



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD
ANTICHAGASICA DE NUEVOS DERIVADOS DE
5-NITROINDAZOLONAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

ROBERTO ANDRÉS MERCADO MUÑOZ

PATROCINANTE

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR
DR. JUAN DIEGO MAYA

Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO, CHILE, 2010

A mi Papá, mi Mamá y mi querida Tana

Agradecimientos

Quiero agradecer con mucho afecto a mi familia, partiendo por mi mamá, Nela, gracias a su incondicional amor y atenciones para ayudarme a salir adelante. A mi papá, Hugo por enseñarme que el camino del esfuerzo te lleva al éxito. A mis hermanos Eduardo y Daniel a quienes vi crecer en este proceso, gracias por apoyarme y en cualquier situación darme alegría. También quiero agradecer muy especialmente a mi Tana, quien ciertamente ha sido un pilar fundamental en mi carrera y aún más en mi vida, enseñándome con acciones y con ejemplo. A mi tío Carlos, mi tía Lidia y primos, gracias por su cariño y fe durante este camino.

Quiero agradecer muy especialmente a Paulina, gracias por remecer mis esquemas, por potenciarme, por escucharme, por enseñarme, por levantarme y por su incondicional amor y apoyo desde que llego a mi vida.

A mis amigos Fito y Aliosha, gracias por compartir cientos de tazas de café estudiando y forjando una gran amistad. A mi amiga Cony, por ser una gran partner y más importante, por ser una excelente amiga.

Finalmente quiero agradecer encarecidamente a mi profesor y director de tesis, Dr. Claudio Olea, por dar muestras claras de su confianza en mis capacidades, gracias por su tiempo y atención ya que me han ayudado a crecer académica y profesionalmente, gracias por su apoyo.

Gracias a todos los profesores y compañeros que me ayudaron en mi formación como Químico.

Tabla de Contenido

Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Resumen	viii
Summary	ix
Introducción	1
<i>Enfermedad de Chagas</i>	1
Hipótesis	9
Objetivo general	9
<i>Objetivos específicos</i>	9
Moléculas en estudio	10
Materiales y equipos	12
<i>Compuestos 5-Nitroindazolonas</i>	12
<i>Materiales y equipos utilizados en la caracterización electroquímica</i>	13
<i>Materiales y equipos utilizados en la espectroscopía de espín electrón.</i>	14
<i>Materiales y equipos utilizados en ensayos de actividad biológica.</i>	14
Metodología	15
<i>Voltametría cíclica</i> ^[13]	15
<i>Espectroscopía de espín electrón</i>	17

<i>Ensayos de actividad biológica</i>	17
Resultados y discusión	19
1. <i>Estudio electroquímico</i>	19
2. <i>Espectroscopía de espín electrón</i>	28
3. <i>Mediciones biológicas</i>	30
Conclusiones	38
Bibliografía	40

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de datos electroquímicos recogidos	22
Tabla 2. Capacidad inhibitoria de GSH	26
Tabla 3. Asignación de señales para el espectro REE	29
Tabla 4. Valores de IC_{50} obtenidos para macrófagos RAW 264.7.....	31
Tabla 5. Población remanente de epimastigotes tras 24 horas de incubación.....	33
Tabla 6. Valores de IC_{50} obtenidos para epimastigotes clon Dm28.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Áreas geográficas de distribución de insectos vectores	2
Figura 2. Flujo de migración de America Latina hacia regiones no endémicas	3
Figura 3. Ciclo vital de <i>Tripanosoma Cruzi</i>	4
Figura 4. Estructura de Nifurtimox	6
Figura 5. Estructura de Benznidazol.....	6
Figura 6. Familia de 5-Nitroindazolonas en estudio.....	10-11
Figura 7. Voltamogramas cíclicos de VA5-13L, VATR 36, 37,38, 46, 65, 59 y 66.....	19
Figura 8. Dependencia lineal de $\log(I_{pc})$ vs $\log(v)$	20
Figura 9. Razón de corrientes vs velocidad de barrido	21
Figura 10. Voltamograma cíclico de VATR 37 con cantidades crecientes de GSH ...	24
Figura 11. Mecanismo propuesto para la reducción de Nitroindazoles en presencia de GSH en medio aprótico	25
Figura 12. Espectro REE de VATR 3	28
Figura 13. Simulación y asignación de señales	28
Figura 14. a) Disminución de células viables versus concentración de droga, b) Curva descriptiva de logaritmo de inhibidor versus porcentaje de células viables.....	30
Figura 15. a) Curva de crecimiento para epimastigotes clon Dm28, b) Comportamiento de la constante de crecimiento en función del logaritmo del inhibidor	34
Figura 16. Comparación de valores de IC_{50} e IC_{K50}	36

Resumen

Estudio de la capacidad antichagásica de nuevos derivados de 5-Nitroindazolonas

Este estudio fue desarrollado para investigar los mecanismos de reducción y reactividad de una nueva familia 5-Nitroindazoles. Estos compuestos poseen actividad radicalaria a partir de su grupo nitro, razón por la cual son candidatos a presentar una posible actividad tripanocida. Para evaluar esta capacidad tripanocida se recurrió a técnicas voltamperométricas y espectroscópicas además de un estudio biológico de toxicidad sobre parásitos.

La formación del anión radical nitro fue estudiada por medio de voltametría cíclica, donde se determinó un mecanismo electrónico simple caracterizado por un par redox único dando como resultado una reacción cuasireversible. Además a través de la misma técnica se evaluó el efecto de un antioxidante natural, como es glutatión, sobre la generación radicalaria. También se utilizó la espectroscopía de espín electrónica para caracterizar los radicales generados, donde se determinó un patrón hiperfino común para toda la serie de compuestos.

Por último se recurrió a un estudio biológico de toxicidad realizado en células murinas y parásitos epimastigotes, mostrando variados resultados en la serie, por lo que se recurrió a una fase exploratoria para determinar aquellos que poseían mayores facultades como agentes tripanocidas.

Summary

Antitrypanosoma cruzi capability study of new derivates of 5-Nitroindazolones

This study was conducted to investigate the mechanisms of reduction and reactivity of a new 5-nitroindazole family. These compounds have a radical activity due to their nitro group, for this reason are candidates to present a possible trypanocidal activity. To evaluate this trypanocidal capability, voltammetric and spectroscopic techniques, was used. At last we performed a biological study of toxicity on mammal cells and parasites.

The nitro radical anion generation was studied by cyclic voltammetry, which was determined with a simple electronic mechanism characterized by a single couple, resulting a quasireversible reaction. Through the same technique, the effect of natural antioxidant, such as glutathione, on the free radical generation was evaluated. Also was used the electron spin spectroscopy to characterize the radicals generated, for which was determined a hyperfine pattern common to all series of compounds.

Finally, a biological toxicity study in mammal cells and parasites epimastigotes was performed, giving different results in the series, which became to an exploratory phase to determine those have more efficacy as trypanocidal agents.

Introducción

Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria muy compleja que está presente en todo el territorio de Sudamérica, Centroamérica y México, y continúa representando una grave amenaza para la salud de los países de la región. El parásito causante, *Tripanosoma Cruzi*, se presenta en una gran variedad de cepas e infecta 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres. La existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho puramente accidental, en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatomíneos infectados a ocupar viviendas humanas, se llevó a cabo el proceso de domiciliación y así, encontraron refugio y suficiente alimento en la sangre humana y la de los animales domésticos. De esta manera, entra el hombre a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas.

La Figura 1 muestra el mosaico epidemiológico en el cual se basaron las diferentes iniciativas continentales de control vectorial de la enfermedad de Chagas. Se muestran las áreas geográficas correspondientes a la distribución de los diferentes insectos vectores, y los países que conforman las iniciativas con sus respectivas fechas de creación.

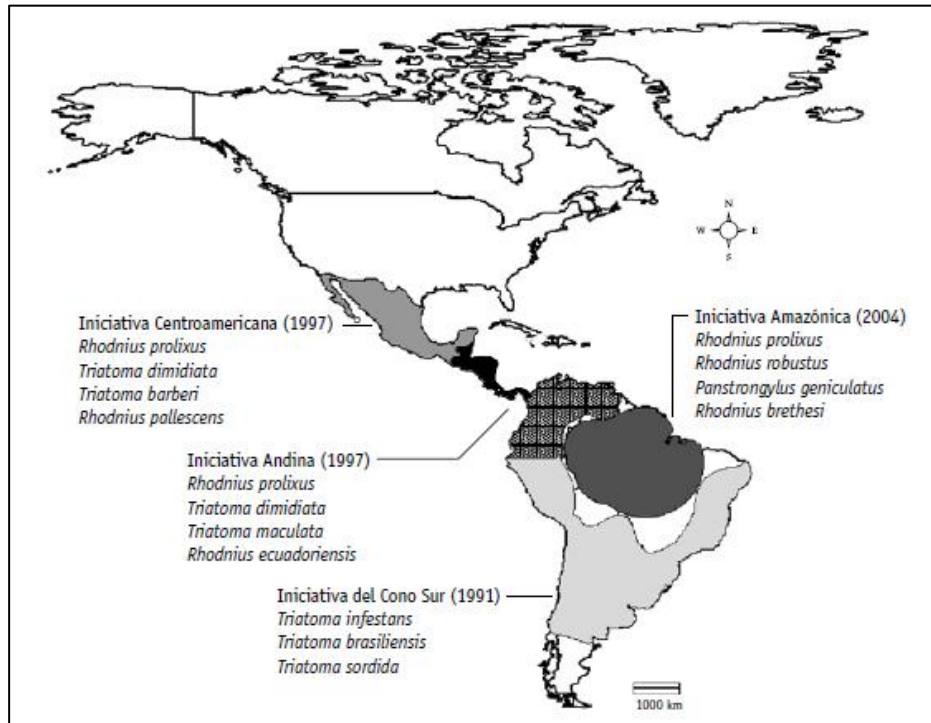


Figura 1. Áreas geográficas correspondientes a la distribución de los diferentes insectos vectores, y países que conforman las iniciativas con sus respectivas fechas de creación.

Además de las regiones de infección congénita de la enfermedad como son Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Honduras, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela, existe una migración de la enfermedad a países no endémicos. La Figura 2 muestra la dimensión de la expansión de la infección por *T. Cruzi* debida a las migraciones de individuos infectados hacia países como los Estados Unidos, Canadá y en Europa, principalmente, España. Esta globalización de la enfermedad de Chagas obliga a los países no endémicos a establecer medidas de prevención y control, además del establecimiento de nuevas políticas y estrategias para la tamización de donantes en bancos de sangre, así como el eventual seguimiento y tratamiento de los pacientes infectados. Como puede observarse en la Figura 2, el mayor número de

inmigrantes infectados procedentes de Latinoamérica corresponde a los Estados Unidos, seguido de España, Canadá y los demás países de Europa en menor grado, al igual que Japón y Australia.^[1]

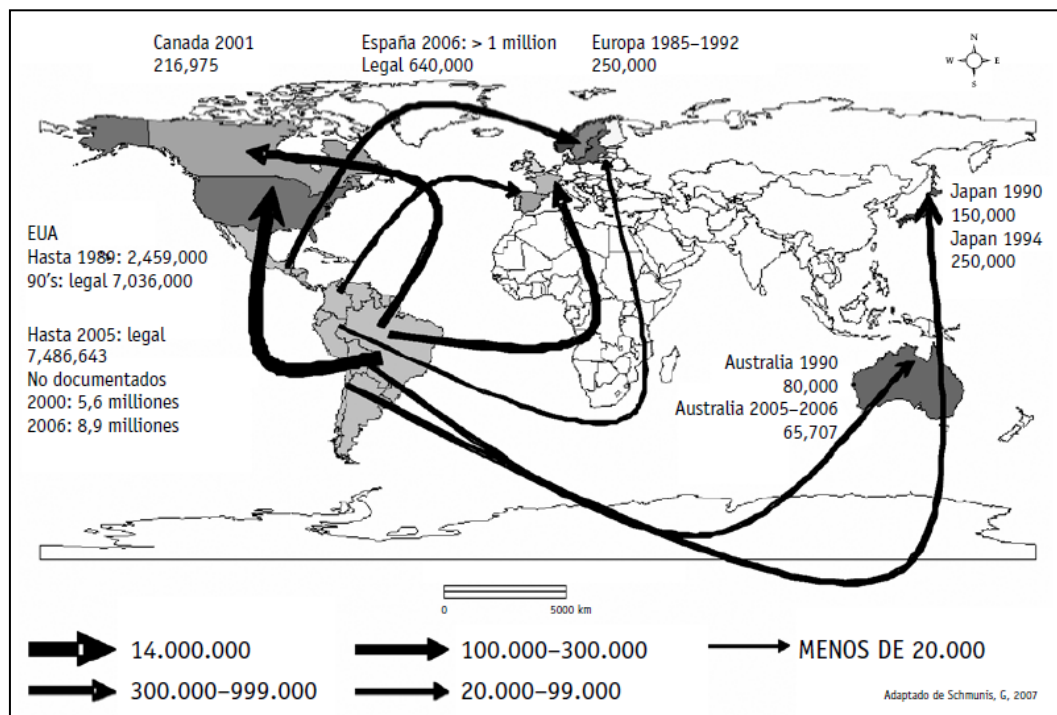


Figura 2. Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas.

El ciclo de acción del *Tripanosoma Cruzi* y su forma de infección se basan en el vector biológico del protozoo, *Triatoma infestans*, vulgarmente conocido como “Vinchuca”. Este ingiere sangre infectada con el protozoo, el cual en el intestino del vector se transforma en un epimastigote que se reproduce en gran número. Este sigue hasta el intestino del huésped hasta transformarse en tripomastigote, este sale del huésped a través de sus fecas. Al momento de picar a sus huéspedes, la vinchuca defeca introduciendo los tripomastigotes en el tejido donde se transforman en amastigotes, donde se multiplican para luego volver a la forma de tripomastigotes y entrar a la circulación^[2]. Por medio de

la circulación sanguínea estas estructuras se distribuyen en el organismo, este ciclo se ilustra en la Figura 3.

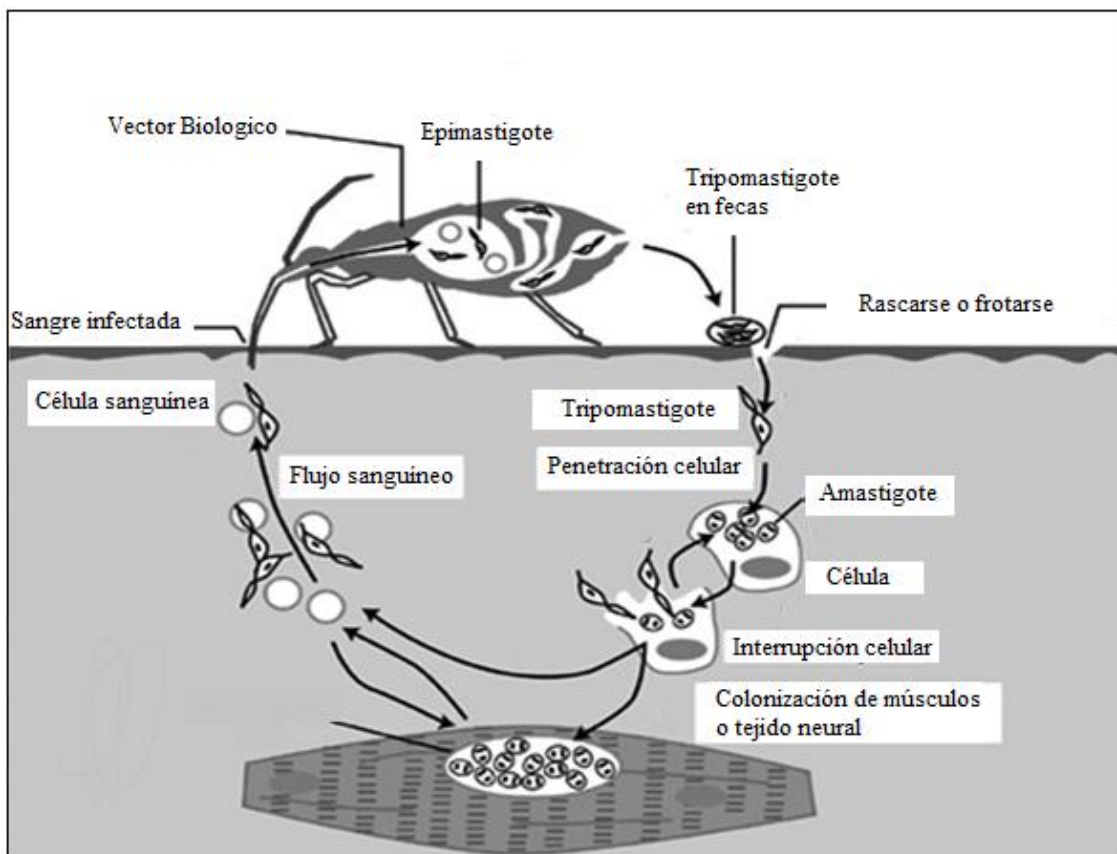


Figura 3. Ciclo vital del *Tripanosoma Cruzi*

Los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de esta patología son Nifurtimox y Benznidazol, ambos agentes nitroheterocíclicos, sin embargo esta quimioterapia aún no es adecuada debido a indeseados efectos secundarios^[3]. Este inconveniente genera el interés de investigar nuevas familias de nitroheterociclos y realizar las respectivas caracterizaciones para su estudio.

Según los estudios de Gillete (1981)^[4] La actividad biológica de estos nitroheterociclos se manifiesta mediante la generación de radicales libres durante su metabolismo a través de un proceso de nitroreducción,

específicamente en un ciclo redox monoelectrónico. El modo de acción sugerido procede a través de una nitroreducción intracelular seguida por el ciclo redox dando lugar a una especie reactiva oxigenada (ROS) formando especies activas intermediarias que pueden causar daño directamente reaccionando con varias macromoléculas biológicas, o indirectamente por generación de radicales hidroxilo altamente activos resultando en la alteración de estructuras y funciones de macromoléculas titulares, como son lípidos y proteínas llevando finalmente a necrosis celular y carcinogénesis.

Con este método de acción se toma ventaja de la deficiencia de mecanismos defensivos de los tripanosomatidos contra radicales libres en comparación con los métodos propios de defensa de los mamíferos. Los tripanosomatidos no presentan actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa dependientes de selenio, muestran muy baja actividad de superóxido dismutasa, y no se ha informado acerca de la presencia en sus células de antioxidantes naturales como α -tocoferol, β -caroteno o ácido ascórbico. Por consiguiente, son mucho más susceptibles que las células de los mamíferos a estrés oxidativo. (Morello, 1988)^[5]

En una mención previa a los fármacos existentes, estudios de Docampo y Morello^[6,7,8] probaron que Nifurtimox (Figura 4) basaba su actividad antiparasitaria a través de la formación de su correspondiente radical nitro el cual genera especies reactivas de oxígeno resultando en la muerte del parásito. Este radical fue detectado por medio de resonancia de espín electrónica (REE), en un medio con Nifurtimox y en presencia de *Tripanosoma Cruzi*

homogeneizado y NADP-H. En presencia de oxígeno el radical nitro dio lugar a especies tóxicas tales como O_2^- y $H_2O_2^-$.

Las mismas pruebas realizadas en Nifurtimox fueron llevadas a cabo en presencia del derivado de nitroimidazol Benznidazol (Figura 5), que en presencia de *Tripanosoma Cruzi* y NADP-H muestra una débil señal en el espectro REE que corresponde al nitro-anión radical, sin embargo no estimuló la generación de radicales basados en oxígeno como son O_2^- y $H_2O_2^-$. De esta manera se infiere que el efecto antiparasitario de este fármaco no es vía radicales sino que se postula que el Benznidazol reducido se enlaza covalentemente a la enzima provocando la toxicidad. Ambos compuestos, Nifurtimox y Benznidazol, son los únicos fármacos utilizados en este tipo de parasitosis. A pesar de esto su efectividad está ligada solo a la fase aguda de la enfermedad y resultan probablemente inútiles en la fase crónica además de producir indeseados efectos secundarios.

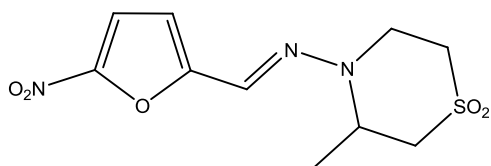


Figura 4. Nifurtimox

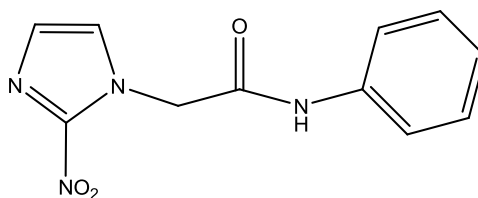


Figura 5. Benznidazol

5- Nitroindazoles

Varios tipos de familias de nitrocompuestos han sido ampliamente estudiadas por ser aptos como antiprotozoarios^[3,9,10,11], sin embargo la familia de 5-Nitroindazoles como potenciales antiprotozoarios no ha sido objeto masivo de estudio.

En este marco, Olea-Azar y col.^[12,20,21,25] estudiaron algunos derivados de 5-Nitroindazoles mediante técnicas de voltametría cíclica y REE (resonancia de espín electrónico) y como resultado se propuso que el mecanismo de reducción para este tipo de compuestos es dependiente de la presencia de hidrógenos lábiles en la estructura de la molécula. En aquel estudio se observaron procesos de autoprotonación sobre el grupo nitro de la estructura, además de su comportamiento sobre un antioxidante natural como es glutatión, indicando si este radical anión nitro ($R-NO_2\cdot^-$) obtenido electroquímicamente es inmediatamente re-oxidado a la especie neutra por la acción del glutatión. Por medio de la técnica de REE se estableció la presencia de un intermediario paramagnético estable producto de la reducción electroquímica del grupo nitro.

En esta memoria de titulo se propone estudiar una variación de la familia mencionada de 5-Nitroindazoles como son las 5-Nitroindazolonas, con una variedad amplia de sustituyentes sobre una base estructural en común, con el objetivo de evaluar su posible actividad antiparasitaria. Este estudio se realizará a partir de voltametría cíclica (VC), para determinar las diferentes propiedades de interés electroquímico y estudiar la reactividad de cada

compuesto con el antioxidante natural glutatión. Posterior a las técnicas electroquímicas se utilizará la espectroscopía de espín electrón (REE) con el fin de detectar la generación de los radicales libres y realizar un análisis estructural del radical generado. Finalmente se efectuará un estudio biológico en células macrófagos para obtener los valores de IC_{50} y poder discriminar entre aquellos que tengan propiedades biológicas adecuadas para luego estudiar en cepas de parásitos.

Hipótesis

Un fármaco ideal tripanocida se podría obtener en base a un mecanismo de acción que involucre la generación de radicales libres, los cuales producirían el daño vía estrés oxidativo. La familias estudiadas en esta tesis tendrían el grupo generador de radicales libres y un sistema aromático que estabiliza el nitro anión radical y que proporciona una lipofilia adecuada para su posible acción.

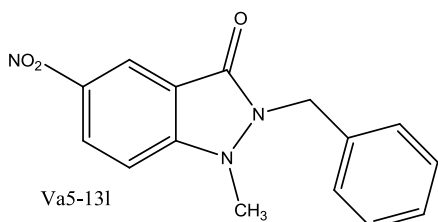
Objetivo general

Evaluar la capacidad generadora de radicales libres de la nueva familia de 5-nitroindazolonas (Fig.6) derivados y su correspondiente mecanismo de reducción.

Objetivos específicos

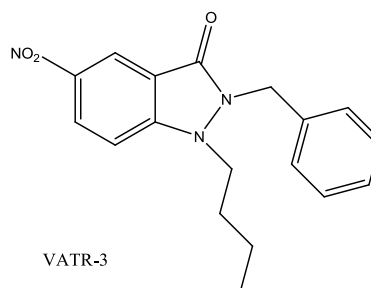
1. Analizar del comportamiento electroquímico de la familia de compuestos estudiados, utilizando la técnica de voltametría cíclica.
2. Evaluar la actividad citotóxica en sistemas in vitro de células murinas mediante técnicas de citotoxicidad.
3. Evaluar la actividad tripanocida en cepas de T. Cruzi y su mecanismo de acción.
4. Análisis espectroscópico a través de REE, y determinación las constantes hiperfinas.

Moléculas en estudio



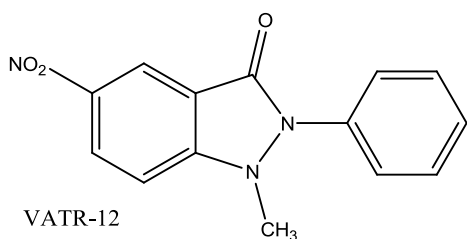
Va5-131

2-bencil-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



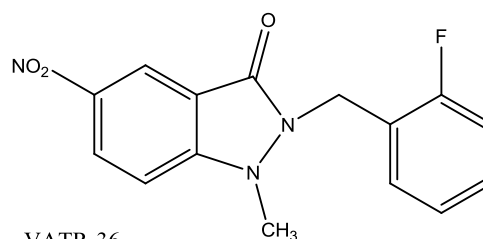
VATR-3

2-bencil-1-butil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



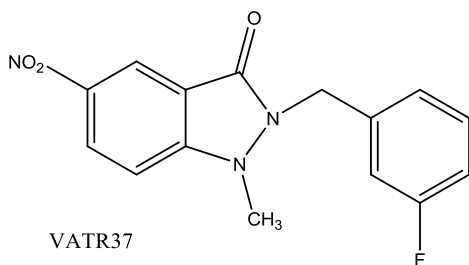
VATR-12

1-metil-5-nitro-2-fenil-1H-indazol-3(2H)-ona



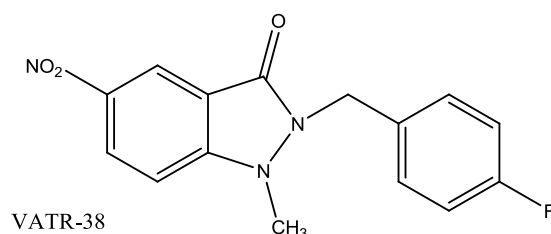
VATR-36

2-(2-fluorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



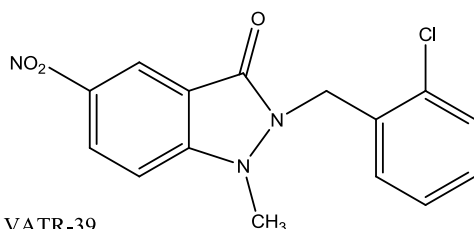
VATR37

2-(3-fluorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



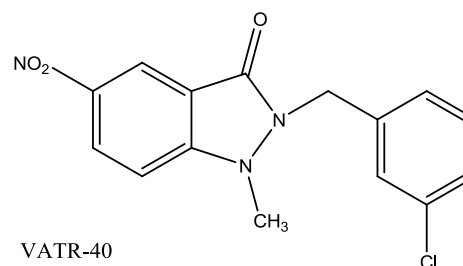
VATR-38

2-(4-fluorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



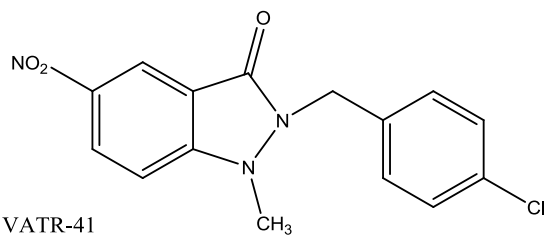
VATR-39

2-(2-clorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



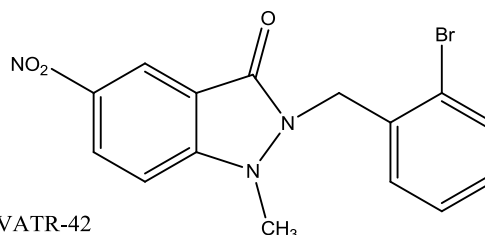
VATR-40

2-(3-clorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



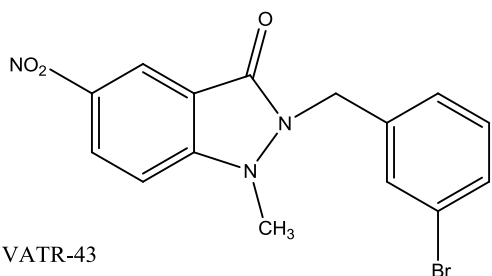
VATR-41

2-(4-clorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



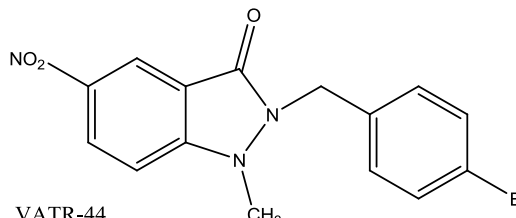
VATR-42

2-(2-bromobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



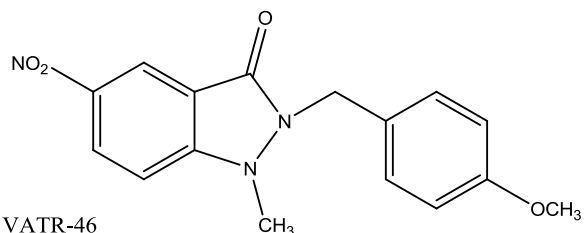
VATR-43

2-(3-bromobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



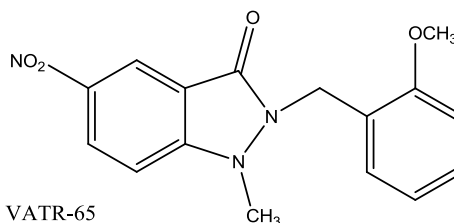
VATR-44

2-(4-bromobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



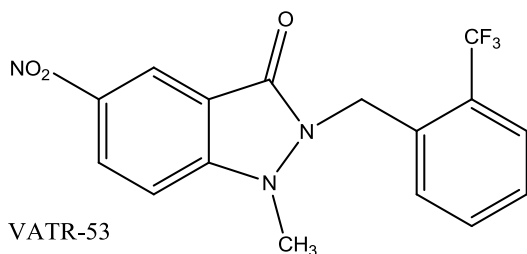
VATR-46

2-(4-metoxibencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



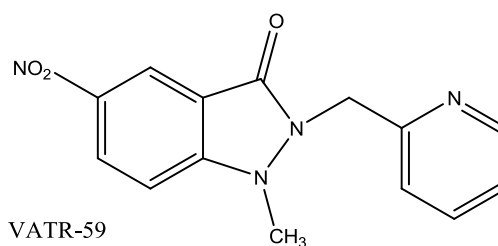
VATR-65

2-(2-metoxibencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona



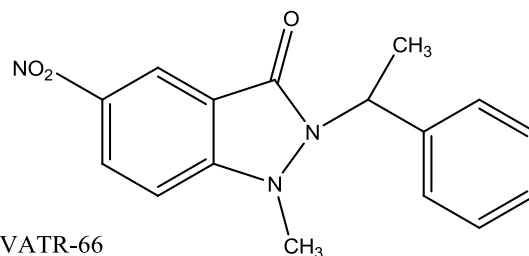
VATR-53

1-metil-5-nitro-2-(2-(trifluorometil)bencil)-1H-indazol-3(2H)-ona



VATR-59

1-metil-5-nitro-2-(2-piridilmetil)-1H-indazol-3(2H)-ona



VATR-66

1-metil-5-nitro-2-(1-feniletil)-1H-indazol-3(2H)-ona

Figura 6. Familia de 5-Nitroindazolonas en estudio

Materiales y equipos

Compuestos 5-Nitroindazolonas (5-NI)

Va5-13L: 2-bencil-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 3: 2-bencil-1-butil-5nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 12: 1-metil-5-nitro-2-fenil-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 36: 2-(2-fluorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 37: 2-(3-fluorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 38: 2-(4-fluorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 39: 2-(2-clorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 40: 2-(3-clorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 41: 2-(4-clorobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 42: 2-(2-bromobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 43: 2-(3-bromobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 44: 2-(4-bromobencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 46: 2-(4-metoxibencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 65: 2-(2-metoxibencil)-1-metil-5-nitro-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 53: 1-metil-5-nitro-2-(2-(trifluorometil)bencil) -1H-indazol -3(2H)-ona

VATR 59: 1-metil-5-nitro-2-(2-piridilmetil)-1H-indazol-3(2H)-ona

VATR 66: 1-metil-5-nitro-2-(1-feniletil)-1H-indazol-3(2H)-ona

Los compuestos fueron sintetizados por el Dr. Vicente Aran del Instituto de Química Física del CSIC Madrid

Materiales y equipos utilizados en la caracterización electroquímica

Equipos y materiales

- Equipo Metrohm 693 VA instrument con un convertidor 694 VA Stand Convertor y un procesador 693 VA Processor.
- Electrodo de trabajo: gota colgante de mercurio.
- Electrodo de referencia: calomelano saturado.
- Electrodo auxiliar: electrodo de platino.
- Micropipetas Labopette, Hirshmann Laborgerate de 20 μL , 100 μL y 1000 μL .
- Celda electrolítica.

Solventes y reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) de grado espectroscópico 99,9%, Merck.
- Perclorato de tetrabutilamonio (TPBA), Sigma.
- Glutación reducido (γ -Glu-Cys-Gly; GSH) 98-100%, Sigma.
- Nitrógeno extra puro (99,8%), AGA S.A.
- Agua desionizada Milli-Q.

Materiales y equipos utilizados en la espectroscopia de espín electrón.

Equipos y materiales

- Equipo de banda X (9,7 GHz) Bruker ECS 106 con una cavidad rectangular y 50 kHz de campo de modulación.
- Celda electroquímica compuesta por dos electrodos conectado a un potenciómetro.
- Pipetas Pasteur.

Solventes y reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) de grado espectroscópico 99,9% Merck.
- Perclorato de tetrabutilamonio (TPBA), Sigma.

Materiales y equipos utilizados en ensayos de actividad biológica.

Equipos y materiales

- Estufa de cultivo fijada a 37°C y 5% de CO₂.
- Trampa de vacío, espátulas y puntas estériles.
- Campana de flujo laminar estéril.
- Espectrofotómetro de placas Oasys Expert Plus.
- Micropipetas de 20 µL, 100µL y 1000µL.
- Placas de Elisa y cajas de cultivo.
- Cámara de Neubauer.
- Tubos de ensayo, Pipetas Pasteur, porta y cubre objetos.
- Microscopio invertido.

Solventes y reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) de grado espectroscópico 99,9%, Merck.
- Células RAW 264.7
- Tripomastigotes de *Trypanosoma Cruzi* (Clon Dm28).
- Medio de cultivo RPMI 1640
- Suero fetal bovino.
- Solución de Penicilina/Estreptomicina.
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltriazolio (MTT)
- Buffer fosfato salino (PBS pH 7,2) estéril.

Metodología

Voltametría cíclica ^[13]

La voltametría cíclica es una técnica electroquímica, de tipo transitorio, utilizada para obtener información sobre el mecanismo de las reacciones químicas asociadas a un proceso de transferencia electrónica. Se basa en el barrido lineal de potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una dirección finalizando en un potencial fijado llamado potencial de switching, para después realizar un barrido en dirección contraria al inicial. Así un potenciostato mide la corriente resultante en función del potencial aplicado, registrando finalmente el voltamograma que corresponde a la curva I-E. De este voltamograma se desprenden los parámetros característicos como son la

corriente de pico catódica I_{pc} , la corriente de pico anódica I_{pa} , el potencial de pico catódico E_{pc} y el potencial de pico anódico E_{pa} .

Un proceso de transferencia electrónica reversible es caracterizado porque el valor de la intensidad de pico anódica es igual al catódico ($I_{pa}=I_{pc}$) y por la obtención de los valores de E_{pc} y E_{pa} constantes en todo el rango de velocidades de barrido de potencial. En este caso el potencial de reducción normal es la semisuma de E_{pc} y E_{pa} ($E_{1/2}$). Si se obtiene una onda totalmente reversible indica que no hay reacciones asociadas y por lo tanto, se genera un radical estable.

La técnica de voltametría cíclica es útil, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo y representa una herramienta en el estudio de mecanismos electroquímicos. Diferencia si la reacción de transferencia de electrones es reversible o irreversible mediante criterios de diagnósticos.

En los estudios electroquímicos, se utilizó para la obtención de los voltamogramas de los compuestos estudiados, soluciones de concentración 1mM en solvente DMSO. Se realizaron barridos de potencial entre 0 y -2000 mV a distintas velocidades de barridos, entre 100 mV/s y 2000 mV/s y en ocasiones hasta 5000 mV/s

Además mediante la técnica de voltametría cíclica es posible realizar el estudio de reactividad de los radicales nitro aniónicos con un antioxidante natural como es el glutatión (GSH), estudiando el efecto de la concentración de GSH sobre la razón de corrientes I_{pa}/I_{pc} realizando barridos a 2000 mVs^{-1} .

Espectroscopía de espín electrón

En los estudios realizados se obtuvieron espectros a través de un equipo de banda X (9,7GHz) Bruker ECS 106 el cual posee una cavidad rectangular y un campo de modulación de 50kHz. La generación de nitro-anión radicales fue realizada in situ por medio de una reducción electroquímica en la mismas condiciones descritas en el apartado de voltametría cíclica, esto es: atmósfera de nitrógeno, solvente DMSO y PTBA como electrolito soporte y una temperatura de 25°C. Se aplicó el potencial correspondiente al pico catódico encontrado para cada compuesto en las medidas de voltamperometría cíclica y se obtuvo el espectro del radical formado in situ.

Ensayos de actividad biológica

Los ensayos de citotoxicidad aguda tienen por objetivo encontrar la concentración de compuesto que reduce una población de células conocida con certeza hasta un 50%, a este valor se le conoce como IC₅₀, estas medidas se realizaron en células de mamíferos a través de la técnica del MTT. Este método se basa en la reducción bioquímica de una sal de tetrazolio (MTT) a formazán, un cristal de color púrpura que presenta su máxima absorbancia a 570 nm. Dicha reducción es catalizada por una enzima reductasa mitocondrial dependiente de NADPH, así la reducción solo puede realizarse en células vivas siendo una medida confiable de la cantidad de células viables. En cada ensayo se sembraron 50.000 células macrófagos en cada pocillo de una placa de ELISA, luego de 2 horas de espera mientras se incubaba a 37°C, se agregan distintas concentraciones de droga. Luego de 24 horas se recambia por medio

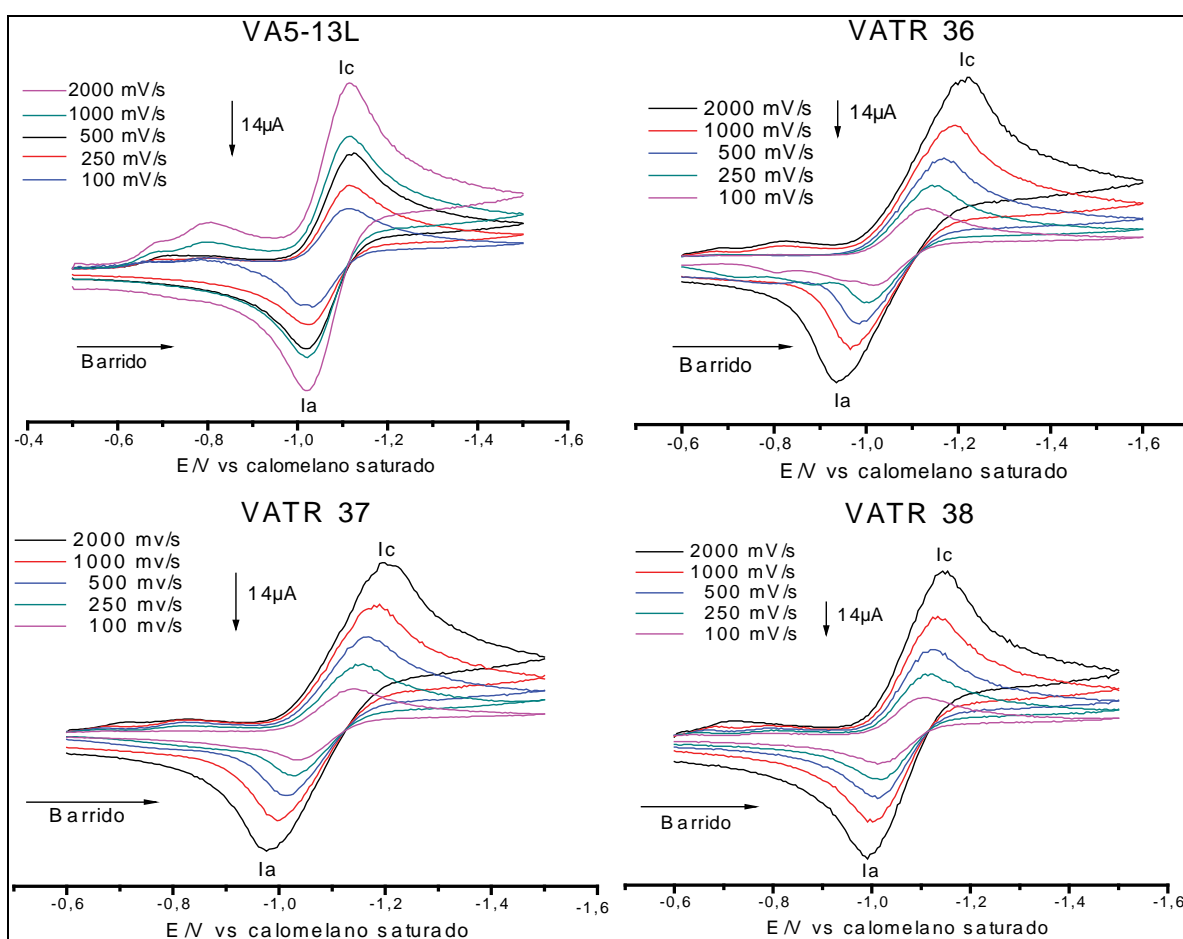
RPMI sin rojo fenol y sin suero, a cada pocillo se añadió 10 μ L de MTT 5mg/mL, en presencia de fenazina metosulfato en una concentración de 0,22 mg/mL (cumple el rol de transportador de electrones). Luego de los pasos anteriores se deja incubar nuevamente por 4 horas para finalmente agregar SDS al 10% en 0,1 N de HCl como solubilizante, deteniendo la reacción y solubilizando los cristales coloreados para poder realizar la cuantificación, finalmente se incuba por toda la noche a 37°C y se mide a 570 nm en un espectrofotómetro para placas.

Resultados y discusión

1. Estudio electroquímico

1.1 Estudio de velocidad de barrido.

El comportamiento electroquímico de los compuestos en estudio fue determinado a través de la técnica de voltametría cíclica, para esto se realizaron barridos de potencial a diferentes velocidades de barrido obteniéndose voltamogramas de la siguiente forma.



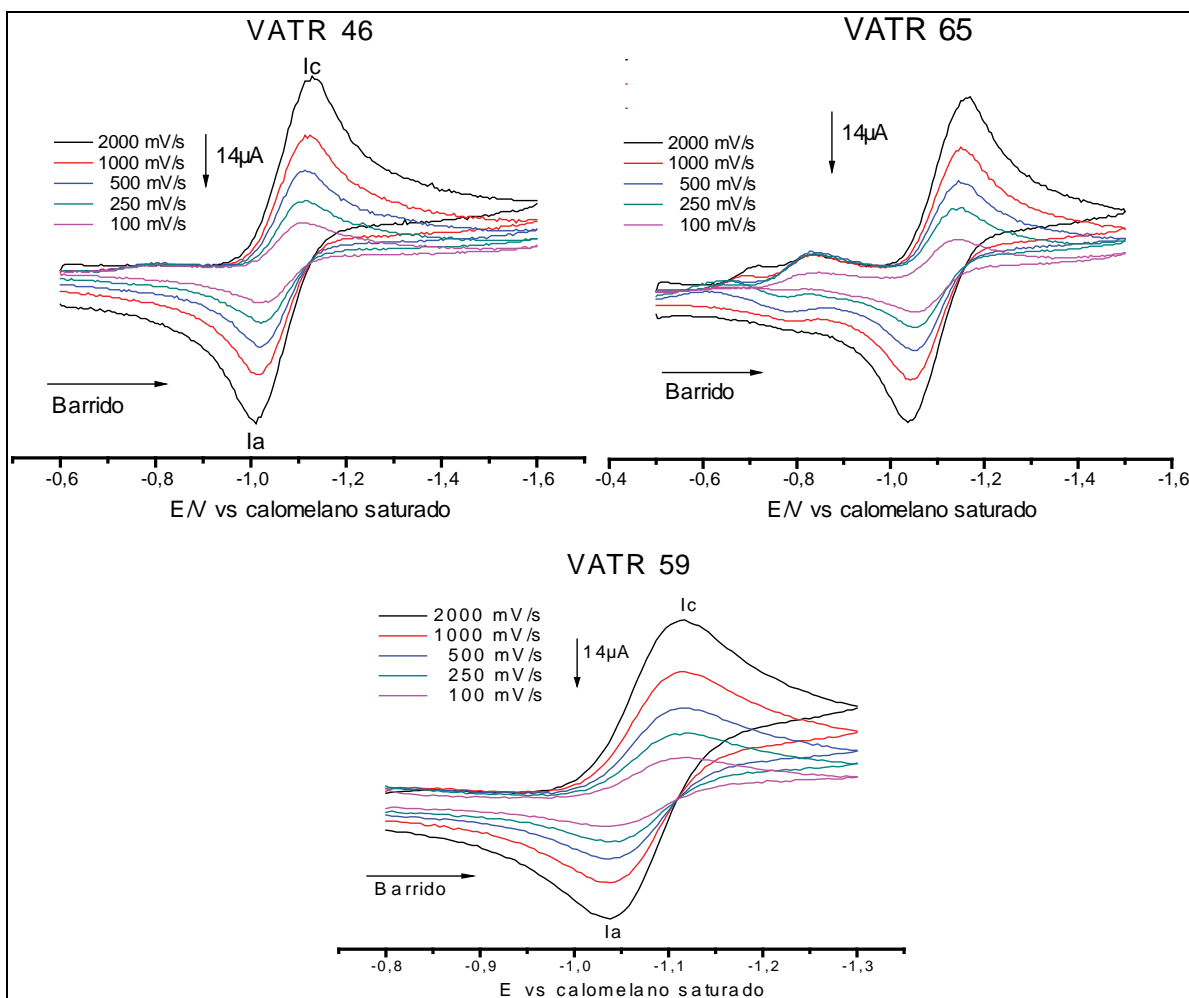


Figura 7. Voltamogramas para los compuesto VA5-13L, VATR 36, VATR 37, VATR 38, VATR 46, VATR 65, VATR 59 y VATR 66. Se aprecia en todos ellos una transferencia monoeléctrica, aparentemente reversible, lo que aseguraría la estabilidad del radical formado.

En la figura 7, se muestran los voltamogramas correspondientes a los compuestos VA5-13L, representando la base estructural de la serie de compuestos, VATR 36, VATR 37 y VATR 38 como ejemplo de los derivados halogenados incluidos en la serie, VATR 46 y VATR 65 dada su sustitución por derivados metoxilicos y VATR 59 por poseer un grupo piridil. Se observa una transferencia monoeléctrica de apariencia reversible en el rango de potencial, mostrando una única cupla en la zona acotada de potencial, involucrando solo una etapa electroquímica, sin embargo la reversibilidad

electroquímica debe ser comprobada con los criterios de reversibilidad en un electrodo estacionario (Nicholson y Shain, 1964)^[14]. Para asegurar una correcta aplicación de estos criterios es necesario asegurar el transporte difusional del analito sobre el electrodo de trabajo.

La figura 7 muestra la dependencia de la corriente de pico catódica con la velocidad de barrido para algunos de los compuestos de la serie como son VA5-13L, VATR 36, VATR 46 y VATR 59. La pendiente de esta recta fue cercana a 0,5 lo que demostró que el proceso de transferencia monoelectrónica reversible es de tipo difusivo como se muestra en la figura 8.

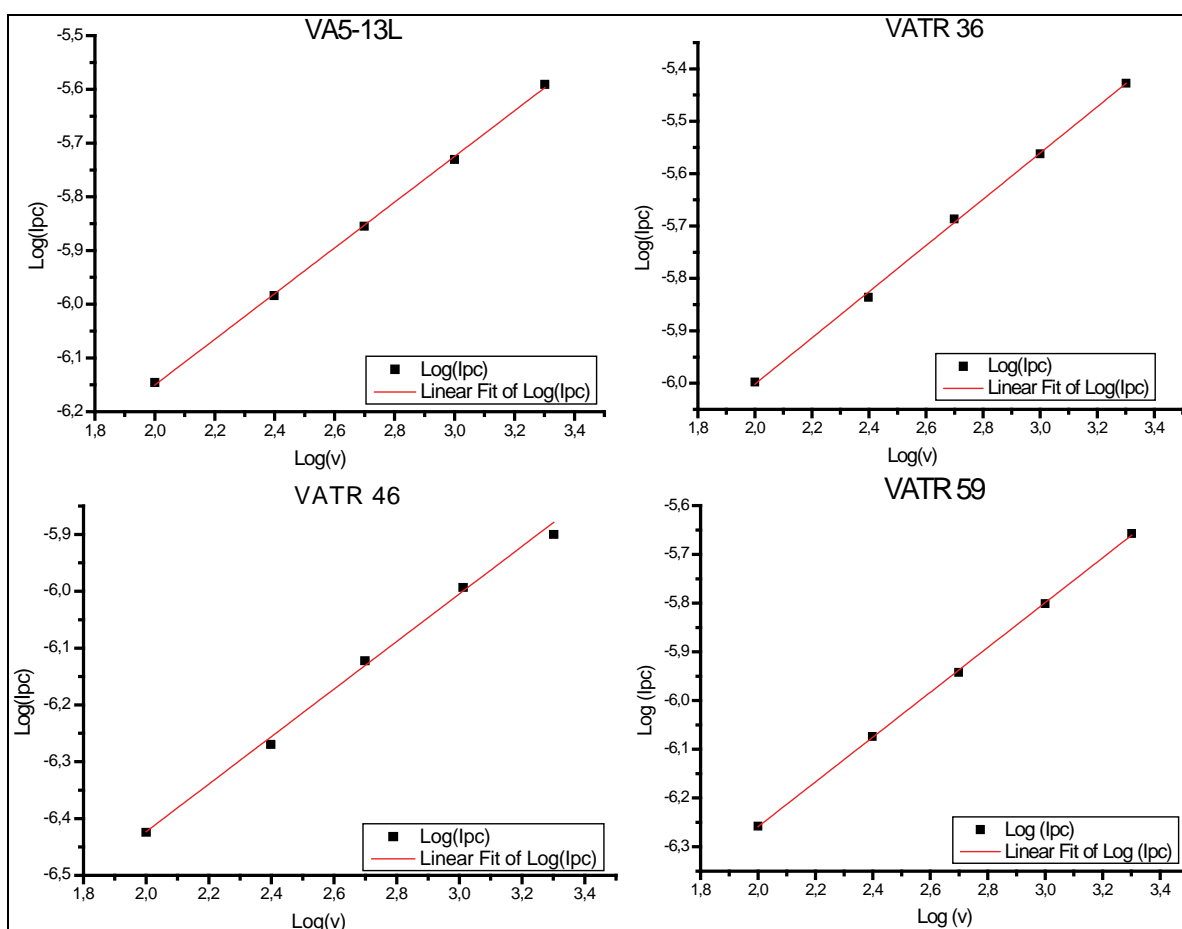


Figura 8. Dependencia lineal de $\log(I_{pc})$ versus $\log(v)$ con pendiente cercana a 0,5 demuestra un proceso de transferencia difusivo.

Luego los parámetros de reversibilidad son:

$$\Delta E_p = 60mV \quad \frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1$$

Para determinar la relación entre $\frac{I_{pa}}{I_{pc}}$ es necesario obtener el valor absoluto de las corrientes de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| = \frac{I_{pa_0}}{I_{pc_0}} + \frac{(0,485)(I_p \lambda_0)}{I_{pc_0}} + 0,086$$

En la figura 9 se observa la tendencia de crecimiento asintótico a 1,0 de la razón de corriente I_{pa}/I_{pc} versus la velocidad de barrido, por lo tanto se cumple el primer requisito, sin embargo y como se puede ver en la tabla 1, el valor de ΔE_p no corresponde a 60 mV, sino que es mayor lo que implica que la reacción es de tipo cuasi-reversible.

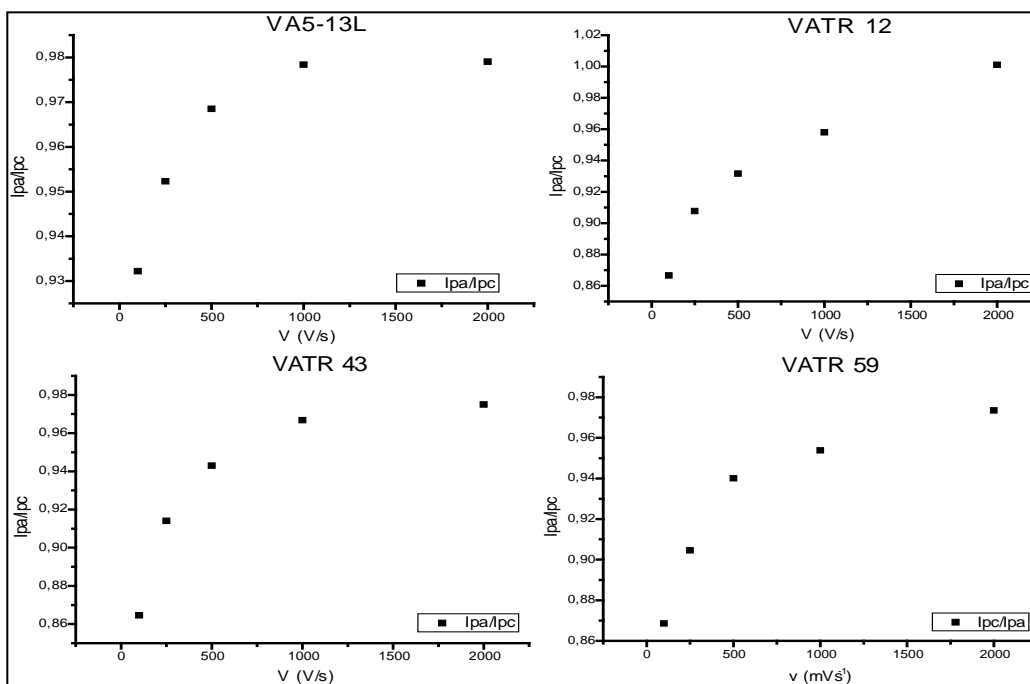


Figura 9. Razón de corrientes versus la velocidad de barrido, existe un aumento asintótico hacia 1,0 a medida que la velocidad de barrido aumenta.

De acuerdo a los voltamogramas se pueden resumir los siguientes datos:

Compuesto	Epc /V	Epa /V	ΔE_p /V	E1/2 /V	Pendiente	Ipa/Ipc
VA513L	-1,114	-1,022	0,093	-1,068	0,485	0,94
VATR3	-1,134	-1,027	0,108	-1,081	0,462	0,98
VATR12	-1,124	-0,981	0,143	-1,053	0,452	1,00
VATR36	-1,219	-0,935	0,284	-1,077	0,441	0,99
VATR37	-1,199	-0,976	0,223	-1,088	0,467	1,00
VATR38	-1,144	-0,991	0,152	-1,068	0,473	1,00
VATR39	-1,099	-1,022	0,077	-1,060	0,449	0,96
VATR40	-1,170	-0,955	0,214	-1,063	0,462	0,93
VATR41	-1,205	-0,991	0,214	-1,098	0,458	0,89
VATR42	-1,165	-0,956	0,209	-1,060	0,456	1,00
VATR43	-1,134	-0,986	0,147	-1,060	0,443	0,97
VATR44	-1,200	-0,986	0,193	-1,083	0,482	0,94
VATR46	-1,154	-1,026	0,128	-1,090	0,460	0,91
VATR65	-1,160	-1,037	0,123	-1,098	0,462	0,96
VATR53	-1,371	-0,819	0,552	-1,095	0,466	0,96
VATR59	-1,117	-1,038	0,079	-1,078	0,460	0,97
VATR66	-1,124	-1,017	0,108	-1,071	0,468	0,91
Nifurtimox	-0,91	-0,85	-0,06	-0,880	0,476	1.01

Tabla 1. Resumen de los datos electroquímicos recogidos en los ensayos de voltametría cíclica, se muestran los resultados correspondientes a una velocidad de barrido de 2000 mVs^{-1} . Potenciales versus calomelano saturado.

En la tabla 1 se aprecia que la familia de compuestos tiene potenciales de reducción catódicos cercanos entre sí, así VATR 53 posee el menor valor de -1,371 V y VATR 39 con el mayor de -1,099 V, todos son valores menores que Nifurtimox cuyo potencial de reducción según la bibliografía ^[11] es -0,91 V. Esto representa que para los compuestos estudiados existe una mayor dificultad

para ser reducidos por el sistema comparados con la droga mencionada anteriormente y que es la utilizada clínicamente. Dentro de la familia de 5-NI estudiadas en esta tesis existen 9 compuestos sustituidos por un bencilo que a su vez esta sustituido por un halógeno en distintas posiciones. Se trató de analizar cómo pueden afectar las distintas variantes sobre las propiedades electroquímicas del compuesto. Los halógenos mencionados son F, Cl y Br, en la tabla desde VATR 36 hasta VATR 44 respectivamente y en el orden orto, meta y para. Sin embargo no se encontró algún patrón entre sus potenciales de reducción catódicos que permita distinguirlo de los demás, salvo VATR 39, ya mencionado como el que posee un potencial más cercano a Nifurtimox. Para explicar tal indiferenciación electroquímica de la familia de compuestos, a pesar de las variantes estructurales que posee, se presume que la especie radicalaria se localiza fundamentalmente en el anillo indazólico, sin involucrar en el sistema de deslocalización a las variantes estructurales, dicho supuesto se comprueba más adelante en el apartado de REE

1.2 Estudio de la reactividad de los radicales nitro aniónicos producidos electroquímicamente a partir de 5-nitroindazoles frente a GSH.

Se estudió la reactividad de los anión radical nitro formados por la familia de compuestos en cuestión frente a un antioxidante natural como GSH, a través del efecto sobre la razón de corrientes I_{pa}/I_{pc} ya medida por medio de voltametría cíclica. La figura 10 muestra las cuplas del 5-NI VATR 37 en medio aprótico (DMSO) en presencia de cantidades crecientes de GSH (una solución de GSH 0,1 M en buffer fosfato pH 7,4). Ilustrando el proceso de transferencia de un electrón y como éste se ve claramente afectado en

cantidades crecientes de GSH hasta alcanzar la completa desaparición del pico anódico cuando se alcanza una proporción de 5-NI:GSH= 1:8, esta proporción en términos de concentración en la celda es 1mM de 5-NI: 8mM de GSH.

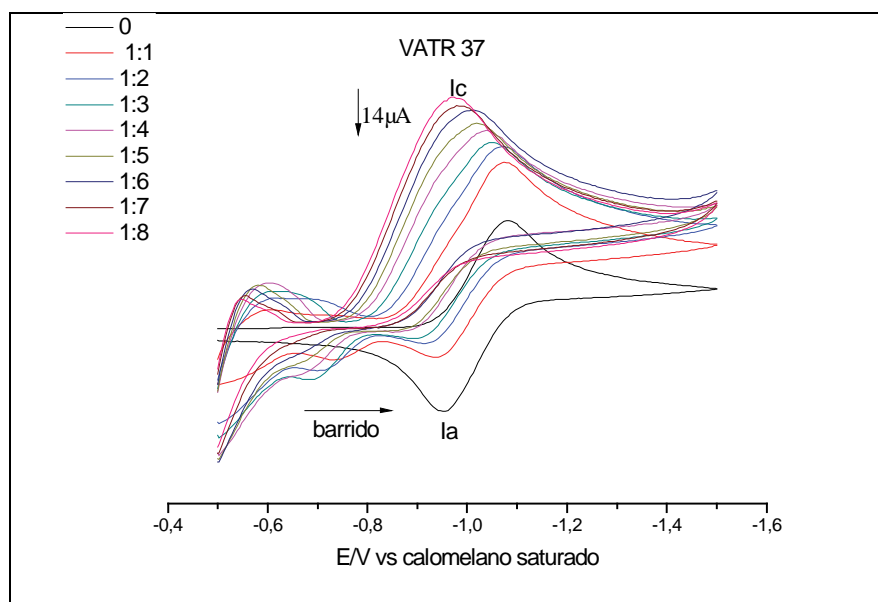


Figura 10. Voltamograma cíclico del derivado VATR 37 (1mM) en medio aprotico (DMSO + 0,1 de PTBA) con cantidades crecientes de GSH 0,1 M (en buffer fosfato pH 7.4), velocidad de barrido de 1 Vs^{-1} .

El desaparecimiento del pico anódico y el aumento de intensidad del pico catódico, son resultados de que el radical nitroaniónico $\text{RNO}_2\bullet^-$ electroquímicamente obtenido es inmediatamente reoxidado al compuesto original por acción del GSH. Este efecto esencialmente catalítico y los cambios totales en los voltamogramas fueron observados al pasar la octava adición de GSH.

El esquema en la figura 11 explica la actividad catalítica del derivado de tiol, favoreciendo dos etapas correspondientes a equilibrios ácido-base, reaccionando con intermediarios generados en el proceso de reducción del

grupo nitro, obteniendo finalmente el nitroso derivado el cual no se observa en la zona de potenciales.

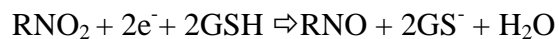
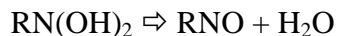
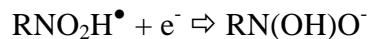
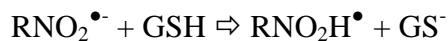
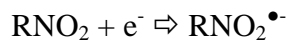


Figura 11. Mecanismo propuesto para la reducción de NI en medio aprótico en presencia de GSH

A partir del aumento de la intensidad del pico catódico se puede establecer una proporción que da cuenta de la capacidad inhibitoria del GSH sobre cada uno de los derivados de 5-nitroindazolonas, es decir, se midió el aumento de la intensidad de pico catódico y en forma de porcentaje se relacionó en términos de capacidad inhibitoria. Estos resultados se resumen en la siguiente tabla.

Compuesto	Ipc GSH (μA)	Ipc (μA)	% Inhibición
VA5-13L	-6,61	-2,92	126,79
VATR3	-3,65	-2,68	36,19
VATR12	-7,26	-3,36	116,07
VATR36	-7,35	-3,25	126,15
VATR37	-7,29	-3,41	113,78
VATR38	-6,98	-3,06	128,10
VATR39	-6,45	-2,61	147,13
VATR40	-6,91	-2,85	142,46
VATR41	-3,42	-2,66	28,57
VATR42	-4,95	-2,62	88,93
VATR43	-6,75	-3,08	119,16
VATR44	-7,58	-3,41	122,29
VATR46	-6,96	-3,04	128,95
VATR65	-7,67	-3,38	126,92
VATR53	-7,13	-3,27	118,04
VATR59	-7,34	-3,06	139,87
VATR66	-7,10	-3,20	121,88

Tabla 2. Capacidad inhibitoria del GSH sobre los derivados de 5-NI estudiados.

La mayoría de los compuestos se ven fuertemente inhibidos en presencia de GSH superando el 100% de inhibición, esto ocurre dado que la inhibición del pico anódico es medida indirectamente a partir del aumento del pico catódico y este último puede seguir aumentado pese a la completa desaparición del pico catódico. Pese a las fuertes inhibiciones los compuestos VATR 3 y VATR 41 son débilmente inhibidos hasta una proporción 1:8 5-NI/GSH. En general se encuentra poca diferencia entre la serie de compuestos y se postula la misma razón enunciada en el estudio de velocidad de barrido, es decir, la especie radicalaria se localiza en el anillo indazólico y de esta manera las variaciones estructurales no influyen en el mecanismo de reducción en presencia de GSH

propuesto, puesto que dichas diferencias corresponden a modificaciones estructurales remotas.

Para la mayoría de la serie de compuestos la ausencia de inhibición se evidenció hasta la cuarta o quinta vez que se agregó GSH, es decir luego de agregar GSH hasta una concentración de 5mM no aumento el pico catódico, lo que indica que aún con un mayor exceso de GSH no es posible causar mayor inhibición de la informada.

2. Espectroscopía de espín electrón

Se procedió a realizar un estudio espectroscópico a través de REE, ya que es una herramienta ampliamente aceptada como poderosa técnica para detectar y caracterizar directamente radicales libres. Además esta técnica proporciona una medida de la distribución de densidad de espín en la especie radicalaria. En la práctica los aniones radicales fueron generados en las mismas condiciones electroquímicas utilizadas en voltametría cíclica, aplicando el potencial de pico catódico de cada compuesto, mientras que las condiciones del espectrómetro fueron: frecuencia de microonda 9,75 GHz, poder de microonda 20mW, modulación de amplitud 0,98G, receiver gain 30db.

Dada la similitud estructural de la familia de compuestos estudiados no existieron diferencias entre los espectros REE, todos caracterizados por intensidades similares y un número de líneas de 28 que de acuerdo al patrón hiperfino descrito en la tabla 3, el ancho de línea del espectro no permite apreciar el número máximo de líneas debido al solapamiento de estas. En estas

condiciones se estudio el espectro más representativo de la familia obtenido, correspondiente a VATR 3.

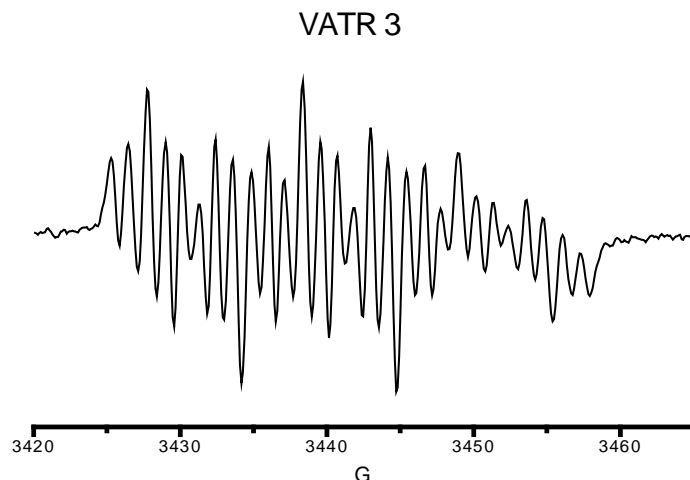


Figura 12. Espectro REE de VATR . Toda la familia de 5-NI estudiados presenta un espectro similar, 28 líneas con intensidades similares y resoluciones similares.

Para determinar con mayor precisión las constantes de acoplamiento hiperfino se utilizaron herramientas de simulación, realizando un ajuste polinomial y obteniendo un espectro simulado mediante el cual se pueden medir las constantes de acoplamiento. La condición de este análisis es que la simulación sea representativa del espectro original.

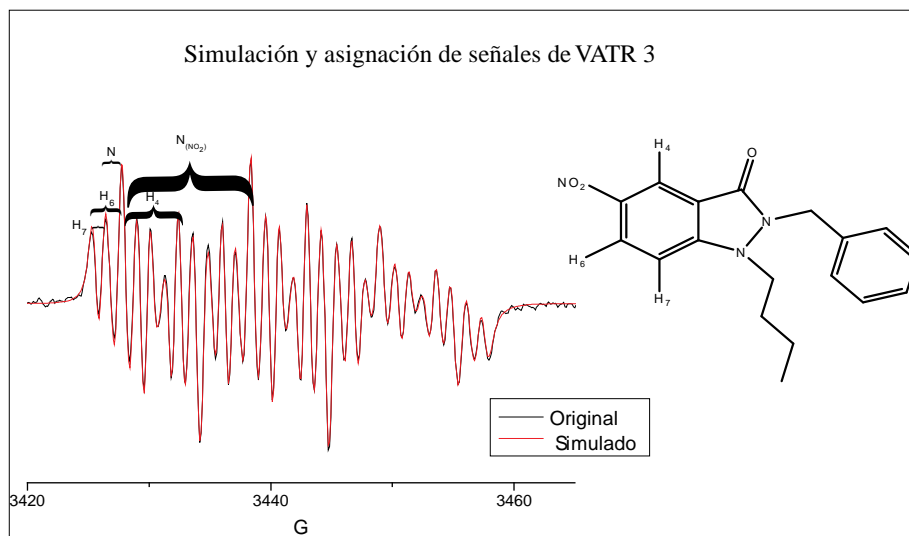


Figura 13. Simulación y asignación de señales. En la Figura se encuentra el espectro original y el simulado superpuesto, además se describe la posición de las señales asignadas.

Puesto que los datos simulados poseen un ajuste confiable con un valor de $R=0,9951$, se pueden obtener de este las constantes de acoplamiento hiperfino correspondientes para VATR 3, estas constantes de acoplamiento son comunes para todos los compuestos, con mínimas desviaciones y describen en la siguiente tabla.

Átomo	N (NO ₂)	N	H ₄	H ₆	H ₇
Señal	10,60	1,37	4,58	2,40	1,01

Tabla 3. Asignación de las señales obtenidas en el espectro REE, comunes para todos los compuestos estudiados.

Los valores de la tabla 3 y la asignación de señales realizada en la figura 13 permiten corroborar la idea postulada en el estudio electroquímico, la especie radicalaria generada tiene su centro activo ubicado en la región del anillo indazólico y con una fuerte presencia en el grupo nitro.

3. Mediciones biológicas

El estudio biológico realizado en esta tesis tiene por finalidad evaluar la toxicidad de los derivados de 5-NI en medio celular como en parásitos aislados de T.Cruzi. Tal evaluación de capacidad farmacológica es determinada por diferencia de toxicidad para parásitos como para células, idealmente una misma concentración de droga debe ser altamente tóxica para la cepa de parásito e inocua para células. Una medida utilizada para evaluar este comportamiento es el IC₅₀ que corresponde a la mitad del máximo de concentración de inhibición.

3.1 Citotoxicidad en macrófagos RAW.

Para determinar el IC_{50} en un modelo mamífero adecuado se utilizaron cultivos celulares de macrófagos RAW 264.7, este cultivo fue realizado en placas de Elisa de 96 pocillos, sembrando una población de 50.000 células por cada uno y agregando concentraciones de compuesto en el intervalo de 0 a 100 μM , para luego, después de 24 horas, evaluar la disminución de población originalmente sembrada. Sin embargo algunos de los compuestos fueron débilmente tóxicos en este intervalo de concentración, razón por la cual para estos casos puntuales se expandió llegando a 300 μM .

Los resultados de este experimento se recogen como la disminución de células viables en función del aumento de concentración de droga agregada. De esta forma aplicando logaritmo de la concentración de droga versus el porcentaje de células viables y considerando el control como el 100% de población, se obtiene el valor de IC_{50} . En la siguiente figura se ejemplifican los gráficos descritos para el compuesto VATR 42.

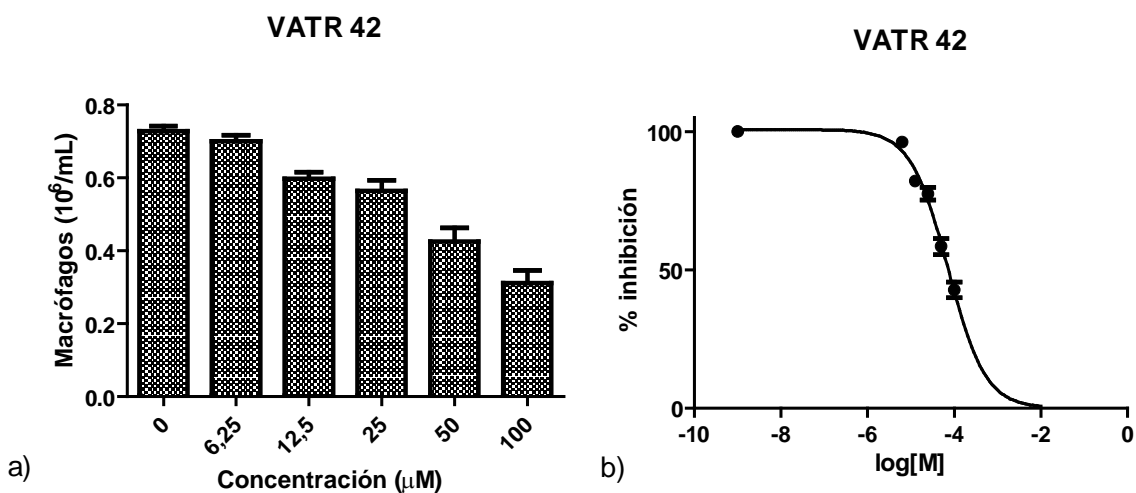


Figura 14. a) Disminución de la cantidad de células viables en respuesta a la concentración de droga agregada. b) Curva descriptiva del logaritmo del inhibidor versus porcentaje de células viables.

Así los valores de IC₅₀ para cada compuesto se presentan la tabla 4.

Compuesto	IC ₅₀ (µM)	Desviación estándar (µM)
VA5 13L	37,8	6,61
VATR 3	45,88	4,92
VATR 12	79,69	15,88
VATR 36	83,85	18,0
VATR 37	95,03	11,7
VATR 38	116,4	28,19
VATR 39	175,5	21,37
VATR 40	222,1	78,15
VATR 41	68,77	3,47
VATR 42	72,39	5,44
VATR 43	213,6	1,40
VATR 44	172,2	11,15
VATR 46	225,6	10,65
VATR 65	36,39	10,48
VATR 53	165,7	6,52
VATR 59	76,51	5,48
VATR 66	200,5	17,12
Nifurtimox	266	32,00
Benznidazol	121	46,3

Tabla 4. Valores de IC₅₀ para los compuestos estudiados células macrófagos RAW 264.7.

Para obtener los valores de Nifurtimox y Benznidazol fue realizada la misma experiencia obteniendo un IC₅₀ de 266 µM, y 121 µM respectivamente. Los valores de IC₅₀ obtenidos son de un amplio rango, lo que se atribuye al efecto de los diferentes sustituyentes que tiene la estructura base de la familia de 5-NI estudiados, a partir de propiedades como la lipofilia de cada compuesto, la capacidad del sistema celular para incorporar los compuestos o la metabolización in vivo. Es así como los valores más altos y en consecuencia

menos tóxicos para el sistema fueron VATR 40, VATR 43, VATR 46 y VATR 66, sin embargo VATR 40 y VATR 66 presentaron cristalizaciones en el medio de cultivo utilizado, por lo que su medición es imprecisa. Dentro de la serie de halogenados resaltan los valores de los derivados de Br, sus posiciones meta y para destacan por tener altos valores obtenidos con precisión sin las dificultades mencionadas, destacando VATR 43, Cl en posición meta, con un alto valor y baja desviación.

*3.2 Toxicidad en *Trypanosoma Cruzi**

Debido a la variedad de valores de IC_{50} obtenidos en macrófagos y a la cantidad de compuestos fue menester realizar una etapa exploratoria para evaluar aquellos compuestos que tienen un índice de toxicidad mayor y apartar del grupo a aquellos cuya actividad tripanocida es muy débil, para efectuar esta selección se realizaron experimentos similares a los de macrófagos, pero a una concentración única, esta fue 50 μM , seleccionada a partir de la comparación con macrófagos y teniendo en cuenta la toxicidad de Nifurtimox en este sistema (22,79 μM). Los resultados de este experimento se presentan como la población remanente tras 24 horas de incubación de los parásitos en presencia de los compuestos con presumible actividad tripanocida, a continuación en la tabla 5 se exhiben los resultados recogidos.

Compuesto	% Población remanente	Desviación estándar
Control	100,00	7,50
VA5 13L	35,20	2,21
VATR 3	30,27	5,03
VATR 12	64,92	6,40
VATR 36	32,52	2,43
VATR 37	32,88	2,84
VATR 38	37,18	7,80
VATR 39	42,55	3,94
VATR 40	77,88	2,73
VATR 41	41,12	5,21
VATR 42	33,26	2,95
VATR 43	86,64	9,62
VATR 44	83,47	2,12
VATR 46	96,46	8,23
VATR 65	126,89	3,76
VATR 53	37,39	2,62
VATR 59	26,72	12,64
VATR 66	43,05	4,59

Tabla 5. Población remanente luego de 24 horas de incubación de parásitos epimastigotes cepa Dm28 en presencia de la nueva familia de nitroindazolonas estudiados.

A partir de los datos recogidos fue posible omitir del grupo de estudio a los compuestos VATR 12, VATR 40, VATR 43, VATR 44, VATR 46 y VATR 65. Estos tienen un bajo índice de decrecimiento poblacional en el intervalo de 24 horas. El derivado metoxilado VATR 65 presenta un porcentaje mayor al 100 % debido a que tuvo una nula acción sobre la cepa parasitaria y no inhibió el crecimiento en un plazo de 24 horas. VATR 46 es el otro derivado metoxilado de la serie y tuvo una mínima acción inhibitoria. El compuesto VATR 43 es una muestra de lo importante de esta etapa exploratoria, dado que fue

débilmente tóxico tanto para el sistema mamífero como parasitario, por lo que pierde interés como agente tripanocida.

Una vez realizada la etapa exploratoria se realizaron observaciones del crecimiento poblacional de epimastigotes de cepa Dm28 a través del tiempo en presencia de la familia de 5-NI en estudio, utilizando técnicas de turbidimetría mediante la cual se observó el crecimiento poblacional como un aumento en la turbidez del medio de cultivo utilizado. A partir de la experiencia descrita se obtuvieron curvas de crecimiento para cada compuesto estudiado, un ejemplo de estas se muestra en la figura 15 a continuación.

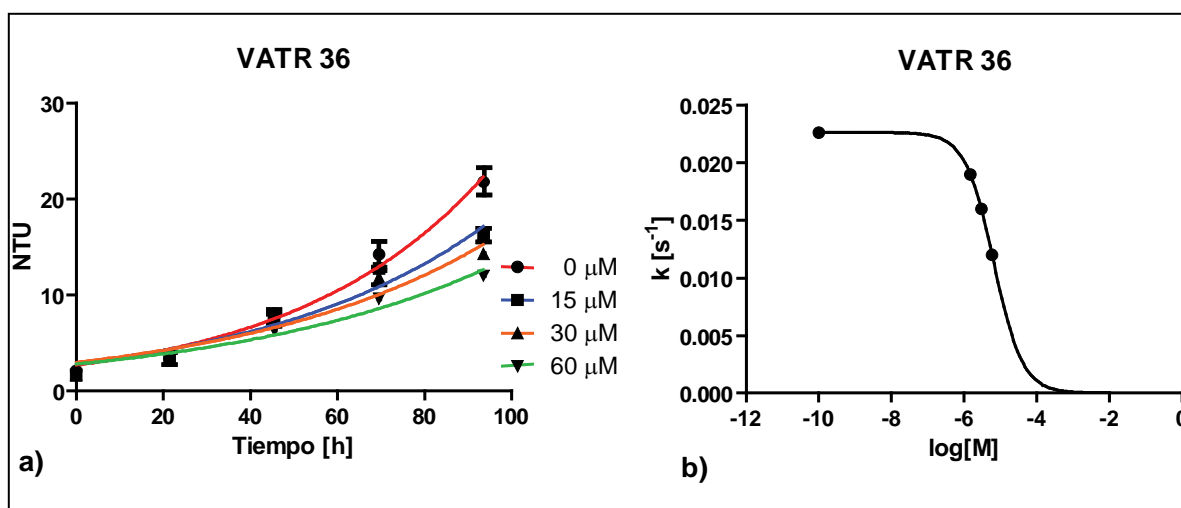


Figura 15. a) Curvas de crecimiento exponencial para cepa Dm28 de epimastigotes a diferentes concentraciones de compuesto. NTU es unidades nefelométricas de turbidez. b) Curva descriptiva del comportamiento de la constante de crecimiento en función de logaritmo de la concentración de inhibidor.

Las curvas de crecimiento obtenidas corresponden a cinéticas de primer orden, a partir de estas se obtuvieron constantes de crecimiento de primer orden, estas constantes son utilizadas para realizar un ajuste similar al utilizado en la obtención del IC_{50} para macrófagos para obtener así un valor de IC_{k50}

indicando el valor de concentración de compuesto que inhibe en un 50% el crecimiento parasitario.

De la familia total de 5-Nitroindazolonas se escogen 7 compuestos, el primero, VA5-13L, dado que es la base de la familia en estudio, el resto de ellos fue escogido tomando en cuenta la fase exploratoria y stock de los compuestos en estudio.

Así es posible resumir los valores de IC₅₀ en la siguiente tabla:

Compuesto	IC ₅₀ [μM]	Desviación estándar
VA5-13L	10,09	3,7
VATR 3	16,22	7,3
VATR 36	32,95	6,8
VATR 37	29,51	9,2
VATR 39	41,7	8,7
VATR 59	52,18	12,3
VATR 66	68,65	11,2
Nifurtimox	22,79	0,34
Benznidazol	38,00	2,25

Tabla 6. Valores de IC₅₀ en epimastigotes de cepa Dm28.

En la tabla 6 es posible ver una variada gama de valores de IC₅₀, desde 10,09 μM a 68,65μM, estos valores son satisfactorios dado que son cercanos a Nifurtimox e incluso inferiores. Sin embargo es necesario reiterar el concepto global de inocuidad para medio celular mamífero y altamente tóxico en epimastigotes de T. Cruzi. Para ilustrar los resultados obtenidos en los estudios biológicos y a modo de resumen se recurre a la figura 16:

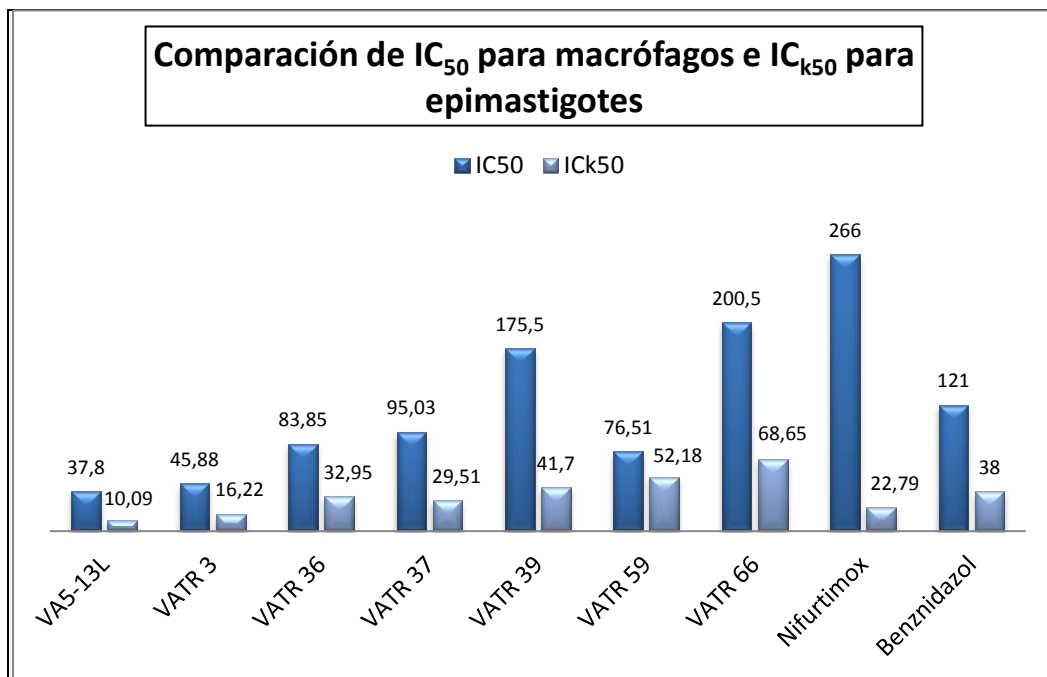


Figura 16. Comparación de los IC₅₀ obtenidos para macrófagos RAW 264.7 y Epimastigotes clon Dm28.

Dentro de la gamma de valores recogidos todos cumplen con el requisito primario de ser mayormente tóxicos en el medio parasitario, esto es lógico puesto que se realizó una etapa exploratoria para discriminar aquellos con mayor actividad. Sin embargo ocurre que aquellos compuestos que tienen baja toxicidad en células mamíferas también son débiles en parásitos. VATR 39 y VATR 66 son ejemplos de lo mencionado, no obstante VATR 39 tiene mejores expectativas para futuros estudios ya que su valor de IC_{K50} corresponde a un 23% del valor de IC₅₀, este porcentaje es el menor de la serie de compuestos, aun así no se acerca a Nifurtimox que presenta un valor inferior al 10%. En una comparación análoga VATR 59 no posee esta diferencia teniendo concentraciones de toxicidad muy similares para células mamíferas y parásitos, es decir que tiene una baja selectividad de acción.

Conclusiones

- La nueva serie de compuestos de 5-NI fue electroquímicamente reducida a través de voltametría cíclica generando aniones radical nitro a potenciales de reducción mayores que la droga utilizada clínicamente, Nifurtimox. Esto indica que tienen una menor capacidad de ser reducidos. De esta manera no existe una diferencia significativa electroquímica a pesar de las diferencias estructurales.
- La serie de compuestos fue fuertemente inhibida por un antioxidante natural como glutatión, regenerando la especie inicial, la máxima inhibición se da desde una proporción 1:4 hasta 1:8 de 5-NI/GSH. La importancia de este resultado radica en la alta cantidad de GSH presente en mamíferos y entrega información vital de la inhibición natural de la serie de compuesto frente un organismo pluricelular más complejo que los estudiados en esta tesis. Además los aniones radical nitro generados actúan como atrapadores de tioles.
- El estudio de espectroscopía de espín electrón mostró espectros similares de 28 líneas para todos los compuestos e iguales patrones hiperfinos. Este efecto es esperable dado que las variaciones estructurales son remotas y no afectan la generación radicalaria, así su propósito reside en modificar las propiedades lipofílicas y de traspaso de membrana de los compuestos. De esta forma se obtienen constantes de acoplamiento generales para toda la familia de compuestos generados.

- Los valores de IC_{50} obtenidos para células murinas tienen un amplio rango, este hecho es atribuible a las diferencias estructurales dado que generan diferencias de solubilidad y lipofilia, es así que varían la metabolización y la capacidad de incorporarse al sistema celular.
- Para evaluar la toxicidad en parásitos del tipo epimastigote clon Dm28 se recurrió primero a una etapa exploratoria, con una concentración fija de $50\mu M$ evaluando el descenso poblacional en un plazo de 24 horas. Este tipo de análisis previo se hace absolutamente necesario para una variedad muy amplia de presuntos compuestos tripanocidas, descartando aquellos compuestos sin interés, permitiendo un mayor enfoque en aquellos con mejores expectativas.
- Al comparar los valores obtenidos en células RAW 264.7 y epimastigotes clon Dm28 se observa que se cumple la condición de ser mayormente tóxico en el medio parasitario, sin embargo esta diferencia no es suficiente en la mayoría de los casos, siendo solo posible mencionar VATR 39 cuyo valor de IC_{K50} corresponde al 23,8% del valor de IC_{50} .

Bibliografía

1. Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease. 2005, World Health Organization (OMS): Buenos Aires, Argentina.
2. Campano Díaz, Sergio. Enfermedades parasitarias producidas por protozoos parte 1. En su: Enfermedades Parasitarias. Universidad de Chile / Universidad Pedro de Valdivia. Chile. 2006. pp. 1-55
3. Silvia N. J. Moreno, R. Docampo, R. P. Mason, W. Leon, A. O. M. Stoppani. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Archives of Biochemistry and Biophysics. Volume 218(2): 585-591. Octubre 1982
4. J. R. Gillette. Medicina. 44: 261, 1981
5. Morello A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. Volume 90(1): 1-12. 1988
6. Roberto Docampo, Silvia N.J. Moreno, Andrés O.M. Stoppani, Wilson Leon, Fernando S. Cruz, Fernando Villalta, Ramiro F.A. Muniz. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochemical Pharmacology. Volume 30(14): 1947-1955. Julio 1981
7. Roberto Docampo, Angela M. Casellas, Eliana D. Madeira, Rita L. Cardoni, Silvia N. J. Moreno, Ronald P. Mason. Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi*-stimulated human neutrophils. FEBS Letters. Volume 155(1): 25-30. Mayo 1983
8. Marta Dubin, Silvia N.J. Moreno, Elba E. Martino, Roberto Docampo, A.O.M. Stoppani. Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. Biochemical Pharmacology. Volume 32(3): 483-487. Febrero 1983
9. H. Cerecetto, B. Messter, S. Onetto, G. Seoane, M. González y P. Zinola. II Farmaco, 47(9): 1207. 1992
10. C. Olea-Azar, Rigol C, Mendizabal F, Otero L, Gambino D, Gonzalez M, Cerecetto H. Spectrochimica Acta part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy (2005) 61, 293

11. C. Olea-Azar, H. Cerecetto, A. Gerpe, M. González, V.J. Arán, C. Rigol, L. Opazo. ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. Spectrochimica Acta Part A. Volume 63: 36-42. 2005
12. C. Olea-Azar, Rigol C, Mendizabal F, Otero L, Gambino D, Gonzalez M, Cerecetto H. Spectrochimica Acta part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy (2005) 61, 2933
13. Guirado López, Gonzalo. Aproximación electroquímica a la reacción de sustitución nucleófila aromática. Determinación del mecanismo de oxidación de los sigma-complejos. Comportamiento electroquímico de compuestos nitroaromáticos. Tesis Doctoral. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002. 245-255
14. R.S. Nicholson and I. Shain. Anal. Chem. Volume 36: 706. 1964
15. R.S. Nicholson and I. Shain. Anal. Chem. Volume 38: 1406. 1966
16. Rodriguez J, C. Olea-Azar, Barriga G, Folch C, Gerpe A, Cerecetto H, Gonzalez M. Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-alcoxy, 3-hidroxy and 3-oxo derivatives. Spectrochimica Acta part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy volume 70: 557-563. 2008
17. J. Rodriguez, A Gerpe, G. Aguirre, U. Kemmerling, O.E. Piro, V.J. Arán, J.D. Maya, C. Olea-Azar, M. González, H. Cerecetto. Study of 5-nitroindazoles' anti-Trypanosoma cruzi mode of action: Electrochemical behaviour and ESR
18. J. Maya, S. Bollo, L. Nuñez-Vergara, J. Squella, Y. Repetto, A. Morello, J. Périé, G. Chauvière. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. Biochemical Pharmacology. Volume 65: 999-1006. 2003
19. J. Rodriguez , C. Olea-Azar, Barriga G, Folch C, Gerpe A, Cerecetto H, Gonzalez M. Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-alcoxy, 3-hidroxy and 3-oxo derivatives. Spectrochimica Acta part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy volume 70: 557-563. 2008
20. J. Rodríguez, Alejandra Gerpe, Gabriela Aguirre, Ulrike Kemmerling, Oscar E. Piro, Vicente J. Arán, Juan Diego Maya, Claudio Olea-Azar, Mercedes González, Hugo Cerecetto Study of 5-nitroindazoles' anti-Trypanosoma cruzi mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies European Journal of Medicinal Chemistry 44 (2009) 1545–1553.
21. C. Folch-Cano, C. Olea-Azar, V.J. Arán, C. Diaz-Urrutia, ESR and Electrochemical Study of 1,2-Disubstituted 5-Nitroindazolin-3-ones and 2- Substituted 3-Alcoxy-5-nitro-2H-indazoles: Reactivity and Free Radical Production Capacity in the

Presence of Biological Systems, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2008), doi:10.1016/j.saa.2009.10.044.

22. Alejandra Gerpe, Gabriela Aguirre, Lucía Boiani, Hugo Cerecetto, Mercedes González, Claudio Olea-Azar, Carolina Rigol, Juan D. Maya, Antonio Morello, Oscar E. Piro, Vicente J. Arán, Amaia Azqueta, Adela López de Ceráin, Antonio Monge, María Antonieta Rojas, Gloria Yaluff. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies/ *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3467–3480.
23. W.H. Koppenol, *Free Radic. Biol. Med. Chem.* 2 (2002) 1187-1213.
24. Marta Dubin, Silvia N.J. Moreno, Elba E. Martino, Roberto Docampo, A.O.M. Stoppani. Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. *Biochemical Pharmacology*. Volume 32(3): 483-487. Febrero 1983.
25. J Rodriguez, V.J. Arán, L. Boiani, C. Olea-Azar, M. Lavaggi, M.Gonzales, H.Cerecetto, J. Maya. New potent 5-Nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma Cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Biorganic & Medicinal Chemistry*. Volume 17(24) 8186-8196. Diciembre 2009.