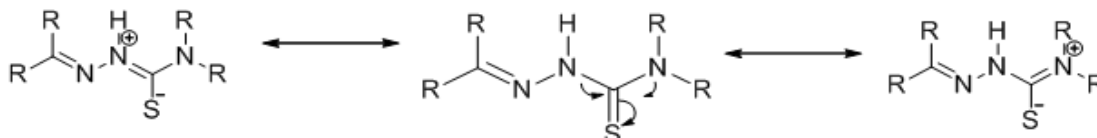


Figura 11: Tautomería tiona- tiol de la tiosemicarbazona y sus formas resonantes

### Complejos metálicos que generan radicales libres

La investigación acerca de los radicales libres durante las últimas décadas ha permitido una mejor comprensión de la producción de radicales fisiológicos e inducidos por drogas en sistemas biológicos. El requisito es que sean moléculas con un grupo electroquímicamente activo, que se pueda reducir u oxidar mediante la transferencia de un solo electrón.

Varios tipos de compuestos pertenecientes a familias de nitroderivados y N-óxidos, entre muchos otros, cumplen con los requisitos necesarios para generar radicales libres y/o especies reactivas de oxígeno en medios biológicos, ya sea en presencia de oxígeno o en su ausencia<sup>31</sup>.

Por ejemplo, los nitrocompuestos, utilizados en este caso como ligando de los complejos metálicos, poseen un grupo nitro en su estructura, el cual es capaz de reducirse generando una variedad de intermediarios dependiendo del medio en que ocurra la reducción. *In vivo*, bajo condiciones aeróbicas, se genera el radical nitro mediante la acción de nitrorreductasas presentes en el interior del parásito. Luego, el radical nitro formado es re-oxidado para generar el compuesto nitro original y producir el radical superóxido, como lo muestra la figura 12, provocando el ciclo generador de especies reactivas de oxígeno, llegando incluso al radical hidroxilo.

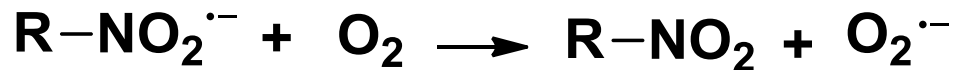


Figura 12: Generación del radical superóxido.

La adición de otro electrón al radical superóxido conduce a la formación del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Esta molécula no es un radical libre, pero la unión entre ambos oxígenos es muy débil, lo que le confiere una reactividad considerablemente alta. Así, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se descompone fácilmente y luego de ganar otro electrón, genera el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), uno de los radicales libres más reactivos que existen, reaccionando con casi todas las biomoléculas.

Su formación, a partir de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ocurre a través de las reacciones de Fenton (A) y Haber-Weiss (B) y (C) (figura 13), las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores. Cabe destacar que, además del

hierro, otros metales pueden participar en estas reacciones de transferencia electrónica, regenerándose y actuando de forma cíclica.

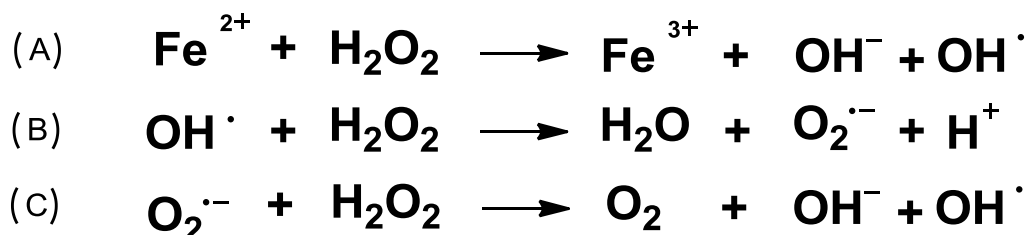


Figura 13: Generación del radical hidroxilo.

La activación reductiva biológica representa una forma elegante para dirigir fármacos hacia células con un contenido limitado de oxígeno. Los compuestos con aplicación clínica más usada son los derivados nitroaromáticos, que han sido empleados en el tratamiento de infecciones anaerobias y en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como citotoxinas de células hipóxicas.<sup>32</sup>

En el caso del cáncer, esta patología se caracteriza por la proliferación no controlada de las células, con capacidad de formar un tumor y metástasis en diferentes tejidos. Parece ser que la inducción o inhibición de la proliferación celular depende de los niveles de radicales libres y antioxidantes de la célula. En un ambiente con un nivel muy reducido de radicales libres se estimula la proliferación; sin embargo, un ligero cambio hacia un ambiente más elevado en radicales libres, induce la apoptosis, regulando la proliferación excesiva<sup>33</sup>. En este contexto, las células que tienen lesiones oncológicas son más sensibles a

estímulos apoptóticos<sup>34</sup>. Por esto, en este proyecto se realizarán estudios sobre la inducción de apoptosis por nuestros complejos sobre células neoplásicas.

Por otra parte, uno de los fármacos utilizados actualmente para combatir el mal de Chagas, posee en su estructura el grupo nitro, figura 14, controlando esta patología mediante varios mecanismos, entre los cuales está la generación de radicales libres, provocando así, estrés oxidativo en el parásito.

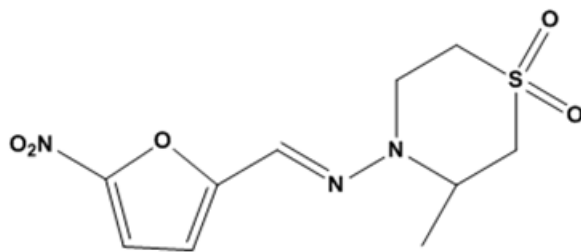
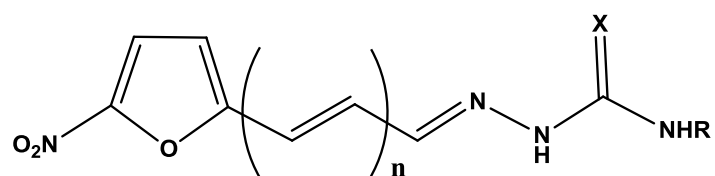
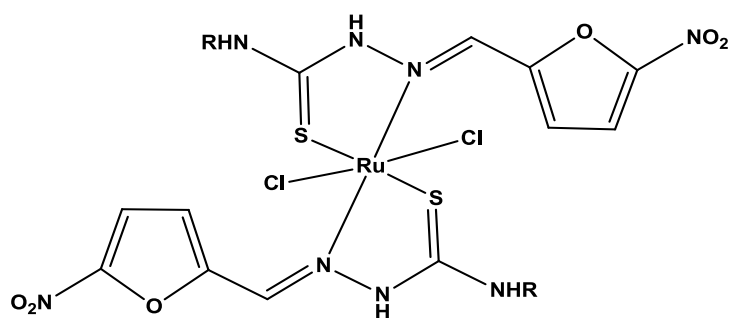
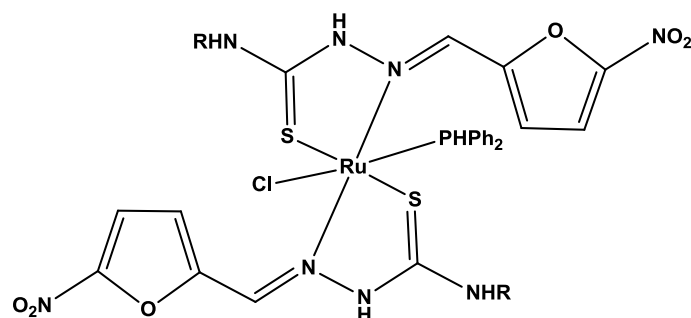
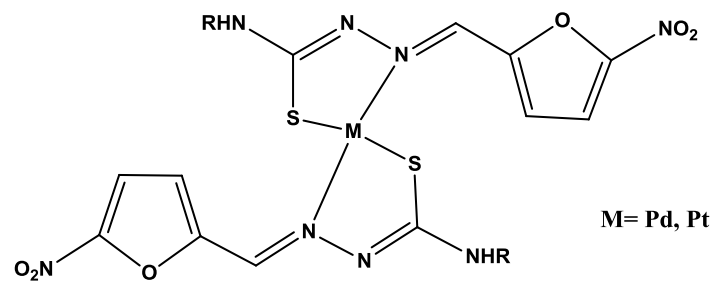


Figura 14: N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina o nifurtimox (Nfx).

En este contexto, nuestro grupo ha estudiado una serie de diferentes complejos metálicos (figura 15) con ligandos que poseen actividad tripanocida, los cuales poseen un mecanismo de acción mediado por la generación de radicales libres<sup>17; 35; 36</sup>, con prometedores resultados.



**X= S, n= 0,1**    **R= H, metil, etil, fenil**  
**X= O, n= 0,1**    **R= H, butil**

Figura 15: Complejos estudiados por nuestro grupo <sup>17; 35; 36</sup>

## Selectividad

Los fármacos se diseñan de forma tal que, idealmente, interaccionen en forma selectiva con el blanco biológico de interés. El blanco biológico es aquel que desempeña un papel preponderante en la fisiopatología de la enfermedad. Este interés por la selectividad de los fármacos se debe a que aquellos que interaccionan con muchos blancos biológicos, suelen mostrar un amplio rango de reacciones adversas.

Estudios previos dan a conocer una pronunciada selectividad de los complejos inorgánicos hacia biomoléculas de parásito o célula anormal, más que por una célula sana. Es el caso de ciertos medicamentos antineoplásicos basados en rutenio, los cuales presentan una alta selectividad hacia las células tumorales. Esto se atribuye al transporte del fármaco mediante la transferrina, entregando una ruta natural de distribución y concentración del compuesto en las células cancerosas, debido a una mayor cantidad de receptores de transferrina que éstas poseen con respecto a una célula normal<sup>37</sup> (figura 16).



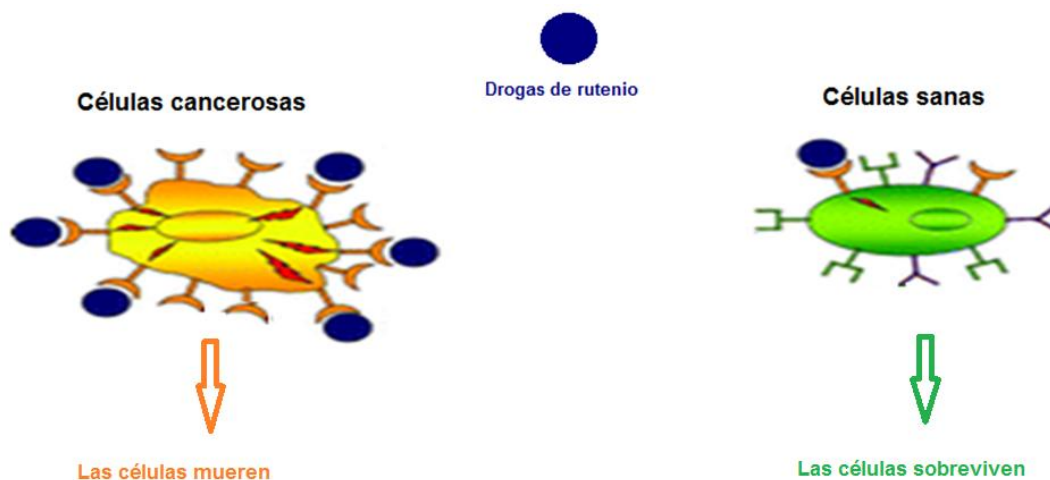


Figura 16: Representación de la selectividad de los complejos de rutenio<sup>37</sup>.

Otro ejemplo de importancia con respecto al tema, es el entregado por el compuesto Rapta-C, (molécula I de la figura 17), el cual daña al ADN en un proceso dependiente del pH; es decir, al pH de las células tumorales el ADN resulta dañado, mientras que al pH de las células sanas, no se detecta daño. Este comportamiento se atribuye al ligando PTA ( $pK_a = 5,5$ ), el cual a pH ácidos predomina la forma protonada, la que facilita la interacción ADN, esquema mostrado en la figura 16.<sup>38</sup> Cabe mencionar que el pH de las células sanas y cancerosas es de 7,2 y 6,8, respectivamente.

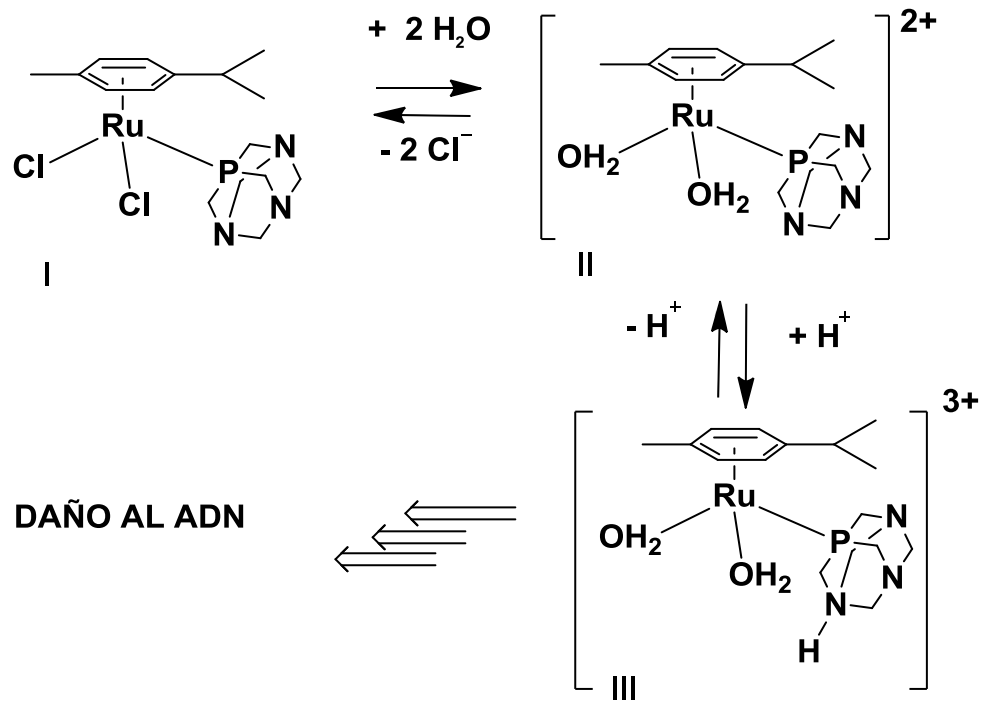


Figura 17: Selectividad del Raptac-C, debido al ligando PTA<sup>38</sup>.

## Rutenio, paladio y platino como metales de interés en bioinorgánica

### Rutenio

El rutenio pertenece a la segunda serie de transición, se encuentra ubicado en el grupo 8 de la tabla periódica, bajo el hierro. Este elemento posee una configuración electrónica  $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$ , y generalmente forma complejos en los estados de oxidación II, III y IV, los que en su mayoría estabilizan en geometría octaédrica. La pertenencia al grupo del hierro le confiere características similares, razón por la cual la transferrina, proteína transportadora de hierro en el plasma, lo distribuye a través del organismo, explicando su potencial selectividad<sup>37</sup>.

Su uso biológico se remonta al año 1975<sup>39</sup>, en el que se estudiaron plicaciones de rutenio, entregando prometedores resultados antitumorales. Hay complejos de rutenio que ya se encuentran en las etapas finales de sus ensayos clínicos; demostrando acción anti-metástasis y muy baja citotoxicidad. En la figura 18 se muestran algunos de estos complejos.

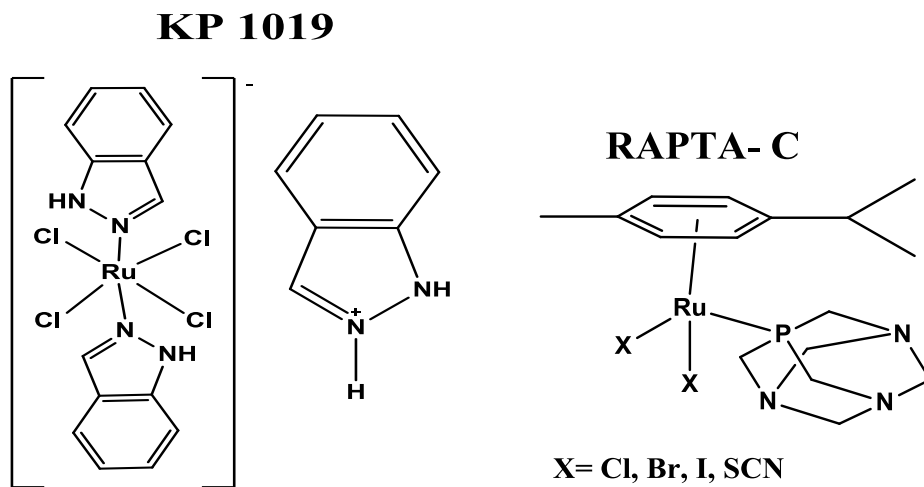


Figura 18: Algunos complejos de rutenio en etapa II de los ensayos clínicos.

Debido a la versatilidad que presenta este tipo de compuestos, se han descrito también algunos complejos de rutenio como tripanocidas. Así, tenemos un complejo que contiene ligandos de ciclopentadieno y 5-nitrofurano derivado de tiosemicarbazona,  $(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)\text{L}$  (figura 19), que mostraron una actividad contra el tripomastigote, mayor al tripanocida de referencia, el nifurtimox. Por otra parte, también mostraron una alta actividad contra el *T. brucei brucei*. Según los estudios, estos complejos adquieren esta actividad debido a un mecanismo múltiple, como son generación intraparasitaria de radicales e interacción con el ADN<sup>40</sup>.

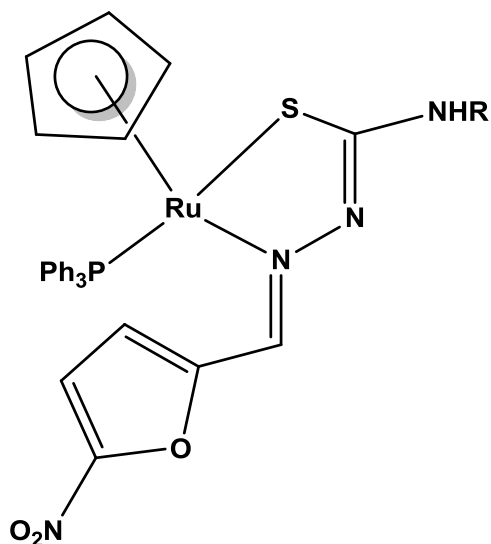


Figura 19: Complejo de rutenio II con actividad tripanocida<sup>35</sup>.

## Platino

El platino pertenece al grupo 10 de la tabla periódica, ubicándose bajo el paladio y posee una configuración electrónica  $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^9 6s^1$ . Sus estados de oxidación son II y IV, cuya configuración electrónica en  $d^8$  y  $d^6$  respectivamente.

En la química de coordinación de este elemento, los compuestos de platino con estados de oxidación II estabilizan una geometría plana cuadrada ( $d^8$ ) mientras que los con estados de oxidación IV presentan una geometría octaédrica ( $d^6$ ).

El platino (II) es un ácido de Lewis y un metal blando, por lo que tiende a coordinarse con ligandos que contienen azufre y el fósforo; sin embargo,

también son de gran importancia los compuestos que forma con ligandos nitrogenados, como por ejemplo el cisplatino.

El Pt es un buen ión central, útil para el diseño de fármacos contra el cáncer. Sin embargo, debido a que es un metal blando posee una gran tiofilía, lo que provoca grandes problemas, como la inactivación de la droga y el desarrollo de resistencia vía reacción con biomoléculas endógenas que contienen azufre presente en altas concentraciones dentro de la célula (cisteína, proteínas ricas en metionina, glutatión y albúmina)<sup>41</sup>, por ello también provoca neurotoxicidad, la mielosupresión y la nefrotoxicidad <sup>42</sup>, y alta resistencia<sup>43</sup>, debido a la interacción con ácidos nucleicos y enzimas neuronales y renales que contienen grupos tioles<sup>44</sup>. Por lo que es necesario buscar alternativas menos tóxicas. Actualmente solo dos derivados han sido aprobados para uso en quimioterapia contra el cáncer a nivel mundial, el oxaliplatino [trans-L-1,2-diaminociclohexanooxalatoplatino(II)] y el carboplatino [cis-diamino1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II), cuyas estructuras se presentan a continuación en la figura 20.

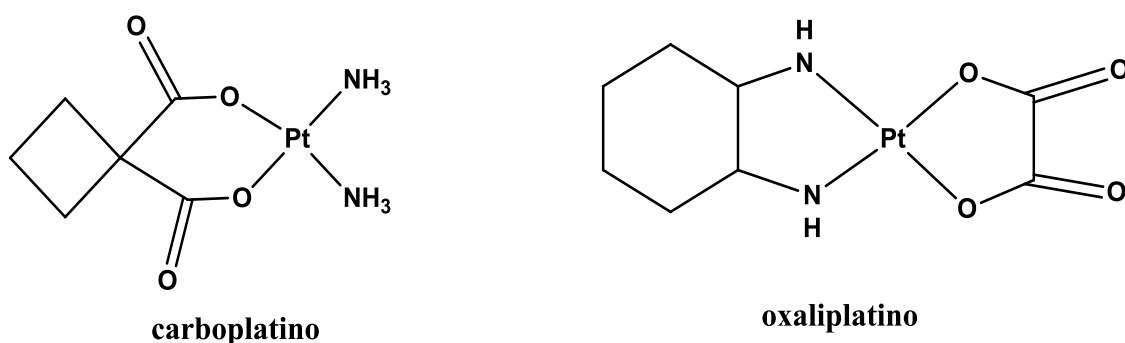


Figura 20: Complejos de platino aprobados a nivel mundial, como quimioterapia contra el cáncer.

Por otra parte, los complejos de platino, también han sido estudiados contra la Tripanosomiasis americana (figura 21), entregando prometedores resultados, como por ejemplo los compuestos de platino con ligandos de 1-indanona derivados de tiosemicarbazona que mostraron  $IC_{50}$  de rango micromolar, más activos que el nifurtimox y que su respectivo ligando libre, en tripomastigotes de *T. cruzi*<sup>45</sup>. También, los complejos de platino con ligandos de 5-nitrofurano derivado de tiosemicarbazona exhibieron una buena actividad tripanocida, la que se atribuyó a dos posibles mecanismos de acción, por una parte producción intraparasitaria de radicales libres y por la otra, interacción con el ADN<sup>36</sup>. Existen también reportes que mencionan una cierta relación entre la actividad antiparasitaria de complejos de platino y la lipofilia<sup>45</sup>.

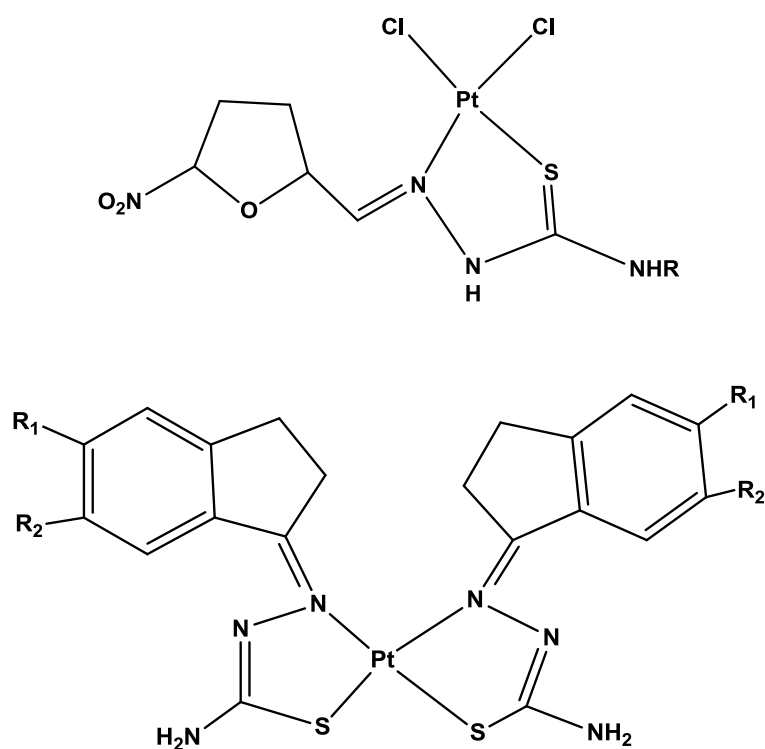


Figura 21: Complejos de platino estudiados contra el *T.cruzi*<sup>45</sup>.

## Paladio

El paladio, pertenece al grupo 10 de la tabla periódica, posicionado sobre el platino. Posee una configuración electrónica [Kr] 4d<sup>10</sup>. Al igual que platino, generalmente forma complejos con estado de oxidación II y IV, de geometría cuadrada planar y octaédrica, respectivamente. Por lo anterior, se consideró que el paladio es una buena alternativa, debido a la gran similitud con platino.

Diversos estudios demostraron que este metal se caracteriza por formar complejos muy lábiles, lo que es contraproducente debido a que aumenta la toxicidad y disminuye la biodisponibilidad del fármaco<sup>46</sup>; por ello, en el diseño de este tipo de complejos requiere ligandos que posean un grupo N y S donador, con el fin de garantizar la integridad estructural<sup>47</sup>.

Estudios previos han observado que la geometría cuadrada planar, típica del Pd<sup>2+</sup>, se distorsiona ligeramente según la naturaleza de los ligandos. Así, cuando el complejo posee como ligando una cadena etilénica, el enlace N-Pd-N es menor a 90°. Cabe destacar que la actividad biológica no se basa únicamente en sus propiedades químicas, siendo dependiente en gran medida de su estructura. Es importante mencionar que una ligera modificación puede afectar drásticamente la absorción, la solubilidad, el perfil reactivo, comportamiento farmacocinético, lipofilia, equilibrio ácido-base, biodistribución y a su vez también la toxicidad, excreción y metabolización del complejo<sup>47</sup>.

Por lo anterior, se han llevado a cabo estudios de complejos de paladio contra el cáncer, en los que para evitar que la gran labilidad de los complejos y



perjudique su actividad, se diseñan complejos con tasas de hidrolisis más lentas, provocadas por una racional elección de los ligandos. A continuación se muestran algunos complejos, que mostraron excelentes resultados.

El complejo 1,2-diaminoetanodinitratopaladio (II) [Pd(en)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], presentó una mayor actividad antitumoral, una disminuida nefrotoxicidad y activo en tumores gástrico que el cisplatino. Así también, complejos de paladio del tipo [Pd(N-C)LX], donde N-C corresponde a una amina alifática o aromática coordinada como ligando quelato, a través de la amina y de un enlace Pd-C ciclometalado, han mostrado efectos citotóxicos frente a siete líneas celulares de tumor humano. En la figura 22 se presentan las estructuras de ambos complejos.

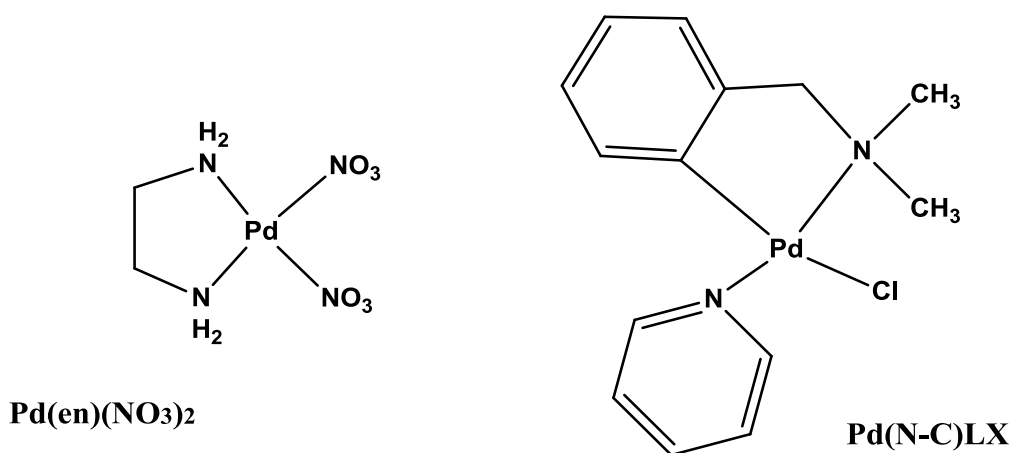


Figura 22: Complejos de paladio con actividad anticancerígena<sup>15</sup>

## **Cáncer y Chagas**

Debido a que en este proyecto se estudia la capacidad tripanocida y antineoplásica de una nueva familia de complejos metálicos de rutenio, paladio y platino con ligandos de 5 nitrofurano derivados de tiosemicarbazonas y PTA, es de gran importancia introducirnos un poco en estas patologías. Por ellos, a continuación se expone a grandes rasgos el mal de Chagas y el Cáncer, sus posibles orígenes y tratamientos.

### **Enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, los cuales se transmiten mediante su presencia en las deyecciones de las vinchucas, cuando se alimentan de la sangre del hospedero vertebrado.

Este parásito es un protozoo caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, como se observa en la figura 23, dentro de la cuál su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada kinetoplasto.

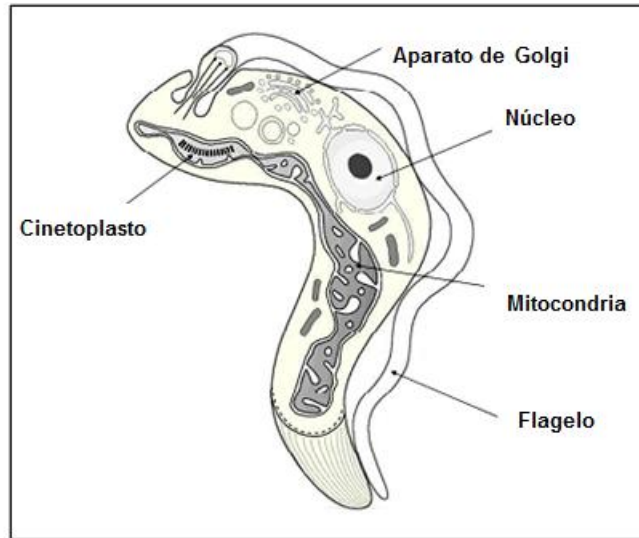


Figura 23: *Tripanosoma cruzi*

El *T. cruzi* posee un ciclo de vida que involucra diversos estadios morfológicos. Así, tenemos al tripomastigote como la forma infecciosa no replicativa del parásito, a epimastigotes y amastigotes como las formas replicativas no infecciosas del parásito en el vector y hospedero, respectivamente.

El ciclo se inicia cuando el vector se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con la forma tripomastigote. Una vez dentro del vector, se multiplica y se diferencia en el sistema digestivo del insecto a epimastigote, multiplicándose y transformándose nuevamente a tripomastigotes en el intestino posterior, donde son eliminados en las heces.

En el momento en que el vector infectado se alimenta de nuevo mamífero, el parásito se introduce al flujo sanguíneo en su forma tripomastigote. En su recorrido por el torrente sanguíneo en el hospedero, es capaz de infectar a cualquier tipo de célula nucleada; entre ellas, macrófagos que son capaces de

fagocitar al parásito. En su interior, el tripomastigote evade la acción oxidativa del macrófago y se diferencia a amastigote, replicándose mediante sucesivas divisiones para nuevamente transformarse a tripomastigotes. El gran número de parásitos en la célula, genera la ruptura de la membrana plasmática, liberando tripomastigotes y dando paso a una nueva infección, completando así el ciclo de la enfermedad.

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: aguda y crónica. La fase aguda, tiene lugar en las primeras semanas de la infección, puede presentar síntomas leves, pero generalmente es asintomática.

La fase crónica puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, algunas personas presentan complicaciones cardíacas (30%), las cuales pueden incluir miocardiopatía e insuficiencia cardíaca, además de complicaciones digestivas (10%), que pueden incluir megaesófago o megacolon.

Para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan dos fármacos: nifurtimox (Bayer, Lapmpit®) un derivado nitrofurano (figura 14) y Benznidazol (Roche, Radanil®) un derivado de nitroimidazol (figura 24). Ambos son eficaces en la etapa aguda de la enfermedad, presentando limitada eficacia en la etapa crónica; además provocan diversos efectos adversos en los pacientes, principalmente daño hepático, lo que ha estimulado la evaluación de nuevas propuestas farmacológicas.

## Benznidazol

N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5nitro-2-furil)metanimina

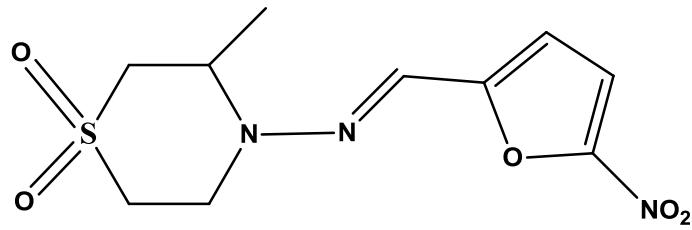


Figura 24: Fármaco utilizados para el tratamiento del Mal de Chagas.

## Cáncer

El cáncer no es una enfermedad nueva, ya desde el 1600 A.C era descrita por los egipcios, es más se cree que el médico griego Hipócrates fue el primero en utilizar la palabra carcinos para denominar el cáncer.

Esta patología es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, según la Organización mundial de la Salud y se prevé que las muertes por cáncer en todo el mundo aumentarán en un 75% para el año 2030<sup>48</sup>.

Cabe destacar que el término cáncer es genérico y engloba un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células. Estas células no responden a los procesos normales que regulan el crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Es más, estas células poseen ciertas capacidades, que Hannahan en el año 2011<sup>49</sup>, describió como las características distintivas del cáncer: potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida, capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis<sup>50</sup>, como se observa en la figura 25.

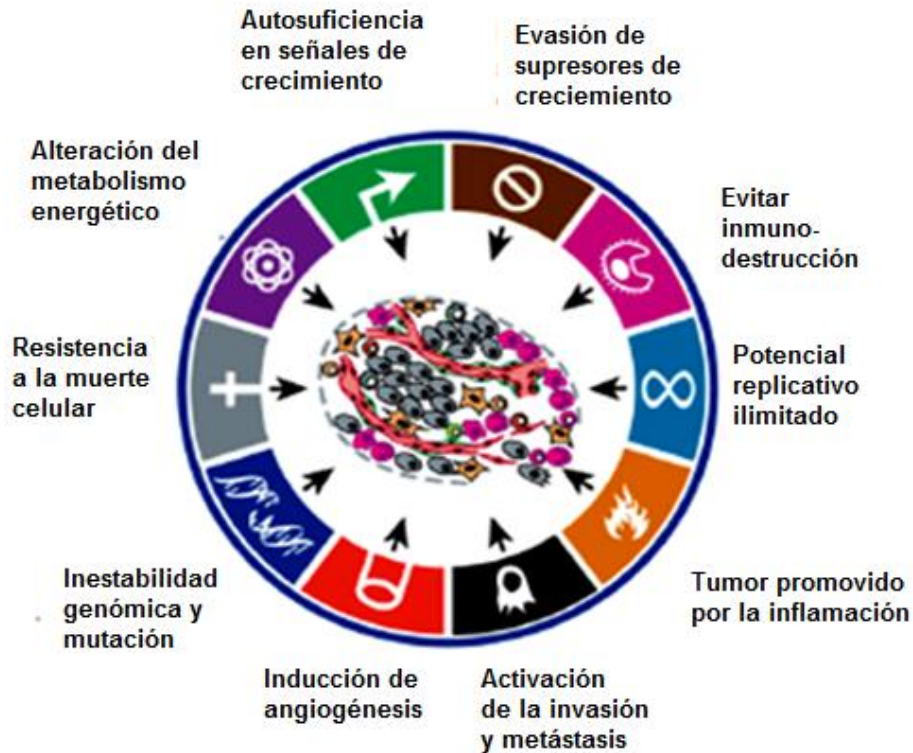


Figura 25: Características distintivas del cáncer<sup>49</sup>.

Con respecto al origen del cáncer, se han descrito ciertos factores, que podrían ser capaces de provocarlo. Estos son la herencia genética, productos químicos, radiaciones, infecciones y traumas.

El tratamiento de esta patología puede ser variado y a la vez mixto, en los cuales las estrategias que predominan son cirugía, radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia. En general, el tratamiento resulta desagradable y muy tóxico para el paciente.

La quimioterapia tiene como fin impedir el crecimiento de las células cancerosas; no obstante, termina destruyendo también las células sanas. Por este motivo, resulta muy importante la búsqueda de nuevos fármacos que sean selectivos y que la cantidad de efectos adversos y daños al paciente sea el mínimo. Los sellos distintivos del cáncer constituyen un auténtico principio de organización que es útil para racionalizar el diseño de fármacos, como lo muestra la figura 26.

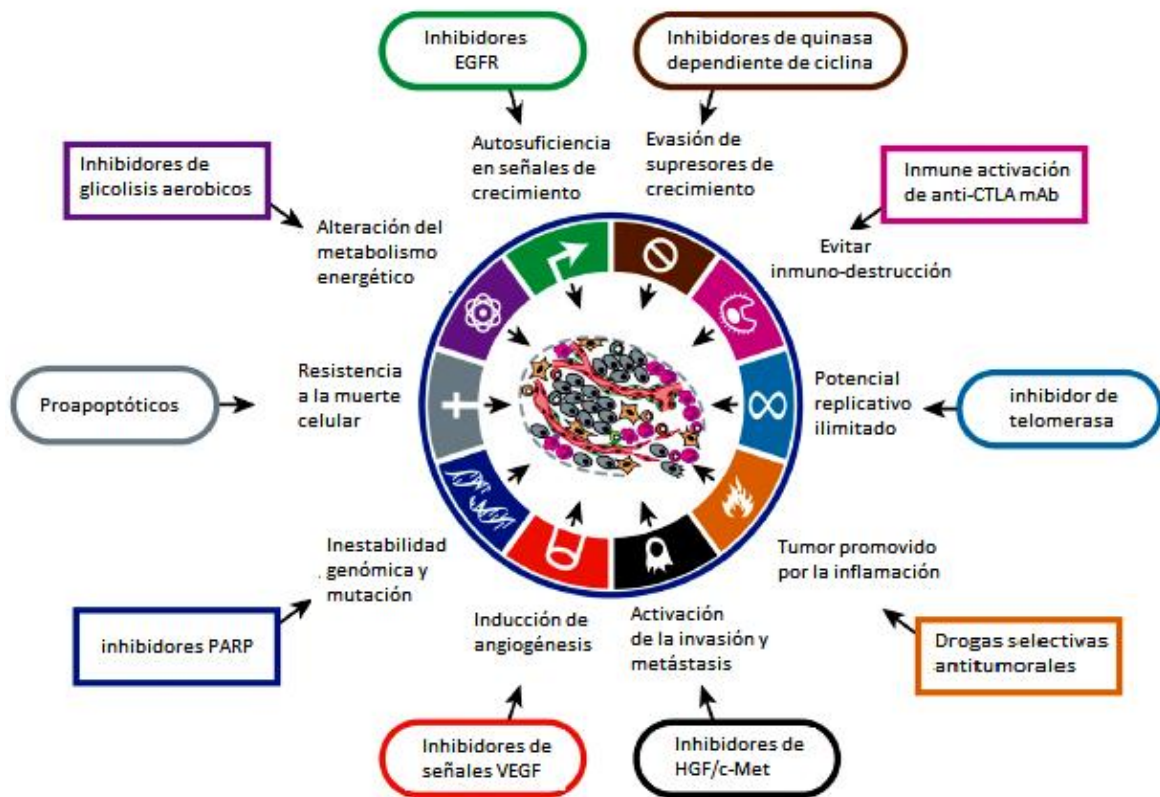
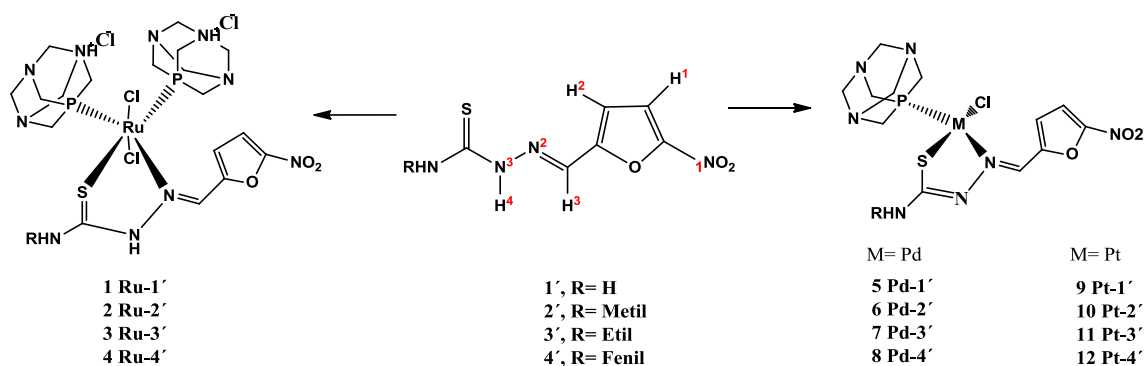


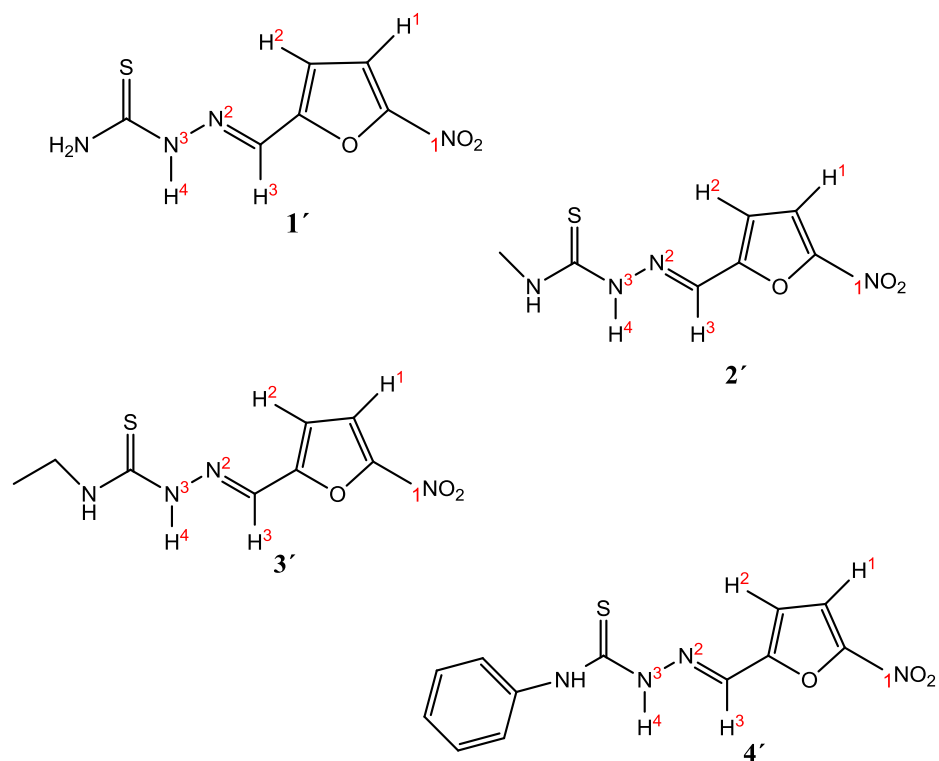
Figura 26: Las características distintivas del cáncer como dianas terapéuticas<sup>49</sup>.



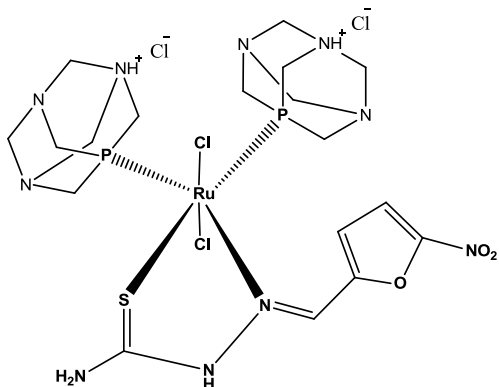
Por esto, en este proyecto se estudió una nueva familia de complejos metálicos de rutenio, paladio y platino con ligandos de 5 nitrofurano derivados de tiosemicarbazonas y PTA contra células neoplásicas y *Tripanosoma cruzi*, mostrados en la figura 27.



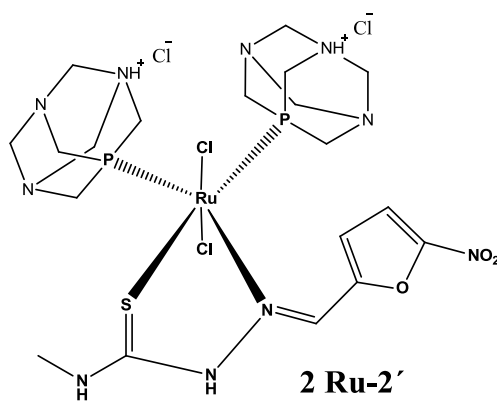
#### LIGANDOS DE 5-NITROFURANO DERIVADO DE TIOSEMICARBAZONA



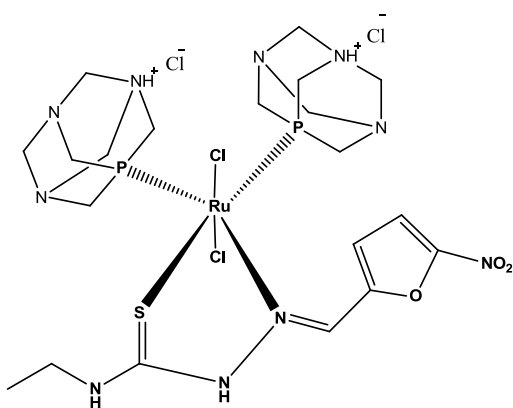
## COMPLEJOS DE RUTENIO



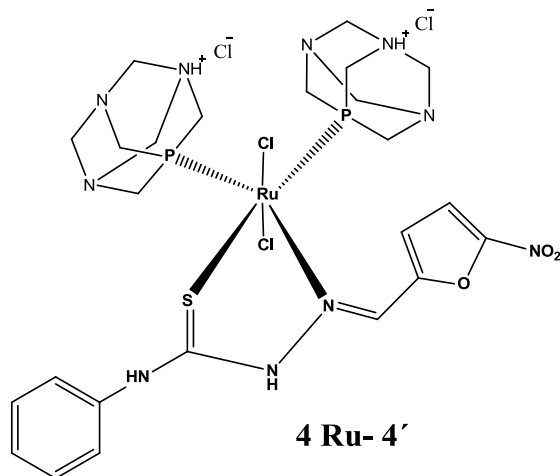
**1 Ru-1'**



**2 Ru-2'**

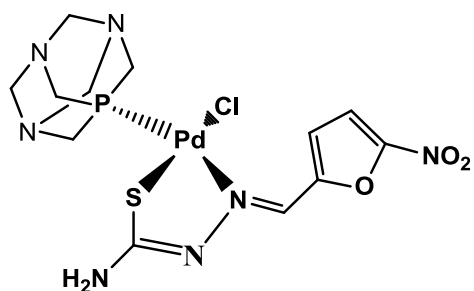


**3 Ru-3'**

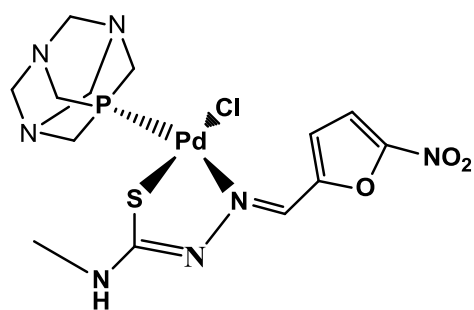


**4 Ru-4'**

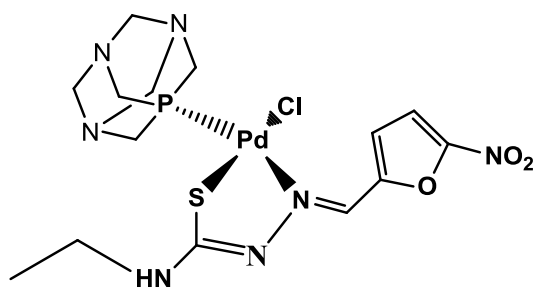
## COMPLEJOS DE PALADIO



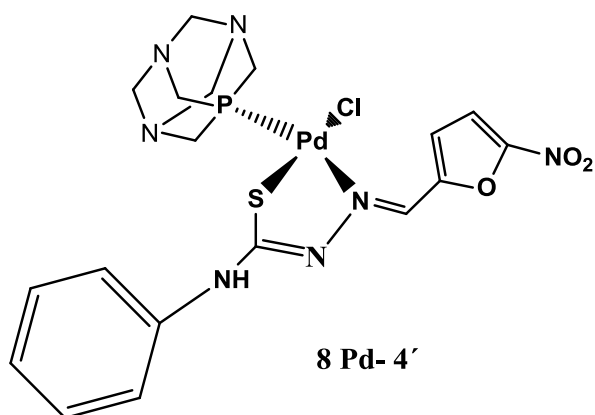
5 Pd-1'



6 Pd-2'



7 Pd-3'



8 Pd-4'

## COMPLEJOS DE PLATINO

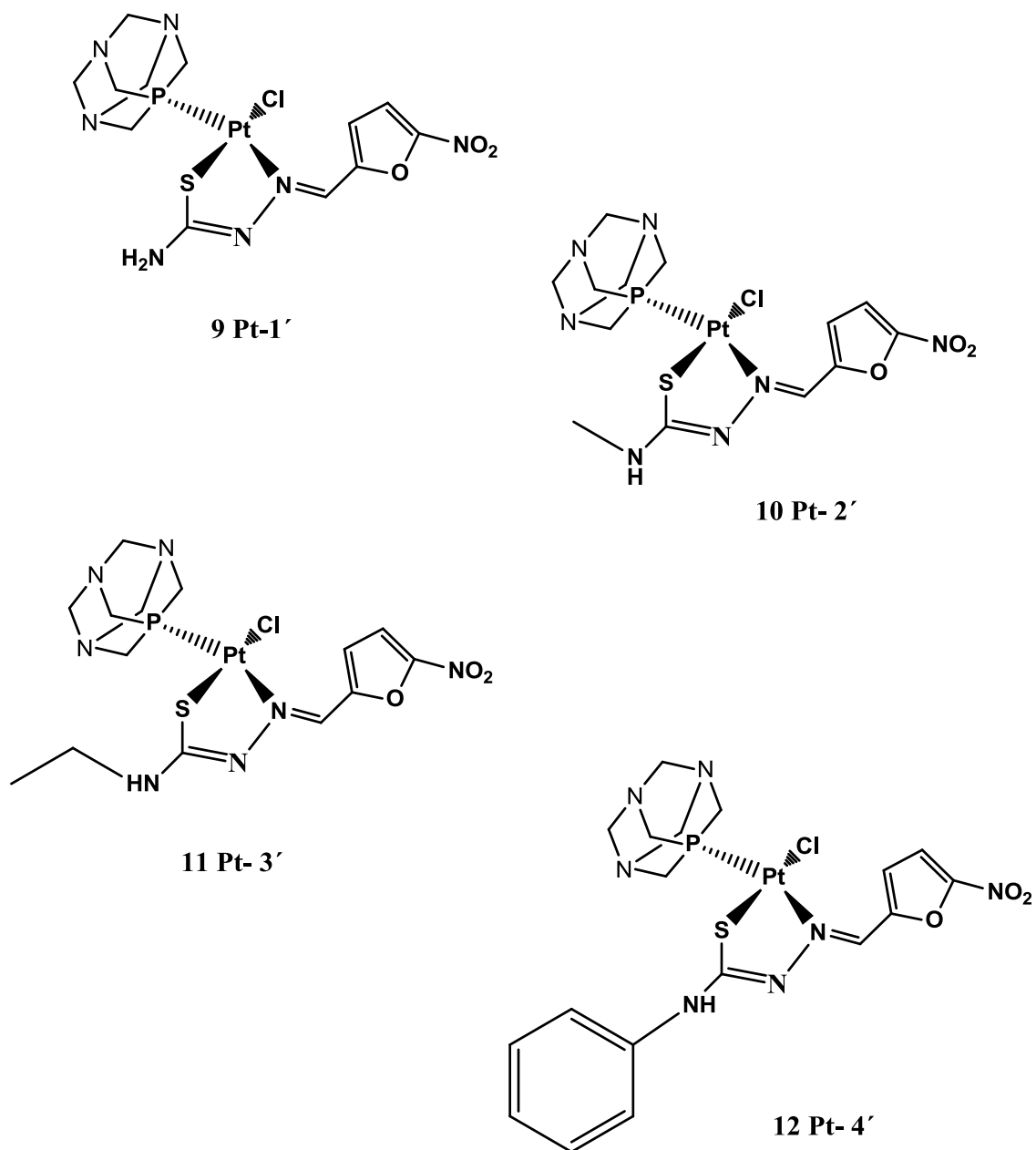


Figura 27: Compuestos a Estudiar.

Los criterios de elección de estos complejos se basan en un desglose de posibles actividades, que entregan alguna parte en particular de la molécula tal como se puede apreciar en la siguiente figura 28.

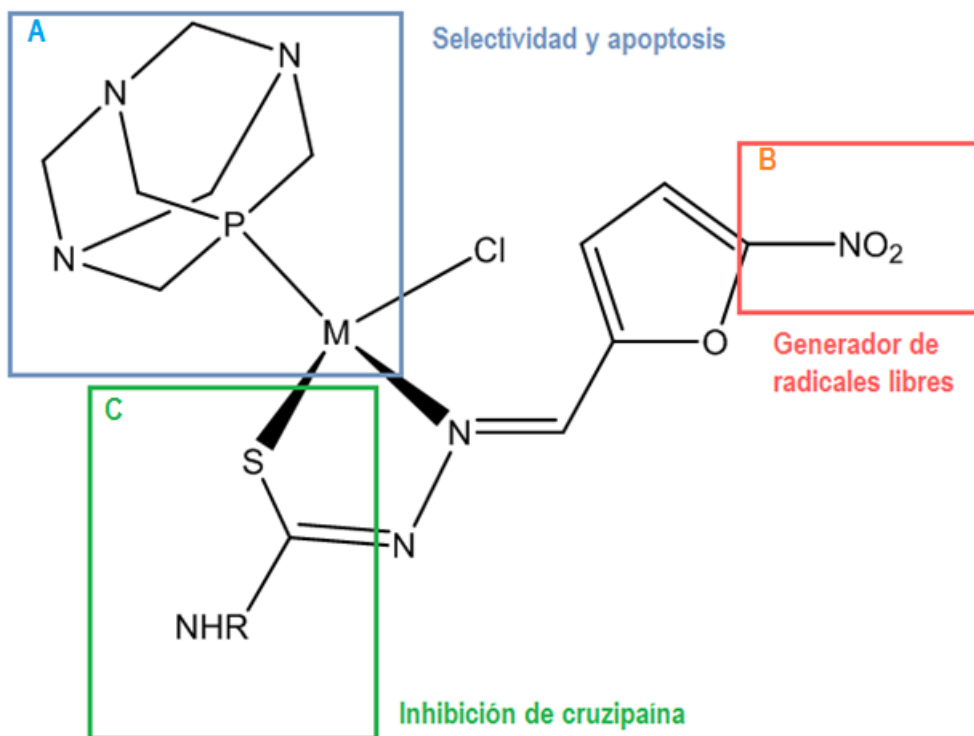


Figura 28: Identificación de las partes activas de los complejos a estudiar.

Donde se observa **A**, el ligando PTA responsable de la actividad de inducir apoptosis y entregar selectividad; **B**, grupo nitro del ligando nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, el cual provee la capacidad de generar radicales libres y **C**, tiocarbonilo proveniente de la cadena de tiosemicarbazona, como inhibidor de cruzipaina.

Como se observa en la figura 28, el ligando PTA junto con el metal, sería el responsable de la selectividad, además de su actividad antineoplásica, como posible proapoptótico<sup>19</sup> debido a la resistencia a la muerte celular que poseen las células cancerosa (figura 25). Por otra parte, el tiocarbonilo del ligando 5 nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, estaría ejerciendo la acción inhibidora contra la cruzipaína (figura 10)<sup>51</sup>, otorgando a la molécula una segunda acción biológica, como posible tripanocida. Ambas actividades, estarían siendo potenciadas por la generación de radicales libres, debido al grupo electroactivo del ligando tiosemicarbazona, el grupo nitro, que posee la propiedad de biorreducirse al interior del parásito, generando así las especies reactivas tóxicas.

## **HIPÓTESIS**

Dada la estructura de esta familia de complejos, deberían poseer una capacidad dual:

- Actividad tripanocida, mediante la inhibición de cruzipaina, por la interacción del grupo tiocarbonilo del ligando 5 nitrofurano, derivado de la tiosemicarbazona.
- Actividad antineoplásica, debido a la presencia del ligando PTA, el cual posee propiedades que presentan una capacidad de inducción de apoptosis.
- Ambas actividades biológicas, estarían siendo potenciadas por la generación de radicales libres, entregadas por el grupo nitro del ligando 5-nitrofurano derivado de tiosemicarbazona.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad tripanocida y antineoplásica de una nueva familia de complejos de rutenio, paladio y platino identificando su posible mecanismo de acción para ambas actividades biológicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de generar radicales mediante un estudio electroquímico y a su vez dilucidar el mecanismo de reducción, a través de voltametría cíclica.
2. Detectar las especies radicalarias generadas y obtener la distribución de densidad de espín en la molécula, mediante espectroscopia resonancia de espín electrónico.
3. Obtener e identificar la especies radicalarias producidas por los parásitos al ser sometidos a los complejos, usando espectroscopia de resonancia de espín electrónico, utilizando la técnica *spin trapping*.
4. Evaluar la citotoxicidad de estos compuestos en células EAhy.926 (modelo de célula sana), HL60 (modelo de célula neoplásica) y parásitos (*Trypanosoma cruzi*).
5. Determinar la capacidad de los complejos de inhibir la cruzipaína.
6. Estudiar la capacidad de estos compuestos de inducir apoptosis en células HL60, mediante Anexina V y electroforesis de ADN.



## METODOLOGÍA

### Voltametría cíclica

La voltametría cíclica (VC) es la técnica más usada para obtener información cualitativa acerca de sistemas que involucran reacciones electroquímicas, ya que dentro de otras propiedades, ofrece la determinación rápida de los potenciales redox de especies electroactivas.

Consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una dirección hasta alcanzar un potencial determinado, seguido del posterior barrido en la dirección contraria. Durante el barrido del potencial, el potencióstato del equipo mide la corriente resultante al potencial aplicado. El gráfico resultante, se conoce como voltamograma cíclico.

Los principales parámetros que se pueden obtener de un voltamograma cíclico son los potenciales de peak  $E_{pc}$  y  $E_{pa}$ , la diferencia entre los potenciales  $\Delta E$  y el cociente entre la corriente anódica y catódica ( $I_{pa}/I_{pc}$ ). Estos últimos son índices de la reversibilidad de la transferencia electroquímica. R. S. Nicholson estableció en 1966 una manera de calcular el cociente  $I_{pa}/I_{pc}$  refiriendo las corrientes al eje de valor cero, haciéndolas independientes de la línea base<sup>52</sup>. Ello se logra introduciendo las corrientes obtenidas del voltamograma, en la ecuación 1, y utilizando los valores de dichas corrientes como valor absoluto.

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{(i_{pc})_0} + \frac{0,485 (i_{p\lambda})_0}{i_{pc} \ 0} + 0,086$$

### Ecuación 1: Razón I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub>

Utilizando esta técnica se estudiaron los complejos de rutenio, paladio, platino y sus ligandos, en concentraciones de 1mM.

El estudio se realizó en un equipo Metrohm 797 VA, bajo condiciones apróticas, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, TBAP (0,1M) como electrolito de soporte, un alambre de platino como electrodo auxiliar, Ag/AgCl (KCl 3 M) como electrodo de referencia y gota colgante de mercurio como electrodo de trabajo.

### **Espectroscopia de resonancia de espín electrónico**

La espectroscopia de resonancia de espín electrónico es una técnica que permite la detección y cuantificación de especies paramagnéticas, o sea, compuestos con electrones desapareados, entre los que se encuentran los radicales libres. Esta técnica puede ser usada para investigar concentraciones de radical muy bajas, mientras éstas sean lo suficientemente estables para que su presencia sea detectada. La espectroscopia REE involucra el desdoblamiento inducido magnéticamente de estados de espín electrónicos. En esta espectroscopia, la muestra es inmersa en un fuerte campo magnético y es

expuesta a una radiación de frecuencia en el orden de las microondas (9,8 GHz, banda X).

Para electrones libres, los momentos de espín angular pueden tener dos orientaciones posibles y éstas dan lugar a dos estados de espín con polaridades opuestas. En la ausencia de un campo magnético externo estos estados son degenerados. Sin embargo, en presencia de un campo magnético externo, la degeneración se pierde, resultando en dos estados de diferente energía. Este desdoblamiento es conocido como efecto Zeeman. Un peak en la absorción ocurre cuando el campo magnético "sintoniza" los dos estados de espín de tal manera que la diferencia en energía coincide con la energía de irradiación.

El conocimiento de las interacciones hiperfinas permite identificar las especies radicalarias, además de contener información sobre la distribución del electrón en la molécula. La estructura hiperfina provee una "huella dactilar" que permite identificar los tipos de radicales presentes en una muestra.

Para detectar las especies radicalarias generadas por los complejos, se realizó una reducción electroquímica in situ, utilizando como electrodo de trabajo un alambre de platino, como electrolito de soporte perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) y como solvente DMSO. Todos los compuestos fueron estudiados a una concentración de 1mM y aplicando un potencial equivalente a la aparición de la cupla III en VC.

Los espectros de REE fueron registrados usando un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9.85 GHz) equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo.

Las constantes de acoplamiento experimentales fueron obtenidas mediante simulación de espectros, usando un programa WINEPR Simfonia Versión 1.25 y estimadas con una precisión de 0,05G.

### ***Spin Trapping***

Las técnicas de REE/Spin Trapping han sido aplicadas con éxito para determinar e identificar intermediarios radicalarios en sistemas biológicos. Esta técnica fue desarrollada a finales de los sesenta para facilitar la detección de radicales de corta vida por REE y permite determinar su presencia atrapándolos para producir otro radical mucho más estable, el cual puede ser registrado por el equipo.

Para detectar las especies radicalarias intraparasitarias generadas por los complejos, se utilizó  $8 \times 10^7$  epimastigotes intactos/mL de *Trypanosoma cruzi*, suspendidos en buffer Fosfato (pH: 7,4) y 100 mM de DMPO (5,5- dimetil-1-pirrol-N-oxido), como atrapador, debido a la corta vida media de las especies radicalarias, 1mM de NADPH, para favorecer la biorreducción del grupo nitro. Se añadió 1 mM del complejo a estudiar disuelto en DMSO. (1mg de proteína es equivalente a 80 millones de epimastigotes )<sup>53</sup>.

## Actividad biológica en células sanas, células tumorales y parásitos

Con el fin de conocer la actividad biológica de nuestros complejos en modelos celulares, se necesita cuantificar el número de células antes y después del estímulo con nuestros compuestos en estudio.

Existen diversos modos de cuantificar el número de células, aunque los más empleados son los fundamentados en la modificación de colores biológicos basados en el tetrazolio como el MTT.

El MTT es un colorante amarillo, soluble en agua, que pasa fácilmente la membrana plasmática y se incorpora en la célula. En las células viables, las mitocondrias tienen plenamente operativa la capacidad de convertir el MTT en azul de formazán: Un colorante azul-violeta, insoluble en agua que se acumula en las células. La producción de azul de formazán en un cultivo celular es proporcional al número de células viables: por lo que tras lissarlas y disolver el colorante, podemos cuantificar las células por la densidad óptica de la solución a 570 nm en un lector de placas (figura 29).

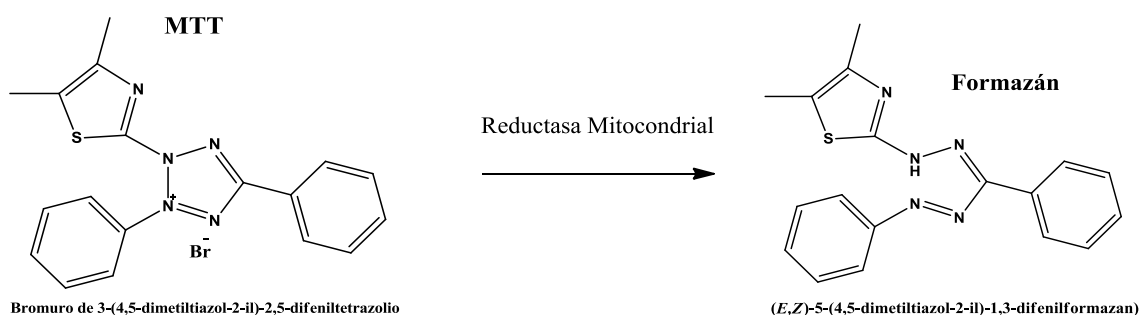


Figura 29: Reducción del MTT a Formazán, técnica MTT.

Se emplearon tres modelos celulares: células EA.hy926, línea de células endoteliales inmortalizadas derivadas de células de vena umbilical humana, células HL60, promieloblastos derivados de leucemia promielocítica aguda y tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Dm28c, provenientes de cultivos de células VERO (fibroblastos de riñón de mono verde africano).

### **Citotoxicidad en modelo célula sana (EA.hy926) y células tumorales (HL60).**

Las células EA.hy926 o HL60 fueron cultivadas en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) con rojo fenol, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y 1% de antibiótico (Penicilina + Estreptomina), en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, fueron cosechadas y resuspendidas en medio de cultivo a una densidad final de 5 x 10<sup>5</sup> células/mL e incubadas con las 3 familias de complejos, los de rutenio, paladio y platino, además de los ligandos libres y las referencias cisplatino y nifurtimox, durante 24 horas a 37 °C CO<sub>2</sub> 5%. Los complejos estaban disueltos en DMSO, y se alcanzó una concentración final del solvente de 0,05% v/v. Al término del período de incubación, se agregó 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de bromuro de tetrazolio y se incubaron las muestras durante 4 horas. Finalmente, el formazán producido fue solubilizado con 10 % sulfato dodecil de Sodio/0,1 mM HCl e incubado toda la noche. Después se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (*AsysExpert Plus*®, Austria). La absorbancia es directamente proporcional al

número de células viables al momento de agregar el bromuro de tetrazolio. Las células no tratadas fueron usadas como control (100% de viabilidad).

### **Citotoxicidad en parásitos**

Para obtener tripomastigotes, se infectaron células Vero con tripomastigotes de la cepa Dm28c, provenientes de cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratones chagásicos, en una relación 1:3 (célula/parásito). Los cultivos se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con 5% de SBF con aire con 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. A los 5-7 días después de la infección, se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 150 x g por 5 min, para separar restos celulares y a continuación, se centrifugó el sobrenadante a 1000 x g por 10 min, para obtener en el pellet, los tripomastigotes. El pellet fue suspendido en RMPI, sin suplementar, para alcanzar una suspensión de 1 x 10<sup>7</sup> parásitos/mL, que fueron incubados con los compuestos estudiados, usando nifurtimox como control positivo, durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se determinó la viabilidad mediante MTT, como se describió para los modelos celulares.

Para determinar la selectividad de los complejos frente a células sanas, se utilizó la siguiente ecuación 2.

$$\frac{\text{IC 50 Célula endotelial}}{\text{IC 50 Tripomastigote}} = \text{Índice de selectividad}$$

Ecuación 2: Índice de Selectividad.

## Evaluación del efecto inhibitorio de los complejos en la cruzipaína

La cuantificación de la inhibición de ciertas enzimas, se abordan utilizando métodos colorimétricos que apelan a reactivos cromogénicos cuyas absorbancias varían al interactuar con estas moléculas.

En este caso, se utilizó la enzima, previamente extraída y aislada de epimastigotes cepa Tulahuen 2<sup>54</sup>, la que fue incubada en Tris-HCl (pH: 7,6). Luego, se agregó el sustrato cromogénico N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA y como activante, β-Mercaptoetanol. Este ensayo, se basa en una competencia entre el sustrato cromogénico y el compuesto a estudiar. Los cambios en la intensidad de la absorbancia se registraron a 410 nm. Los complejos y ligandos fueron ensayados a una concentración del doble del IC<sub>50</sub> correspondiente disueltos en DMSO.

El porcentaje de inhibición de la cruzipaína fue calculado utilizando la ecuación 3:

$$\% = \frac{V_i}{V_o} * 100$$

Ecuación 3: Porcentaje inhibición de la cruzipaína

Donde Vi y Vo corresponden al Δ Absorbancia/minuto, con o sin inhibidor, respectivamente.



## **Inducción de apoptosis**

Para estos experimentos, se cultivaron células HL60 en medio IMDM, con 10% de Suero Fetal Bovino Inactivo y 1% de Antibiótico con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C con los compuestos a estudiar durante 24 horas. A continuación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 1000 x g. El pellet obtenido se usó para separación en gel de agarosa por electroforesis para determinación de *laddering* o para determinación de anexina V mediante citometría de flujo.

## **Electroforesis de ADN**

Un sello bioquímico de la apoptosis es la fragmentación de cromatina, un proceso irreversible que compromete a la célula a morir. La endonucleasa corta selectivamente la cromatina entre las unidades nucleosomales generando fragmentos, que luego de una electroforesis en gel de agarosa, exhiben un patrón de escalera (*laddering*).

Este ensayo se realizó usando un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (*Apoptotic ADN Ladder Kit, Roche*). Las células HL60 estimuladas con los complejos fueron lisadas con el buffer de lisis del kit y vertidas en una columna de extracción de ADN. Luego de centrifugar (10000 x g, 1 minuto), se agregó isopropanol y se incubaron por 15 minutos antes de volver a centrifugar.

Posteriormente, se lavaron varias veces con buffer de lavado y se volvió a centrifugar (13000 x g, 10 segundos). Por último se añadió buffer de elución

para extraer el ADN de la columna, el cual está listo para utilizar o se puede almacenar durante 14 días a -20°C.

El ADN se mezcló con el buffer de carga y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Las condiciones de la electroforesis fueron Buffer TBE (Tris- Borato- EDTA) a 100V por 2 Horas. Finalmente, el gel se observó en un transiluminador UV para visualizar el patrón y se comparó con el del control positivo.

## **Anexina V**

Otro tipo de sello bioquímico de la apoptosis son los cambios en la superficie celular como son la asimetría de la membrana celular, lo que conlleva a una alteración en hidrofobicidad y la carga de la superficie.

En células normales, la distribución de los fosfolípidos en la membrana es asimétrica, en su parte interna contiene fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS), y en la externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. En cambio, en una célula apoptótica se produce una traslocación de los restos de PS desde la esfera interna de la membrana hacia la externa, exponiendo la fosfatidilserina al exterior.

La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos, la cual posee una gran afinidad de unión a PS. Así, la Anexina puede unirse a los restos de fosfatidilserina de las células apoptóticas al ser estos accesibles por estar

expuestos. Lo que permite discriminar entre células apoptóticas y células normales.

Para detectar la apoptosis se usó el *kit Apoptosis Detection, Abcam*, en el cual la Anexina V está conjugada con isocianato de fluoresceína (FITC) pudiendo detectar esta fluorescencia por citometría de flujo.

Para el experimento se utilizaron células neoplásicas HL60 y placas de 24 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pocillo. Al final del estímulo las células se lavaron 2 veces con PBS (*phosphate buffer saline*) y luego fueron resuspendidas en 0,5 mL de buffer de unión a Anexina V, se agregó 5  $\mu$ L de la solución de anexina V y 5  $\mu$ L de solución de PI. Luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se traspasaron a tubos para citometría, con el fin de detectar la unión tanto para Anexina V como para PI.

Dado que la membrana de células necróticas se permeabiliza, estas pueden unir también anexina. Para distinguirlas de las apoptóticas, se utiliza un colorante de unión al ADN, el yoduro de propidio (IP). Así, sólo las células con membrana permeabilizada, podrán tomar este fluorocromo.

Por lo tanto tenemos:

Células Viables: no unen anexina y excluyen IP

Células en apoptosis: unen anexina y excluyen IP

Células en apoptosis que no fueron fagocitadas: unen anexina e incorporan IP

Células necróticas: sólo incorporan IP

Mediante citometría de flujo se detecta el FITC (Isotiocianato de fluoresceína) conjugada a la anexina V. Debido a que esta técnica se basa en la interacción de una célula con una fuente de iluminación (el láser), el cual a la longitud de onda correcta logra excitar el fluorocromo y detectar a su vez, la emisión del mismo, es posible cuantificar la cantidad de células que unen Anexina, debido a que la intensidad de la fluorescencia emitida es proporcional a los sitios de unión del fluorocromo. El citómetro presenta los datos en forma de histogramas, tabla de números y distribución en dos dimensiones. En nuestro caso, los datos son entregados en gráfico de puntos en distribución de dos dimensiones, como se ve a continuación en la figura 30.

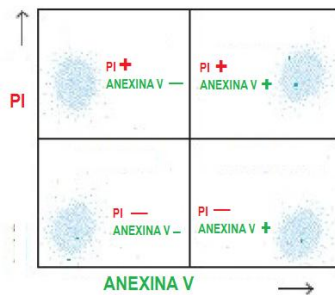
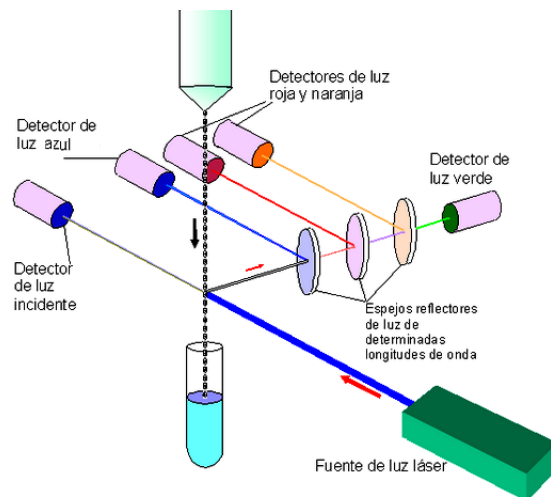


Figura 30: Representación del citómetro y entrega de resultados

## RESULTADO Y DISCUSIÓN

### Estudios Químicos

#### Estudio Electroquímico

Se realizó un estudio electroquímico de los complejos mediante voltametría cíclica, con el objeto de determinar los parámetros necesarios para dilucidar su mecanismo de reducción y su factibilidad para generar el radical nitro anión.

En la figura 31 se presenta la estructura del ligando libre (HTN), referencia para el estudio de los complejos metálicos en general.

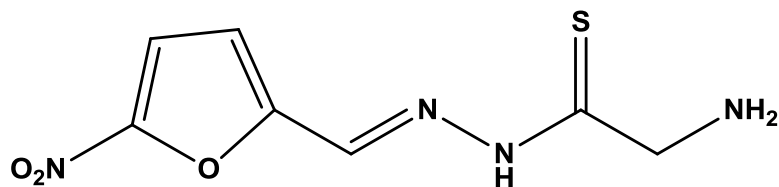


Figura 31: Ligando 1'

En la figura 31 muestra el voltamograma obtenido de una solución de ligando 1' en DMSO (1mM), en presencia de 100 mM TBAP, barrida de 0 a -2 V a una velocidad de 2 V s<sup>-1</sup>. Velocidades de barrido más lentas, generan para algunos compuestos señales agudas que resultan de la ocurrencia de un fenómeno de adsorción en la superficie del electrodo, lo que dificulta la apreciación de cada señal.

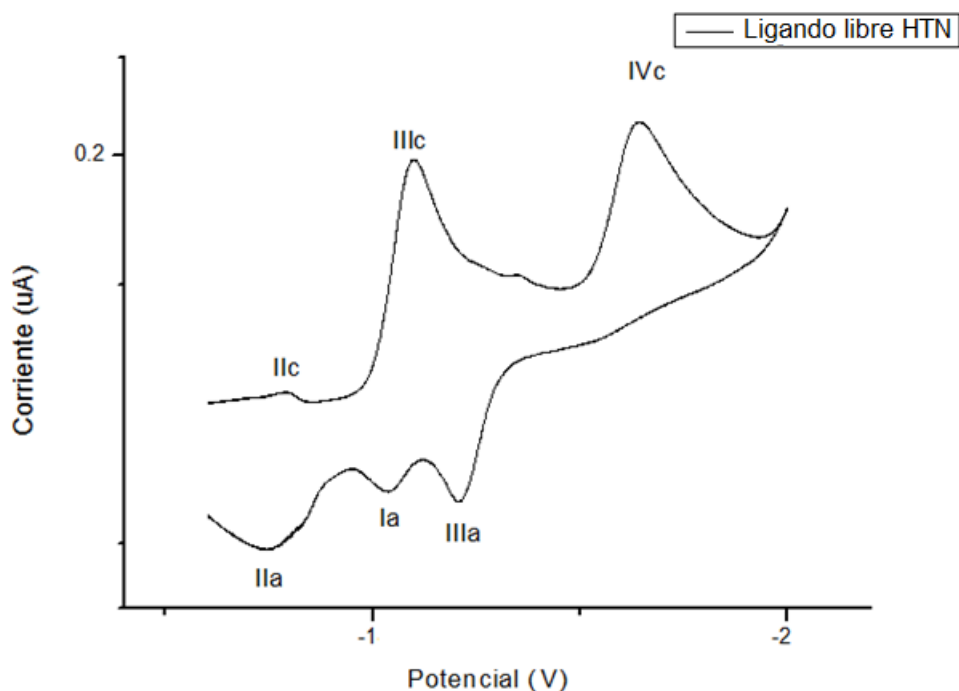


Figura 32: Voltamograma Cíclico de ligando libre TN, TBAP (100Mm) en DMSO y a una velocidad de barrido de 2000 mV s<sup>-1</sup>

En el voltamograma (figura 32), se puede apreciar claramente la aparición de la cupla (IIIc/IIIa), que según estudios previos<sup>55</sup>, correspondería a la generación del radical aniónico  $\text{RNO}_2^-$ , alrededor de los -1000 mV. Esta cupla es de importancia biológica, ya que se podría relacionar con la capacidad de generar radicales libres tóxicos.

La siguiente señal catódica (IVc), hacia los valores más negativos, pertenecería a la generación de la hidroxilamina. Se observa también un pico anódico alrededor de los -1,2 V (Ia), atribuible a un proceso de oxidación de la hidroxilamina desprotonada a su correspondiente derivado nitroso.

Por otra parte, aparece la cupla IIc/IIa que correspondería a la autoprotónación del grupo nitro a hidroxilamina y a su respectiva oxidación a su derivado nitroso. Esto ocurre debido a que el grupo nitro aumenta la acidez de la tiosemicarbazona, lo que facilita la autoprotónación. Cabe destacar que este proceso no afecta a todas las moléculas, ya que en las señales III y IV el grupo nitro no se encuentra protonado<sup>55</sup>.

## Rutenio

En la figura 33 se muestra el voltamograma rutenio 1-Ru-1' y su respectivo ligando libre 1'.

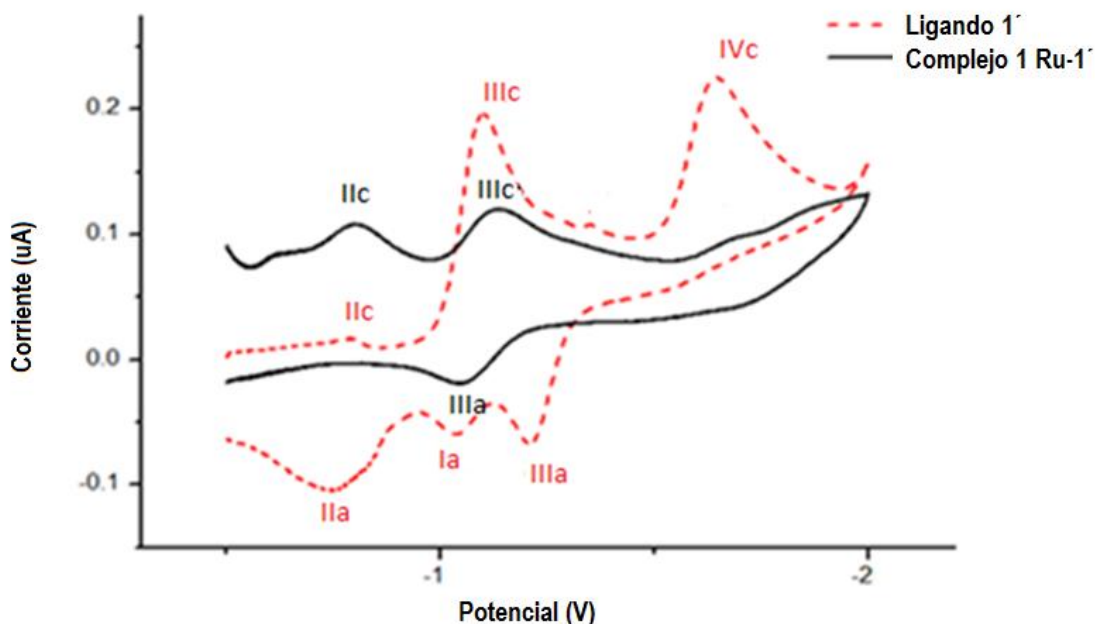


Figura 33: Voltamograma cíclico del complejo 1 Ru-1', en color negro y del ligando 1', color rojo y punteado; TBAP (100Mm) en DMSO y a una velocidad de barrido de 2000mV s<sup>-1</sup>

Se aprecia en el voltamograma (figura 33) la señal IIc, correspondiente a la autoprotonación del grupo nitro, que resulta de una mayor intensidad para el complejo de rutenio, que para el ligando libre. Esto indica que el metal volvería aún más ácida la tiosemicarbazona, facilitando la liberación del protón de la cadena y autoprotonando el grupo electroactivo.

Por otra parte, al observar la cupla IIIa/IIIc, a la que se le atribuye la generación del radical nitro, se aprecia que el potencial es muy similar, tanto en



el complejo como en el ligando libre. Tomando en cuenta que, en general, el valor de potencial de una cupla se relaciona con la facilidad o dificultad de generar los radicales libres tóxicos, responsables de la actividad biológica, valores bajos de potenciales de reducción pueden repercutir en la generación de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos. Por lo tanto, se puede inferir que los complejos de rutenio no obtendrían mejores resultados biológicos que su ligando libre.

## Paladio

La figura 34 presenta el voltamograma del complejo 5 Pd-1' representativo de todos los complejos de paladio y a su ligando libre 1' correspondiente.

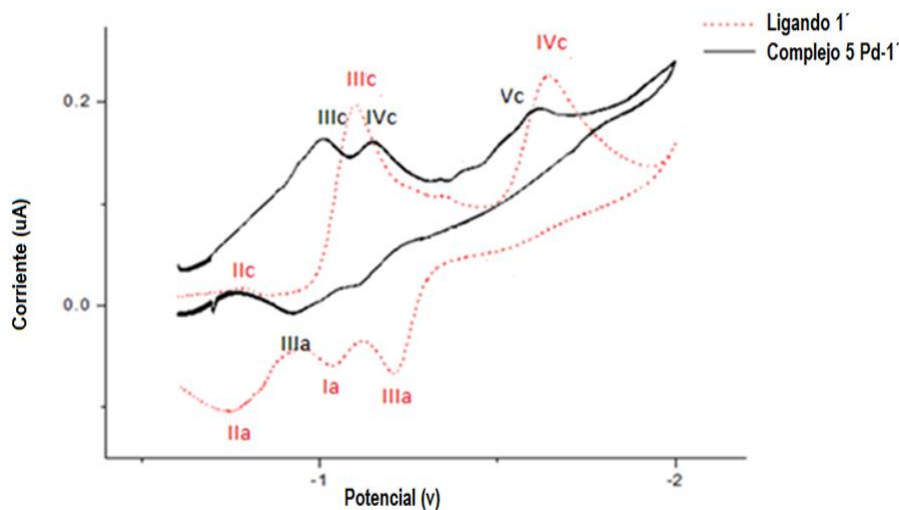


Figura 34: Voltamograma cíclico del complejo 5 Pd-1', en color negro y del ligando 1', color rojo y punteado; TBAP (100Mm) en DMSO y a una velocidad de barrido de 2000mVs<sup>-1</sup>

El voltamograma muestra la ausencia de la señal de autoprotonación en los complejos de paladio. Esto se debe a que no hay protones lábiles en la cadena, porque el ligando 1' pierde el hidrógeno 4 (figura 27), al formar parte del complejo. La señal IVc se explica por la formación de la hidroxilamina y la señal V es ocasionada por la reducción del grupo imino.

Como se mencionó anteriormente, el valor del potencial medio de la cupla (IIIc/IIIa) se relaciona con la factibilidad de generar el radical nitro, atribuyéndole así, importancia biológica.

En este caso, se observa claramente que el potencial en el que aparece la cupla IIIc/IIIa del complejo de paladio 0,97 V, es menor que el potencial entregado por el ligando libre 1,05 V para la misma cupla, lo que permite inferir que, al complejar el ligando con el paladio, se estaría facilitando la generación de radicales libres. Así, bajo este parámetro, el paladio podría mejorar la actividad biológica con respecto al ligando libre.

## Platino

La figura 35 muestra el voltamograma del complejo de platino, 9 Pt-1' con su respectivo ligando 1' correspondiente.

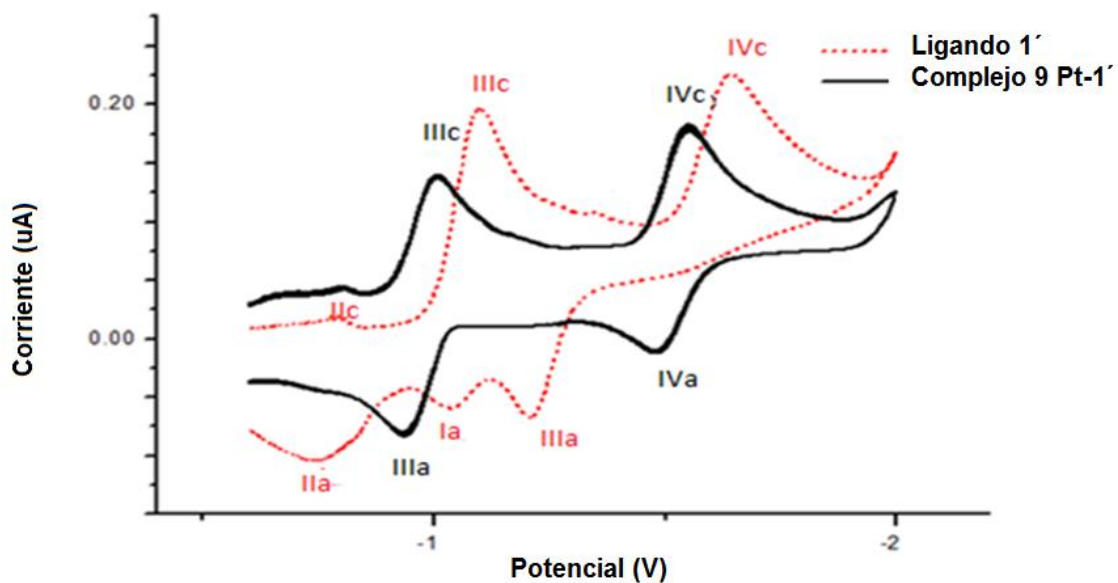


Figura 35: Voltamograma cíclico del complejo 9 Pt-1' en color negro y del ligando 1', color rojo y punteado; TBAP (100Mm) en DMSO y a una velocidad de barrido de 2000mV s<sup>-1</sup>

En el voltamograma de la figura 35 se aprecian dos cuplas, la generación del radical nitro aniónico alrededor de -1000 mV (IIIc/IIIa) y la generación de la hidroxilamina con su respectiva oxidación al derivado nitroso (IVc/IVa). Se observa también la ausencia de la señal correspondiente a la autoprotonación del grupo nitro, dado que no hay hidrógeno disponible, debido a que al complejar el ligando con el platino, este también pierde el hidrógeno 4 de la cadena tiosemicarbazona (figura 26).

Es importante destacar que el potencial donde aparece la cupla de generación del radical nitro, en el caso del complejo de platino, es menor que el entregado por el ligando libre. Lo que denota una mayor factibilidad de generar el radical libre por el complejo. Por lo tanto, se puede inferir que el platino podría aumentar la actividad biológica del ligando libre.

En la tabla 3 se presentan los parámetros obtenidos de los voltamogramas, que caracterizan la cupla IIIc/IIIa, correspondiente a la generación del radical nitro anión.

Tabla 3: Parámetros electroquímicos para los complejos y sus ligandos libres

Ligandos libres y	Epc IIIc	Epa IIIa	$\Delta E$	Ep 1/2	Ipa/Ip
1´	-1,10	-1,00	0,1	-1,05	0,95
2´	-1,09	-1,00	0,0	-1,04	1,04
3´	-1,11	-1,02	0,0	-1,06	1,03
4´	-1,07	-0,99	0,0	-1,03	0,88
1 Ru-1´	-1,14	-1,10	0,0	-1,06	0,99
2 Ru-2´	-1,11	-1,00	0,1	-1,12	0,91
3 Ru-3´	-1,11	-1,01	0,1	-1,06	0,98
4 Ru-4´	-1,11	-1,00	0,1	-1,06	0,99
5 Pd-1´	-1,01	-0,93	0,0	-0,97	0,99
6 Pd-2´	-1,01	-0,95	0,0	-0,98	0,92
7 Pd-3´	-1,01	-0,94	0,0	-0,98	0,98
8 Pd-4´	-0,96	-0,89	0,0	-0,92	0,99
9 Pt-1´	-1,01	-0,95	0,0	-0,94	0,99
10 Pt-2´	-0,97	-0,93	0,0	-0,95	0,92
11 Pt-3´	-0,97	-0,89	0,0	-0,93	0,98
12 Pt-4´	-0,93	-0,85	0,0	-0,89	0,99
Nifurtimox	-1,17	-1,11	0,0	-1,14	1,00

Los valores de la tabla fueron obtenidos aislando la cupla de generación del radical nitro, por lo que pueden aparecer ciertas diferencias con respecto de los voltamogramas mostrados anteriormente

Ep IIIc : Potencial catódico, cupla generación del radical nitro aniónico.

Ep IIIa: Potencial anódico, cupla generación del radical nitro aniónico.

$\Delta E$ : Diferencia entre el potencial catódico y anódico.

Ep ½ : Potencial medio, promedio entre catódico y anódico.

Ipa/Ipc: Razón entre corriente anódica/catódica<sup>52</sup>

Así, uno de los criterios para determinar la reversibilidad de una cupla es analizando dos parámetros en particular, los cuales son: el Ipa/Ipc y el  $\Delta E$ , que para una cupla reversible tienen un valor de 1 y 60 mV, respectivamente.

Como se aprecia en la tabla 3, los complejos de rutenio no alcanzan estos valores, por lo que la generación del radical nitro anión (IIIc/IIIa); además, el potencial varió a medida que se aumentó la velocidad, lo cual indicaría que este proceso es cuasireversible.

Para el caso de los complejos de paladio y platino, los valores de  $I_{pa}/I_{pc}$  y  $\Delta E$  se encuentran bastante cercanos a los valores antes mencionados; lo que indicaría que en el caso de estos compuestos, la generación del radical nitro anión es mediante un proceso reversible al igual que el fármaco de referencia nifurtimox.

En la tabla 3 se observa que el nifurtimox posee un valor de -1,14 V y todos los compuestos estudiados, incluyendo los ligandos, poseen valores menores. Esto indica que estos compuestos generan el radical con mayor facilidad que el nifurtimox, lo que representa un efecto favorable de estos compuestos estudiados con respecto a su potencial actividad biológica, mostrando una menor dificultad para bio reducirse y producir su efecto tóxico.

Sin embargo, al comparar los complejos con su ligando libre correspondiente se observa claramente que:

- El complejo de rutenio no logra desplazar el potencial medio en el cual aparece la cupla de generación del radical, por lo que podemos inferir que rutenio no mejora la actividad biológica del ligando libre.
- Por el contrario, paladio y platino logran modificar considerablemente el potencial de la cupla de reducción del grupo nitro a radical nitro

anión radical, hacia valores menos negativos, entregando un posible y favorable efecto en la actividad biológica.

A continuación, basándonos en los voltamogramas, los parámetros derivados del mismo y de acuerdo con antecedentes previos,<sup>36; 55; 56</sup> se propone el siguiente mecanismo electroquímico para los complejos estudiados (figuras 36, 37 y 38)

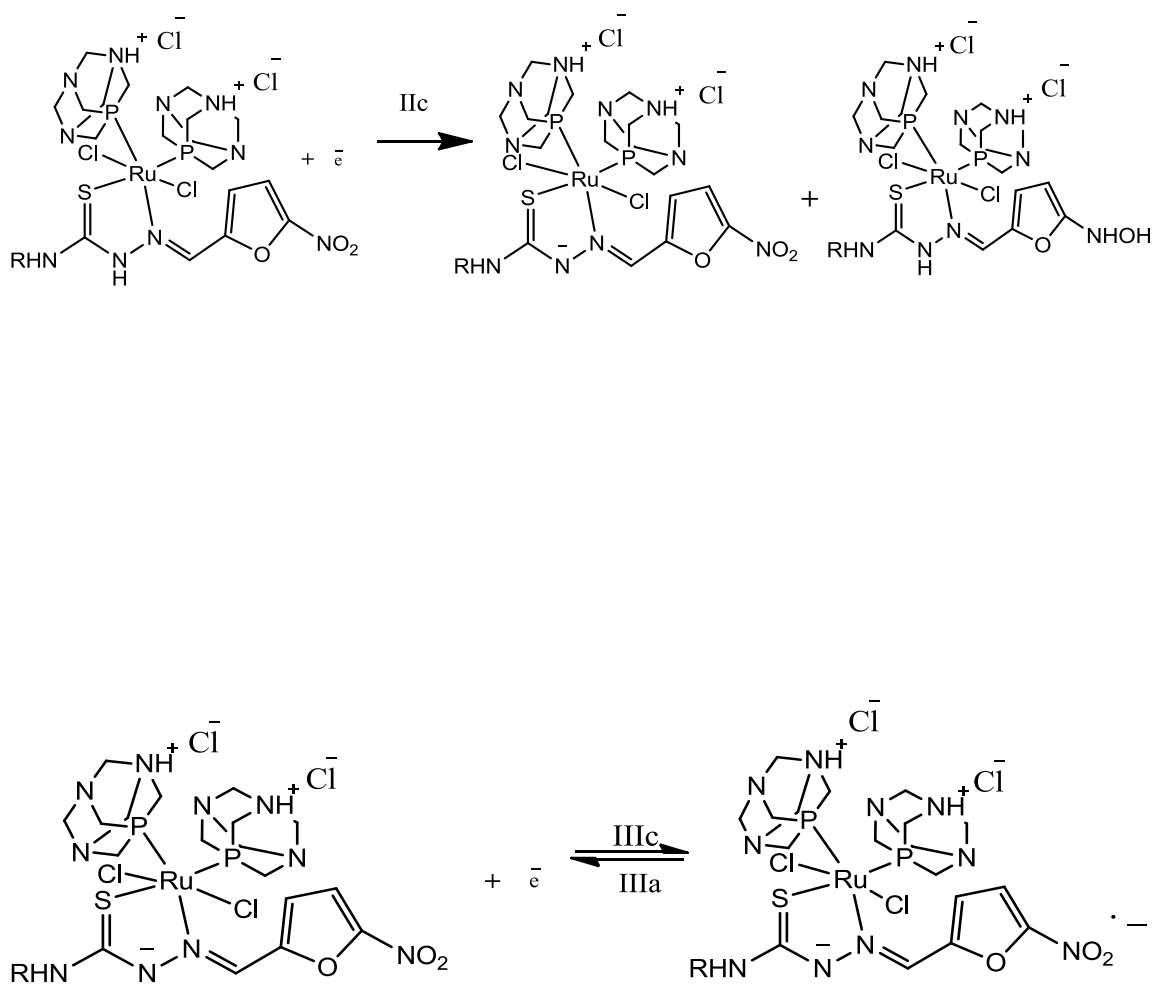


Figura 36: Mecanismo electroquímico de los complejos de rutenio

Es importante mencionar que a pesar de que el estudio se realiza utilizando un solvente aprótico, es inevitable aislar el sistema del agua, debido a la gran higroscopia del solvente y que el electrodo de referencia se encuentra en un medio acuoso, el cual provee los hidrógenos para las reacciones aquí mostradas.



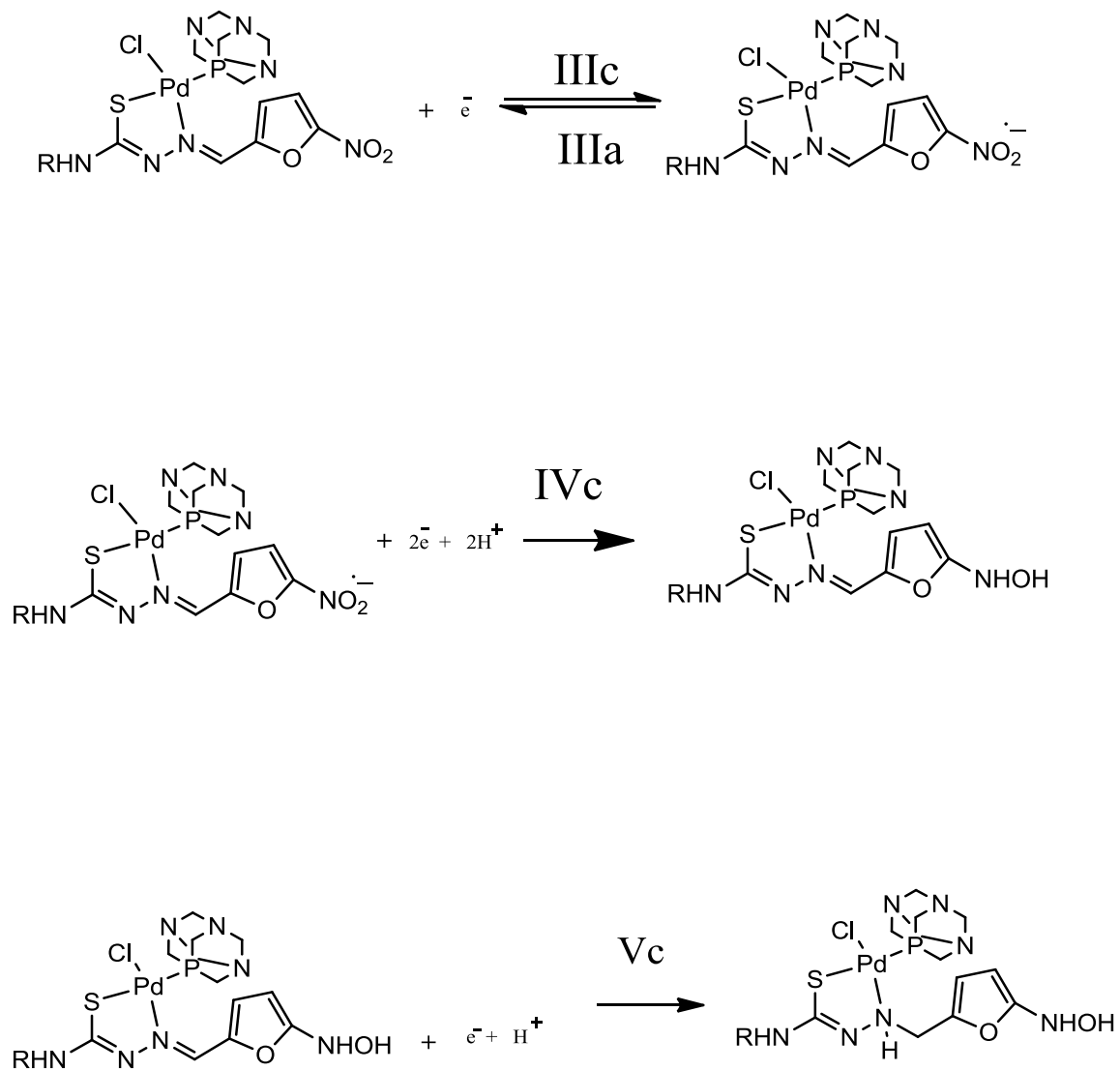


Figura 37: Mecanismo electroquímico de los complejos de paladio

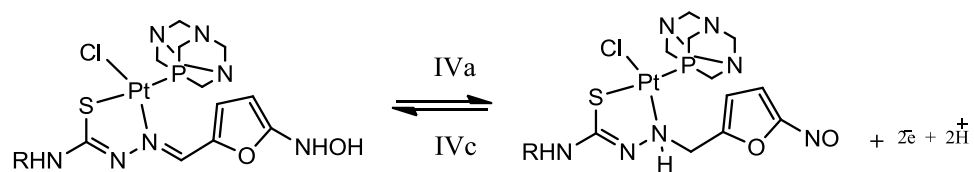
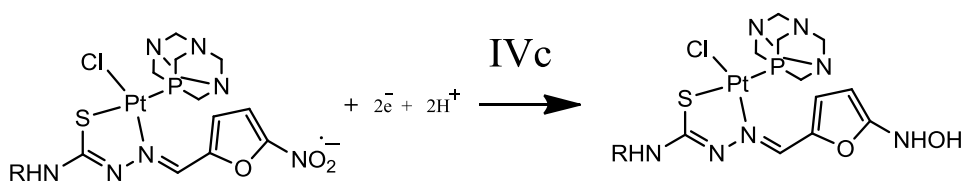
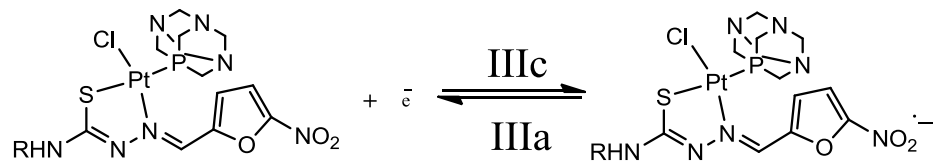


Figura 38: Mecanismo electroquímico de los complejos de platino

Con el objeto de comparar la influencia de cada metal sobre la facilidad de generar el radical nitro anión, se presentan a continuación los voltamogramas, junto a la estructura de cada familia de complejos (figura 39 y 40).

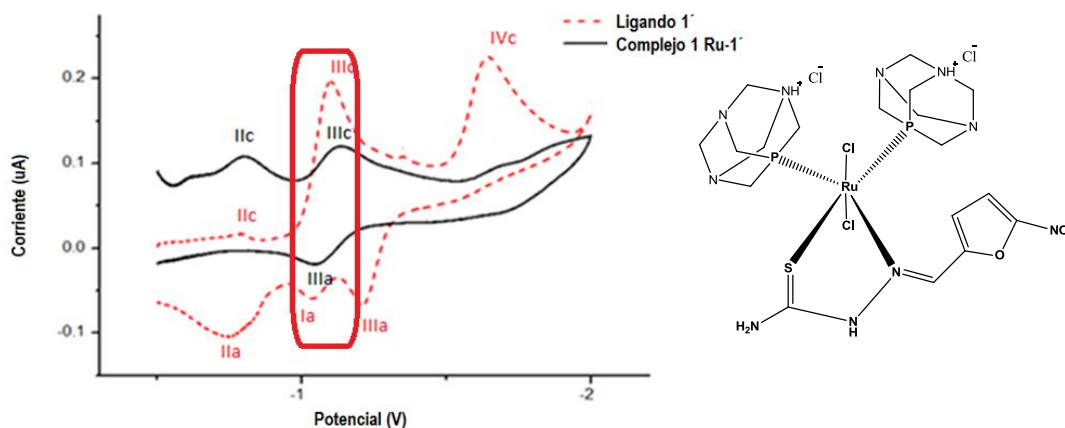


Figura 39: Voltamograma y estructura del complejo de rutenio correspondiente.

Una posible explicación al nulo aporte del rutenio en el desplazamiento del potencial (figura 39), es la mayor cantidad de ligandos que posee este complejo con respecto a paladio y platino. Por una parte, confiere una alta tensión estérica, lo que facilitaría la conformación extendida del 5-nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, generando una gran distancia del grupo nitro al rutenio; así la acción electroattractora tendría un mínimo en el grupo nitro. Además, el efecto atractor del rutenio se vería disminuido, ya que debe distribuirlo a todos sus ligandos, afectando en menor medida al electrón necesario para generar el radical.

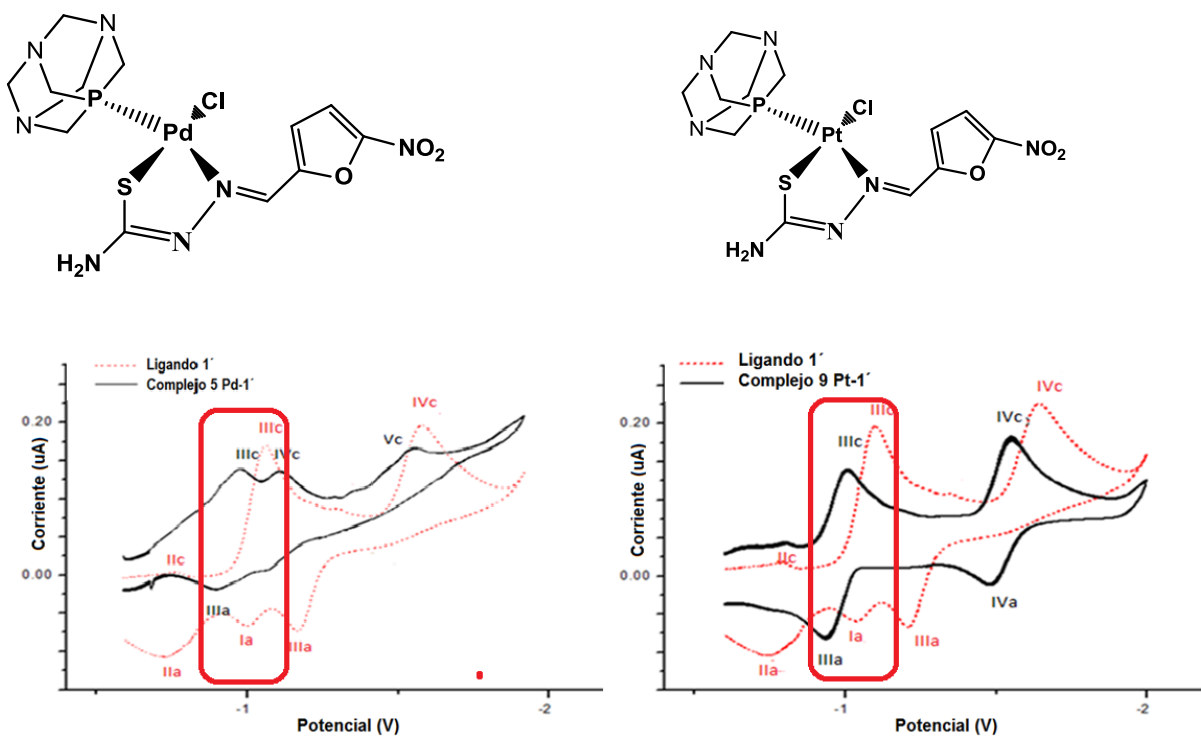


Figura 40: Voltamogramas junto a la estructura de los complejos de paladio y platino correspondiente.

El efecto que entrega el metal paladio y platino complejado con el ligando 5 nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, reflejado en el desplazamiento del potencial hacia los valores menos negativos, como se observa en la figura 40, se explicaría mediante un modelo electroestático que depende de la relación carga sobre el radio de los iones metálicos. Tomando en cuenta que paladio y platino son más pequeños que rutenio, ejercerían un mayor efecto atractor. Por otra parte, el tamaño también afecta la geometría del complejo. El paladio al ser más pequeño y tomando en cuenta que el ligando 5 nitrofurano en su estado libre estabiliza en una conformación plegada<sup>57</sup>, se espera que el ligando

no pierda del todo esa conformación, adquiriendo el complejo una geometría cuadrado planar distorsionada.

Las diferencias encontradas entre paladio y platino se deberían a que la geometría del complejo del paladio presenta una conformación más distorsionada que la del platino, lo que dificultaría la deslocalización del radical, generando un radical más inestable producto de una posible menor planaridad en el ligando al compararlo con platino, lo que se traduciría en un aumento del potencial, como se vio experimentalmente.

## Estudios de resonancia de espín electrónico

Con el objeto de comprobar la presencia de radicales en el mecanismo de reducción propuesto, se analizaron los compuestos mediante espectroscopia de espín electrónico, utilizando reacciones electroquímicas *in situ* y el potencial obtenido en voltametría cíclica para la cupla de generación del radical nitro anión, como se describió en metodología.

### Rutenio

En la figura 41, se presenta el espectro REE del radical obtenido el complejo 1-Ru-1'. Los otros complejos entregaron espectros muy similares entre sí, observándose una línea ancha sin un patrón hiperfino.

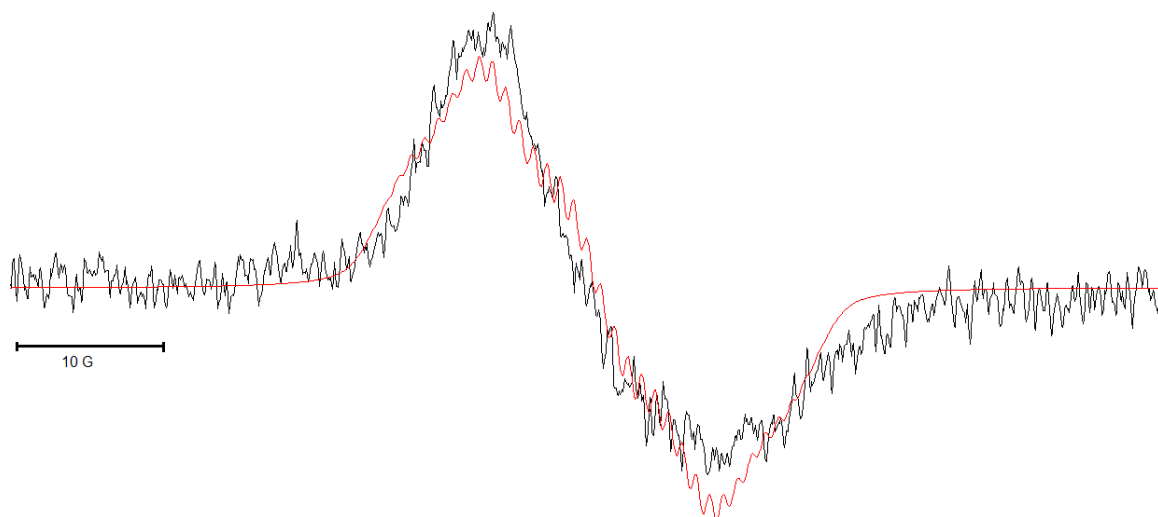


Figura 41: Espectro de espín electrónico del complejo 1 Ru-1', donde en negro se presenta el espectro experimental y en rojo el simulado

Los espectros REE fueron simulados utilizando las constantes de acoplamiento hiperfina reportadas previamente para los ligandos<sup>58 36; 57; 59</sup> Los complejos de rutenio presentaron similares constantes que el ligando libre. Sin embargo, para obtener una simulación adecuada, se modificó el ancho de línea obteniéndose uno mucho mayor que el utilizado para los ligandos, lo cual indica que en los complejos, la deslocalización de espín en la molécula es mucho mayor que en los ligandos libres.

En general, los radicales libres formados de derivados de nitro heterociclos localizan generalmente el electrón desapareado en el nitrógeno del grupo nitro<sup>60</sup>. Sin embargo, estos ligandos, nitrofuranos derivados de tiosemicarbazonas, exhiben un comportamiento diferente centrando la densidad de spin alrededor de los núcleos N<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>, figura 42, debido a que adoptan una conformación plegada<sup>57</sup>. En este caso, particularmente con los complejos de rutenio, esa localización no se produce, lo cual podemos inferir que el metal estaría facilitando la conformación extendida del ligando 5-nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, logrando una gran deslocalización.

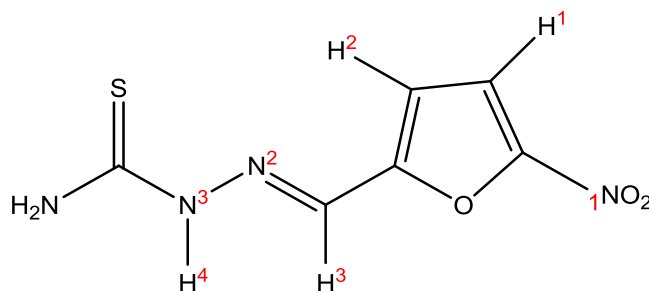


Figura 42: Ligando libre 5- nitrofurano derivado de tiosemicarbazona(1´)

Por otra parte, el efecto electro tractor del rutenio se ve disminuido por su tamaño y la cantidad de ligandos, facilitando así la deslocalización del radical por toda la molécula.

## Paladio

La figura 43 presenta el espectro REE del radical obtenido mediante una reducción electroquímica *in situ* para el complejo 5 Pd-1' y es representativo para el resto de los complejos de paladio.

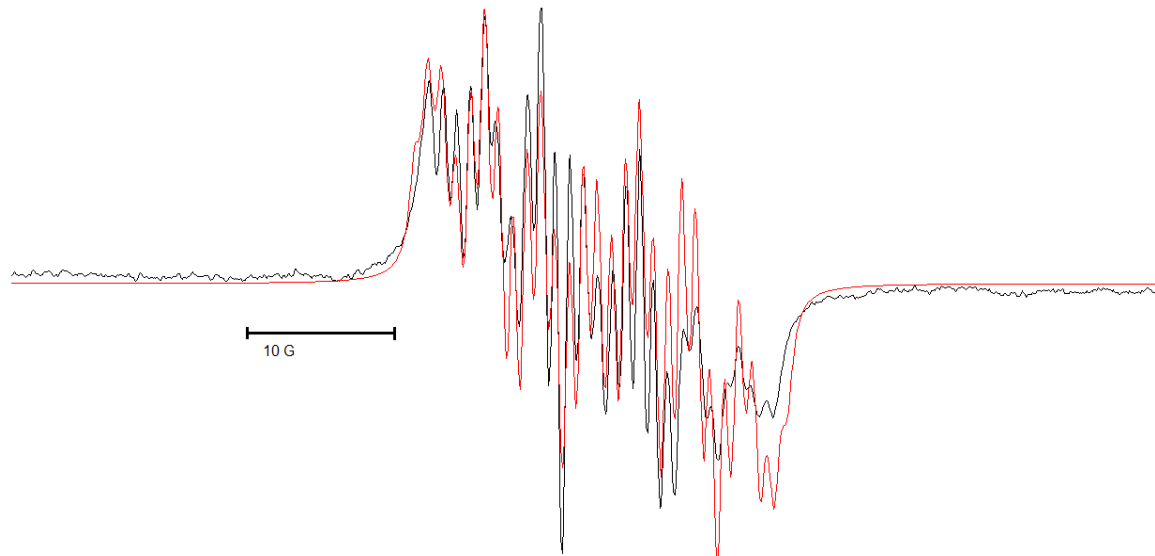


Figura 43: Espectro del espín electrónico del complejo 5 Pd-1', en negro se presenta el espectro experimental y el rojo el espectro simulado



El espectro simulado, fue obtenido usando el software WINEPR SimFonia Versión 1.25 y estimadas con una precisión de 0.05 G. Las constantes de acoplamiento fueron realizadas modificando el ancho de línea, la modulación de amplitud y la componente lorentziana/gausiana hasta alcanzar la mayor similitud con el espectro experimental.

La interpretación de los espectros REE fue realizada a través de un proceso de simulación, utilizando cálculos teóricos previamente reportados<sup>51</sup>, referente a los ligandos 5-nitrofurano derivados de tiosemicarbazonas. En la tabla 4 se muestran las constantes hiperfinas obtenidas para cada complejo de paladio.

Tabla 4: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) de los complejos de paladio.

Complejos	aN1	aN2	aN3	aN4	aH1	aH2	aH3	aHR
1´	1,19	6,98	1,57	-----	1,17	-----	2,59	1,06
2´	2,16	7,43	-----	-----	3,02	-----	-----	-----
3´	2,49	8,76	-----	-----	3,43	-----	1,33	0,36
4´	2,07	5,47	1,09	-----	2,66	-----	-----	-----
5 Pd-1´	1,11	8,45	1,17	0,63	3,66	4,89	0,33	0,36
6 Pd-2´	0,52	6,89	5,19	-----	3,97	2,55	-----	-----
7 Pd-3´	2,99	8,77	3,00	-----	1,50	2,50	0,75	-----
8 Pd-4´	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

aHR : Hidrógenos del grupo R, del ligando 5 –nitrofurano derivado de tiosemicarbazona  
\*55

En el espectro correspondiente al complejo 5 Pd-1' se exhibe un patrón de 4 tripletes asignados al efecto que producen los nitrógenos: N1 (grupo nitro), N2, N3 y N4 (tiosemicarbazona) y de 4 dobletes provocados por los hidrógenos: H1, H2 (anillo furano) y H3, HR (tiosemicarbazona).

En el caso del espectro simulado del complejo radical 6 Pd-2', resulta de un patrón de tres tripletes que aparecen por la interacción del electrón desapareado con los nitrógenos N1, N2 y N3, y dos dobletes debidos a los núcleos H1 y H2

Con respecto al complejo radical 7 Pd-3', fue simulado a partir de tres tripletes asignados a los núcleos N1, N2 y N3, y cuatro dobletes pertenecientes a los hidrógenos H1 y H2 (anillo furano) y H3

El espectro perteneciente al complejo radical 8 Pd-4' no mostró patrón hiperfino, solo una línea ancha, al igual que los complejos de rutenio.

Finalmente, el patrón hiperfino y las constantes de acoplamiento determinaron que, en este tipo de complejos, la densidad de espín se deslocaliza a través de todo el ligando 5-nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, concentrándose en el N2 de la molécula.

## Platino

En la figura 44, se muestra el espectro REE del radical obtenido mediante una reducción electroquímica in situ para el complejo 9 Pt-1'. El espectro mostrado es representativo de la familia de complejos de platino, debido a su similitud con el resto de los espectros entregados por los demás compuestos.

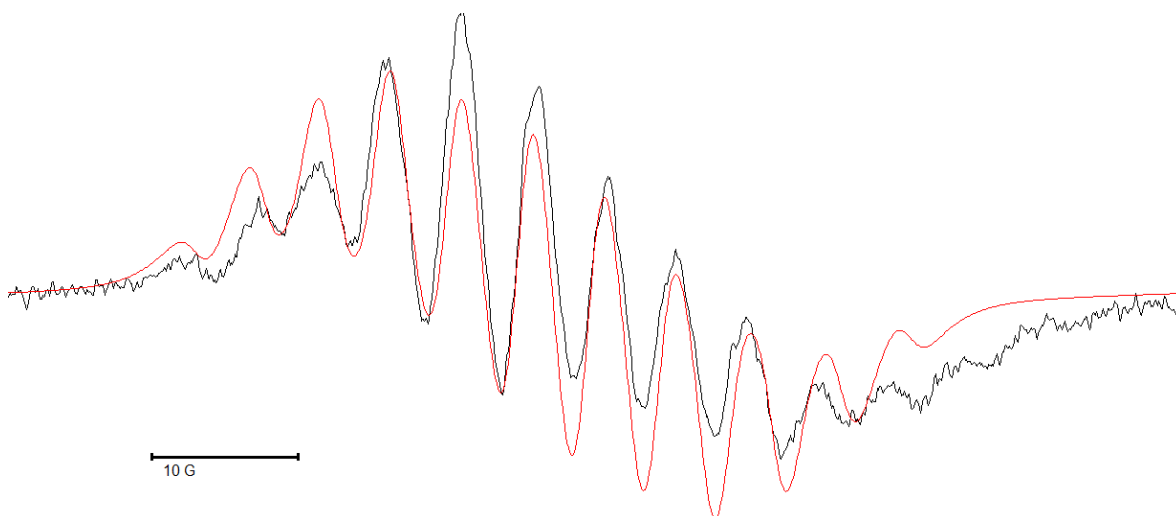


Figura 44: Espectro del espín electrónico del complejo 9 Pt-1', en negro se presenta el espectro experimental y el rojo el espectro simulado

La simulación del espectro se realizó con ayuda de cálculos teóricos, realizados en estudios previos<sup>55</sup>, como en los casos anteriores. En la tabla 5 se muestran las constantes hiperfinas obtenidas para cada complejo de platino.

Tabla 5: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) de los complejos de platino.

Complejos	aN1	aN2	aN3	aN4	aH1	aH2	aH3	aHR
1´	1,19	6,98	1,57	-----	1,17	-----	2,59	1,06
2´	2,16	7,43	-----	-----	3,02	-----	-----	-----
3´	2,49	8,76	-----	-----	3,43	-----	1,33	0,36
4´	2,07	5,47	1,09	-----	2,66	-----	-----	-----
9 Pt-1´	3,06	6,12	2,59	3.04	3,52	3,13	3,08	2,56
10 Pt-2´	2,70	5,93	2,61	-----	3,90	2,96	-----	-----
11 Pt-3´	3,71	6,63	2,79	-----	4,88	2,5	-----	-----
12 Pt-4´	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

aHR : Hidrógenos del grupo R, del ligando 5 –nitrofurano derivado de tiosemicarbazona

\*55

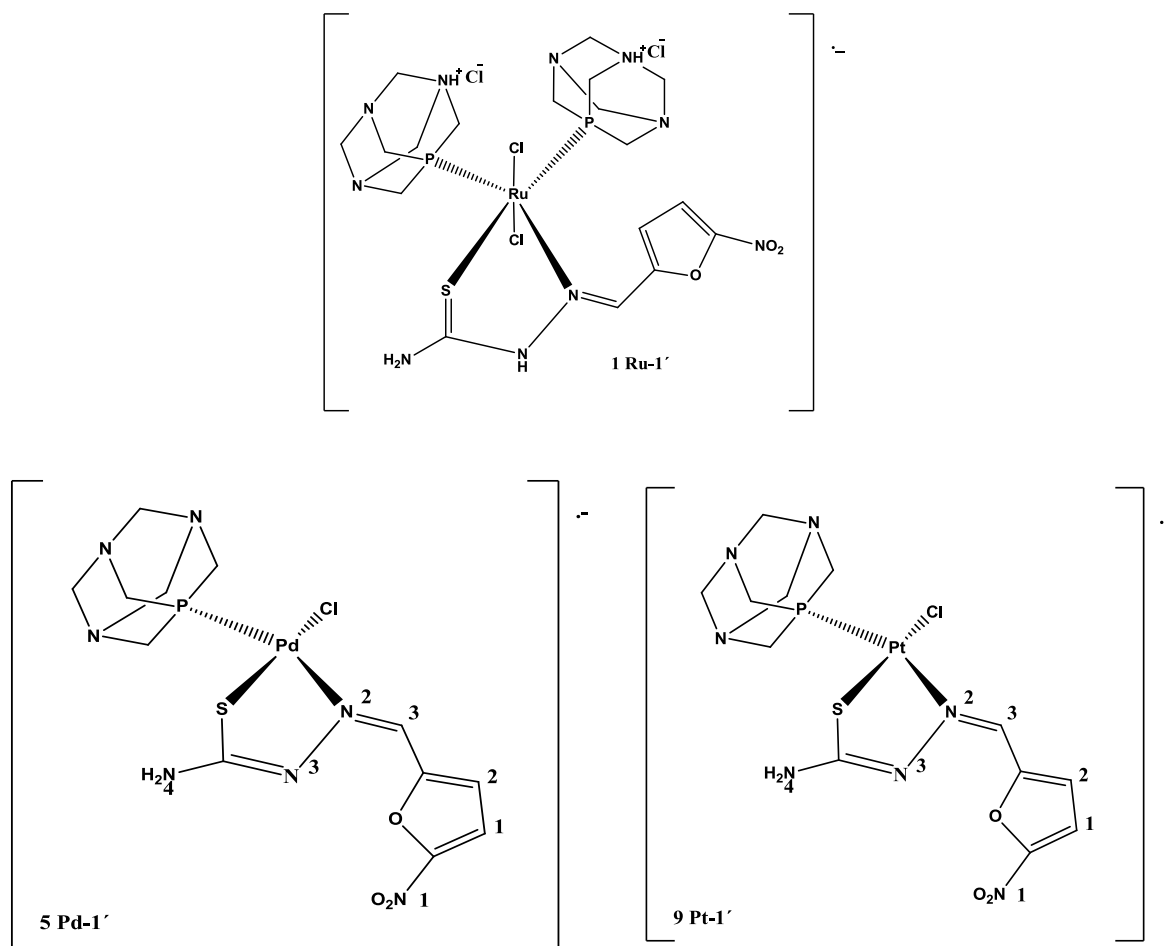
El análisis del complejo radical 9 Pt-1´ muestra un patrón de señales de un cuarteto de tripletes provenientes del grupo nitro N1 y de la tiosemicarbazona N2, N3 y N4, y cuatro dobletes asignados a los hidrógenos H1 y H2 del anillo furano, H3 y HR de la tiosemicarbazona.

En el caso del complejo 10 Pt-2´, fue simulado a partir de tres tripletes de los nitrógenos N1, N2 y N3, y dos dobletes de los hidrógenos H1 y H2.

El complejo 11 Pt-3´ resultó de un patrón de señales de tres tripletes asignados a los núcleos N1, N2 y N3 y dos dobletes provenientes de los H1 y H2, hidrógenos del anillo furánico.

El espectro perteneciente al complejo radical 12 Pt-4´ no mostró patrón hiperfino, al igual que los complejos de rutenio.

Con el fin de comparar los espectros y analizar la influencia del metal en la las constantes de acoplamiento de la molécula, se presentan las moléculas junto con sus constantes de acoplamiento hiperfino y las de su ligando libre correspondiente, (figura 45).



Complejos y Ligandos	$a_{N1}$	$a_{N2}$	$a_{N3}$	$a_{N4}$	$a_{H1}$	$a_{H2}$	$a_{H3}$	$a_{HR}$
1'	1,19	6,98	1,57	-----	1,17	-----	2,59	1,06
5 Pd-1'	1,11	8,45	1,17	0,63	3,66	4,89	0,33	0,36
9 Pt-1'	3,06	6,12	2,59	3,04	3,52	3,13	3,08	2,56

Figura 45: Complejos 1 Ru-1', 5 Pd-1' y 9 Pt-1' con sus respectivas constantes de acoplamiento hiperfino y las de su ligando 1' correspondiente

La ausencia de un patrón hiperfino de los complejos de rutenio indicaría una gran deslocalización del electrón desapareado de la molécula, lo que redundaría en constantes de acoplamiento muy pequeñas con respecto al ancho de las líneas registradas en el espectro. La línea ancha registrada es demostración de tal efecto. Esta deslocalización registrada en el espectros REE se debería a la conformación extendida que adopta el ligando 5 nitrofurano derivado de tiosemicarbazona en el complejo, corroborando así lo inferido en voltametría cíclica.

Las constantes de acoplamiento registradas para los complejos de paladio indican una mayor localización de la densidad de espín fundamentalmente en el nitrógeno 2, del ligando 5 nitrofurano derivado de tiosemicarbazona, lo que se debería a la cercanía con el metal. Adicionalmente, el patrón hiperfino y las constantes de acoplamiento registradas para el complejo de paladio son similares a las obtenidas para el ligando libre (figura 45), lo que permite inferir una estructura plegada en el complejo correspondiente. Esta constantes demuestran claramente que la estructura del ligando es plegada tanto en el complejo como en el ligando libre, caso particular que no es observado para otros nitro heterociclos con cadena de tiosemicarbazona. Estos resultados también concuerdan con lo inferido en voltametría cíclica.

En el caso del complejo de platino, las constantes de acoplamiento del N1 aumentan con respecto del resto de los complejos, lo que explica una configuración más extendida y más plana que paladio, explicando así lo obtenido en voltametría cíclica.

Cabe destacar que la mayor constante de acoplamiento en el N1 de los complejos de platino podría conllevar una mejor actividad biológica, incluso mayor que los complejos de rutenio y paladio. Esto se explica porque la densidad electrónica estaría mayormente localizada en el grupo nitro, lo cual le da una mayor reactividad. El grupo nitro es el encargado de entregar un electrón al oxígeno en medio biológico y así, generar las especies reactivas capaces de atacar a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, como se presenta en la figura 46, donde se ilustra el caso del nifurtimox, que posee dentro de su estructura un grupo nitro<sup>61</sup>

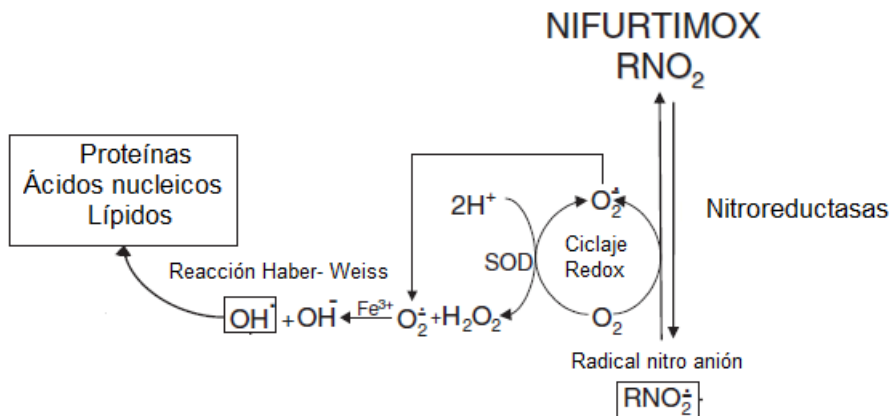


Figura 46: Reacción de generación de radicales libres tóxicos, en medio biológico<sup>61</sup>

## Estudio de Spín trapping

Para confirmar la presencia de radicales libres, generados por los complejos en el interior del parásito, se realizó un estudio de Espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico, utilizando parásitos enteros y un atrapador de espín, según la metodología descrita anteriormente.

En la figura 47 se muestran los controles y el espectro de uno de los complejos, en representación de los 12 compuestos estudiados.

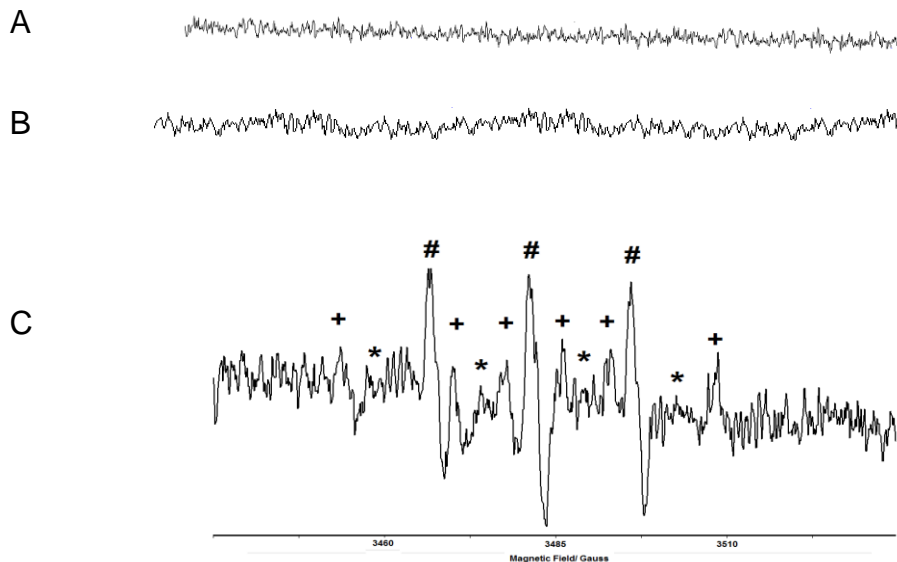


Figura 47: Espectro experimental para los espín-aductos generados en parásitos intactos de *T. cruzi* (Cepa Dm28c) a temperatura ambiente.

(A) Control 1: parásitos enteros en buffer fosfato, NADPH y DMPO. (B) Control 2: parásitos enteros en buffer fosfato, NADPH, DMPO y DMSO. (C) parásitos en buffer fosfato pH, NADPH, 4 Ru-4' en DMSO, DMPO, en donde (+) Corresponde al patrón hiperfino para el espín-aducto DMPO-CH<sub>3</sub>, (#) Corresponde al patrón hiperfino para el espín-aducto DMPOX y (\*) Corresponde al patrón hiperfino para el espín-aducto DMPO-OH



En el espectro, figura 48, se observan 3 patrones característicos, un sexteto (+), un cuarteto (\*) y un triplete (#).

Con respecto al sexteto, este patrón correspondería al atrapamiento del radical metilo ( $a_N = 15.8$  Gauss y  $a_H = 23.0$  Gauss), el cual es el producto de la reacción del radical hidroxilo con el solvente, representado en la figura 47<sup>62</sup>.

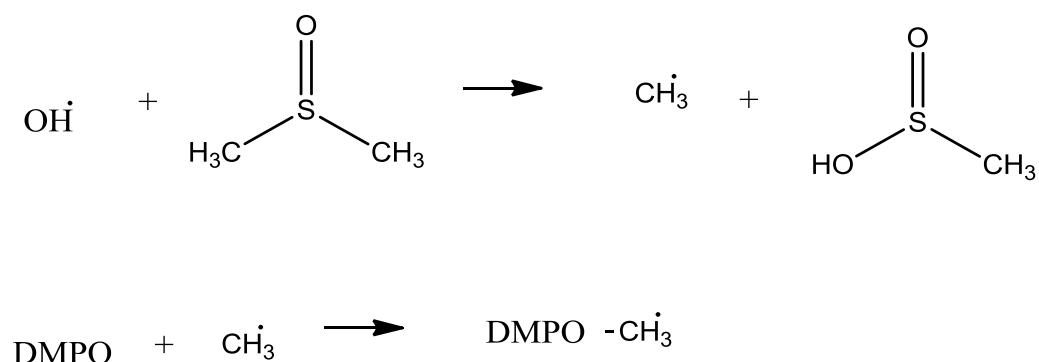


Figura 48: Reacción entre el radical hidroxilo con el solvente DMSO

Así, con el sexteto generado por los complejos tendríamos evidencia clara y segura de que nuestros compuestos generan radical OH, radical libre muy tóxico y posible mecanismo para la acción tripanocida.

El triplete (#) de gran intensidad corresponde a la descomposición del atrapador DMPO en su forma oxidada, DMPOX, con una constante de acoplamiento  $a_N = 14.8$ G. Esta descomposición no es natural, como se demuestra en el control A y B del espectro. Esto se debe a la formación, en primera instancia, del espín-aducto DMPO-OH, la que luego deriva rápidamente a DMPOX a través del mecanismo propuesto por Burkit<sup>63</sup> (Figura 49)

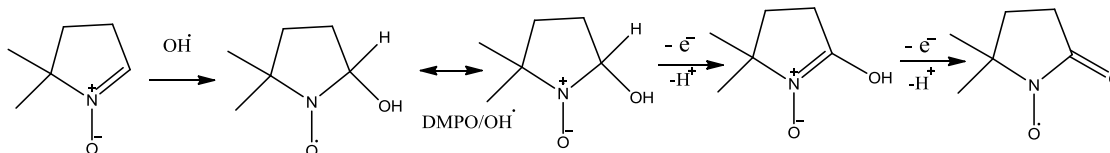


Figura 49: Mecanismo de descomposición del atrapador DMPO debido al radical hidroxilo

Finalmente, el cuarteto (\*) se relaciona con el espín-aducto DMPO-OH. La cantidad de señal se debe a que parte importante del radical OH reacciona con el compuesto y el atrapador, dando como producto las señales anteriormente analizadas.

Cabe destacar que estos ensayos se realizaron con parásitos enteros, evidenciando que estos compuestos logran atravesar la membrana celular y tener contacto con la nitrorreductasa para biorreducirse y generar los metabolitos radicalarios tóxicos.

## Ensayos biológicos

### Actividad biológica en modelo célula sana, modelo de célula tumoral y parásitos

Con el fin de determinar el posible efecto tóxico de los compuestos en los tres modelos celulares. Además de la influencia del centro metálico en la actividad citotóxica, tripanocida y su posible selectividad, se realizaron estudios de viabilidad usando células endoteliales (EAhy926), tripomastigotes de *T. cruzi* y células neoplásicas (HL60). Para la evaluación de la viabilidad, los cultivos celulares se incubaron con los ligandos y complejos de paladio, platino y rutenio durante 24 horas y a continuación se cuantificó el número de células viables mediante MTT.

Los resultados de este ensayo para cada uno de los compuestos estudiados en los tres modelos celulares se presentan como IC<sub>50</sub> en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Efecto citotóxico de los complejos y sus ligandos sobre los modelos celulares.

Complejo/Ligando	Células Endoteliales	Parásitos	Células neoplásicas
	IC <sub>50</sub> <sup>1,2</sup> [μM]	IC <sub>50</sub> <sup>1,2</sup> [μM]	IC <sub>50</sub> <sup>1,2</sup> [μM]
1´	>100	9,8±1,5	71,56±0,8
2´	>100	17,4±1,9	56,03±0,4
3´	>100	18,5±1,7	>100
4´	>100	22,7±1,6	54,42±0,3
1 Ru-1´	>100	>100	>100
2 Ru-2´	>100	>100	>100
3 Ru-3´	>100	>100	>100
4 Ru-4´	>100	84,23±3,25	>100
5 Pd-1´	86,83±0,20	57,8± 2,5	8,41±0,42
6 Pd-2´	29,78±1,50	51,3±2,2	7,27±0,36
7 Pd-3´	45,81±2,10	70,6±3,1	3,19±0,16
8 Pd-4´	>100	9,84±0,32	2,16±0,03
9 Pt-1´	49,90±2,51	58,03±1,25	16,31±0,59
10 Pt -2´	39,26±1,53	13,04±0,15	1,63±0,06
11 Pt-3´	35,14±1,62	41,17±1,05	3,64±0,17
12 Pt-4´	>100	4,94±0,24	2,17±0,01
Cisplatino	>100	57,78±2,1	8,54±0,07
Nifurtimox	>100	10,05±0,42	>100

<sup>1</sup>IC<sub>50</sub>: concentración que inhibe el 50 % de la viabilidad de las células.

<sup>2</sup>Los valores son expresados como media ± desviación estándar (SD) y todos los ensayos fueron realizados por triplicado

Se puede observar que los ligandos libres poseen una baja citotoxicidad sobre células endoteliales, una moderada actividad contra células neoplásicas y una buena actividad tripanocida.

Sin embargo, las actividades de los complejos varían dependiendo del centro metálico. Así, en células endoteliales los complejos de paladio y platino aumentan su citotoxicidad aproximadamente al doble, excepto para el ligando

TF, que mantiene su toxicidad baja, al igual que el ligando libre. No obstante, este resultado no se replica para los complejos de rutenio, manteniendo la baja actividad que tienen los ligandos libres respectivos.

Con respecto a los cambios en la actividad tripanocida, el complejo disminuye su actividad, probablemente por problemas de lipofilia, como se ha reportado previamente<sup>35; 40</sup>.

En este sentido, es posible atribuir la baja actividad de los complejos de rutenio, que son altamente hidrosolubles por la presencia de dos moléculas de PTA en su estructura, y por lo tanto, no penetrarían a las células. No obstante, se observó inducción de la producción de especies radicalarias en los ensayos de REE. Es importante recordar que estos ensayos fueron realizados con el parásito entero, lo que implica que hubo penetración efectiva de la molécula. Sin embargo, la concentración empleada fue 10 veces más alta que en los estudios biológicos.

Al contrario que en el caso de las células de mamífero, el metal paladio y platino complejado con el ligando TF, presentó actividad tripanocida aumentada. Esto se puede explicar por la capacidad electro-atractora de estos dos metales, que hacen a estas moléculas más fácilmente reducibles por la nitrorreductasa, facilitando así la generación de especies reactivas. Cabe destacar que el ligando TF es el más lipofílico de la serie<sup>64</sup>, lo que aumenta la probabilidad de atravesar la membrana plasmática de los parásitos. Tomando en cuenta la actividad tripanocida y la citotoxicidad del complejo, paladio y

platino con el ligando TF en células endoteliales, la selectividad puede ser entre 10 a 20 veces, según el metal al que fue complejado, lo que lo hace un prometedor agente anti-*T. cruzi*.

Al igual que en el caso de la actividad tripanocida, la actividad antineoplásica varió al complejar los metales con los ligandos libres y la magnitud de esta actividad dependió del metal. Así, en el caso de paladio y platino su actividad aumentó, mientras que al formar el complejo con rutenio como metal central, su actividad disminuyó.

En resumen, paladio y platino complejado con el ligando TF presenta alta selectividad y buena citotoxicidad contra *T. cruzi* y células neoplásicas, por lo que son las moléculas más prometedoras de la serie.

## Estudio de inhibición de Cruzipaína

La cruzipaína, es una cisteína proteasa que juega un rol fundamental en el ciclo biológico e infectivo del parásito *T. cruzi*, por lo que se ha convertido en una prometedora diana biológica en compuestos con fines tripanocida. Por ello, resulta interesante determinar si los ligandos y complejos de paladio, platino y rutenio poseen la capacidad de inhibir la cruzipaína, con el fin de inferir un posible mecanismo de acción contra el parásito.

Para evaluar esta actividad inhibitoria, los complejos se incubaron con cruzipaína, extraída y purificada de epimastigotes de Tulahuen 2, según protocolo previamente descrito<sup>65</sup>, en presencia de un sustrato cromogénico. La disminución de la actividad de cruzipaína se reflejó en un cambio en la absorbancia, determinado por espectrofotometría.

Los resultados de este ensayo, se presentan como porcentajes de inhibición, a continuación en la tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática en cruzipaína de los complejos y sus ligandos libres

Complejo (10 $\mu$ M)	% inhibición
1´	10,4 $\pm$ 1,2
2´	1,0 $\pm$ 0,9
3´	8,1 $\pm$ 2,3
4´	14,6 $\pm$ 2,5
4 Ru-4´	9,5 $\pm$ 1,9
8 Pd-4´	11,9 $\pm$ 0,1
12 Pt- 4´	28,8 $\pm$ 1,5

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes

Como se puede observar en la tabla 7, tanto los complejos como sus ligandos libres inhibieron de manera marginal la actividad de cruzipaína. Por lo tanto, aunque los compuestos estudiados fueron los que presentaron mejor actividad tripanocida, su acción farmacológica no estaría mediada por la inhibición de la cruzipaína.

La baja actividad inhibitoria de los ligandos podría ser explicada por la conformación plegada, la cual se mantendría durante la interacción con el sitio activo de la enzima, dificultando la interacción entre el tiocarbonilo y los residuos Cys 25 e His 159. Esta conformación plegada es conservada en los complejos de paladio lo que explicaría su baja actividad. Por otro lado, a pesar de que el ligando de rutenio se encontraría extendido, el complejo tiene un gran tamaño, lo que podría afectar el acceso al sitio de interacción, disminuyendo la actividad inhibitoria.



El complejo de platino, fue el que mostró la mayor inhibición con respecto al resto, por lo que se infiere que su menor tamaño, en comparación con el complejo de rutenio y la conformación un poco más extendida de su ligando 5 nitrofurano derivado de tiosemicarbazona en comparación con el complejo de paladio, serían características de importancia para favorecer la interacción, facilitando la inhibición.

### **Inducción de Apoptosis**

De acuerdo con los resultados presentados hasta ahora, varios de nuestros complejos presentan una excelente actividad antineoplásica.

En las etapas más tempranas del cáncer las células son más sensibles a los estímulos proapoptóticos. Lo que se correlaciona con lo observado en clínica, en que se observa que pacientes con menor carga tumoral muestran mejor respuesta a la quimio o radioterapia.<sup>66</sup> Por ende, resulta interesante estudiar la capacidad que tienen los complejos metálicos en estudio de producir muerte celular mediante apoptosis.

Es importante mencionar que durante la apoptosis se produce un cambio en la membrana celular, donde la fosfatidilserina que se encuentra presente en la cara interna de la membrana plasmática, se expone en la cara externa, lo que permite el reconocimiento por parte de los macrófagos, la que luego la fagocitan<sup>21</sup>. Este fosfolípido puede ser detectado mediante una reacción con anexina V marcada con FIT C y cuantificada por citometría de flujo, como se observa en la figura 50.

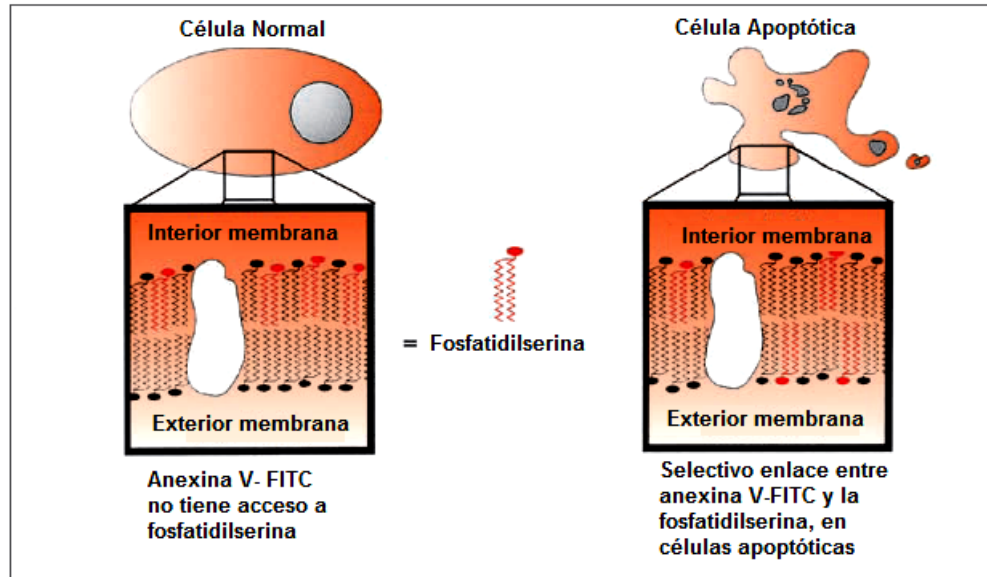


Figura 50: Detección de cambios morfológicos durante la apoptosis, traslocación de la fosfatidilserina<sup>22</sup>

Así, se determinó la capacidad de inducir apoptosis en células HL60 de los complejos, añadidos al doble del valor de  $IC_{50}$  correspondiente, e incubados durante 24 horas. En la figura 51 presentan los resultados de la determinación de Anexina V por citometría.

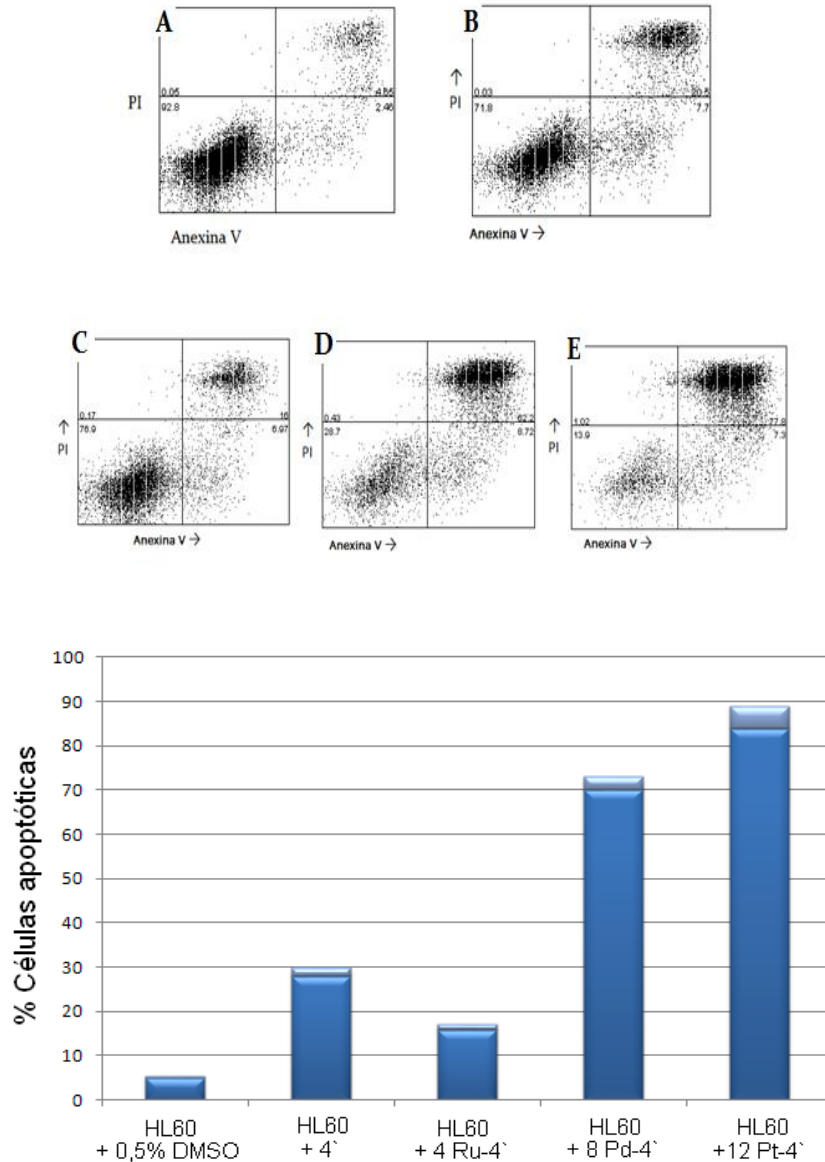


Figura 51: Efecto de complejos sobre la exposición de fosfatidilserina en células HL60.

Las células HL60 fueron incubadas con una concentración final equivalente al doble del  $IC_{50}$  del ligando 4' y sus correspondientes complejos. Luego se incubó con Anexina V y PI por 5 min y luego de lavar las células se cuantificó mediante citometría de flujo. A) Control con vehículo; B) Ligando 4'; C) Complejo 4 Ru-4'; D) 8 Pd-4' E) 12 Pt-4'. La figura inferior corresponde a la comparación cuantitativa de células en supuesta apoptosis.

En la figura 51 se aprecia que el ligando TF induce apoptosis en aproximadamente un 30% de las células, lo que no varía al formar parte del complejo con rutenio. Por el contrario, la capacidad de inducir apoptosis del ligando TF aumenta al complejar paladio y platino. Esta misma relación se presenta en el ensayo de viabilidad celular; lo cual nos lleva a sugerir una muerte por apoptosis.

Con el fin de comprobar el resultado anterior, se estudió otro tipo de marca bioquímica de la apoptosis como es la fragmentación de la cromatina. Para facilitar la comprensión de este resultado, es importante comprender la organización del material genético que se encuentra en el núcleo celular.

La cromatina está formada por fibras que nucleosomas y ADN enrollado. Cada nucleosoma tiene 8 histonas (proteínas) que forman el octámero histónico y el espaciado del nucleosoma a lo largo del DNA, que define una unidad de casi 200 pb que se repite, de los cuales 146 pb están enlazados fuertemente alrededor del núcleo de histonas y el resto sirve como un ligamiento entre nucleosomas.<sup>67</sup>

La figura 52 muestra la estructura de la cromatina, con el objeto de facilitar la comprensión del proceso de fragmentación durante la apoptosis y el consiguiente patrón electroforético.

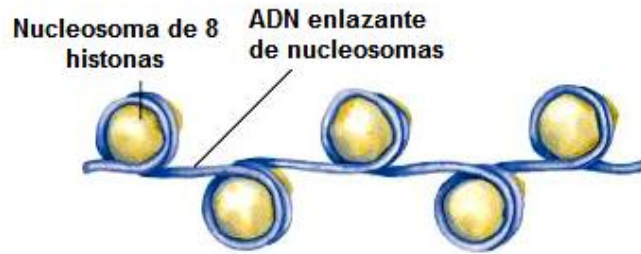


Figura 52: Estructura de la cromatina<sup>67</sup>

Tomando en cuenta lo anterior, en el proceso de apoptosis la cromatina es cortada entre los nucleosomas, produciendo oligómeros de múltiplos de 180 - 200pb aproximadamente (unidades nucleosomales)<sup>68</sup>. Los cuales al ser sometidos a una electroforesis en gel, exhiben un patrón parecido a una escalera “DNA ladder”, como se observa en la figura 53

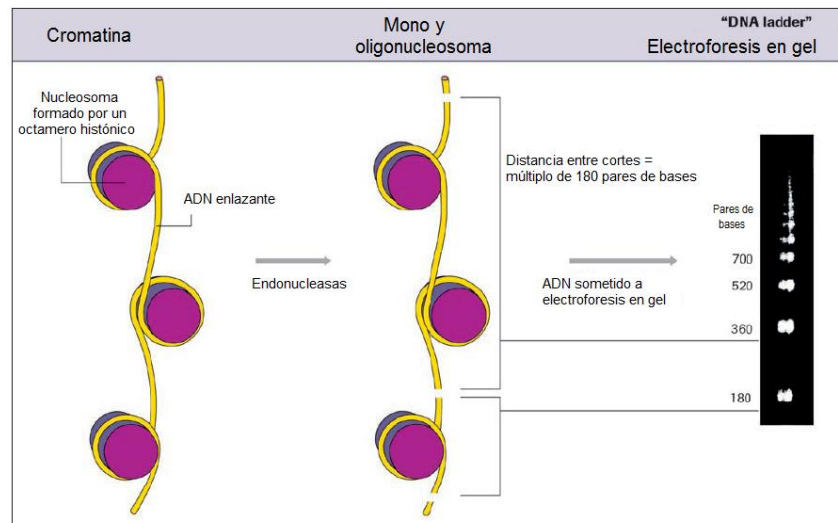


Figura 53: Bioquímica de la fragmentación de la cromatina y el patrón de escalera exhibido en la electroforesis en gel<sup>22</sup>

Por lo que la aparición del “DNA ladder”, es un buen marcador de muerte celular por apoptosis. Así, se extrajo el ADN de células HL60 incubadas con una concentración final equivalente al doble del IC<sub>50</sub> de los complejos estudiados y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% cuyos resultados se aprecian en la figura 54.

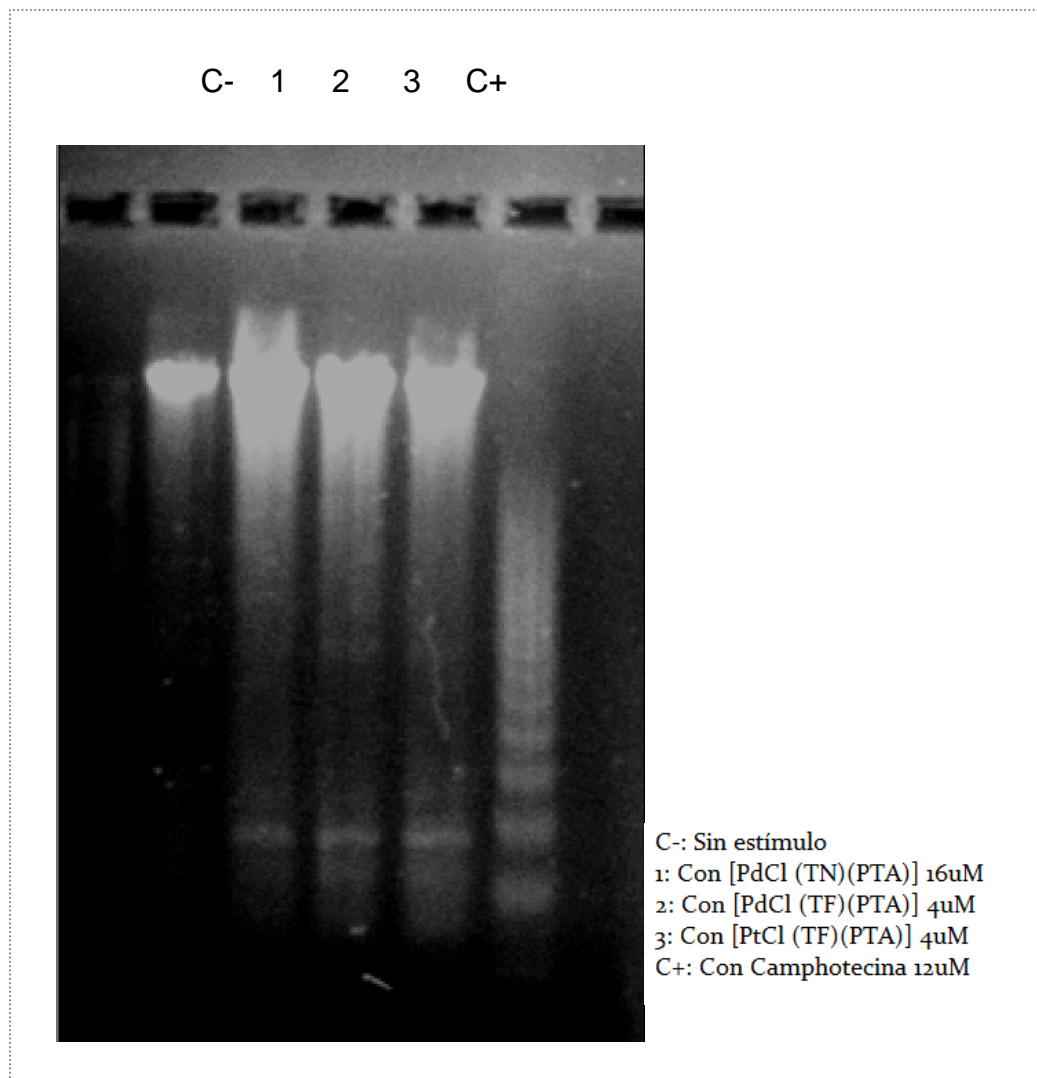


Figura 54: Electroforesis en gel de agarosa, representativa para todos los complejos

Se observa el patrón representativo de separación de los fragmentos de cromatina en células HL60 incubadas con los complejos en estudio, complementando los resultados obtenidos con Anexina V. Por lo tanto, se puede concluir que los complejos de paladio y platino podrían estar involucrados en un proceso de muerte celular que sugiere apoptosis.

## DISCUSIÓN GENERAL

En relación a los resultados de voltametría cíclica, se observó un cambio en el valor del potencial medio, indicador de una posible facilidad para generar el radical libre de los complejos con respecto a su ligando libre correspondiente. Obteniéndose valores de potencial de  $-0.92\text{ V}$  y  $-0.89\text{ V}$ , para los complejos 8 Pd-4' y 12 Pt- 4' respectivamente, valores por debajo del exhibido por el ligando 4' de  $-1.03\text{V}$ .

En general, los complejos de rutenio promedian un potencial medio de  $1.08\text{V}$ , los complejos de paladio  $0,96\text{V}$  y los complejos platino  $0.93\text{V}$ . Si comparamos estos valores con los que promedian los ligandos libres  $1,05\text{V}$ , se observa claramente que rutenio no ofrece ningún aporte a la facilidad de generación del radical, a diferencia de paladio y platino que disminuyen el valor del potencial medio evidenciando una facilidad para la generación de radicales libres, lo que bajo este parámetro podríamos inferir que paladio y platino, obtendrían una mayor actividad biológica en comparación con los ligandos libres, no así, los complejos de rutenio que por los potenciales que presentan, dificultan la generación radicalaria y por ende su actividad biológica se vería perjudicada.

En el caso del ensayo por espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE), la ausencia de un patrón hiperfino en los complejos de rutenio denotan una alta deslocalización de densidad de espín, lo que no sucede en los complejos de paladio y platino, lo cuales entregan grandes



constantes de acoplamiento, mostrando así una mayor localización del radical, lo que permite inferir que estos complejos (paladio y platino), tendrían una mayor capacidad biológica, debido a la mayor localización de la densidad de espín, entregando un radical más inestable y por ende más tóxico.

Con respecto a los complejos de paladio versus los complejos de platino, a pesar de que ambos localizan más el radical que rutenio, platino logra distribuir relativamente uniforme, sus constantes de acoplamiento por la cadena de la tiosemicarbazona, lo cual forma una radical más estable que los formados por los complejos de paladio. Es el caso del complejo 12 Pt-4' que sus constantes de acoplamiento bordean los 3G en toda la cadena de la tiosemicarbazona, a diferencia del complejo 8 Pd-4' en que sus constantes de acoplamiento van desde los 0.36G hasta los 8.45G. Esa uniformidad en las constantes entregadas por el complejo 12 Pt-4', explica de cierta forma, la medida de potencial obtenida por voltametría cíclica, ya que al formar un radical más estable, su potencial de generación disminuye. Por otra parte, cabe destacar que los complejos de platino adquieren una alta constante de acoplamiento en el nitrógeno del grupo nitro de un valor de 3G a diferencia de los complejos de paladio que bordean el valor de 1G, lo que permite inferir que los complejos de platino son más reactivos que el resto de los complejos.

Mediante la misma técnica, pero utilizando un atrapador de espín, se analizaron las especies radicalarias producidas en el interior del parásito. En este estudio, no hubo diferencias entre un metal y otro, todos produjeron el radical hidroxilo, lo cual se observó mediante diferentes patrones. Aquí se

demostró que todos los complejos logran atravesar la membrana celular y tener contacto con la nitrorreductasa del parásito para biorreducirse y generar los metabolitos radicalarios tóxicos. Cabe mencionar que la muerte celular producida por los complejos es una suma diferentes mecanismos de acción y propiedades fisicoquímicas, por ende, sabemos que penetra la membrana celular, pero no cuanto, esto explica los diferentes valores de  $IC_{50}$  obtenidos para cada compuesto estudiado.

En los ensayos de citotoxicidad mediante la reducción de sales de tetrazolio, se observó que existen diferencias, con respecto a la citotoxicidad en tripomastigotes, entre los ligandos libres y sus respectivos complejos. Particularmente, los complejos de rutenio presentan una muy baja actividad tripanocida en comparación con los complejos de paladio y platino, usando como referencia los ligandos libres, que de por sí ya poseen una buena actividad tripanocida. Caben destacar los complejos 8 Pd-4' y 12 PT-4' con un  $IC_{50}$  de 9.8  $\mu M$  y 4.94  $\mu M$  respectivamente, tomando en cuenta que el ligando 4' posee un  $IC_{50}$  de 22.7 $\mu M$ .

Con respecto a la selectividad entregada por estos compuestos hacia células EAhy, modelo de célula sana, hubo grandes diferencias entre ligandos libres y sus respectivos complejos, ya que los ligandos y los complejos de rutenio, no fueron citotóxicos, mientras que los complejos de paladio y platino si lo fueron. Se exceptúa a 8 Pd-4' y 12 PT-4' que presentaron un índice de selectividad de 10 y 20, respectivamente.

En el estudio sobre el modelo neoplásico, los complejos de rutenio continuaron siendo muy poco activos, con valores de  $IC_{50}$  sobre 100  $\mu M$ , a diferencia de los complejos de paladio y platino que resultaron ser muy activos, superando ampliamente a los ligandos libres. Así, destacaron nuevamente los complejos 8 Pd-4' y 12 Pt-4', con valores de  $IC_{50}$  de 2  $\mu M$  aproximadamente, presentando un índice de selectividad de 50.

Cabe mencionar que los valores de  $IC_{50}$  entre las 2 líneas celulares de alta proliferación son diferentes, siendo más activos para cáncer que para tripanosoma. No obstante, la relación entre ellos se mantiene. Es decir, los complejos de paladio y platino son muy activos mientras que el rutenio posee una actividad casi nula.

Por otra parte, con el fin de dilucidar el mecanismo de acción de la capacidad tripanocida que presentan los complejos y los ligandos, se estudió la capacidad inhibitoria enzimática en cruzipaína. Sin embargo, por los resultados obtenidos, esa actividad inhibitoria no guarda directa relación con su capacidad de inhibir esta enzima. La baja actividad inhibitoria de los compuestos estudiados, se podría explicar debido a que el tiocarbonilo, parte importante en el enlace con el sitio activo de la enzima se encuentra enlazado al metal, no quedando disponible para el residuo cys 125 de la enzima y con respecto a los ligandos, probablemente su conformación plegada, podría interferir perjudicando el acceso al sitio activo de la cruzipaína. Empero, el que posee mayor porcentaje de inhibición, cerca de un 30%, fue el 12 Pt-4' que también es el que tiene menor  $IC_{50}$  en tripomastigote.

En el estudio sobre la capacidad de inducción de apoptosis de los complejos en células HL60, modelo neoplásico, se determinó que los complejos inducen muerte celular por un proceso que sugiere apoptosis, demostrados por los resultados con Anexina V, en los cuales se observó gran porcentaje de células positivas a Anexina V, las cuales fueron mayores para los complejos de paladio y platino. Por otra parte se corroboró la muerte celular que sugiere apoptosis mediante la fragmentación de cromatina, la cual para todos los complejos estudiados, presentó en la electroforesis el patrón característico de la fragmentación, marca bioquímica del proceso de apoptosis.

## CONCLUSIONES

En VC, se postularon 2 tipos de mecanismos de reducción, en los cuales para los complejos de rutenio, comienza con una autoprotónación y para los complejos de paladio y platino, directamente con la reducción del grupo nitro, para generar el radical nitro aniónico.

Por otra parte, todos los ligandos y complejos estudiados presentaron un potencial medio de la cupla de generación radicalaria menores que la referencia, destacando los complejos de paladio y platino.

A través de REE, se pudo corroborar el mecanismo propuesto por VC, en donde se postula la generación de especies radicalarias. Además, se determinó que los complejos de paladio y platino, muestran una gran localización de espín a diferencia de rutenio.

A través de la metodología de *spin trapping*, se logró identificar y caracterizar las especies radicalarias producidas dentro del parásito, particularmente el radical hidroxilo, además de comprobar la penetración de los complejos en la célula.

En los ensayos biológicos, para los complejos de paladio y platino se obtuvieron excelentes actividades tripanocidas y antineoplásicas, siendo selectivos en algunos casos.

Para el caso de los complejos de rutenio, estos no entregan resultados beneficiosos contra el parásito y las células neoplásicas, lo que permite concluir que no ofrecen ningún potencial biológico.

Contrariamente a lo esperado, los complejos y ligandos estudiados, no mostraron una gran actividad inhibitoria en cruzipaína.

Mediante anexina V y fragmentación de cromatina se determinó que los complejos producen muerte celular por un proceso que sugiere apoptosis.

Finalmente, tal como fue propuesto en la hipótesis, los complejos estudiados tienen propiedades tripanocidas y antineoplásicas. Aunque los mecanismos de acción resultaron ser inespecíficos, se pueden obtener ciertos patrones de actividad. Así, los complejos de paladio y el platino, pero no los complejos de rutenio, disminuyen el potencial correspondiente a la generación del radical nitro, dando lugar a un radical más localizado, más reactivo y por ende más tóxico. Lo que tiene que ver con la mayor actividad tripanocida y antineoplásica de estos complejos, sin afectar a la selectividad. En adición, aparentemente el mecanismo de muerte celular involucra la inducción de apoptosis, lo que los hace particularmente atractivos como potenciales antineoplásicos.

## REFERENCIAS

1. Sychrova, H. (2004). Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* **53** Suppl **1**, S91-8.
2. Guo, Z. & Sadler, P. J. (1999). Metals in Medicine. *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 1512-1531.
3. Chabner, B. A. (2010). Barnett Rosenberg: In Memoriam (1924–2009). *Cancer Research* **70**, 428.
4. Renfrew, A. K. (2014). Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics* **6**, 1324-35.
5. Sanchez-Delgado, R. A. & Anzellotti, A. (2004). Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem* **4**, 23-30.
6. Kasumov, V. T., Sahin, O. & Aktas, H. G. (2016). Synthesis, characterization, crystal structure, redox-reactivity and antiproliferative activity studies of Cu(II) and Pd(II) complexes with F, CF<sub>3</sub> bearing 3,5-di-tert-butylsalicylaldimines. *Polyhedron* **115**, 119-127.
7. Kaloğlu, M., Kaloğlu, N., Özdemir, İ., Günal, S. & Özdemir, İ. (2016). Novel benzimidazol-2-ylidene carbene precursors and their silver(I) complexes: Potential antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**, 3649-3656.
8. Rettondin, A. R., Carneiro, Z. A., Gonçalves, A. C. R., Ferreira, V. F., Oliveira, C. G., Lima, A. N., Oliveira, R. J., de Albuquerque, S., Deflon, V. M. & Maia, P. I. S. (2016). Gold(III) complexes with ONS-Tridentate thiosemicarbazones: Toward selective trypanocidal drugs. *Eur J Med Chem* **120**, 217-226.
9. Sigel, H. (1995). Intramolecular equilibria in metal ion complexes of artificial nucleotide analogues with antiviral properties. A case study. *Coordination Chemistry Reviews* **144**, 287-319.
10. Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L. & Gambino, D. (2010). Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug Discov Today* **15**, 1070-8.
11. Parker, R. J., Eastman, A., Bostick-Bruton, F. & Reed, E. (1991). Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *Journal of Clinical Investigation* **87**, 772-777.
12. Rybak, L. P., Whitworth, C. A., Mukherjea, D. & Ramkumar, V. (2007). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* **226**, 157-67.
13. Oscar Aguilar Cuevas, R. C. R., Jessica J. Sánchez García, Horacio López- Sandoval, Norah Barba-Behrens. (2012). Química Inorgánica Medicinal: vanadio, platino, oro. *Educación Química* **23**, 33-40.
14. Anzar, S. M. metal ions in medicine. *Inorganic Chemistry*.
15. Elangovan Sindhuja , R. R., Nallasamy Dharmaraj b, Yu Liu. (2014). DNA/protein interaction and cytotoxicity of palladium(II) complexes of thiocarboxamide ligands. *Inorganica Chimica Acta*, 12.

16. Chatterjee, S., Biondi, I., Dyson, P. J. & Bhattacharyya, A. (2011). A bifunctional organometallic ruthenium drug with multiple modes of inducing apoptosis. *J Biol Inorg Chem* **16**, 715-24.
17. Otero, L., Aguirre, G., Boiani, L., Denicola, A., Rigol, C., Olea-Azar, C., Maya, J. D., Morello, A., Gonzalez, M., Gambino, D. & Cerecetto, H. (2006). Nitrofurylsemicarbazone rhenium and ruthenium complexes as anti-trypanosomal agents. *Eur J Med Chem* **41**, 1231-9.
18. Phillips, A. D., Gonsalvi, L., Romerosa, A., Vizza, F. & Peruzzini, M. (2004). Coordination chemistry of 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA): Transition metal complexes and related catalytic, medicinal and photoluminescent applications. *Coordination Chemistry Reviews* **248**, 955-993.
19. Bravo, J., Bolaño, S., Gonsalvi, L. & Peruzzini, M. (2010). Coordination chemistry of 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) and derivatives. Part II. The quest for tailored ligands, complexes and related applications. *Coordination Chemistry Reviews* **254**, 555-607.
20. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
21. Romero, S. P. Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo, Universidad de Granada.
22. Hans- Jürgen Rode, P. D. (2008). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation Dossris Eisel edit. Roche Diagnostic GmbH.
23. Polo, S. A. (2003). Herramientas de la Biología Molecular aplicadas a la Microbiología. In *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas* Universidad de Barcelona.
24. Lin, Y., Huang, Y., Zheng, W., Wang, F., Habtemariam, A., Luo, Q., Li, X., Wu, K., Sadler, P. J. & Xiong, S. (2013). Organometallic ruthenium anticancer complexes inhibit human glutathione-S-transferase pi. *J Inorg Biochem* **128**, 77-84.
25. Özbek, N., Alyar, S., Memmi, B. K., Gündüzalp, A. B., Bahçeci, Z. & Alyar, H. (2017). Synthesis, characterization, computational studies, antimicrobial activities and carbonic anhydrase inhibitor effects of 2-hydroxy acetophenone-N-methyl p-toluenesulfonylhydrazide and its Co(II), Pd(II), Pt(II) complexes. *Journal of Molecular Structure* **1127**, 437-448.
26. Parrilha, G. L., Ferraz, K. S., Lessa, J. A., de Oliveira, K. N., Rodrigues, B. L., Ramos, J. P., Souza-Fagundes, E. M., Ott, I. & Beraldo, H. (2014). Metal complexes with 2-acetylpyridine-N(4)-ortho-chlorophenylthiosemicarbazone: cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase. *Eur J Med Chem* **84**, 537-44.
27. Scharfstein, J. & Andrade, D. (2011). Chapter 5 - Infection-Associated Vasculopathy in Experimental Chagas Disease: Pathogenic Roles of Endothelin and Kinin Pathways. In *Advances in Parasitology* (Louis, M. W. & Herbert, B. T., eds.), Vol. Volume 76, pp. 101-127. Academic Press.
28. Du, X., Guo, C., Hansell, E., Doyle, P. S., Caffrey, C. R., Holler, T. P., McKerrow, J. H. & Cohen, F. E. (2002). Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. *J Med Chem* **45**, 2695-2707.
29. Aguirre, G., Boiani, L. a., Cerecetto, H., Fernández, M., González, M., Denicola, A., Otero, L. a., Gambino, D., Rigol, C., Olea-Azar, C. & Faundez, M. (2004). In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-



- nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 4885-4893.
30. Rodriguez Riobó, R. (2007). Tesis doctoral. Complejos metálicos con tiosemicarbazonas derivadas de 2-pirazinaformamida.
  31. Cerecetto, H. & Gonzalez, M. (2001). N-Oxides as Hypoxia Selective Cytotoxins. *Mini Rev Med Chem* **1**, 219-231.
  32. Tocher, J. (1997). Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *General Pharmacology: The Vascular System* **28**, 485-487.
  33. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1-40.
  34. Evan, G. I. & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342-348.
  35. Pagano, M., Demoro, B., Toloza, J., Boiani, L., González, M., Cerecetto, H., Olea-Azar, C., Norambuena, E., Gambino, D. & Otero, L. (2009). Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Eur J Med Chem* **44**, 4937-4943.
  36. Vieites, M., Otero, L., Santos, D., Toloza, J., Figueroa, R., Norambuena, E., Olea-Azar, C., Aguirre, G., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Morello, A., Maya, J. D., Garat, B. & Gambino, D. (2008). Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *J Inorg Biochem* **102**, 1033-43.
  37. Bergamo, A. & Sava, G. (2011). Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans* **40**, 7817-23.
  38. Scolaro, C., Bergamo, A., Brescacin, L., Delfino, R., Cocchietto, M., Laurenczy, G., Geldbach, T. J., Sava, G. & Dyson, P. J. (2005). In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J Med Chem* **48**, 4161-71.
  39. Anghileri, L. J. (1975). The in vivo inhibition of tumor growth by ruthenium red: its relationship with the metabolism of calcium in the tumor. *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie* **83**, 213-217.
  40. Demoro, B., Rossi, M., Caruso, F., Liebowitz, D., Olea-Azar, C., Kemmerling, U., Maya, J., Guiset, H., Moreno, V., Pizzo, C., Mahler, G., Otero, L. & Gambino, D. (2013). Potential Mechanism of the Anti-trypanosomal Activity of Organoruthenium Complexes with Bioactive Thiosemicarbazones. *Biological Trace Element Research* **153**, 371-381.
  41. Andrews, P. A., Murphy, M. P. & Howell, S. B. (1985). Differential Potentiation of Alkylating and Platinating Agent Cytotoxicity in Human Ovarian Carcinoma Cells by Glutathione Depletion. *Cancer Research* **45**, 6250-6253.
  42. Von Hoff, D. D., Schilsky, R., Reichert, C. M., Reddick, R. L., Rozenzweig, M., Young, R. C. & Muggia, F. M. (1979). Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in man. *Cancer Treat Rep* **63**, 1527-31.
  43. Kartalou, M. & Essigmann, J. M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* **478**, 23-43.
  44. Zutphen, S. v., Kraus, M., Driessen, C., van der Marel, G. A., Overkleeft, H. S. & Reedijk, J. (2005). Probing the potential of platinum(II) complexes for the inhibition of thiol-dependent enzymatic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**, 1384-1389.
  45. Santos, D., Parajón-Costa, B., Rossi, M., Caruso, F., Benítez, D., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Gómez, N., Caputto, M. E., Moglioni, A. G., Moltrasio, G. Y., Finkielstein, L. M. & Gambino, D. (2012). Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of

- thiosemicarbazones derived from 1-indanones. *Journal of Inorganic Biochemistry* **117**, 270-276.
46. P. Jeffrey Hay, J. C. T., and Roald Hoffmann. (1975). Orbital Interactions in Metal Dimer Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **97**, 4884.
  47. Marques, M. P. M. (2012). Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor. *International Scholarly Research Notices* **2013**, 29.
  48. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* **13**, 790-801.
  49. Hanahan, D. & Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674.
  50. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.
  51. Aguirre, G., Boiani, L. a., Cerecetto, H., Fernández, M., González, M., Denicola, A., Otero, L. a., Gambino, D., Rigol, C., Olea-Azar, C. & Faundez, M. (2004). In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem* **12**, 4885-4893.
  52. Nicholson, R. S. (1966). Semiempirical Procedure for Measuring with Stationary Electrode Polarography Rates of Chemical Reactions Involving the Product of Electron Transfer. *Analytical Chemistry* **38**, 1406-1406.
  53. Aguilera-Venegas, B., Arán, V. J., Kemmerling, U., Maya, J. D., Mendizábal, F., Olea-Azar, C. A. & Speisky, H. (2012). Electrochemical, ESR and theoretical insights into the free radical generation by 1,1'-hydrocarbylenebisindazoles and its evaluation as potential bio-active compounds.
  54. Parussini, F., Garcia, M., Mucci, J., Agüero, F., Sanchez, D., Hellman, U., Aslund, L. & Cazzulo, J. J. (2003). Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **131**, 11-23.
  55. Rigol, C., Olea-Azar, C., Mendizabal, F., Otero, L., Gambino, D., Gonzalez, M. & Cerecetto, H. (2005). Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **61**, 2933-8.
  56. Otero, L., Folch, C., Barriga, G., Rigol, C., Opazo, L., Vieites, M., Gambino, D., Cerecetto, H., Norambuena, E. & Olea-Azar, C. (2008). ESR, electrochemical and reactivity studies of antitrypanosomal palladium thiosemicarbazone complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **70**, 519-23.
  57. Rigol, C., Olea-Azar, C., Mendizábal, F., Briones, R., Cerecetto, H. & González, M. (2006). Theoretical study on 5-nitrofuryl thiosemicarbazone radicals electronic properties. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **770**, 125-129.
  58. Aravena, C. M., Olea, A. C., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Maya, J. D. & Rodriguez-Becerra, J. (2011). Potent 5-nitrofuran derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: electrochemical, spectroscopic and biological studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **79**, 312-9.
  59. Aravena, C. M., Olea, A. C., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Diego Maya, J. & Rodriguez-Becerra, J. (2011). Potent 5-nitrofuran derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Electrochemical, spectroscopic and biological studies. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **79**, 312-319.
  60. Moreno, S. N., Mason, R. P. & Docampo, R. (1984). Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *J Biol Chem* **259**, 8252-9.

61. Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., Ferreira, A. & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**, 601-20.
62. Finkelstein, E., Rosen, G. M., Rauckman, E. J. & Paxton, J. (1979). Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol* **16**, 676-85.
63. Lawrence, A., Jones, C. M., Wardman, P. & Burkitt, M. J. (2003). Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 29410-9.
64. Sarniguet, C., Toloza, J., Cipriani, M., Lapier, M., Vieites, M., Toledano-Magaña, Y., García-Ramos, J., Ruiz-Azuara, L., Moreno, V., Maya, J., Azar, C., Gambino, D. & Otero, L. (2014). Water-Soluble Ruthenium Complexes Bearing Activity Against Protozoan Parasites. *Biological Trace Element Research* **159**, 379-392.
65. Cazzulo, J. J. C. R., Raimondi A et al. (1989). Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **33**, 33-41.
66. Martin, D. S. & Schwartz, G. K. (1997). Chemotherapeutically induced DNA damage, ATP depletion, and the apoptotic biochemical cascade. *Oncol Res* **9**, 1-5.
67. López, D. G. E. (2004). Genética, Universidad de la Habana.
68. Matassov, D., Kagan, T., Leblanc, J., Sikorska, M. & Zakeri, Z. (2004). Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. *Methods Mol Biol* **282**, 1-17.

## PAPERS

Los resultados de esta tesis, se encuentran publicados en estos papers, adjuntados en los anexos

### Effect of the Metal Ion on the anti *T. cruzi* Activity and Mechanism of Action of 5-Nitrofuryl-containing Thiosemicarbazone Metal Complexes

Micaella Cipriani,[a][‡] Jeannette Toloza,[b][‡] Lara Bradford,[a] Eugenia Putzu,[a] Marisol Vieites,[a] Estela Curbelo,[a] Ana Isabel Tomaz,[c] Beatriz Garat,[d] Juan Guerrero,[e] Jorge S. Gancheff,[a] Juan Diego Maya,[f] Claudio Olea Azar,[b] Dinorah Gambino,[a] and Lucía Otero\*[a].

[a] Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química, Udelar, Montevideo, Uruguay

[b] Depto de Química Inorgánica y Analítica, F. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago,

[c] Centro de Ciências Moleculares e Materiais, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa,

Portugal [d] Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, Udelar, Montevideo, Uruguay

[e] Departamento de Ciencias de los Materiales, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile,

[f] Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

[‡] Both authors contributed to this manuscript equally.

### Water-Soluble Ruthenium Complexes Bearing Activity Against Protozoan Parasites

Cynthia Sarniguet, Jeannette Toloza, Micaella Cipriani, Michel Lapier, Marisol Vieites, Yanis Toledano-Magaña, Juan Carlos García-Ramos, Lena Ruiz-Azuara, Virtudes Moreno, Juan Diego Maya, Claudio Olea Azar, Dinorah Gambino, Lucía Otero.

C. Sarniguet, M. Cipriani, M. Vieites, D. Gambino (\*), L. Otero (\*)

Cátedra de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, C. C. 1157, 11800 Montevideo, Uruguay. e-mail: [dgambino@fq.edu.uy](mailto:dgambino@fq.edu.uy), e-mail: [luotero@fq.edu.uy](mailto:luotero@fq.edu.uy)

J. Toloza, C. O. Azar

Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Sergio Livingstone 1007, Casilla 233, Santiago, Chile

M. Lapier, J. D. Maya

Departamento de Farmacología Clínica y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile

## CONGRESOS

Se participó en el segundo Congreso Ciencia Joven 2012, XV aniversario ICBM con el título “Complejos de rutenio: estudio de su capacidad tripanocida”

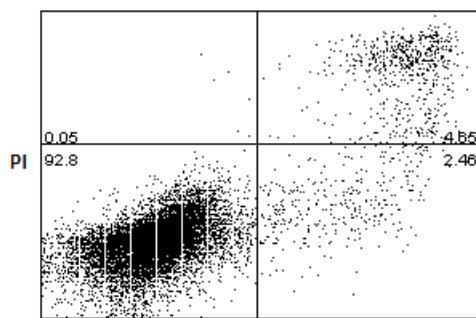
Se presentó poster en el IV Simposio Internacional sobre enfermedad de Chagas 2013; III Reunión Nacional Integrada prevención y control de la enfermedad de Chagas, XV Jornada anuales de Parasitología (SOCHIPA) Santiago Chile

Se presentó poster en VIII meeting of the Society for free Radical Biology and Medicine- South American Group (VIII SFRM-SAG), 2013, Buenos Aires, Argentina

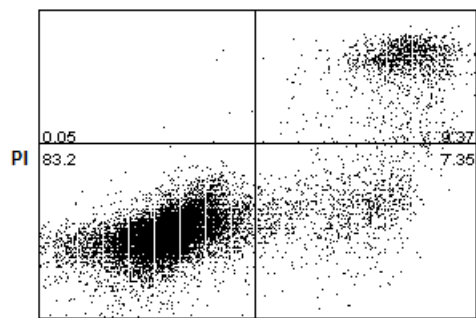
# ANEXO

## Citometría de flujo

### Control DMSO

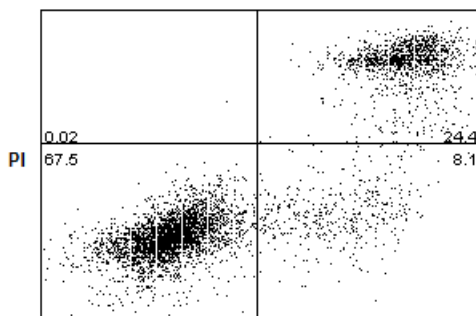


ANEXINA V

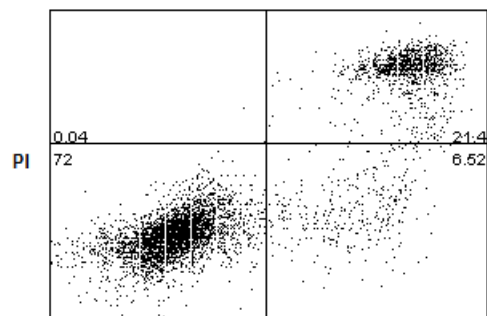


ANEXINA V

### Ligando libre TF

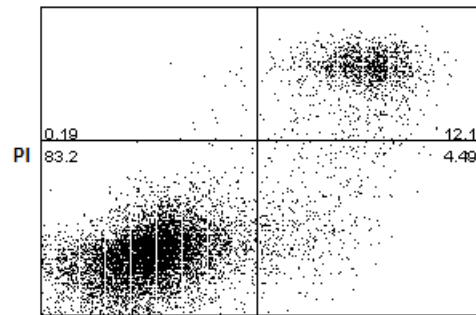


ANEXINA V

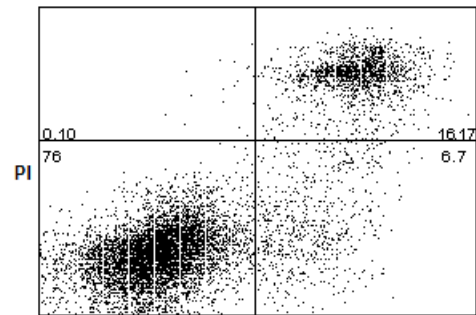


ANEXINA V

### Complejo [RuCl (TF)(PTAH)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>

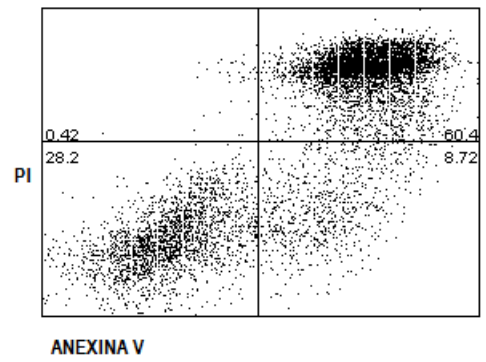
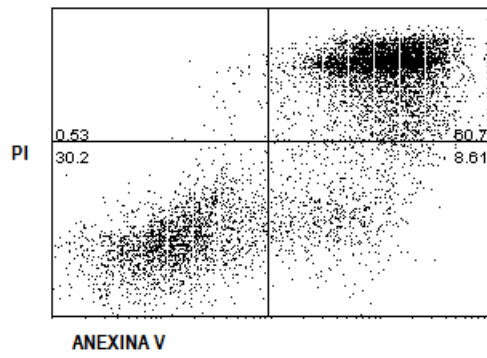


ANEXINA V



ANEXINA V

Complejo [PdCl (TF)(PTA)]



Complejo [Pt Cl(TF)(PTA)]

