

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**ESTUDIO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DE
COMPLEJOS METÁLICOS DE ORO QUE INCLUYEN
LIGANTES BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD
TRIPANOCIDA POTENCIAL**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Química y
Memoria para optar al Título de Química por:

JAVIERA ALEJANDRA ÓRDENES ROJAS

DIRECTORES DE TESIS:

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR

DRA. ULRIKE KEMMERLING WEIS

SANTIAGO - CHILE

Julio de 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y la Memoria de Título presentada por la candidata:

JAVIERA ALEJANDRA ÓRDENES ROJAS

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Química y al Título de Química.

Directores de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Dra. Ulrike Kemmerling Weis

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Soledad Bollo Dragnic

Dr. Juan Diego Maya Arango

Dr. Camilo López Alarcón

Este estudio fue financiado por:

Agencia Nacional de Desarrollo e Investigación

Proyecto FONDECYT Regular N°1190340

El programa de Magíster en Química fue financiado por:

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la

Universidad de Chile

Beca Rebaja de Arancel (2020-2022)

Esta tesis se la dedico a mis padres, hermanos, abuela y a mi gran compañero y amigo durante estos 9 años, por apoyarme y ser incondicionales siempre.

"Érase una vez un jarro que se creía de lata, con marcas y con heridas, triste y vacío se hallaba. No se había dado cuenta que era de porcelana, que sus heridas brillaban como medallas ganadas. Descubrió que era hermoso, y se permitió sus sueños, y casi sin darse cuenta pudo contener el cielo."

M. Baquedano

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer por apoyarme en este largo y difícil camino a mi familia; a mi mamá (María Antonia), a mi papá (Carlos), por siempre estar conmigo y entenderme la mayoría de las veces; a mis hermanos (Gabriel y María Paz) por soportar mi mal carácter y mis enojos.

Quiero agradecer en especial a mi amor, José Ortega, por estar conmigo desde el primer año de carrera y apoyarme siempre en todo lo que necesitaba, sin él nada hubiese sido posible y le agradezco con todo mi corazón el estar conmigo siempre. Por darme motivación a no rendirme nunca y luchar por lo que quiero, a pesar de todos los obstáculos que se presenten. Te amo y espero ser parte de tu vida siempre.

Gracias a los abuelos de mi amor José (Gladys y Francisco), por acogerme en su casa siempre y darme palabras de aliento durante todos estos años.

Agradezco a mis Directores de Tesis: a la Dra. Ulrike Kemmerling y en especial al Dr. Claudio Olea, por siempre guiarme y por darme su apoyo durante todo este proceso y por supuesto por dejarme formar parte de sus laboratorios.

Por supuesto quiero agradecer al Dr. Josué Pozo y al Dr. Mauricio Moncada por brindarme su conocimiento y tener siempre una buena disposición y brindarme su tiempo siempre que lo necesite. También, quiero agradecer a la Dra. Ana Liempi, por enseñarme todo lo relacionado con un área desconocida para mí, por su paciencia, su tiempo y su buena disposición.

Por otro lado, quiero agradecer a la Dra. Lucía Otero y su grupo de investigación: Desarrollo de Potenciales Fármacos Inorgánicos, de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Uruguay, por brindarme su orientación y su ayuda en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Germán Barriga y su estudiante Paola Risco, del Laboratorio MACEDONIA del Departamento de Química de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación,

gracias por su apoyo con los cálculos computacionales realizados, su buena onda y disposición en resolver mis dudas acerca del tema.

Al Dr. Esteban Rodríguez, por proporcionar los compuestos estudiados.

A la comisión evaluadora, por sus orientaciones y correcciones en este trabajo.

Y a todos los que fueron parte de este largo proceso, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES	10
RESUMEN	15
SUMMARY	17
INTRODUCCIÓN	19
Enfermedad de Chagas	19
Enfermedad de Chagas en Chile	25
Tratamiento farmacológico de la Enfermedad de Chagas	28
Química Inorgánica Medicinal	31
Ligante tiosemicarbazona	34
Complejos de coordinación con ligante tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído	36
Actividad farmacológica de compuestos de Oro	37
HIPÓTESIS	43
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
METODOLOGÍAS	45

Caracterización electroquímica mediante Voltametría Cíclica	45
Espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico	47
Lipofilia	48
I. Determinación del coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{ow})	49
II. Determinación de la lipofilia mediante cromatografía en capa fina (TLC)	51
Citotoxicidad sobre tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> y células de mamífero VERO®	52
I. Citotoxicidad en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa Dm28	53
II. Citotoxicidad en célula de mamífero sana (VERO®)	54
Determinación de especies radicalarias intraparasitarias mediante espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico a través de <i>Spin Trapping</i>	54
Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa Dm28	56
RESULTADOS Y DISCUSIONES	58
Caracterización electroquímica mediante Voltametría Cíclica	58
Caracterización mediante Resonancia de Espín Electrónico	66
Lipofilia	69
I. Determinación del coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{ow})	69

II. Determinación de la lipofilia mediante cromatografía en capa fina (TLC)	70
Citotoxicidad sobre tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> y células de mamífero VERO®.....	72
Determinación de especies radicalarias intraparasitarias mediante espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico a través de <i>Spin Trapping</i>	75
Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa Dm28	80
Análisis de la relación estructura-actividad	83
CONCLUSIONES	86
PROYECCIONES	87
PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	88
REFERENCIAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS, ECUACIONES Y TABLAS

Figura 1. Distribución enfermedad de Chagas en el mundo, 2016.	20
Figura 2. Formas morfológicas del parásito <i>T. cruzi</i> .	22
Figura 3. Ciclo de vida del parásito <i>T. cruzi</i> .	24
Figura 4. Seroprevalencia de la EC según región de residencia. Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 y 2016-2017.	26
Figura 5. Porcentaje de notificaciones por EC, según sexo y grupo etario. Chile 2019 y 2020.	27
Figura 6. Estructura de fármacos utilizados en el tratamiento de la EC.	28
Figura 7. Mecanismos de acción propuestos para los fármacos Nifurtimox y Benznidazol.	30
Figura 8. Esqueleto básico de tiosemicarbazona.	34
Figura 9. Ligantes libres estudiados.	35
Figura 10. Estructura química de compuestos A, B, C y D a estudiar.	41
Figura 11. Identificación de las partes activas de los complejos a estudiar.	42
Ecuación 1. Cociente I_{pa}/I_{pc} .	46
Ecuación 2. Coeficiente de partición octanol/agua en escala logarítmica.	48
Ecuación 3. Factor de retardo R_f .	49
Ecuación 4. Parámetro R_M de lipofilia.	49

Figura 12. Espectro de absorción del compuesto A en 1-octanol saturado con agua Mili-Q a concentración 0,07 mM, representativo de todos los complejos estudiados.	50
Ecuación 5. Coeficiente de partición calculado experimentalmente.	51
Figura 13. Reacción química de reducción mitocondrial de MTT a formazán.	52
Figura 14. Representación generalizada para la reacción entre una nitrona y un radical libre formando el aducto de espín.	55
Figura 15. Estructura del N-óxido-5,5-dimetil-1-pirrolina o DMPO.	55
Ecuación 6. Ley de Fick.	58
Figura 16. Voltamogramas cíclicos del complejo B 25 mM (PTBA 0,1 M en DMSO) a diferentes velocidades de barrido, realizado con: (a) 1 <i>scan</i> y (b) 2 <i>scan</i> .	59
Figura 17. Voltamograma cíclico de 2 <i>scan</i> del complejo B 25 mM (PTBA 0,1 M en DMSO) a 1,0 V/s.	60
Tabla 1. Potenciales eléctricos asociados a señales identificadas, para todos los complejos.	60
Figura 18. Voltamograma cíclico de 2 <i>scan</i> de cupla aislada de generación de radical nitro anión del complejo B 25 mM, a diferentes velocidades de barrido (PTBA 0,1 M en DMSO).	61
Tabla 2. Parámetros electroquímicos para la cupla de generación del radical nitro anión, para todos los complejos, a 1,0 V/s.	62
Figura 19. Influencia de la adición equimolar de NaOH en el voltamograma cíclico del complejo B 25 mM a una velocidad de barrido de 1,0 V/s (PTBA 0,1 M en DMSO), realizado con: (a) 1 <i>scan</i> y (b) 2 <i>scan</i> .	63
Figura 20. Mecanismo de reducción de los complejos de Au(I) propuesto.	65

- Figura 21.** Estructura general de los compuestos estudiados, donde R: H; Me, Et, Ph, y la numeración está asociada a los núcleos paramagnéticos en que se deslocaliza en electrón. 66
- Figura 22.** Espectro de REE del compuesto B: (a) espectro experimental; (b) espectro simulado; (c) espectro teórico; (d) superposición de espectros experimental y simulado; (e) superposición de espectros experimental y teórico. 67
- Tabla 3.** Constantes de acoplamiento hiperfino (G), determinadas mediante simulación, para los complejos estudiados mediante REE realizando generación electroquímica *in situ*, con precisión de 0,05 G. 68
- Tabla 4.** Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) junto a curvas de calibrado en 1-octanol, para los complejos estudiados. 69
- Tabla 5.** Coeficientes de partición 1-octanol/agua Mili-Q (P_{ow}) determinados para los complejos estudiados. 70
- Tabla 6.** Valores de R_f y lipofilia R_M determinados mediante TLC en fase reversa, expresados como el promedio con su desviación estándar (n=3). 71
- Figura 23.** Relación de los valores de $\log(P_{ow})$ y R_M obtenidos con las masas molares, para los complejos estudiados. 71
- Figura 24.** Viabilidad celular vs. concentración micromolar de (a) complejos A, B y C, y, (b) complejo D, frente a tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28; donde **CN = control negativo** (parásitos en medio RPMI 1640) y **CP = control positivo** (parásitos en medio RPMI 1640 con Nifurtimox 15 μ M). 72
- Figura 25.** Viabilidad celular vs. concentración micromolar de complejos A, B, C y D, frente a células VERO®; donde **CN = control negativo** (células en medio RPMI 1640) y **CP = control positivo** (células en medio RPMI 1640 con Tritón X-100 1%). 73

Tabla 7. Valores de IC₅₀ (μM) sobre cultivos celulares de tripomastigotes de *T. cruzi* 73
y de células VERO[®], presentados como el promedio de 3 ensayos independientes
(n=3) con su desviación estándar e índice de selectividad calculado como:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ en VERO}^{\circledR}}{IC_{50} \text{ en } T.cruzi}.$$

Figura 26. Ejemplos de aductos de espín de DMPO con radicales libres centrados 75
en oxígeno y carbono, generados de manera química.

Figura 27. Espectro de resonancia de espín electrónico utilizando la técnica de 76
atrapamiento de espín donde: **CN (control negativo)**: parásitos en medio RPMI
1640, NADPH y DMPO; **CP (control positivo)**: parásitos en medio RPMI 1640,
NADPH, DMPO y Nifurtimox disuelto en DMSO; **A**: parásitos en medio RPMI
1640, NADPH, DMPO y complejo A disuelto en DMSO; **B**: parásitos en medio
RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo B disuelto en DMSO; **C**: parásitos en
medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo C disuelto en DMSO; **D**: parásitos
en medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo D disuelto en DMSO. **Símbolos**:
* corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-CH₃; # corresponde
al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPOX; + corresponde al patrón
hiperfino para el aducto de espín DMPO-OH.

Tabla 8. Valores de constantes de acoplamiento hiperfino para complejos estudiados 77
y controles, para distintos aductos de espín formados en tripomastigotes de *T. cruzi*.
Todos los ensayos tienen DMSO al 0,5% v/v. Donde, **CN = control negativo**
(parásitos en medio RPMI 1640) y **CP = control positivo** (parásitos en medio RPMI
1640 con Nifurtimox 15 μM).

Figura 28. (arriba) Espectro de REE del complejo D obtenido experimentalmente; 77
(abajo) Espectro de REE del complejo D simulado mediante *WINEPR-SimFonia*
1.25. Ambos espectros son representativos de los compuestos en estudio.

Figura 29. Reacción entre el radical hidroxilo y el vehículo (DMSO). 78

- Figura 30.** Mecanismo de descomposición del atrapador DMPO debido al radical hidroxilo. 78
- Figura 31.** Mecanismo propuesto para la entrada de DCFH-DA al interior de las células, adaptado desde [70]. Luego de atravesar la membrana, ocurre una deacetilación a DCFH, que posteriormente es oxidada a la molécula fluorescente DCF mediante la presencia de ERO. 80
- Figura 32.** Gráfico de barras ilustrativo del efecto de los complejos **A-D** (razón de áreas de espectros de fluorescencia respecto del control negativo), asociado a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28, a concentración 10 μ M. Donde, **CN = control negativo** (parásitos en medio RPMI 1640) y **CP = control positivo** (parásitos en medio RPMI 1640 con Nifurtimox 10 μ M). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía con posterior prueba de Dunnett (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). 81
- Tabla 9.** Efecto de los complejos A-D a diferentes concentraciones sobre la generación de especies radicalarias en tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28, mediante la detección de la sonda fluorescente DCF (n=3). 82
- Figura 33.** Relación coeficiente de reparto 1-octanol/agua vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*. 83
- Figura 34.** Relación potencial de reducción grupo nitro (Ep IIc) vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*. 84
- Figura 35.** Relación constante de acoplamiento hiperfino a_N nitro vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*. 85
- Figura 36.** Relación porcentaje de aumento de generación de ERO intraparasitaria vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*. 85

RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, provocada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), presenta un problema de salud pública en América Latina, abarcando alrededor de veintiún países. El proceso de globalización ha llevado a que la enfermedad se propague a otras áreas no endémicas, convirtiéndola en un problema de salud global.

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se han utilizado fármacos como Nifurtimox y Benznidazol, pero pese a tener cierta eficacia en la etapa aguda de la enfermedad, son ineficaces en la erradicación del parásito. Por este motivo se han investigado nuevas alternativas farmacológicas, tales como las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído, que han mostrado ser potentes antiparasitarios.

Una estrategia desarrollada en conjunto con el Laboratorio de Bioinorgánica de la Universidad de la República, Uruguay, es sintetizar complejos de metales de transición con ligantes bioactivos como las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído, esperando observar una sinergia metal-ligante en cuanto a su actividad biológica.

En este trabajo se proponen complejos de oro(I) con ligantes bioactivos tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído, que se han estudiado previamente por nuestro grupo.

Se determinó el mecanismo de reducción de los complejos mediante voltametría cíclica y se caracterizó las especies radicalarias generadas por espectroscopía de resonancia de espín electrónico. Asimismo, se evaluó la actividad citotóxica en células VERO[®] y la actividad tripanocida en tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28. El mecanismo de acción potencial se evaluó a través de la técnica de atrapamiento de espín. Se cuantificó las especies radicalarias producidas y se estudió la lipofilia de los complejos.

Mediante resonancia de espín electrónico se determinó la formación de una especie radicalaria cuyo espectro indicó que el electrón desapareado fue capaz de deslocalizarse a

través del ligante. Los resultados biológicos indicaron buenas selectividades para algunos complejos, pero menores a la descrita para el fármaco Nifurtimox. Además, el estudio por *Spin Trapping* determinó la formación del radical hidroxilo en el parásito *T. cruzi*, evidencia que puede explicar la actividad antiparasitaria a través de un mecanismo de estrés oxidativo, lo que se corroboró utilizando la sonda diclorofluoresceína para evaluar la cantidad de especies radicalarias generadas. No obstante, puede haber otros mecanismos involucrados en la actividad antiparasitaria.

SUMMARY

American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), presents a public health problem in Latin America, covering around twenty-one countries. The globalization process has led the disease to spread to other non-endemic areas, making it a global health problem.

Drugs such as Nifurtimox and Benznidazole have been used to treat Chagas disease, but despite having some efficacy in the acute stage of the disease, they are ineffective in eradicating the parasite. For this reason, new pharmacological alternatives have been investigated, such as thiosemicarbazones derived from 5-nitrofuraldehyde, which have shown to be potent antiparasitic.

A strategy developed in conjunction with the Bioinorganic Laboratory of the University of the Republic, Uruguay, is to synthesize transition metal complexes with bioactive binders such as thiosemicarbazones derived from 5-nitrofuraldehyde, hoping to observe a metal-binder synergy in terms of its biological activity.

In this work, complexes of gold(I) with bioactive binder thiosemicarbazones derived from 5-nitrofuraldehyde, which have been previously studied by our group, are proposed.

The reduction mechanism of the complexes was determined by cyclic voltammetry and the radical species generated by electron spin resonance spectroscopy were characterized. Likewise, the cytotoxic activity in VERO[®] cells and the trypanocidal activity in *T. cruzi* Dm28 trypomastigotes were evaluated. The potential action mechanism was evaluated through the Spin Trapping technique. The radical species produced were quantified and the lipophilicity of the complexes was studied.

Through electron spin resonance, the formation of a radical species was determined whose spectrum indicated that the unpaired electron was able to delocalize through the binder. The biological results indicated good selectivity for some complexes, but less than that described for the drug Nifurtimox. In addition, the Spin Trapping study determined the formation of

hydroxyl radical in the *T. cruzi* parasite, evidence that may explain the antiparasitic activity through a mechanism of oxidative stress, evidence that may explain the antiparasitic activity through a mechanism of oxidative stress, which was corroborated using the dichlorofluorescein probe to assess the number of species radicals generated. However, there may be other mechanisms involved in the antiparasitic activity.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) son un gran problema de salud pública y tienen un importante impacto socioeconómico a nivel mundial [1]. Estas enfermedades afectan generalmente a personas pobres y marginadas y su tratamiento es aún precario; por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevos medicamentos. La mayoría de las compañías farmacéuticas no están interesadas en diseñar y desarrollar nuevos medicamentos para las ETD debido al bajo rendimiento financiero que representan [2-8]. Sin embargo, ha habido un cambio en esta situación con algunas compañías desarrollando *hits*, *leads* y fármacos candidatos en asociación con organizaciones globales, como la iniciativa *Drugs for Neglected Diseases* (DNDi). Dentro del grupo de las ETD se encuentra la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la esquistosomiasis [9].

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas (EC) fue descubierta por el investigador brasilero Dr. Carlos Chagas, quien describió una enfermedad infecciosa parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El Dr. Chagas fue el único científico en la historia de la medicina en identificar completamente todos los aspectos de la enfermedad, desde el agente etiológico hasta el vector, pasando por la infección, los huéspedes y las manifestaciones clínicas [9;10]. Se estima que mundialmente hay entre 6 y 7 millones de personas afectadas con aproximadamente 30 mil casos nuevos por año. Además, la EC es responsable de más de 12 mil muertes al año. Esta enfermedad es endémica en 21 países de América Latina; sin embargo, durante las últimas décadas se ha extendido a regiones no endémicas (América del Norte, Europa, Asia, Australia) debido, principalmente, a la migración de personas infectadas desde América Latina a regiones no endémicas, por lo que la incidencia de la enfermedad se ha incrementado, transformando la enfermedad en un nuevo desafío de salud pública mundial [11]. La figura 1 muestra la distribución de EC a nivel mundial en 2016 [9].

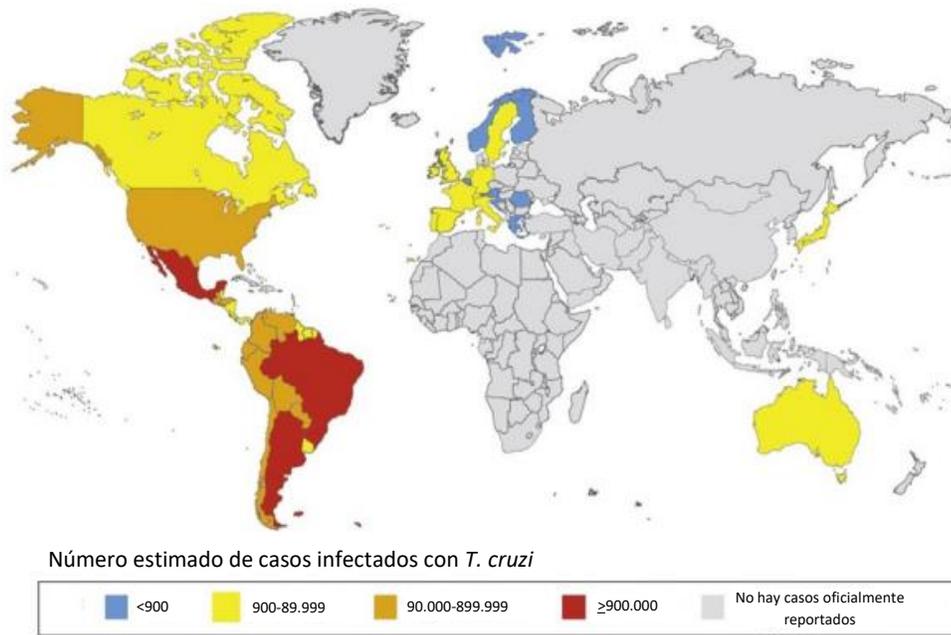


Figura 1. Distribución enfermedad de Chagas en el mundo, 2016 [9].

La EC presenta dos fases: aguda y crónica. La fase aguda se aprecia después de la infección, es generalmente asintomática o presenta síntomas inespecíficos tales como fiebre y malestar general [12-15]. Por esta razón, muchas personas infectadas no son identificadas, ya que a menudo no buscan atención médica [15]. Un pequeño número de pacientes puede presentar un chagoma (inflamación en el sitio de inoculación; chagoma de inoculación), edema bpalpebral unilateral (signo de Romana), linfadenopatía y hepatoesplenomegalia [14;15]. La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y se caracteriza por presentar una alta parasitemia [16]. En esta fase los tripomastigotes de *T. cruzi* pueden detectarse mediante microscopía de sangre, la cual disminuye sustancialmente a partir de los 90 días de infección [14;15;17;18]. La enfermedad aguda grave ocurre en menos del 1 al 5 % de los pacientes e incluye manifestaciones tales como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis con un riesgo de mortalidad de 0,2 a 0,5 % [14;18;19].

Los síntomas de la fase aguda generalmente se resuelven espontáneamente, después de lo cual los pacientes permanecen infectados crónicamente si no reciben tratamiento. La

mayoría de las personas nunca desarrollan síntomas o compromiso visceral y, por lo tanto, son el grupo más grande de pacientes afectados [14].

Por otra parte, la fase crónica presenta dos etapas:

- i) *Etapa indeterminada asintomática* que puede durar décadas o incluso de por vida. Esta etapa se caracteriza por seropositividad para *T. cruzi*, ausencia de signos y síntomas clínicos de afectación cardíaca y digestiva, y radiografía de tórax y electrocardiograma normales.
- ii) *Etapa determinada sintomática* que se observa en el 20 a 30 % de los casos. La fase crónica presenta una muy baja parasitemia, por lo que *T. cruzi* no es detectable en la fase crónica, lo que causa que el diagnóstico se centre en la detección de anticuerpos séricos contra el parásito [15]. La fase crónica sintomática se caracteriza por presentar trastornos degenerativos graves en órganos vitales tales como, complicaciones cardíacas como miocardiopatía, insuficiencia cardíaca y cardiomegalia, o complicaciones digestivas que se caracterizan por la dilatación de vísceras, siendo lo más frecuente la dilatación del colon y/o esófago [9;16]. En esta fase la enfermedad puede ser incapacitante, y ser la causa concurrente o directa de la muerte.

El curso de la enfermedad depende de diversos factores como la carga parasitaria en el sitio de inoculación, el grupo genético y la cepa del parásito; si se trata de una reinfección, el estado inmunológico del huésped y el tipo de vector [20].

T. cruzi posee un ciclo de vida que involucra diversos estadios morfológicos que varían con el vector (triatominos) y huésped en que se encuentra. El ciclo biológico del parásito incluye tres aspectos morfológicos caracterizados por las posiciones relativas del flagelo, el cinetoplasto y el núcleo. Los principales estadios morfológicos que se estudian son [20]:

- 1.- Tripomastigotes: de 20 micrómetros de largo, cinetoplasto subterminal y fusiforme. Constituyen la forma infectiva y no replicativa del parásito, que se encuentran en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatominos. En los mamíferos, esta es la forma celular que disemina la infección a través de la sangre.

2.- Epimastigotes: de 20 micrómetros de longitud, cinetoplasto anterior al núcleo y fusiforme. Representan la forma de replicación del parásito en el intestino anterior del triatomino. Es la forma replicativa no infectiva del parásito en el insecto vector y la forma predominante en cultivos axénicos.

3.- Amastigotes: de 2 micrómetros de diámetro, redondos, sin flagelo emergente. Se multiplican dentro de las células del huésped mamífero, siendo la forma replicativa no infectiva del parásito en el hospedero mamífero. Tienen una duración de 8 a 9 divisiones celulares antes de ser liberados a la sangre como en esta forma. Antes de su liberación de las células huésped, los amastigotes se diferencian nuevamente en tripomastigotes que invaden el torrente sanguíneo; luego pueden entrar en cualquier otra célula nucleada.

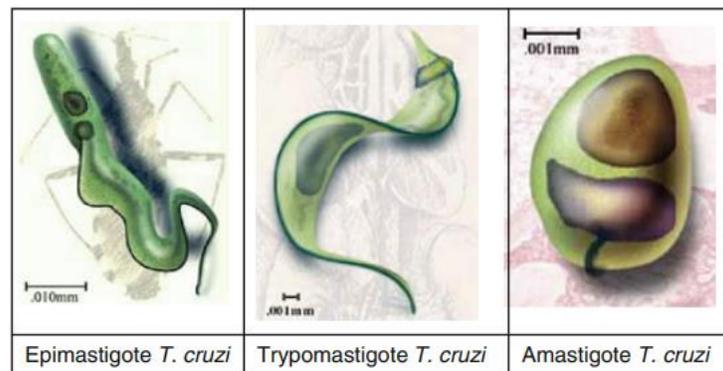


Figura 2. Formas morfológicas del parásito *T. cruzi* [21].

El ciclo de vida se inicia cuando el insecto se alimenta de la sangre de un mamífero infectado que presenta tripomastigotes sanguíneos circulantes. En el intestino del insecto el tripomastigote se diferencia a epimastigote y como tal se replica extracelularmente. En la parte posterior del sistema digestivo del vector, los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos y como tal son eliminados en las deyecciones que son depositadas en la piel o cerca de las membranas mucosas de un nuevo mamífero, permitiendo la entrada de los tripomastigotes metacíclicos al hospedero mamífero [14;15;22;23]. Luego, los parásitos ingresan al torrente sanguíneo a través de la piel mediante un mecanismo

facilitado por el rascado autoinfligido y las enzimas proteolíticas que se encuentran en la saliva del insecto [20]. En el mamífero, los tripomastigotes infectan a células presentadoras de antígeno, en los cuales se diferencian a amastigotes, éstos se multiplican intracelularmente, se diferencian nuevamente a tripomastigote que lisan las células, entran al torrente sanguíneo e infectan los órganos blancos (miocardio, músculo esquelético, músculo visceral liso, células gliales del sistema nervioso, placenta y sistema digestivo) [14;20;22;23]

La principal vía de transmisión es vectorial [16], sin embargo, existen otras formas de transmisión tales como la transfusión de sangre, trasplante de órganos, vía oral por ingesta de alimentos contaminados, vía congénita y accidentes de laboratorio [12].

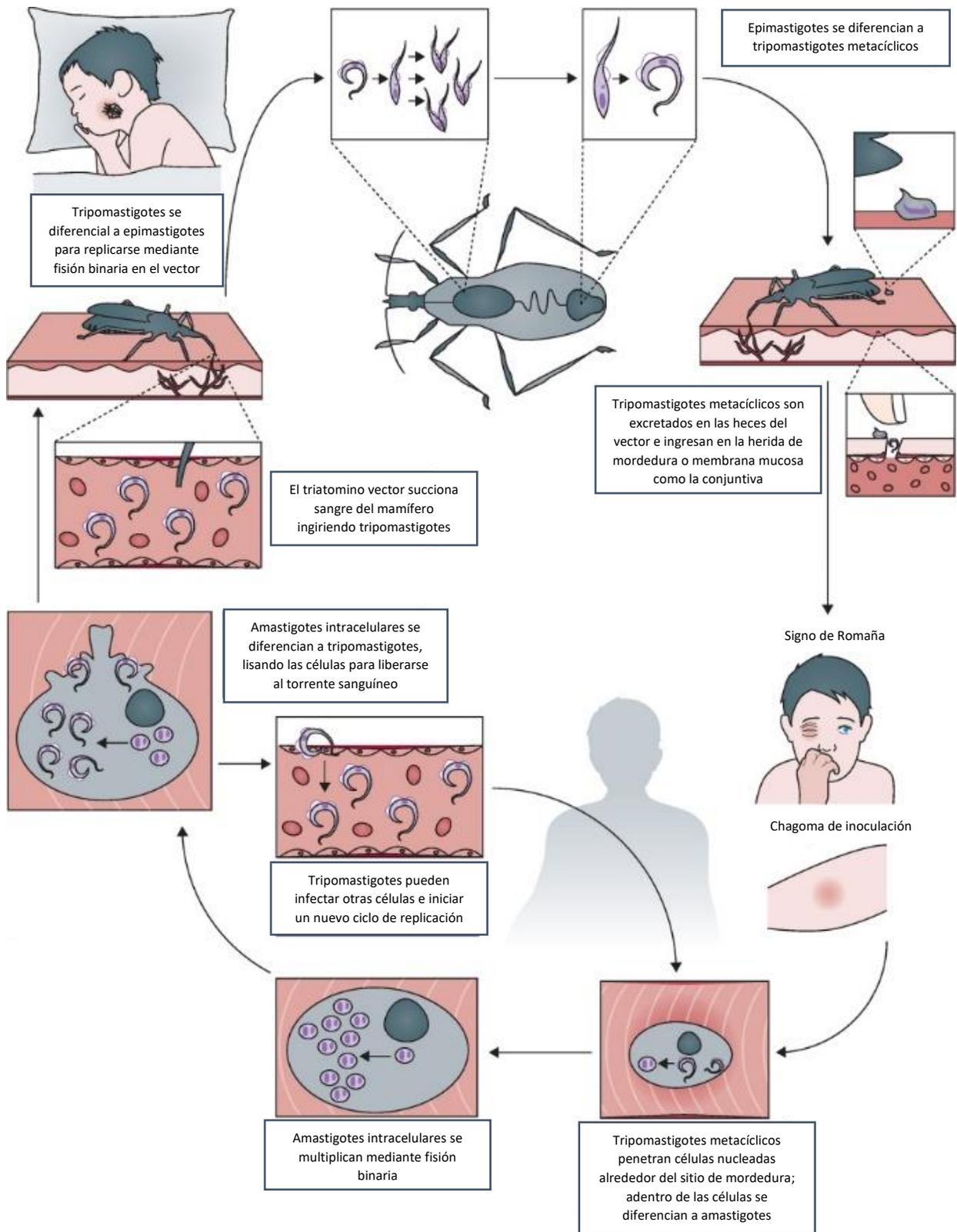


Figura 3. Ciclo de vida del parásito *T. cruzi*.

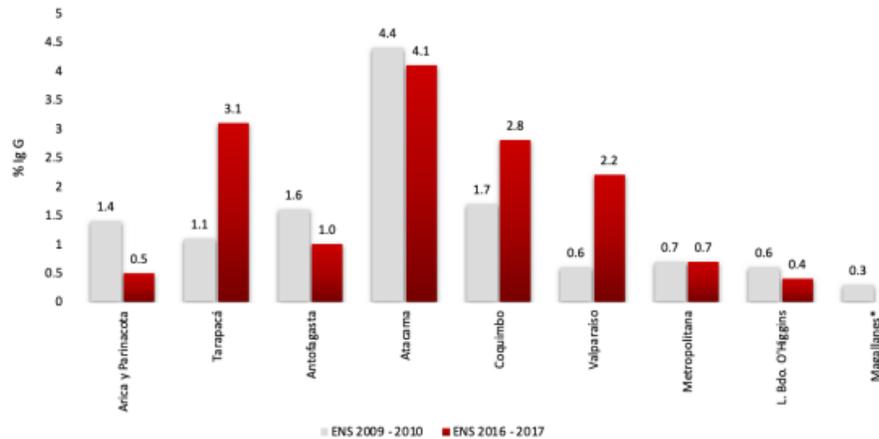
Enfermedad de Chagas en Chile

En Latinoamérica se estima que entre seis y once millones de personas están afectadas por la EC. Esta parasitosis es considerada una patología desatendida porque menos de 10% de las personas en las Américas han sido diagnosticadas y, si bien los medicamentos para su tratamiento se descubrieron hace medio siglo, han sido proporcionados a sólo el 1 % de las personas enfermas [24].

En Chile, la EC es una patología sujeta a vigilancia universal y obligatoria, cuya notificación debe ser hecha a la Autoridad Sanitaria a través del sistema informático *Epivigila*. El propósito de esta vigilancia es recabar información que permita diseñar estrategias de prevención para cortar la cadena de transmisión e intervenciones terapéuticas, que entreguen tratamiento y asistencia oportuna al paciente [25].

En Chile, según la última Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 (ENS 2016-2017), la seroprevalencia (IgG) de la infección por *T. cruzi* en personas de 15 o más años alcanza a 1,2 % (95 %; IC = 0,8 - 1,7 %). Este valor es superior al detectado en la ENS 2009-2010, según la cual la seroprevalencia nacional de *T. cruzi* era de 0,7 % (95 %; IC = 0,4 - 1,1 %), siendo similar en hombres (0,7 %; 95 %; IC = 0,4 - 1,3 %) y mujeres (0,7 %; 95 %; IC = 0,3 - 1,4 %) y continúa siendo mayor la prevalencia en zonas rurales (2,3 %) comparado con zonas urbanas (1,1 %) [25]. En este último informe epidemiológico publicado en Chile sobre la EC señala que la tasa de casos notificados ha aumentado en un 10 % entre los años 2016 y 2017 en el país, en especial en los mayores de 60 años. Las tasas más altas se observaron en la Región de Coquimbo, la que presenta una tasa de 52,12 por 100 mil habitantes el año 2017, con un aumento del 43,14 % comparado con el año 2016 [24].

En la Figura 4 se observa que la prevalencia de infección por *T. cruzi* según la ENS 2016-2017 muestra valores extremos en las Regiones de Atacama y O'Higgins, situación similar a lo observado en la ENS 2009-2010 [25].



Fuente: Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud de Chile.

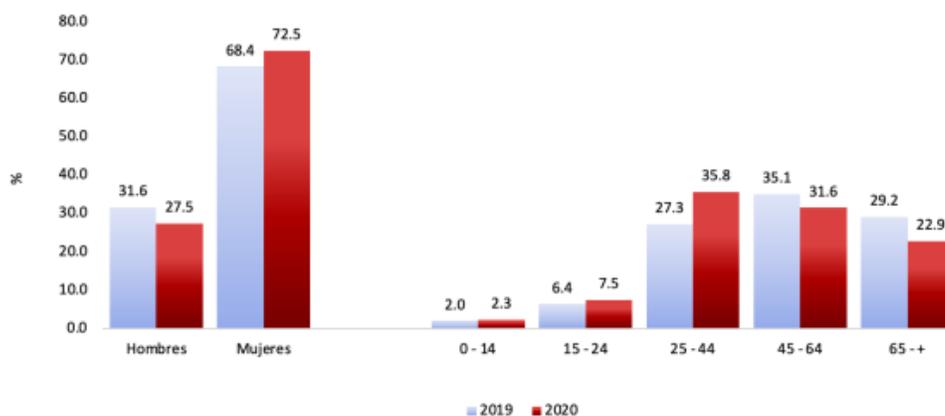
*La Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016 – 2017 solo consideró la toma de muestras para *T. cruzi* desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región de O'Higgins. La ENS 2009 – 2010 no detectó casos en las Regiones del Maule hasta Aysén.

Figura 4. Seroprevalencia de la EC según región de residencia. Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 y 2016-2017 [25].

Por otro lado, el total de casos fallecidos por EC en el período entre 1997 y 2017 correspondió a 1.353 casos en todo el país, de los cuales 668 casos (49,37 %) presentaron residencia en la Región de Coquimbo. La tendencia en la tasa de mortalidad en esta región ha sido siempre superior al país [24].

Recientes investigaciones ambientales sitúan a Coquimbo como una de las zonas de mayor riesgo para la presencia de *Triatoma infestans* o vinchuca, principal vector del parásito en nuestro territorio, lo cual estaría asociado a la temperatura máxima y la precipitación durante el mes más seco [24].

Durante 2020 se notificó un total de 691 casos de EC en el país, 898 casos menos que los reportados durante 2019. Este notorio descenso podría encontrar su explicación en la situación sanitaria derivada de la pandemia por COVID-19. Las mujeres concentran la mayor proporción de notificaciones, cifra que es 4,1 % más alta que la observada en 2019, mientras que, en los hombres, la proporción de notificaciones es 4,1 % más baja que la de 2019. En el análisis según edad se aprecia que en 2020 el segmento etario de 25 a 44 años concentra la mayor proporción de notificaciones [25].



Fuente: Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud de Chile.

Figura 5. Porcentaje de notificaciones por EC, según sexo y grupo etario. Chile 2019 y 2020 [25].

La EC se ha enfrentado en dos ámbitos complementarios en nuestro país; por una parte, con el programa de control vectorial y por otra, con el programa de prevención y control de la enfermedad en las personas. El primero incluye la interrupción de la transmisión vectorial, certificada en 1999 y con recertificación en el año 2016 por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). En las personas se implementó la notificación obligatoria (ENO) de los casos confirmados como positivos por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) desde 1986 y, diez años después, se hizo obligatorio el análisis de *T. cruzi* en la sangre de donantes de las zonas endémica (1996). En el año 2014 comienza la búsqueda activa en mujeres embarazadas (factor predominante de transmisión de la madres al hijo) y en el 2017 comienza lentamente el acceso al tratamiento tripanocida en algunos grupos como personas en fase aguda, hospederos inmunodeprimidos, pacientes bajo 18 años, recién nacidos con EC congénita, mujeres en edad fértil hasta 45 años, pacientes jóvenes y adultos hasta los 60 años con serología positiva, en fase crónica indeterminada. En todos estos grupos, el objetivo principal es disminuir la carga parasitaria [24;26].

Sumado a lo anterior se ha descubierto que si bien en Chile, el ciclo de contagios ha logrado ser contenido a través de campañas de fumigación en los hogares donde el Chagas es endémico, sobre todo en la Región de Coquimbo, el patógeno *T. cruzi* sigue estando presente entre nosotros y los contagios también se estarían dando en entornos silvestres [27]. Se ha planteado que la presencia de *T. cruzi* en el país está presente en una amplia variedad de

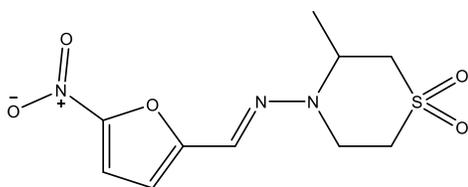
mamíferos, como roedores, murciélagos, vacas, burros, caballos, cabras, ovejas, llamas, vicuñas, conejos, perros, gatos, zorros e incluso en un pequeño marsupial endémico de Chile conocido como yaca, además que el mismo parásito causante de esta grave enfermedad no solo infectaría a mamíferos, sino también a reptiles e incluso algunas especies de aves en un estudio realizado en México [28]. Por lo que no solo este patógeno se transmite desde mamíferos a vinchucas y desde vinchucas a mamíferos [27;28].

Actualmente, la vinchuca está distribuida en zonas áridas, semiáridas y mediterráneas de Chile, desde la Región de Arica y Parinacota, por el norte, hasta la Región de O'Higgins, en la zona central. El cambio climático, la disminución de precipitaciones y el avance de la desertificación hacia latitudes más australes ofrecen un escenario cada vez más propicio para la expansión de la vinchuca hacia el sur. Unos 800 mil individuos en Chile viven en zona de riesgo [29].

Tratamiento farmacológico de la Enfermedad de Chagas

En la década de 1960, los nitroderivados demostraron ser tratamientos efectivos para la EC aguda. Actualmente, solo hay dos fármacos nitroheterociclos disponibles: Nifurtimox (Bayer, Lampit[®]), un derivado nitrofurano, y Benznidazol (Roche, Radanil[®]), un derivado nitroimidazólico. Estos agentes son más efectivos en la fase aguda de la enfermedad, con tasas de curación parasitológica del 60 al 80 % [15].

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



Benznidazol
N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)-acetamida

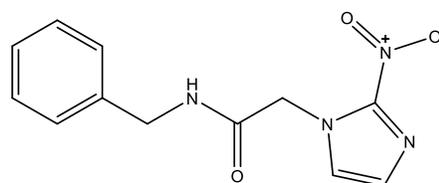


Figura 6. Estructura de fármacos utilizados en el tratamiento de la EC.

Los ensayos clínicos han mostrado limitaciones en adultos con infección crónica y ambos fármacos inducen varios efectos secundarios tóxicos, lo que a menudo conduce a la interrupción del tratamiento [9].

Las tasas de curación de Nifurtimox en la fase crónica indeterminada oscilan entre el 86 % en niños menores de 14 años y 7 a 8% en adultos. La frecuencia de efectos adversos con Nifurtimox es del 43 a 98 %; los más comunes son anorexia, pérdida de peso, trastornos neurológicos (irritabilidad, insomnio, desorientación, cambios de humor, parestesias y neuropatía periférica), manifestaciones digestivas como náuseas y vómitos y, ocasionalmente, fiebre y exantema. El tratamiento se suspende en el 14 a 75 % de los casos [14].

Al igual que la mayoría de los nitroheterociclos, para que Nifurtimox sea eficaz como profármaco debe someterse a la activación por nitrorreducción. Dos clases de enzimas pueden catalizar este proceso, nitrorreductasas del tipo I y del tipo II [30]. Nifurtimox genera radicales nitro anión por nitrorreductasas que, en presencia de oxígeno, producen radicales libres que dañan a los parásitos *T. cruzi* [31].

Benznidazol se introdujo para el tratamiento humano en 1971 y mostró una eficacia similar a la de Nifurtimox, aunque con menos efectos tóxicos. Posteriormente, se publicaron diferentes estudios clínicos y experimentales utilizando Benznidazol como tratamiento de la EC aguda y crónica; se convirtió en el tratamiento de primera línea en ambas situaciones [31].

Se ha descrito que el efecto tripanocida de Benznidazol no sigue el mismo mecanismo de Nifurtimox. El efecto tripanocida de Benznidazol no dependería de radicales de oxígeno como ocurre con Nifurtimox [32]. Parece probable que los metabolitos reducidos de Benznidazol, mediante unión covalente con macromoléculas, están involucrados en los efectos tóxicos y tripanocidas de este fármaco [30].

El benznidazol tiene una actividad considerable durante las fases aguda y temprana de la infección por *T. cruzi*: se logra la curación serológica hasta en el 100 % de los pacientes con enfermedad congénita tratados durante el primer año de vida y en el 76 % de los pacientes

con enfermedad aguda. En la fase crónica, las tasas de curación son mucho más bajas: 60 a 93 % en niños de hasta 13 años y 2 a 40% en adultos con enfermedad crónica. Los efectos adversos más comunes incluyen hipersensibilidad, principalmente en forma de erupción cutánea, intolerancia digestiva y síntomas como anorexia, astenia, cefalea y trastornos del sueño y el tratamiento se interrumpe en el 9 a 29 % de los casos [14].

Experimentos realizados con estos medicamentos utilizados en el tratamiento de la EC sugieren que la reducción intracelular seguida de ciclos redox produce especies reactivas de oxígeno (ERO) el cual puede ser su principal mecanismo de acción contra *T. cruzi*. Estos pueden causar daño celular directamente al reaccionar con varias macromoléculas biológicas, o indirectamente mediante la generación del radical hidroxilo que es altamente reactivo, a través de la reacción de Haber-Weiss o reacción de Fenton. La sensibilidad conocida de las células tripanosomátidas hacia ERO hace que las enzimas del metabolismo que protegen a los parásitos del daño oxidante sean objetivos prometedores para el desarrollo de fármacos específicos contra parásitos [33;34].

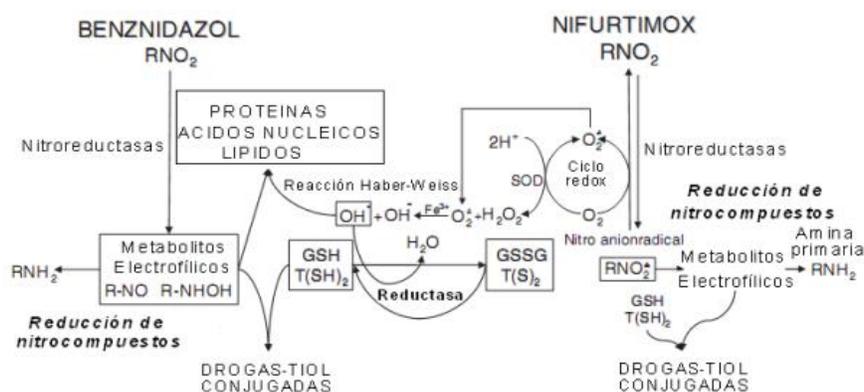


Figura 7. Mecanismos de acción propuestos para los fármacos Nifurtimox y Benznidazol.

En síntesis, ambos fármacos muestran un efecto tripanocida sobre todas las formas del parásito, pero causan toxicidad sistémica y efectos adversos graves. Son los únicos que poseen eficacia clínica, pero están lejos de ser óptimos debido principalmente al daño

hepático que causan [12], lo que ha incentivado la evaluación de nuevas propuestas farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad. Por estas razones, se requieren esfuerzos concertados de la comunidad científica para el descubrimiento de nuevas sustancias químicas con efecto tripanocida. Es por esto por lo que nuestro grupo de Radicales Libres y Antioxidantes de la Universidad de Chile ha estudiado diversos tipos de compuestos con actividad anti-*T. cruzi*. Dentro de estos compuestos destacan los complejos metálicos.

Química Inorgánica Medicinal

La Bioinorgánica es una rama de la ciencia centrada en el estudio de funciones e interacciones de elementos y compuestos inorgánicos (metales principalmente) en los sistemas biológicos. Aunque la biología se asocia tradicionalmente con la química orgánica, al menos 20 elementos inorgánicos presentan un papel fundamental en los procesos biológicos [35]. Los iones metálicos presentan numerosas funciones en sistemas biológicos que varían enormemente en su función y complejidad. Así, el potasio, el magnesio, el hierro, el cobalto, el cobre, el molibdeno y el zinc, entre otros, no sólo son importantes catalizadores de reacciones enzimáticas, sino que también existen en sistemas proteicos implicados en el almacenamiento, en el control de la cantidad, el transporte y la incorporación a sus respectivos sistemas enzimáticos [35].

El rápido crecimiento de la comprensión de la química bioinorgánica ha visto un crecimiento del interés en las propiedades medicinales de varios metales, ya sea que se encuentren o no en especies biológicas. La introducción de iones metálicos o componentes de unión de iones metálicos en un sistema biológico para el tratamiento de enfermedades es una de las principales subdivisiones en el campo de la química bioinorgánica.

La química inorgánica medicinal es un campo multidisciplinario que combina elementos de química (síntesis, reactividad), farmacología (farmacocinética, toxicología), bioquímica (objetivos, estructura, cambios conformacionales) y química medicinal (terapéutica, farmacodinamia, relaciones estructura-actividad). Los campos están unidos por la necesidad de aportar tanto una comprensión de la química inorgánica como una investigación en

biología para abordar los problemas que afectan el uso de medicamentos que contienen metales [36].

Por otra parte, la versatilidad químico-estructural y las propiedades cinéticas de los compuestos de coordinación han permitido que sean utilizados para el diseño de potenciales fármacos basados en metales (metalofármacos). Los complejos metálicos proporcionan una plataforma ideal para el diseño de fármacos, ya que permiten utilizar diferentes centros metálicos con diferentes estados de oxidación, así como varios ligantes. Así, podrían obtenerse diferentes geometrías, lo que permite la modulación de actividad biológica y de las propiedades fisicoquímicas, entre otras ventajas [37]. Los compuestos metálicos también se han utilizado como sondas con fines de diagnóstico. Un ejemplo de metalofármacos son los complejos de platino que poseen efecto antitumoral, los complejos de oro que se utilizan en el tratamiento de la artritis reumatoidea y los compuestos con tecnecio que se utilizan como radiofármacos [35].

En los últimos 100 años la actividad medicinal de los compuestos inorgánicos se ha desarrollado lentamente y de manera racional comenzando a principios del siglo XX con el compuesto metálico antimicrobiano de Au(I), $K[Au(CN)_2]$ contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causante de tuberculosis descubierto por Robert Koch (1843-1910), además de varios compuestos de antimonio para la leishmaniasis y de varias sales de oro para la actividad antibacteriana [38;39]. Iniciando así la moderna utilización de compuestos de oro en medicina. Pocos años después se demostró que diversos compuestos de este metal eran efectivos en el tratamiento de artritis reumatoidea [40].

Como disciplina, la química inorgánica medicinal solo ha existido durante los últimos 50 a 55 años, desde el descubrimiento fortuito de la actividad antitumoral del cisplatino, *cis*- $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ [36], Aunque el salvarsán de Ehrlich es ampliamente considerado como el nacimiento de la quimioterapia moderna y a menudo citado como el comienzo de la investigación y el desarrollo moderno de metalofármacos, la estrella del campo es el agente anticancerígeno cisplatino (Bristol Laboratories®; Platinol), donde su actividad biológica fue descubierta por serendipia en 1965 por Barnett Rosenberg y Loretta VanCamp de la Universidad Estatal de Michigan. Este hallazgo condujo a la continua investigación y desarrollo posterior de metalofármacos contra el cáncer a base de Pt(II) y análogos de este

que amplían el espectro de actividad de los fármacos originales [38;41]. Dada la similitud metabólica entre el cáncer y la EC es que se han probado como tripanocida varios complejos metálicos de Pt(II). El cisplatino es ampliamente utilizado, pero presenta diversas reacciones adversas como náuseas, neurotoxicidad y nefrotoxicidad, lo que genera ciertas limitaciones en su uso clínico [12;42]. Por lo que se busca sustituir el fármaco por opciones menos tóxicas [42], siendo las tiosemicarbazonas una buena opción, ya que han mostrado una actividad antineoplásica significativa contra un gran número de líneas de células tumorales humanas en condiciones *in vitro* [43].

Aprovechando la estrategia de diseño de la química médica, en particular el desarrollar agentes que podrían modular múltiples objetivos simultáneos con el propósito de mejorar la eficacia o mejorar la seguridad en relación con los medicamentos que se dirigen a un solo objetivo [44], nuestro grupo ha desarrollado nuevos candidatos a fármacos antichagásicos basados en metales. Una de las estrategias utilizadas ha sido la formación de complejos con ligantes que tienen actividad anti-*T. cruzi* como son las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano, que contienen el farmacóforo 5-nitrofuril, e iones de metales de transición farmacológicamente activos. Así, se han desarrollado diferentes series de compuestos metálicos de este tipo de ligantes y se han estudiado exhaustivamente sus probables mecanismos de acción, donde uno de ellos es mediado por la generación de radicales libres.

En comparación con las características estructurales que se pueden construir alrededor de un ion metálico, las posibilidades de las moléculas orgánicas pequeñas y las moléculas biológicas parecen casi monótonas. Si bien tales moléculas de fármaco se basan únicamente en el carbono, su geometría de unión en el espacio está dictada por los principios de hibridación: sp (lineal), sp^2 (trigonal-planar) y sp^3 (tetraédrica), en comparación con la geometría diversa en el espacio tridimensional abierto a fármacos que contienen iones metálicos. Además de geometrías lineales, planas cuadradas y tetraédricas, se pueden crear formas piramidales, bipirámides trigonales y octaédricas (e incluso números de coordinación más altos y geometrías con iones metálicos más grandes), todas con importancia para los procesos biológicos [41].

Los complejos metálicos proporcionan una plataforma ideal para el diseño de fármacos, ya que permiten utilizar diferentes centros metálicos con diferentes estados de oxidación, así

como varios ligantes. Así, podría modularse la actividad biológica y las propiedades fisicoquímicas, entre otras características [37].

Se ha reportado que los complejos metálicos también presentan actividades antibacterianas, antimicrobianas, antiartrítica, antiulcerosa, insulino-mimética y antivirales, así como también actividad antioxidante, aparte de la actividad antitumoral y antiparasitaria [40]. Estas actividades se explican porque este tipo de complejos tienen la capacidad de interactuar con el ADN, inhibiendo enzimas específicas importantes para la actividad biológica de la célula, o generando intermediarios metabólicos como por ejemplo radicales libres, los que afectan de manera general la supervivencia de las células [12;13;16;30;33;34;37;44].

Ligante tiosemicarbazona

Las tiosemicarbazonas (Figura 8) constituyen una clase de ligantes que posee en su estructura átomos donores como el nitrógeno y el azufre, además de una tautomería tiona-tiol la cual presenta formas resonantes que junto con la facilidad de deprotonar el nitrógeno hidracínico, pueden comportarse como ligantes monodentados, bidentados (tanto aniónicos como neutros) y tridentados si el anillo aromático tiene átomos donores adecuados [12;45].

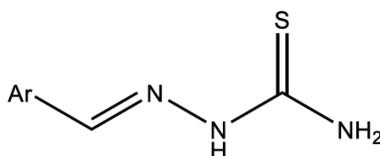


Figura 8. Esqueleto básico de tiosemicarbazona.

Además de un efecto tripanocida de las tiosemicarbazonas, se han descrito propiedades antivirales, antibacterianas y antiparasitarias contra la malaria [46]. Más aún, complejos metálicos con ligantes de tiosemicarbazonas han demostrado tener actividad contra diversas enzimas incluyendo tiorredoxina reductasa, glutatión reductasa, ribonucleótido reductasa, involucradas en la fisiopatología de las neoplasias y también, contra cisteína proteasas como

la cruzipaina de *T. cruzi* [43;47], la que es un blanco terapéutico ampliamente estudiado en el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la EC [48].

Por otro lado, diferentes compuestos orgánicos que llevan una función nitro aromática han mostrado actividad tripanocida principalmente a través de la biorreducción del grupo nitro en el parásito y estos han sido sintetizados como análogos al fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, Nifurtimox [30].

Ceretto y col. estudiaron derivados de 5-nitrofuril, los cuales evidenciaron tener una alta actividad anti-*T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* [3;48]. Además, Olea y col. demostraron que la familia de tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído producen estrés oxidativo dentro del parásito como principal mecanismo de acción tripanocida [34].

Debido a los antecedentes anteriormente mencionados, Aguirre y col., estudiaron una familia de ocho derivados de tiosemicarbazona que contienen 5-nitrofuril *in vitro* (Figura 9), los cuales podrían actuar contra *T. cruzi* mediante un mecanismo de acción dual, estrés oxidativo e inhibición de la cruzipaina debido a los grupos bioactivos nitrofurano y tiosemicarbazona, respectivamente [48]. En este estudio descubrieron que algunos derivados eran muy activos contra la forma epimastigote del parásito, siendo 1,5 a 1,7 veces más activos que el fármaco tripanocida de referencia, Nifurtimox. Los estudios de resonancia de espín electrónico mediante la técnica de atrapamiento de espín mostraron que los derivados de tiosemicarbazona producían radicales libres en medio biológico, lo que indica que estos podrían mantener el modo de acción del farmacóforo 5-nitrofurano.

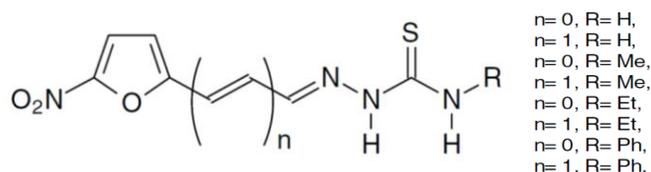


Figura 9. Ligantes libres estudiados [48].

Complejos de coordinación con ligante bioactivo tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofurano

El desarrollo de fármacos a base de metales ha demostrado ser un enfoque prometedor en la búsqueda de respuestas farmacológicas a las enfermedades parasitarias. En este contexto, la principal estrategia de diseño se ha enfocado en desarrollar complejos metálicos con ligantes con actividad anti-*T. cruzi* conocida.

Las tiosemicarbazonas que llevan el farmacóforo 5-nitrofuril y un gran número de sus complejos metálicos, estudiados y desarrollados por nuestro grupo junto al de la Dra. Lucía Otero de la Universidad de la República, Uruguay, han mostrado actividad *in vitro* en el rango micromolar sobre *T. cruzi* [49]. El mecanismo de acción antiparasitaria de los ligantes libres implica la biorreducción del grupo nitro seguida de un ciclo redox que produce ERO [23] tales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo los cuales desencadenan estrés oxidativo intraparasitario [12;13;30;33;34;37;44;48;50;51].

Otero y col. sintetizaron, caracterizaron y estudiaron dos series de complejos de Pd(II) con 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona como ligante con actividad anti-*T. cruzi* de fórmulas $[PdCl_2(HL)]$ (serie A) y $[Pd(L)_2]$ (serie B), donde HL son ligante en forma neutras y L, ligante en forma monoaniónica [52]. En estas dos series de complejos se determinó la actividad tripanocida *in vitro* frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y se estudió aspectos relacionados con su mecanismo de acción tripanocida como la producción intracelular de radicales libres y la capacidad de los compuestos de paladio para inhibir la enzima tripanotión reductasa (TR) que es específica del parásito y la cual posee función de mantener un medio intracelular reductor en el parásito y actuar como defensa contra el estrés oxidativo. Como resultado se obtuvo que la mayoría de los complejos mostraron ser tan activos como los ligantes libres, y fueron hasta 1,7 veces más activos que el Nifurtimox. A pesar de que los valores de IC_{50} fueron bastante similares para cada ligante y su complejo, se observó la siguiente tendencia relacionada con la actividad biológica: Complejos de la serie A $[PdCl_2(HL)] >$ ligante libre $>$ Complejos de la serie B $[Pd(L)_2]$.

Posteriormente Vieites y col. [44], estudiaron 2 series de complejos solo cambiando el centro metálico a Pt(II) como análogos a los complejos de Pd(II) anteriormente estudiados por Otero

y col. El estudio determinó que los potenciales medios correspondientes al grupo nitro de los ligantes libres cambiaron ligeramente como consecuencia de la formación del complejo de Pt(II), siendo este último solo ligeramente más favorable que los primeros y que los reportados previamente para los análogos del Pd(II). Sin embargo, cabe señalar que todos los compuestos estudiados mostraron una mayor facilidad de reducción que Nifurtimox. Los estudios de atrapamiento de espín mostraron que los complejos fueron biorreducidos dentro del parásito, lo que indicaría que podrían mantener el modo de acción del farmacóforo 5-nitrofuril.

Olea y col., han descrito un mecanismo de autoprotónación en nitrocompuestos a bajos potenciales de reducción mediante el cual la molécula con un grupo nitro cede un hidrógeno lábil, el que es aceptado por el grupo nitro quedando un radical nitro protonado. Estudios posteriores, han observado este mecanismo para complejos con nitrocompuestos derivados de tiosemicarbazona, proponiendo además que los complejos mejoran la actividad biológica de derivados de tiosemicarbazona sustancialmente [13].

Rigol y col., identificaron parámetros característicos mediante voltametría cíclica asociados a procesos de reducción del grupo nitro del ligante derivado de tiosemicarbazona libre. En dicho estudio caracterizaron la transferencia reversible de un electrón correspondiente a la cupla de generación del radical nitro anión alrededor de -0,80 V [34]. También observaron una señal correspondiente a la generación de la hidroxilamina y una cupla correspondiente a la reducción del grupo imino [34]. Además, se observó la autoprotónación del grupo nitro a potenciales bajos [13;34]. Esto ocurre porque el grupo nitro aumenta la acidez de la tiosemicarbazona, facilitando así la autoprotónación [13].

Actividad farmacológica de compuestos de Oro

Desde la antigüedad hasta su uso actual en la Auranofina, el oro se ha utilizado en medicamentos de diversos tipos. El uso del oro en la medicina se remonta a la historia, en el 2500 a. C., la primera aplicación del oro como agente terapéutico fue en China, y fue ampliamente utilizada por médicos y cirujanos. Muchas culturas antiguas, como las de la

India y Egipto, usaban preparaciones medicinales a base de oro, pero la China fue la primera en curar enfermedades con él. Por ejemplo, utilizaron oro puro para tratar furúnculos, viruela y úlceras cutáneas y para eliminar el mercurio de la piel y la carne. Algunas referencias antiguas señalaron que los medicamentos de oro pueden curar las enfermedades de las articulaciones y las enfermedades de los pulmones [53].

El interés moderno en la aplicación médica de compuestos de oro se origina en el descubrimiento en 1890 por Robert Koch, del cianuro de oro $[\text{KAu}(\text{CN})_2]$ el cual inhibe el crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria responsable de la mayor cantidad de casos de tuberculosis en el mundo. A pesar de la toxicidad de este compuesto, siguió la "década del oro" (1925-1935), en la que se utilizaron sales de tiolato de Au(I) administradas por vía intravenosa para el tratamiento de la tuberculosis, a pesar de la falta de evidencia experimental de beneficios antituberculosos. Se encontró que la terapia con oro reduce significativamente el dolor articular en un grupo de pacientes no tuberculosos, lo que llevó al médico francés Jacques Forestier en 1935 a investigar el uso de compuestos de oro para el tratamiento de la inflamación relacionado con la artritis reumatoide. Algunos fármacos con tiolato de oro (I), introducidos por primera vez en la década de 1920, todavía se utilizan clínicamente en la actualidad, y se incluyen en la clase de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), que principalmente ralentizan la progresión de la enfermedad [53-56].

Se han utilizado y diseñado compuestos de Au(I) y Au(III) antiguos y nuevos con el objetivo de apuntar componentes que están implicados en la aparición o progresión de cánceres, artritis reumatoide, enfermedades virales y parasitarias [56;57].

Se han diseñado varios compuestos de Au(III) con el objetivo de superar las desventajas asociadas con los fármacos a base de platino para el tratamiento del cáncer [55]. Existe evidencia de que los efectos citotóxicos de una variedad de complejos de Au(I) y Au(III) están relacionados con la inhibición de la tiorredoxina reductasa mitocondrial y de la función mitocondrial [54;55;58;59]. Por lo que el objetivo de la mayoría de ellos es la mitocondria, a diferencia del cisplatino que tiene como objetivo es el ADN.

Los compuestos a base de oro ofrecen un gran potencial debido a que pueden unirse a proteínas con grupos tiol y selenol que se han identificado como dianas farmacológicas en tripanosomas (enfermedad del sueño africana, enfermedad de Chagas y leishmaniasis) [56]. En un estudio reciente, se incluyó un compuesto de Au(III) entre varios compuestos metálicos probados en las cisteínas proteasas de parásitos, como la cruzipaína de *T. cruzi*. Aunque este compuesto no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de *T. cruzi*, abre el camino para investigar otros compuestos de Au(I), como la Auranofina, que se ha demostrado que inhiben las cisteínas proteasas.

Se ha desarrollado una estrategia basada en la síntesis de complejos que combinan ligantes con actividad antiparasitaria como los compuestos de tiosemicarbazona y metales de importancia farmacológica como es el oro, en una sola estructura. Se han estudiado diferentes complejos de oro con ligante de tiosemicarbazona en los cuales se ha estudiado la actividad de estos complejos principalmente frente a enzimas específicas del parásito y que no están presentes en el hospedero humano.

Duque y col., evaluaron la actividad *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi* del complejo organometálico de Au(III) de fórmula general $[Au(III)(Hdamp)(L_1^4)]Cl$, (L_1 = híbrido de tiosemicarbazona donadora de SNS; Hdamp: dimetilamonio metilfenilo) el cual posee una alta estabilidad en solución acuosa [60].

Estos complejos mostraron 3 veces mayor potencia tripanocida en la forma tripomastigote de *T. cruzi in vitro* y 4 veces mayor potencia tripanocida en la forma amastigote de *T. cruzi* vs. el Benznidazol, además de que no presentaron efectos citotóxicos en las células de mamíferos. Adicionalmente, se evidenció que el complejo no actuaría como sustrato de la cruzipaína de *T. cruzi* y que actuaría directamente sobre los parásitos de *T. cruzi*.

Se determinó que este complejo de Au(III) es capaz de mitigar el daño causado por la fase aguda de la enfermedad de Chagas; además mediante pruebas *in vivo* fue posible observar que el complejo reduce el parasitismo tisular en bajas dosis, además de proteger el daño al tejido del corazón e hígado.

Vieites y col., evaluaron la actividad de un complejo de Au(I) con trifenilfosfina con el co-ligante bioactivo mpo (piridina-2-tiol-*N*-óxido) y observaron un efecto inhibitor del crecimiento *in vitro* sobre la forma epimastigote de *T. cruzi*, mostrando mayor actividad tripanocida que el fármaco de referencia Nifurtimox y el ligante libre [61]. El complejo mostró un marcado aumento del efecto inhibitor de la enzima NADH fumarato reductasa (ausente en células mamíferas) con respecto al ligante libre, de acuerdo con un aumento del efecto sobre los parásitos debido a la formación del complejo, por lo que la inhibición de esta enzima se vio favorecida por el metal. La falta de NADH fumarato reductasa en las células de mamíferos hace de esta enzima un objetivo interesante contra la enfermedad de Chagas. Además, la eficacia anti-*T. cruzi* y la citotoxicidad frente a células normales revela que la formación del complejo con oro proporciona una buena selectividad, siendo el complejo preferentemente tóxico para los parásitos.

En base a los antecedentes descritos, se propone estudiar una nueva familia de complejos de Au(I) con el ligante bioactivo tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído (Figura 10) como potenciales compuestos tripanocidas, en función de los antecedentes expuestos, como alternativa a los fármacos Nifurtimox y Benznidazol.

Estos complejos fueron sintetizados previamente por nuestro grupo en colaboración con el grupo de la Dra. Lucia Otero del área Química Inorgánica Medicinal: Desarrollo de Potenciales Fármacos Inorgánicos, de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Uruguay.

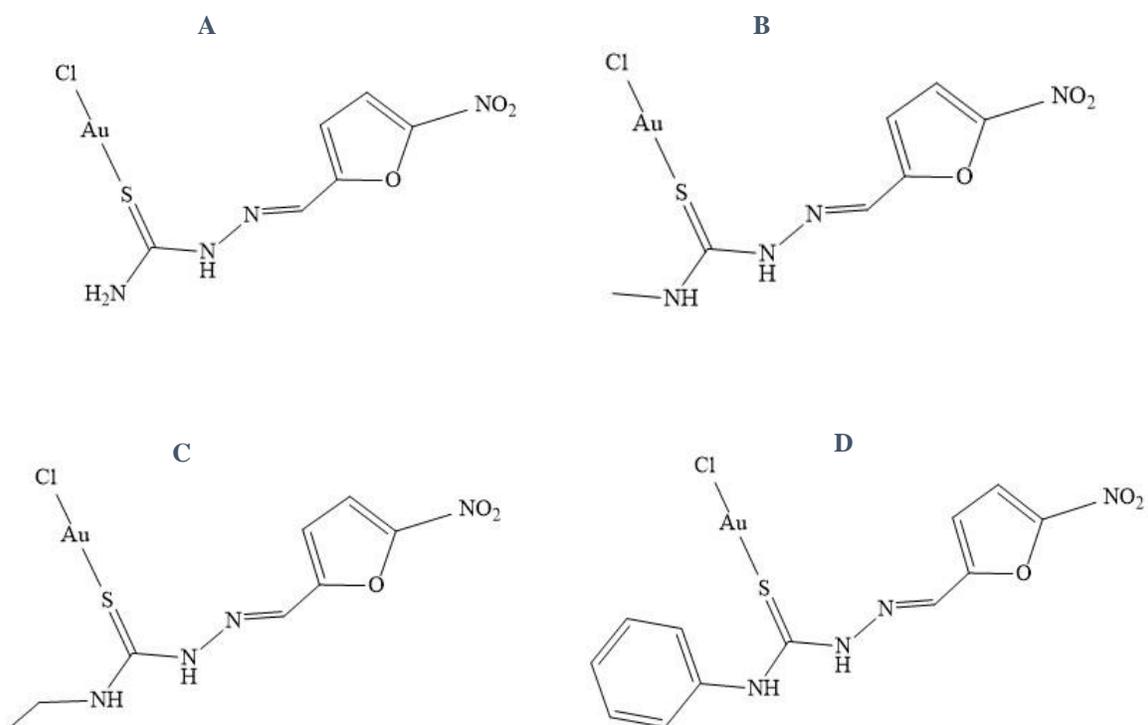


Figura 10. Estructura química de compuestos **A**, **B**, **C** y **D** a estudiar.

Los criterios de elección de estos complejos se basan en un desglose de posibles actividades, que entrega algún grupo funcional en particular, tal como se puede apreciar en la Figura 11.

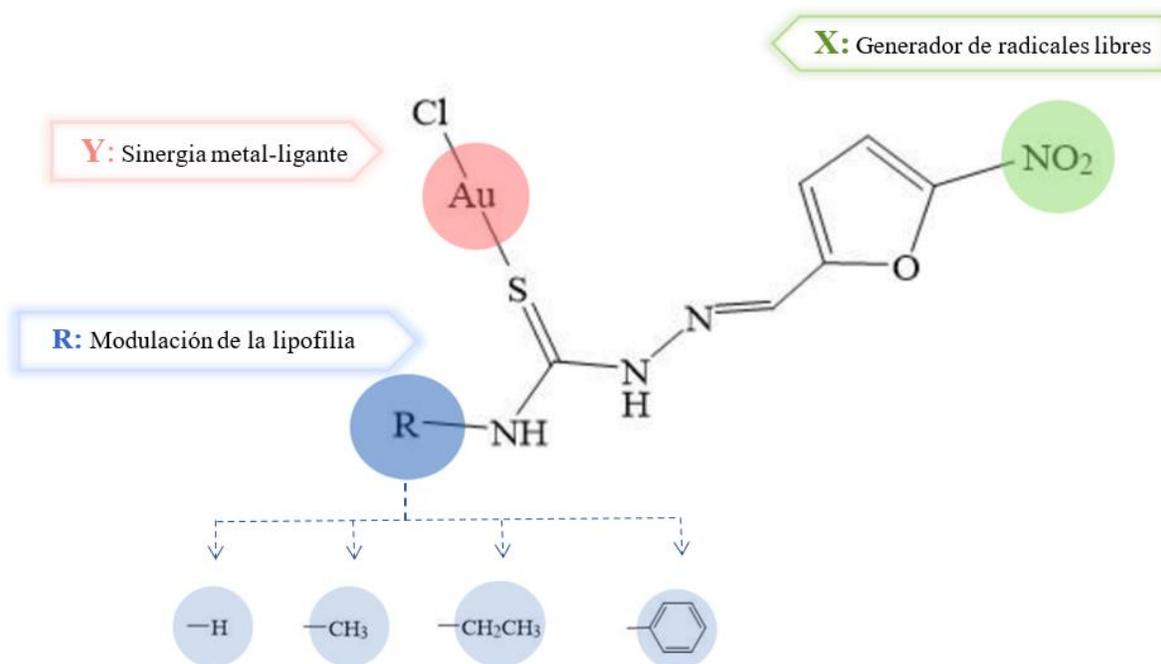


Figura 11. Identificación de las partes activas de los complejos a estudiar.

Donde se observa; **X**: grupo nitro del ligante, el cual provee la capacidad de generar radicales libres y por ende estrés oxidativo; **Y**: metal de transición, Au(I), el cual potencia las propiedades fisicoquímicas del ligante; **R**: variabilidad estructural de la cadena de tiosemicarbazona, el cual proporciona cambio en la lipofilia de los complejos.

HIPÓTESIS

Esta familia de complejos de oro, dada su estructura, posee actividad tripanocida selectiva mediante la generación de estrés oxidativo, asociada a la reducción del grupo nitro del ligante tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído. Adicionalmente se genera una sinergia metal-ligante, facilitando la reducción del grupo nitro, debido a que el metal potenciará las propiedades electroattractoras del ligante y, por otro lado, la variación del ligante permitirá modular la lipofilia y la actividad biológica.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica de una nueva familia de complejos de oro(I) con ligantes tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído como agentes tripanocidas potenciales. Asimismo, estudiar un posible mecanismo de acción tripanocida mediado por la generación de estrés oxidativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar electroquímicamente los complejos de oro mediante voltamperometría cíclica (VC) en medio aprótico.
2. Caracterizar las especies radicalarias generadas electroquímicamente mediante espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE).
3. Determinar la lipofilia de los complejos de oro mediante el coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{ow}) y cromatografía en capa fina (TLC) en fase reversa.
4. Determinar la citotoxicidad en tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28 y en células VERO®.
5. Determinar la generación de especies radicalarias intraparasitarias mediante *Spin Trapping*.
6. Estudiar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos de *T. cruzi* mediante espectroscopía de fluorescencia.

METODOLOGÍAS

Caracterización electroquímica mediante Voltamperometría Cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es una técnica electroquímica comúnmente empleada para investigar los procesos de reducción y oxidación de especies moleculares. La VC también es invaluable para estudiar reacciones químicas iniciadas por transferencia de electrones y es quizás la técnica electroanalítica más versátil para el estudio de especies electroactivas.

La VC es un método electroquímico que permite comprender los mecanismos de las reacciones redox, la reversibilidad de una reacción y la cinética de transferencia de electrones de una especie electroactiva en solución empleando parámetros obtenidos de los voltamogramas.

Esta técnica consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario primero en el sentido de la reducción de los complejos tornando más negativo el electrodo hasta alcanzar un potencial determinado, seguido de la oxidación donde el electrodo se torna más positivo hasta volver al valor inicial. Durante el barrido del potencial, el potenciostato del equipo registra la corriente resultante al potencial aplicado (E), así, se obtiene un gráfico conocido como voltamograma cíclico. La pendiente de la gráfica E vs. tiempo corresponde a la velocidad de barrido (V/s).

El comportamiento electroquímico de los compuestos de Au(I), se estudió por voltamperometría cíclica (VC) en un equipo *Metrohm 797 VA*, en medio aprótico, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, perclorato de tetrabutilamonio (PTBA 0,1 M) como electrolito de soporte, un alambre de platino como electrodo auxiliar, Ag/AgCl (KCl 3 M) como electrodo de referencia y electrodo de gota colgante de mercurio (HDME) como electrodo de trabajo. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente a concentración 1 mM de los compuestos. Las soluciones se desoxigenaron purgando con nitrógeno durante 5 minutos antes de cada medición y las señales obtenidas fueron procesadas en el programa *Origin 8.5*.

Se realizaron barridos en el rango de -0,65 a -1,75 V a diferentes velocidades desde 100 mV/s a 5000 mV/s para determinar la reversibilidad de las cuplas observadas, y poder determinar un posible mecanismo de acción de estos complejos.

En 1966, R. S. Nicholson estableció una manera de calcular el cociente I_{pa}/I_{pc} utilizando los valores de las corrientes desde el eje valor cero de corriente, haciéndolas independientes de la línea base, como se observa en la Ecuación 1. Esto se logra introduciendo las corrientes obtenidas de un determinado voltamograma en la siguiente ecuación, utilizando los valores absolutos de dichas corrientes [62].

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{(i_{pc})_0} + 0,485 \frac{(i_{ps})_0}{(i_{pc})_0} + 0,086 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

$(i_{pa})_0$ = intensidad de corriente de pico anódico desde el eje de valor de corriente cero.

$(i_{pc})_0$ = intensidad de corriente de pico catódico desde el eje de valor de corriente cero.

$(i_{ps})_0$ = intensidad de corriente de *switching* desde el eje de valor de corriente cero.

Los parámetros que se obtienen a partir de un voltamograma cíclico son los potenciales de pico anódico y catódico (simbolizado E_{pa} y E_{pc} , respectivamente), la diferencia entre dichos potenciales ($\Delta E = E_{pc} - E_{pa}$) y el cociente entre la corriente anódica y catódica (I_{pa}/I_{pc}). Tanto la diferencia de potenciales como el cociente entre la corriente anódica y catódica son índices de la reversibilidad del proceso.

A partir del análisis de los voltamogramas se puede determinar si las reacciones de transferencia electrónica ocurridas son de tipo reversible, cuasi reversible o irreversible.

1. Reacciones reversibles: $\Delta E = -56/n$ (V), donde n es el número de electrones transferidos en la etapa electroquímica; potenciales de pico catódico (E_{pc}) y anódico (E_{pa}) constantes en todo rango de velocidades de barrido de potencial; $(I_{pa}/I_{pc}) = 1$, para todas las velocidades de barrido.
2. Reacciones cuasi-reversibles: $\Delta E = -56/n$ (V) a bajas velocidades de barrido y aumenta a velocidades mayores; potenciales de pico catódico (E_{pc}) y anódico (E_{pa}) varían en todo rango de velocidades de barrido de potencial; (I_{pa}/I_{pc}) distinto de 1.

El voltamograma se aproxima a un sistema irreversible al aumentar la velocidad de barrido.

3. Reacciones irreversibles: ΔE distinto de $-56/n$ (V); potenciales de pico catódico (E_{pc}) y anódico (E_{pa}) varían en todo rango de velocidades de barrido de potencial; (I_{pa}/I_{pc}) distinto de 1, no hay corriente de barrido de vuelta.

Caracterización mediante Resonancia de Espín Electrónico

La Resonancia de Espín Electrónico (REE) es una técnica de detección de especies paramagnéticas como por ejemplo radicales libres, que son especies que tiene uno o más electrones desapareados en su estructura. En ausencia de campo magnético externo ($B=0$) el momento magnético de espín del electrón libre tiene igual energía, sin embargo, cuando se aplica un campo magnético externo (B distinto de 0) se produce un desdoblamiento de los estados de espín electrónicos, y por lo tanto se generan dos poblaciones de electrones que tienen diferente energía y presentan espines opuestos (Efecto Zeeman). Esta diferencia de energía entre estos dos estados de espín es proporcional a la fuerza del campo magnético aplicado. Y las transiciones entre los diferentes estados de espín son inducidas por radiaciones electromagnéticas de microondas.

Para detectar las especies radicalarias generadas por reducción electroquímica de los complejos estudiados, se realizó la reducción electroquímica *in situ*, utilizando como electrodo de trabajo un alambre de platino, como electrolito soporte perclorato de tetrabutilamonio (PTBA), como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Todos los compuestos fueron estudiados a una concentración 1 mM y aplicando el potencial determinado mediante VC, correspondiente al proceso de formación del radical nitro anión.

Los espectros de REE fueron registrados utilizando un espectrómetro *Bruker ECS 106* de banda X (9,85 GHz), el cual está equipado con una cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo.

Las constantes de acoplamiento hiperfino experimentales fueron obtenidas mediante la simulación de espectros, utilizando el programa *WINEPR-SimFonia 1.25* y estimadas con una precisión de 0,05 G.

Lipofilia

La lipofilia es una propiedad fisicoquímica importante de los fármacos que determina el comportamiento biológico, y particularmente está relacionada con el transporte transmembrana y la interacción con los receptores biológicos. Por tanto, la relación entre la actividad biológica y la lipofilia suele ser una característica relevante para estudiar.

El coeficiente de partición octanol-agua (P_{ow}), es ampliamente utilizado como una medida de la lipofilidad. El P_{ow} es una de las propiedades fisicoquímicas más comúnmente reportadas de fármacos y productos químicos industriales y, es la escala de facto más utilizada para establecer relaciones cuantitativas de estructura-actividad.

El P_{ow} está definido de manera logarítmica como:

$$\log P_{ow} = \log \frac{C_o}{C_w} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

C_o = Concentración de compuesto en la fase orgánica (octanol) cuando el sistema está en equilibrio.

C_w = Concentración de compuesto en la fase acuosa (agua) cuando el sistema está en equilibrio.

La lipofilia puede ser medida no sólo en sistema líquido-líquido sino también en sistemas sólido-líquido. De acuerdo con la recomendación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la cromatografía en capa fina (TLC) puede considerarse también una herramienta eficaz para la predicción de la lipofilidad. Este método indirecto es una de las técnicas más globalmente utilizadas en cuanto a lipofilia. El mecanismo de retención en RP-TLC se basa en la partición de la sustancia entre la fase estacionaria hidrófoba y la fase móvil

hidrófila, por lo que la retención generalmente está estrictamente correlacionada con la lipofilidad de los eluatos.

El parámetro básico de TLC es el factor de retardo (R_f) que se puede describir matemáticamente por la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{a}{b} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde a es la distancia desde el origen hasta el centro del punto de avance del eluato y b es la distancia desde el origen hasta el frente de la fase móvil. A pesar de que algunos autores utilizan directamente el factor de retardo R_f para la determinación de la lipofilidad, el procedimiento estándar se basa en los parámetros R_M , que es reconocido como parámetro cromatográfico de lipofilidad en TLC y fue definido por Bate-Smith y Westall como [63]:

$$R_M = \log \left[\left(\frac{1}{R_f} \right) - 1 \right] \quad \text{(Ecuación 4)}$$

I. Determinación del coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{ow})

Se utilizó el método *shake flask*, utilizando ambos solventes saturados uno con el otro, para asegurar que solo exista transferencia de compuesto de una fase a otra y no de solvente al momento de realizar la partición. Debido a la baja absortividad de los compuestos en agua, se midió la absorbancia solo en la fase orgánica (1-octanol).

Previo a la determinación de los coeficientes de partición se realizó la identificación de la longitud de onda máxima de absorción de los compuestos en 1-octanol saturado con agua Mili-Q en el rango UV-Visible, mediante barrido entre 300 a 800 nm, donde se observó que presentan una longitud de onda máxima de absorción ($\lambda_{m\acute{a}x.}$) en 375 nm.

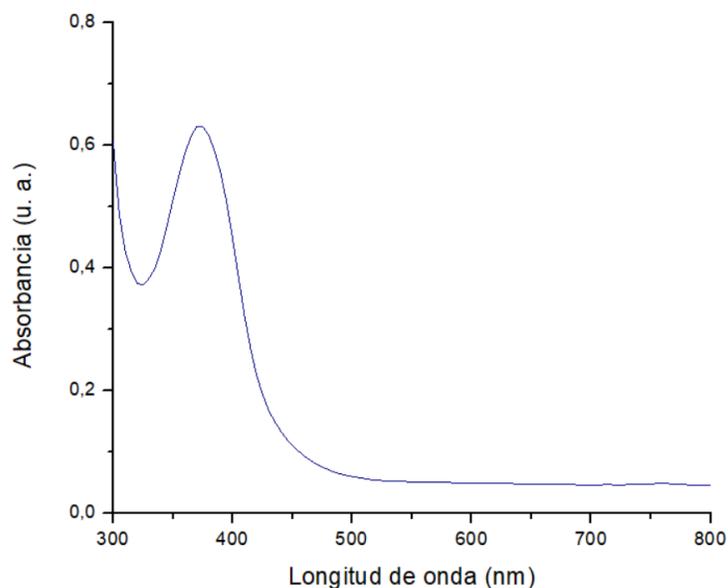


Figura 12. Espectro de absorción del compuesto A en 1-octanol saturado con agua Mili-Q a concentración 0,07 mM, representativo de todos los complejos estudiados.

Posteriormente se realizaron curvas de calibrado en 1-octanol saturado con agua Mili-Q. A partir de estas, se determinó el Límite de detección (LD) y el Límite de cuantificación (LC) del método mediante la medición de la absorbancia del blanco a 375 nm (1-octanol saturado sin compuesto), en decuplicado. El paso óptico será el correspondiente al sistema con 200 μL /pocillo, en todos los casos.

Para la realización de la curva de calibrado se consideraron 11 concentraciones entre 0,01 mM y 0,15 mM para el compuesto A, 11 concentraciones entre 0,05 mM y 0,30 mM para el compuesto B, 7 concentraciones entre 0,02 mM a 0,09 mM para el compuesto C y 8 concentraciones entre 0,01 mM a 0,09 mM para el compuesto D, a las cuales se le registró la absorbancia a 375 nm en quintuplicado (200 μL /pocillo). La curva de calibrado fue realizada para valores de absorbancia en el rango 0,2-0,9, en espectrómetro de placas *Synergy HTX*.

Finalmente, el coeficiente de partición de los compuestos se determinó considerando una relación de volúmenes 1:1 (1-octanol : agua Mili-Q), a 3 concentraciones diferentes de compuesto, en duplicado cada una. Se colocó en placas transparentes de 96 pocillos, 200 μL /pocillo de la fase orgánica, solución *stock* de concentración conocida y blanco (fase orgánica sin compuesto), todos en quintuplicado. Se registraron los espectros de absorción

(300-800 nm) y se identificó el valor de absorbancia a 375 nm. Con estos datos, se obtuvo un promedio de los valores de absorbancia de cada compuesto en la fase orgánica y en la solución *stock*. Estos valores de absorbancia se interpolaron en la recta de la curva de calibrado de cada compuesto y se obtuvo cada valor de concentración (mM) en la fase orgánica y la concentración real de la solución *stock* para cada partición.

Con estos valores de concentración obtenidos, y considerando que no hubo pérdida en la interfase, se calculó el coeficiente de partición (P_{ow}) para cada compuesto mediante la siguiente ecuación:

$$P_{ow} = \frac{[\]_{oct,eq}}{[\]_{oct,t=0} - [\]_{oct,eq}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$[\]_{oct,eq}$ = Concentración de compuesto en 1-octanol saturado en el equilibrio.

$[\]_{oct,t=0}$ = Concentración de compuesto en 1-octanol saturado a tiempo $t=0$ (Solución *stock* de concentración conocida).

II. Determinación de la lipofilia mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La lipofilia de los compuestos A-D y ligantes libres HLA-HLD se determinó mediante TLC en fase reversa (TLC sílice gel 60 RP-18 F_{254s}) que pueden considerarse para simular lípidos de membranas o receptores biológicos. Se utilizó como fase móvil DMSO/PBS (PBS: Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; pH=7,4) (80/20 v/v). Las soluciones de los compuestos A-D y ligantes libres se prepararon en acetona antes de su sembrado.

Las placas corrieron en un tanque cromatográfico cerrado, luego se secaron, y las manchas de la elución de los compuestos y ligantes libres se visualizaron bajo luz ultravioleta a 254 nm. Se calcularon los valores de R_f para los compuestos A-D y ligantes libres HLA-HLD, los cuales se promediaron a partir de tres determinaciones independientes y se obtuvieron los valores de R_M utilizando la Ecuación 4.

Citotoxicidad sobre tripomastigotes de *T. cruzi* y células de mamífero VERO®

Los ensayos biológicos tienen por objetivo determinar la citotoxicidad de los compuestos en estudio, para esto se debe determinar la concentración del compuesto necesaria para inhibir un proceso biológico o componente en un 50% llamado IC₅₀.

Para cuantificar el número de células viables, se empleó la técnica colorimétrica de reducción de sales de tetrazolio (MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) al compuesto denominado azul de formazán, el cual es insoluble en agua y de color violeta. El MTT es un reactivo amarillo, soluble en agua y que difunde fácilmente la membrana plasmática y se incorpora al interior de las células. El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica de MTT a cristales de formazán realizado por células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial de estas. Dado que, para la mayoría de las poblaciones de células, la actividad mitocondrial está relacionada con el número de células viables, este ensayo se usa ampliamente para medir los efectos citotóxicos *in vitro* de drogas sobre líneas celulares. Por esto, la producción de azul de formazán en un cultivo celular es proporcional al número de células viables, por lo que tras lisar las células y solubilizar el colorante, es posible cuantificar la cantidad de células viables mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm.

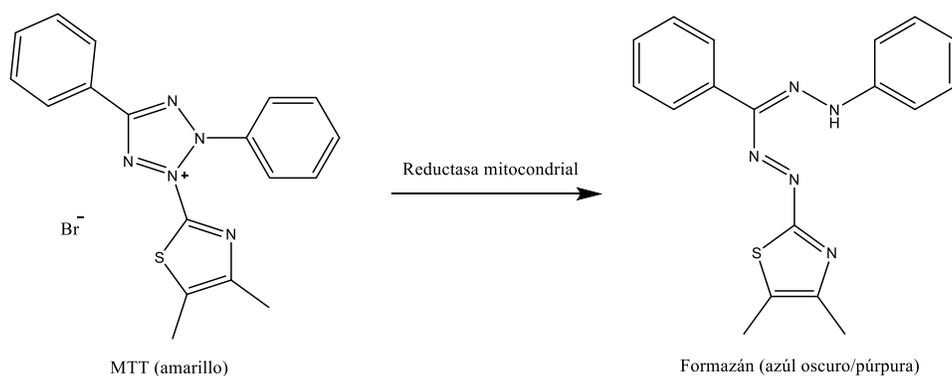


Figura 13. Reacción química de reducción mitocondrial de MTT a formazán.

Los cultivos celulares de *T. cruzi* en el estadio morfológico tripomastigote (cepa Dm28) y de fibroblasto de mono verde africano (VERO®), se obtuvieron del Laboratorio de Mecanismos de la Infección Parasitaria (LMIP) del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

I. Citotoxicidad en tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28

Para la obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*, células VERO® en semi-confluencia fueron infectadas con 1 a 2 mL de medio con tripomastigotes de la cepa Dm28 provenientes de un cultivo anterior. De esta forma, los tripomastigotes invaden a las células VERO®, se diferenciaron intracelularmente a amastigotes, proliferaron y posteriormente (luego de 48-96 horas) se diferenciaron nuevamente a tripomastigotes, que lisaron las células VERO® y fueron liberados al medio de cultivo.

Los cultivos se mantuvieron en medio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640, Gibco®), suplementado con estreptomicina (50 µg/mL), penicilina (50 UI/mL), y suero fetal bovino inactivo (SFBi) al 5 %, con 5 % de CO₂ a 37 °C. Días después de la infección, se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 2500 rpm (revoluciones por minuto) por 5 minutos, para separar detritus celular. A continuación, se centrifugó el sobrenadante a 6000 rpm por 10 minutos, para obtener el *pellet* de tripomastigotes. El *pellet* fue resuspendido en RPMI 1640, sin rojo fenol, para alcanzar una densidad de 1×10^7 parásitos/mL, los que fueron incubados con los compuestos en estudio previamente disueltos en DMSO, alcanzando una concentración final de este solvente de 0,5 % v/v. Los compuestos en estudio se ensayaron a 5 concentraciones de 1 µM a 100 µM para los compuestos A, B y C y a 5 concentraciones de 10 µM a 100 µM para el compuesto D, así como con Nifurtimox 15 µM como control positivo (CP), en microplacas de 96 pocillos durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂.

Transcurrido este tiempo, alícuotas de 100 µL de suspensión de parásitos tratados con distintos compuestos, fueron incubadas con 10 µL de la solución MTT (5 mg/mL) y fenazina (0,22 mg/mL) durante 3 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Luego, el precipitado de los cristales de formazán fue solubilizado con 100 µL de una solución de SDS al 10 % en HCl 0,01 N durante toda la noche a 37 °C y 5 % CO₂. La producción de formazán se midió a 570 nm en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode* (Thermo Fisher®). Los parásitos no tratados se usaron como controles negativos (100 % de viabilidad). La viabilidad celular fue estimada como el porcentaje de la absorbancia con relación a la absorbancia del control, luego de un tratamiento de datos. Posteriormente fue evaluada la actividad tripanocida mediante la determinación del IC₅₀, utilizando el software *Prism 6 GraphPad*. Los resultados se reportaron como valores IC₅₀.

II. Citotoxicidad en célula de mamífero sana (VERO®)

Células VERO® (fibroblasto de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* ATCC® CCL-81TM) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 75 cm² (250 mL) con medio RPMI 1640 suplementado con estreptomicina (50 µg/mL), penicilina (50 UI/mL), y SFBi al 5 %, a 37 °C en un ambiente humedecido con CO₂ al 5 %, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas.

Las células fueron cosechadas y contadas en una cámara de Neubauer, previo a los experimentos, y resuspendidas a una densidad final de 5x10⁵ células/mL. Posteriormente fueron sembradas e incubadas durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂ en conjunto con los compuestos (los cuales fueron previamente disueltos en DMSO, alcanzando una concentración final de este solvente de 0,5 % v/v). Las células fueron incubadas durante 24h con compuestos en estudio a diferente concentración (1 a 100 µM), en triplicado cada una de ellas, y se utilizó como control positivo (CP) Tritón X-100 al 1 % y se determinó la viabilidad celular mediante el método de reducción de sales de tetrazolio (MTT).

Al terminar el periodo de incubación se agregó 5 mg/mL de MTT y se incubó durante 3 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Finalmente, el formazán que se produjo fue solubilizado con SDS al 10 % en HCl 0,01 N y se incubó por 12 horas a 37 °C. Posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas *Asys Expert Plus*®. La absorbancia es directamente proporcional al número de células viables al momento de agregar el MTT. Las células a las que no se adicionó ningún compuesto fueron utilizadas como control negativo, correspondiente al 100 % de viabilidad. Los resultados obtenidos fueron procesados en el programa *Prism 6 GraphPad*.

Determinación de especies radicalarias intraparasitarias mediante espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico a través de *Spin Trapping*

La detección directa de radicales libres por REE solo es posible si los radicales son producidos en concentraciones relativamente altas en la cavidad del equipo mediante una radiación *in situ* o por sistemas de mezclado por flujos. Lamentablemente, los radicales libres de mayor interés biológico presentan tiempos de vida media muy cortos que van de los

milisegundos a los nanosegundos, lo que imposibilita su correcta caracterización y por lo tanto resulta difícil su estudio. En general para estos casos y en particular para estudiar la generación de especies radicalarias en sistemas biológicos fue necesario utilizar la técnica de atrapamiento de espín (*Spin Trapping*). En esta técnica se emplean atrapadores de espín (*spin traps*). El uso de atrapadores de espín se basa en la adición de radicales libres a compuestos tales como nitroso compuestos y nitronas. El producto de la reacción del radical libre con el atrapador (silente a la REE) genera un nitróxido conocido como aducto de espín, el cual presenta un tiempo de vida media considerablemente mayor al del radical libre sin atrapar, lo que permite el estudio de radicales libres en medio biológico.

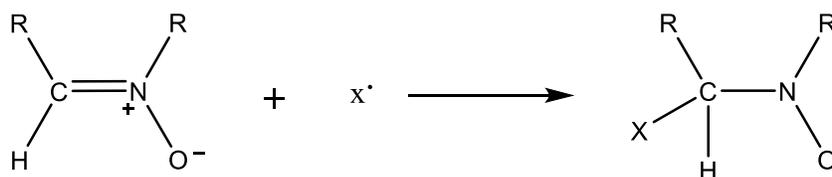


Figura 14. Representación generalizada para la reacción entre una nitrona y un radical libre formando el aducto de espín.

Las nitronas son los atrapadores de radicales libres más usados en la actualidad, debido a que permiten caracterizar radicales libres de interés biológico como el radical hidroxilo y el anión radical superóxido. Uno de los atrapadores de espín más usados es el N-óxido-5,5-dimetil-1-pirrolina, DMPO.

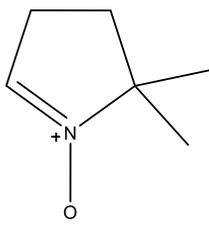


Figura 15. Estructura del N-óxido-5,5-dimetil-1-pirrolina o DMPO.

Para el ensayo se utilizó 240×10^6 tripomastigote/mL de *T. cruzi* cepa Dm28, suspendidos en RPMI 1640, suplementado con NaHCO_3 (2 mg/mL), estreptomina (50 $\mu\text{g/mL}$), penicilina (50 UI/mL) y SFBi al 5 % y 100 mM de DMPO como atrapador de espín, 1mM de NADPH que favorece la biorreducción del grupo nitro. Se añadió 1 mM de cada complejo a estudiar en DMSO.

Los espectros de REE fueron registrados utilizando un espectrómetro *Bruker ECS 106* de banda X (9,85 GHz), el cual está equipado con una cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Las constantes de acoplamiento hiperfino experimentales fueron obtenidas mediante la simulación de espectros, utilizando el programa *WINEPR-SimFonia 1.25* y estimadas con una precisión de 0,05 G.

Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28

Para el estudio de generación de especies reactivas de oxígeno en tripomastigotes se empleó la sonda DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), que es un compuesto no iónico y apolar que atraviesa las membranas celulares y es hidrolizado enzimáticamente por esterasas intracelulares mediante escisión de enlaces acetilo a DCFH (2',7'-diclorodihidrofluoresceína) no fluorescente. En presencia de especies reactivas de oxígeno, la DCFH se oxida rápidamente a DCF (2',7'-diclorofluoresceína) la cual es altamente fluorescente, y su intensidad se puede registrar con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Por lo que el propósito de este método es cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno generadas en medio intracelular mediante el uso de la sonda DCFH-DA.

Se utilizó suspensiones celulares a densidad de 1×10^7 tripomastigotes/mL, los que fueron incubados en placas de 96 pocillos con solución de DCFH-DA (20 μM) durante 15 min a 37 °C y 5 % CO_2 , se centrifugaron y se lavaron con tampón fosfato salino (pH 7,4). Así, las células cargadas con DCFH-DA y transferidas a una placa de 96 pocillos de fluorescencia Nunc[®] se incubaron a dos concentraciones distintas para cada compuesto, en triplicado cada una de ellas:

Compuesto A: 10 μM y 24,5 μM (IC_{50} *T. cruzi*)

Compuesto B: 1 μM y 10,3 μM (IC_{50} *T. cruzi*)

Compuesto C: 1 μM y 9,9 μM (IC_{50} *T. cruzi*)

Compuesto D: 10 μM y 49,1 μM (IC_{50} *T. cruzi*)

Se utilizó como control positivo Nifurtimox a 10 μM (IC_{50} *T. cruzi*) y 100 μM .

Posteriormente se registró la fluorescencia (excitación: 488 nm / 20 nm, emisión: 528 nm / 20 nm) durante 60 minutos utilizando un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode* (Thermo Fisher®). El área bajo la curva de fluorescencia relativa se calculó usando el software *Origin 8.58* y se normalizó vs. el control. Los resultados de tres experimentos independientes (n=3) se presentan como promedio con su desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Caracterización electroquímica mediante Voltamperometría Cíclica

Se realizó el estudio electroquímico de estos complejos de Au(I) para evaluar la influencia de la cadena lateral de los ligantes y del metal central en la capacidad oxidante de los complejos. De acuerdo con la literatura un posible mecanismo de acción tripanocida de las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído corresponde a la generación de estrés oxidativo intraparasitario [12;13;33;34;44;48;52;64].

Debido a la presencia del grupo nitro en las moléculas, un grupo electroattractor, resulta interesante estudiar el mecanismo de reducción de estos complejos, mediante la identificación de los potenciales de reducción, para posteriormente comparar con los ligantes libres reportados [65]. El potencial de reducción da cuenta de la energía necesaria para que un compuesto capte electrones, así como también nos permite estudiar la reversibilidad de este proceso. Paralelamente, podemos obtener información respecto del mecanismo de acción dado su interés biológico.

En la Figura 16 se presenta el voltamograma cíclico del compuesto B, registrado en una ventana de potencial de -0,65 a -1,75 V, a diferentes velocidades de barrido, con 1 y 2 *scan*. Este voltamograma, representativo para los demás compuestos estudiados en este trabajo, da cuenta de una dependencia entre la velocidad de barrido y la intensidad de corriente, lo cual está explicado mediante la ley de Fick (Ecuación 6), donde J corresponde al flujo de especies por unidad de tiempo y superficie, D es el coeficiente de difusión y $\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)$ da cuenta de la variación de concentración c a lo largo de una distancia x desde la superficie del electrodo. Así, mientras mayor sea la velocidad de barrido la reducción de especies reaccionantes será más próxima a la superficie del electrodo y por lo tanto la derivada tendrá un mayor valor.

$$J = -D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad \text{(Ecuación 6)}$$

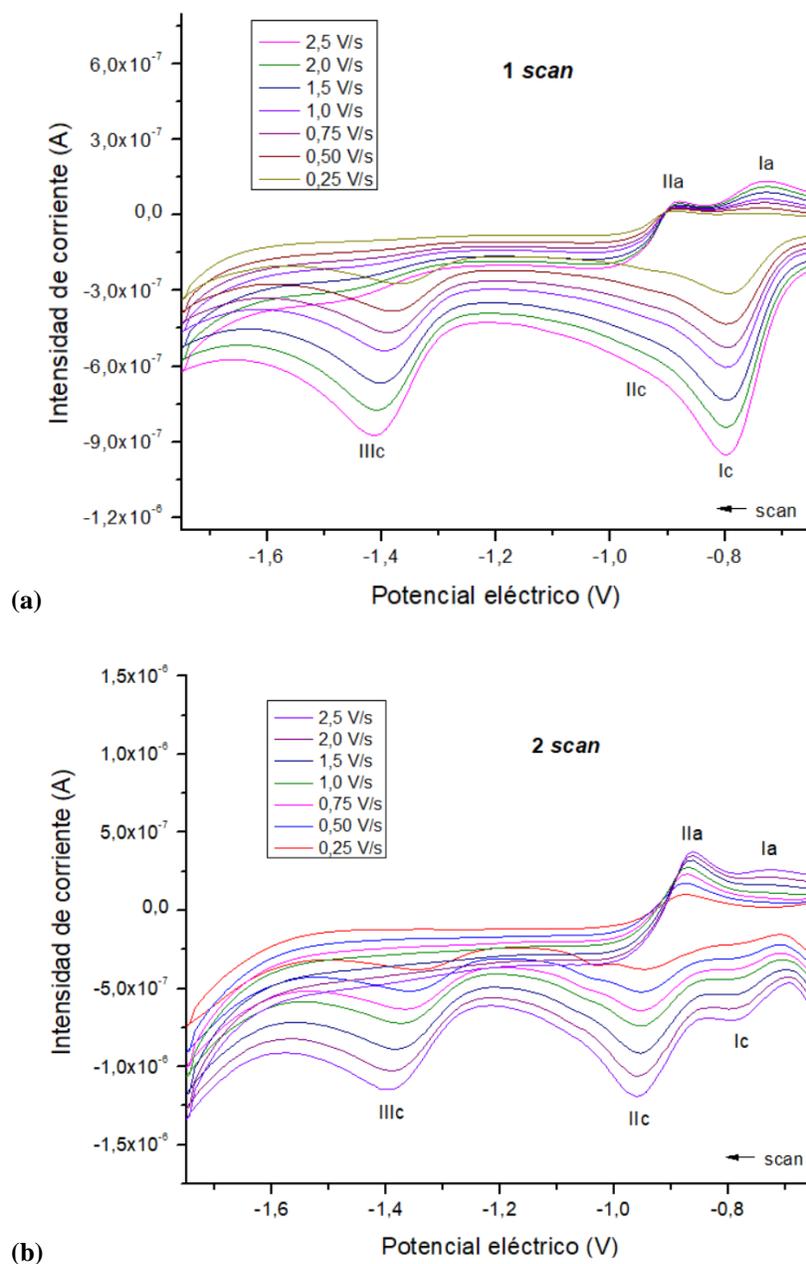


Figura 16. Voltamogramas cíclicos del complejo B 25 mM (PTBA 0,1 M en DMSO) a diferentes velocidades de barrido, realizado con: (a) 1 *scan* y (b) 2 *scan*.

Considerando la literatura reportada para los ligantes libres [34] y para otros complejos metálicos de estos ligantes, se observa la señal correspondiente a la reducción monoelectrónica cuasi-reversible del radical nitro anión, señalada como IIc con su respectiva contraparte anódica IIa, intensificándose en barridos sucesivos respecto del primero. Adicionalmente, se observa la señal IIIc característica de la reducción de tres electrones del

radical nitro anión a hidroxilamina, irreversible. Por otra parte, es posible determinar otra señal catódica I_c previa a la formación del radical nitro anión, que disminuye en intensidad con barridos sucesivos y que da cuenta de una reducción paralela del grupo nitro de una pequeña parte de moléculas en la superficie del electrodo [34].

De este modo, es posible confirmar la presencia de las 3 señales catódicas determinadas mediante voltamperometría cíclica (Figuras 16 y 17), con 2 *scan*. Estas tres señales son características de los ligantes libres según la literatura [34]. En el ligante libre las señales están cercanas en valor a las observadas en los complejos de Au(I) (+0,1 V vs. ligante libre), lo que da cuenta de un efecto del centro metálico sobre el potencial de reducción de estos complejos. Las señales apreciadas para los complejos estudiados con 2 *scan* a velocidad de barrido de 1,0 V/s se registran en la Tabla 1.

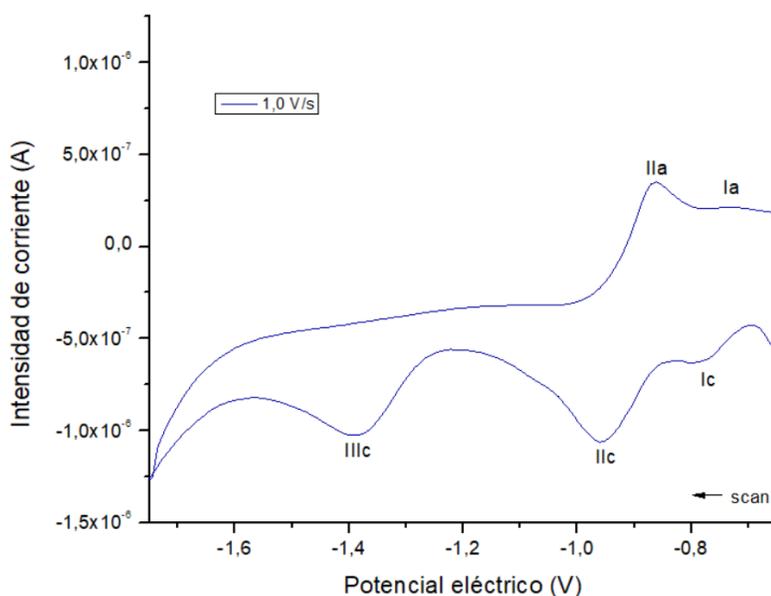


Figura 17. Voltamograma cíclico de 2 *scan* del complejo B 25 mM (PTBA 0,1 M en DMSO) a 1,0 V/s.

Tabla 1. Potenciales eléctricos asociados a señales identificadas, para todos los complejos.

Complejo	Ep I_c (V)	Ep I_a (V)	Ep IIc (V)	Ep IIa (V)	Ep $IIIc$ (V)
A	-0,80	*	-0,96	-0,89	-1,38
B	-0,80	-0,73	-0,95	-0,89	-1,39
C	-0,79	-0,72	-0,93	-0,87	-1,35
D	-0,75	-0,74	-0,92	-0,86	-1,38

*: no fue posible determinar este valor

En la Figura 18 se presenta la cupla aislada con 2 *scan* asociada a la reducción del grupo nitro para generar el radical nitro anión, correspondiente a la cupla I₂c/I₂a, a diferentes velocidades de barrido.

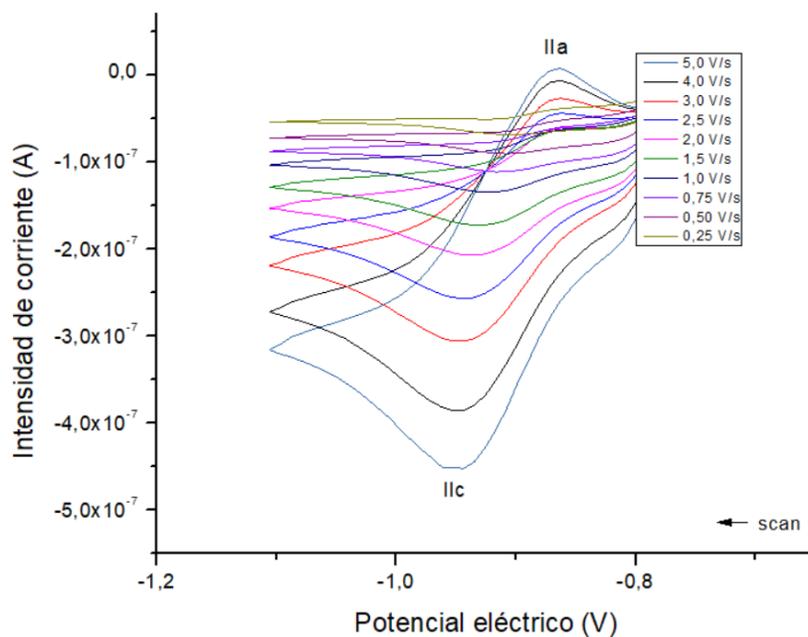


Figura 18. Voltamograma cíclico de 2 *scan* de cupla aislada de generación de radical nitro anión del complejo B 25 mM, a diferentes velocidades de barrido (PTBA 0,1 M en DMSO).

En la Figura 18 se observa la cupla aislada correspondiente a la generación del radical nitro anión, cuyos parámetros electroquímicos se registran en la Tabla 2, donde E_p I₂c corresponde al potencial catódico, E_p I₂a corresponde al potencial anódico, ΔE corresponde a la diferencia de potencial catódico y anódico e I_{pa}/I_{pc} corresponde a la razón de corrientes anódica y catódica, obtenidas mediante la Ecuación 1. El valor del potencial de reducción está relacionado con la factibilidad de generar el radical nitro anión, con relevancia biológica [34;37].

Tabla 2. Parámetros electroquímicos para la cupla de generación del radical nitro anión, para todos los complejos, a 1,0 V/s.

Complejo	Ep IIc (V)	Ep IIa (V)	ΔE (V)	Ipa/Ipc
A	-0,910	-0,864	-0,046	0,85
B	-0,939	-0,885	-0,054	0,89
C	-0,932	-0,871	-0,061	0,94
D	-0,953	-0,889	-0,064	0,88

Mediante la adición de hidróxido de sodio en cantidad equimolar en un barrido cíclico a 1,0 V/s (Figura 19), en 1 y 2 *scan*, se aprecia una disminución en la intensidad de corriente de la señal Ic, lo que da cuenta de que hay una reacción química paralela asociada al mecanismo de reducción del grupo nitro, en menor proporción por la intensidad de la señal luego de barridos sucesivos. Consecuentemente, aumenta la intensidad de la señal IIc a partir del segundo *scan*, lo que indicaría que existe una mayor cantidad de reactivo disponible para ese proceso, luego de apagarse el proceso antes mencionado. Según esta observación, y datos reportados para ligantes libres [34;37], es posible asignar las siguientes señales relacionadas al ligante:

- Señal Ic: autoprotonación del grupo nitro, alrededor de -0,79 V.
- Cupla IIc/IIa: generación del radical nitro anión, alrededor de -0,93 V.
- Señal IIIc: generación de hidroxilamina, alrededor de -1,38 V.
- Señal Ia: oxidación de hidroxilamina a nitroso compuesto alrededor de -0,73 V.

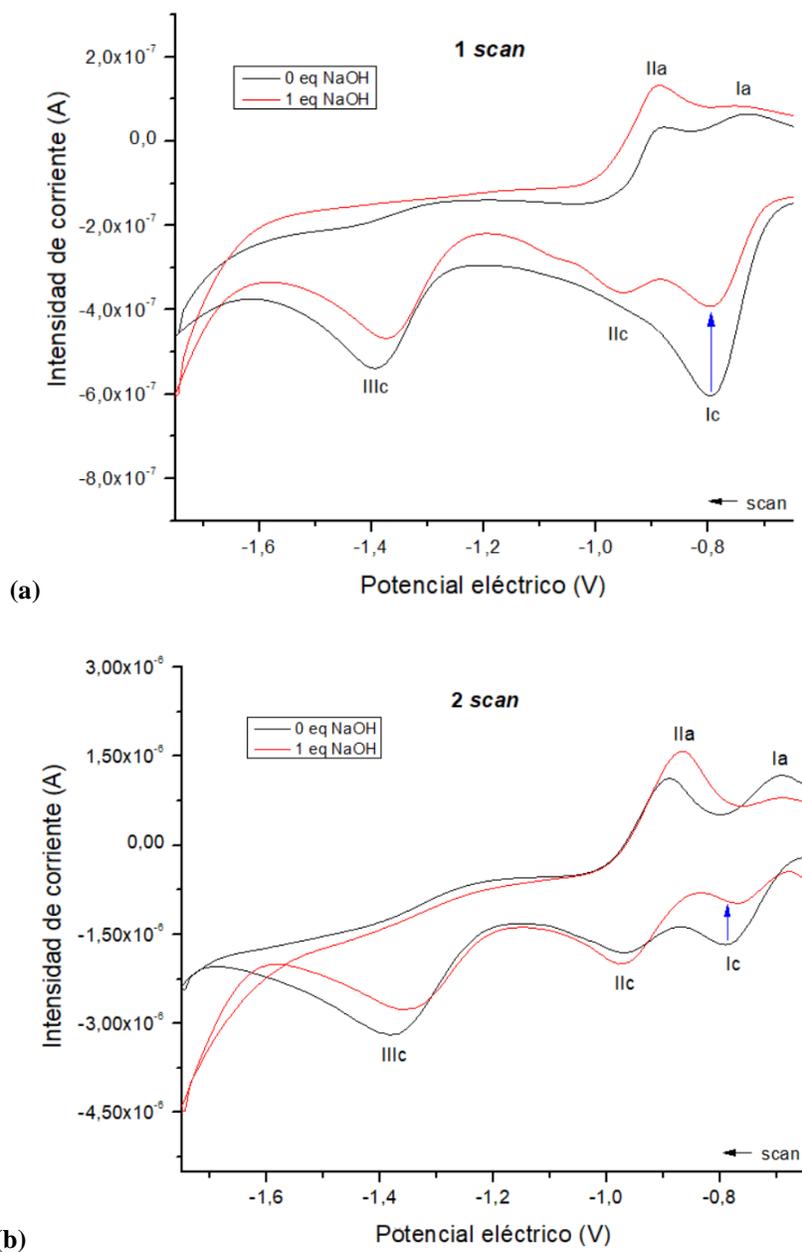


Figura 19. Influencia de la adición equimolar de NaOH en el voltamograma cíclico del complejo B 25 mM a una velocidad de barrido de 1,0 V/s (PTBA 0,1 M en DMSO), realizado con: (a) 1 *scan* y (b) 2 *scan*.

Respecto de los valores de potencial de reducción del grupo nitro descritos para los ligantes libres [37], alrededor de -1,03 V, los potenciales de reducción en estos complejos resultan ser muy similares con una variación de +0,1 V, lo cual da cuenta de una similar facilidad en la formación de este radical nitro anión en los complejos de Au(I) vs. el ligante libre. En este

sentido, el metal Au(I) tiene un efecto en la variación del potencial de reducción del grupo nitro. Con este antecedente, y considerando que según la Tabla 2, la generación del radical nitro anión corresponde a una reacción cuasi-reversible de transferencia de un solo electrón, se propone una mayor facilidad en la formación del radical nitro anión también respecto del fármaco de referencia Nifurtimox (-1,14 V) [37].

En nuestro grupo de investigación se han ensayado compuestos de paladio, platino y rutenio con ligantes tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído con valores de potencial de reducción del grupo nitro menores en valor absoluto ($\sim 0,3$ V) a los de estos compuestos de Au(I), sin embargo, han resultado ser muy tóxicos en modelos de célula sana en estudios *in vitro* [12;13]. La mayor facilidad de reducir al grupo nitro en formación de complejos metálicos estaría explicada por la capacidad electroattractora del metal central, efecto que el Au(I) ejerce en menor proporción que los demás metales probablemente porque el ligante tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído coordina monodentado, distinto a lo estudiado anteriormente por nuestro grupo. Además, el centro metálico tiene estado de oxidación +1, diferente a lo estudiado anteriormente con estados de oxidación +2 o más. Estos aspectos cambian la capacidad electroattractora del metal, la cual es probablemente menor en estos complejos de Au(I).

Por otra parte, el centro metálico Au(I) favorece la labilidad del protón que se encuentra en el nitrógeno hidracínico, el cuál es lábil por sí mismo en el ligante libre dada la capacidad electroattractora del grupo nitro sobre la cadena de tiosemicarbazona. Así, Au(I) aumentaría esta labilidad favoreciendo el proceso de que una pequeña parte de moléculas de complejo en la superficie del electrodo, en medio aprótico, sean reducidas a hidroxilamina utilizando los protones cedidos por el resto de las moléculas en solución [34]. Esto justifica un consumo en la autoprotónación de los complejos *vs.* los ligantes libres, por lo que se observa una mayor intensidad de señal I_c en 1 *scan*, la que decae en intensidad con barridos sucesivos. Así, el centro metálico Au(I) favorecería la especie deprotonada luego de 1 *scan*, consecuentemente, existiría una mayor proporción de radical nitro anión formado en *scan* sucesivos.

En síntesis, se propuso un mecanismo de reducción (Figura 20) para los complejos de Au(I) estudiados en este trabajo, los que experimentan un proceso de autoprotónación

independiente de la reducción del grupo nitro, con potenciales alrededor de 0,1 V menores en valor absoluto que los ligantes libres de referencia.

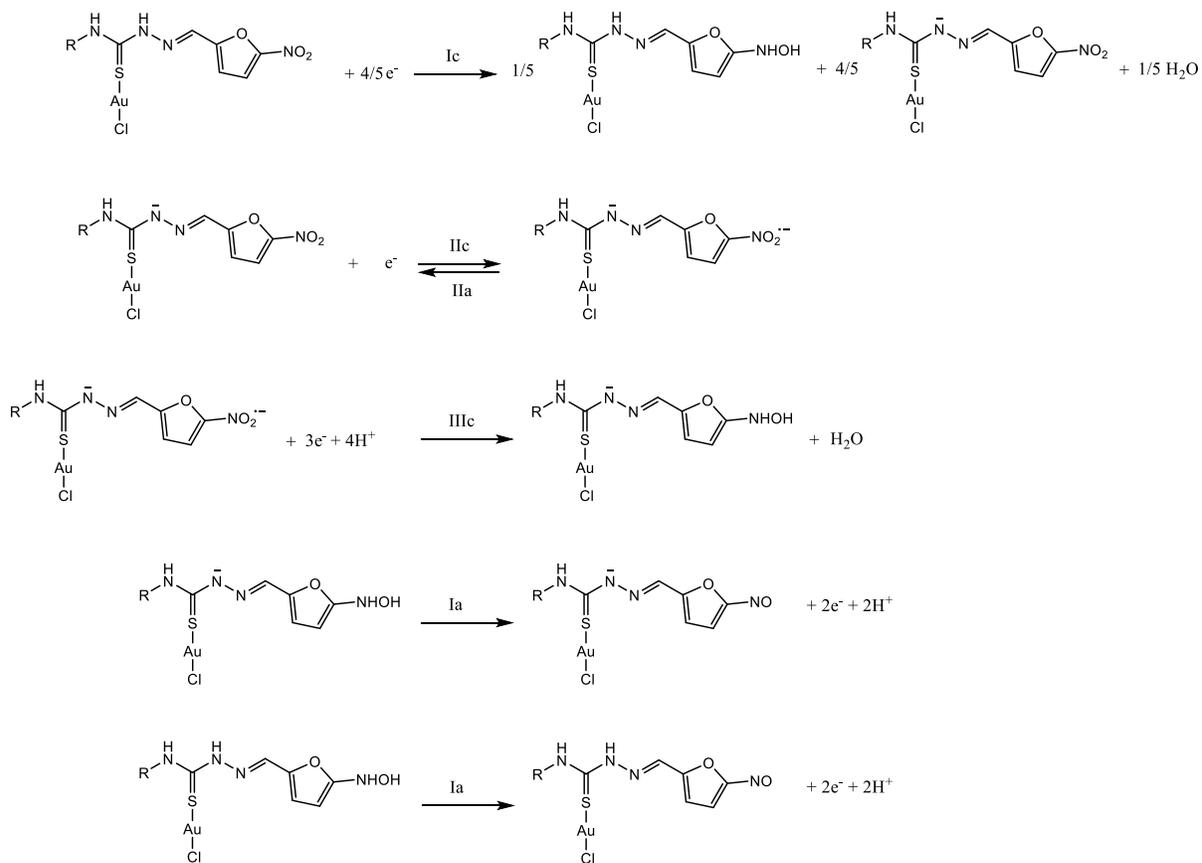


Figura 20. Mecanismo de reducción de los complejos de Au(I) propuesto.

Caracterización mediante Resonancia de Espín Electrónico

Para caracterizar el radical nitro anión generado mediante la reducción electroquímica de los complejos, se realizó la generación electrolítica *in situ* a los potenciales obtenidos bajo condiciones iguales que en voltamperometría cíclica. Luego de generar las especies radicalarias *in situ*, en la cavidad del espectrómetro de Resonancia de Espín Electrónico (REE), se registró un espectro a campo magnético variable, para determinar mediante simulación las constantes de acoplamiento hiperfino, considerando la literatura [34;44;64;66]. Lo más común en compuestos nitro heterocíclicos es que los radicales libres formados deslocalizan el electrón desapareado mayormente en el nitrógeno del grupo nitro [37].

La Figura 21 muestra un esquema de los complejos estudiados identificando en color rojo la numeración de los núcleos paramagnéticos cuyas constantes de acoplamiento se registran en la Tabla 3 y fueron obtenidas de los espectros de REE del radical obtenido experimentalmente (Figura 22a), simulado a partir de la literatura reportada para el ligante libre (Figura 22b). Por otra parte, en colaboración con el Laboratorio MACEDONIA del Dr. Germán Barriga, del Departamento de Química de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, determinamos que la estructura de estos ligantes es lineal a lo largo de la cadena, y se obtuvo un espectro teórico (Figura 22c), cuyos datos no se presentan en el actual trabajo. Estos espectros fueron calculados en condiciones de vacío, lo que explica la diferencia en el ancho de líneas con el espectro experimental.

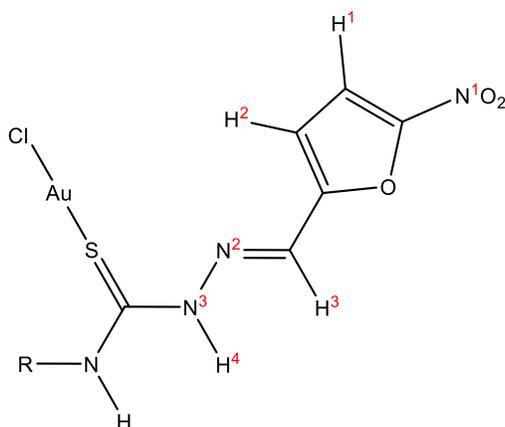


Figura 21. Estructura general de los compuestos estudiados, donde R: H; Me, Et, Ph, y la numeración está asociada a los núcleos paramagnéticos en que se deslocaliza en electrón.

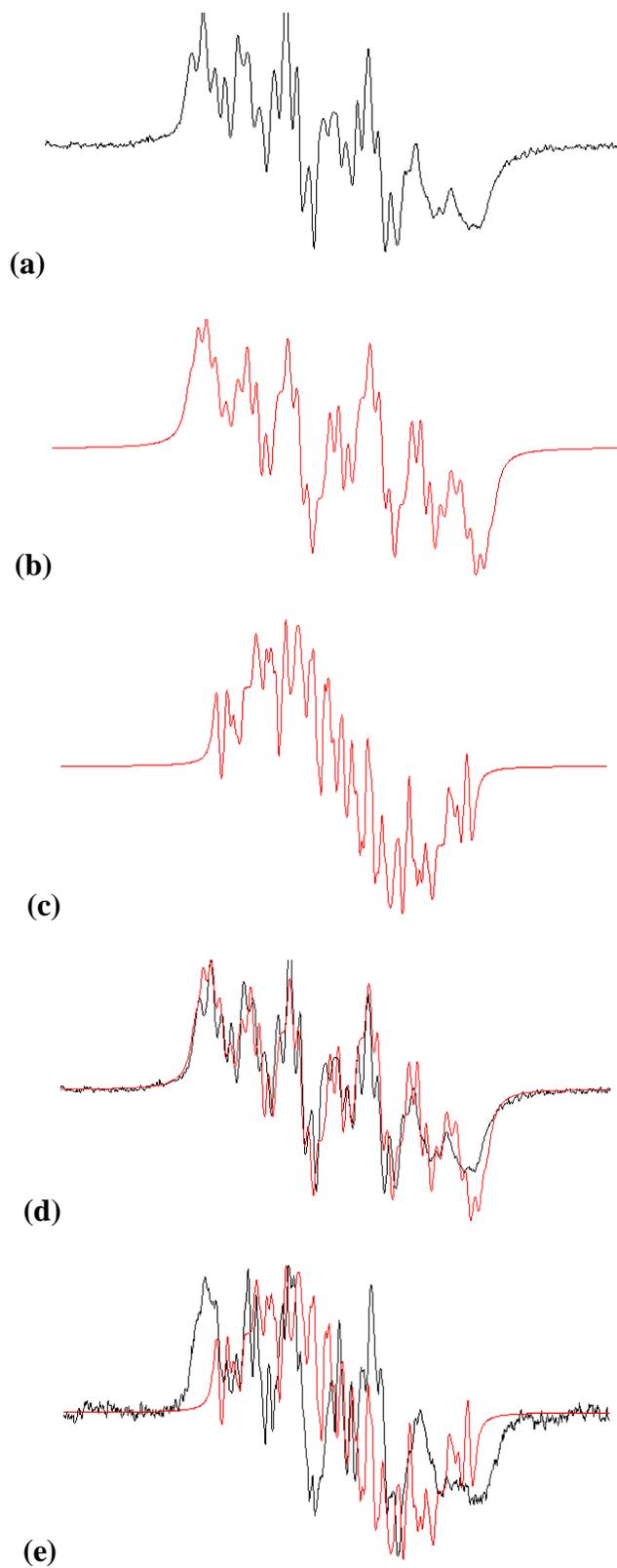


Figura 22. Espectro de REE del compuesto B: **(a)** espectro experimental; **(b)** espectro simulado; **(c)** espectro teórico; **(d)** superposición de espectros experimental y simulado; **(e)** superposición de espectros experimental y teórico.

Tabla 3. Constantes de acoplamiento hiperfino (G), determinadas mediante simulación, para complejos estudiados mediante REE realizando generación electroquímica *in situ*, con precisión de 0,05 G.

Complejo	aN ¹	aN ²	aN ³	aH ¹	aH ²	aH ³	aH ⁴
A	8,55	1,09	0,88	5,20	3,28	0,83	0,67
B	9,16	1,07	0,98	5,42	3,35	0,53	0,46
C	9,05	1,05	0,94	5,43	3,30	0,96	0,80
D	8,20	1,07	0,90	5,10	3,40	0,90	0,90

Todos los complejos presentan un espectro simulado con patrón hiperfino de 3 tripletes asignados al efecto que provocan los nitrógenos N¹ (nitro), N² y N³ de la tiosemicarbazona y de 4 dobletes asignados al efecto provocado por los hidrógenos H¹ y H² (anillo furano), H³ y H⁴ (tiosemicarbazona). Las constantes de acoplamiento registradas indican la existencia de una mayor deslocalización del electrón desapareado fundamentalmente en el nitrógeno N¹ del grupo nitro del anillo furano; esto fue corroborado en colaboración con el grupo del Dr. Barriga, quienes mediante estudios teóricos concluyeron que los ligantes en estas moléculas son lineales. Los valores de las constantes de acoplamiento van disminuyendo a lo largo de la cadena a medida que se van alejando del grupo nitro, por lo que la transferencia de carga ocurre a lo largo de la cadena desde el grupo nitro. El patrón hiperfino y las constantes de acoplamiento determinadas tienen similitudes con el patrón hiperfino descrito para el ligante libre [34].

Según la teoría ácido-base duro-blando, Au(I) corresponde a un ácido de Lewis blando y fácilmente polarizable que tiende a formar enlaces de tipo covalente. El efecto del cloruro en la estructura es aumentar el tamaño y la polarizabilidad de los complejos, haciendo ligeramente más fácil así la reducción del grupo nitro en los complejos (potenciales de reducción más cercanos a cero), lo que se relaciona con un aumento en los valores de constantes de acoplamiento hiperfino respecto de los ligantes libres. Resulta interesante plantear que intercambiar el cloruro por otro halogenuro de mayor polarizabilidad, podría mejorar este aspecto fisicoquímico en la generación del radical nitro anión, dada la influencia del centro metálico sobre la polarizabilidad del complejo, según el análisis descrito en el estudio electroquímico.

Lipofilia

I. Determinación del coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{ow})

Utilizando el método *shake flask* [67] se determinaron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del método utilizando un blanco definido por solo solvente saturado, a la longitud de onda de trabajo, en decuplicado. El paso óptico es el correspondiente al sistema con 200 μL /pocillo, en todos los casos. Para determinar el coeficiente de partición 1-octanol/agua (P_{ow}) se realizaron curvas de calibrado en rango de absorbancia 0,1 a 1,2 para los complejos A y D, y en rango de absorbancia 0,1 a 0,8 para los complejos B y C, debido a la linealidad obtenida para cada compuesto. Los límites obtenidos como concentración y las curvas de calibrado se registran en la Tabla 4.

Tabla 4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) junto a curvas de calibrado en 1-octanol, para los complejos estudiados.

Complejo	Concentración LD (μM)	Concentración LC (μM)	Curva de calibrado absorbancia (u. a.) vs. concentración (μM)	Coefficiente de correlación (R^2)
A	6,57	7,01	$y=7,1774x+0,0044$	0,9969
B	9,42	11,08	$y=2,1796x+0,0316$	0,9971
C	4,06	4,83	$y=4,5495x+0,0334$	0,9975
D	4,71	5,28	$y=14,416x-0,0139$	0,9911

Se utilizaron tres concentraciones conocidas (*stock*) para cada complejo, en duplicado, para evaluar el coeficiente de partición 1-octanol/agua Mili-Q (P_{ow}), utilizando la Ecuación 5. Los valores obtenidos de P_{ow} se presentan como un promedio junto a su desviación estándar en la Tabla 5.

Tabla 5. Coeficientes de partición 1-octanol/agua Mili-Q (P_{ow}) determinados para los complejos estudiados.

Complejo	P_{ow}	$\log(P_{ow})$	Masa Molar (g/mol)
A	0,49 \pm 0,05	-0,31 \pm 0,04	446,62
B	0,78 \pm 0,30	-0,14 \pm 0,19	460,57
C	1,20 \pm 0,56	0,03 \pm 0,24	474,67
D	1,92 \pm 0,60	0,26 \pm 0,16	522,72

El método utilizado tiene un rango de validez de -2 a 4,5 unidades de P_{ow} y los valores obtenidos deben estar dentro de un rango de $\pm 0,3$ unidades logarítmicas [67], por lo que podemos concluir que el método es adecuado para medir la lipofilia de los complejos.

II. Determinación de la lipofilia mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Utilizando como fase móvil DMSO/PBS (PBS: Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,8 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; pH=7,4) (80/20 v/v) y placas TLC sílice gel 60 RP-18 F_{254s} se evaluó en triplicado la lipofilidad de los complejos y ligantes libres disueltos en acetona justo antes del experimento. Las placas tardaron 11 horas aproximadamente en correr en un tanque cromatográfico cerrado y previamente saturado con fase móvil. Los compuestos se visualizaron bajo luz ultravioleta a 254 nm. Se calcularon los valores de R_f para los compuestos A-D y ligantes libres HLA-HLD, los cuales se promediaron a partir de tres determinaciones independientes y se obtuvieron los valores de R_M utilizando la Ecuación 4, cuyos datos se registran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de R_f y lipofilia R_M determinados mediante TLC en fase reversa, expresados como el promedio con su desviación estándar (n=3).

Complejo	R_f	R_M	Masa Molar (g/mol)
A	0,622±0,004	-0,216±0,008	446,62
B	0,504±0,009	-0,007±0,015	460,57
C	0,4139±0,0001	0,1511±0,0002	474,67
D	0,414±0,008	0,15±0,01	522,72
HLA	0,672±0,008	-0,31±0,02	214,08
HLB	0,5231±0,0001	-0,0401±0,0002	228,12
HLC	0,432±0,002	0,119±0,003	242,12
HLD	0,34±0,01	0,29±0,03	290,25

Con estos datos, podemos concluir que tanto con los valores de $\log(P_{ow})$ como de R_M se observa una tendencia (Figura 23) que indica generalmente que a mayor masa molar de complejos A-D, mayor es su lipofilidad, es decir, tendrían mayor facilidad para atravesar una membrana celular. Los complejos metálicos tienen mayor lipofilidad que el respectivo ligante libre. Un estudio de permeabilidad de membrana no se pudo realizar dada la baja solubilidad de estos complejos en tampón fosfato salino pH 7,4.

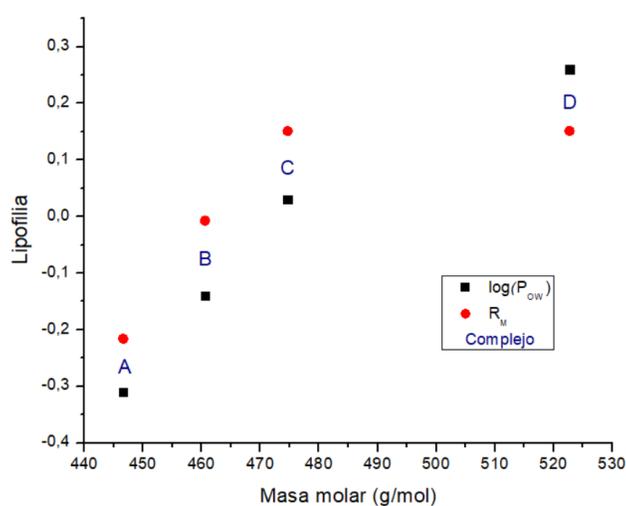


Figura 23. Relación de los valores de $\log(P_{ow})$ y R_M obtenidos con las masas molares, para los complejos estudiados.

Citotoxicidad sobre tripomastigotes de *T. cruzi* y células de mamífero VERO®

Para evaluar el efecto anti-*T. cruzi* de los complejos se utilizaron tripomastigotes de la cepa Dm28, y para explorar la selectividad sobre células de mamífero se utilizaron células VERO®. Los cultivos utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Mecanismos de la Infección Parasitaria del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina.

Mediante la técnica de MTT, se determinó la cantidad de células viables a diferentes concentraciones de complejo en estudio, como se muestra en las Figuras 24 y 25. A partir de curvas dosis-respuesta se determinaron los valores de IC₅₀ (concentración a la cual se inhibe el 50% de la viabilidad celular) para cada complejo, sobre cada cultivo, cuyos datos se registran en la Tabla 7.

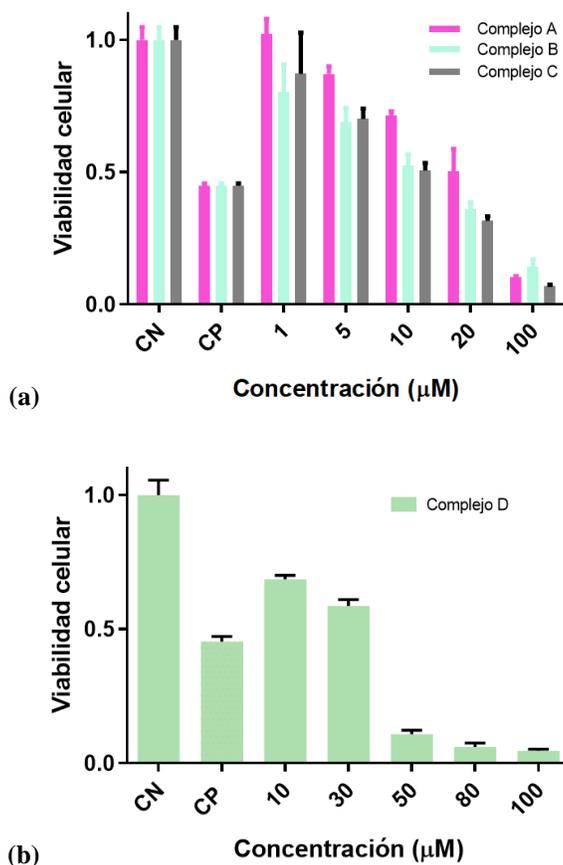


Figura 24. Viabilidad celular vs. concentración micromolar de (a) complejos A, B y C, y, (b) complejo D, frente a tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28; donde CN = **control negativo** (parásitos en medio RPMI 1640) y CP = **control positivo** (parásitos en medio RPMI 1640 con Nifurtimox 15 µM).

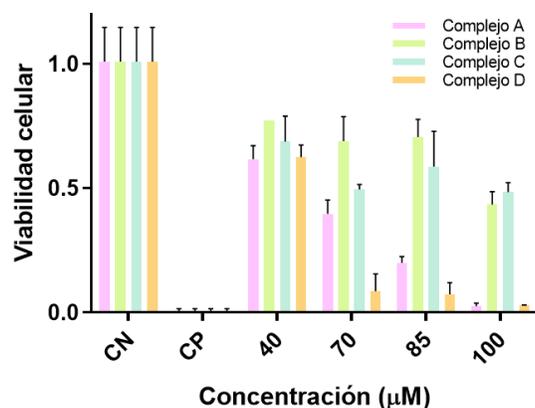


Figura 25. Viabilidad celular vs. concentración micromolar de complejos A, B, C y D, frente a células VERO®; donde CN = **control negativo** (células en medio RPMI 1640) y CP = **control positivo** (células en medio RPMI 1640 con Tritón X-100 1%).

Tabla 7. Valores de IC₅₀ (µM) sobre cultivos celulares de tripomastigotes de *T. cruzi* y de células VERO®, presentados como el promedio de 3 ensayos independientes (n=3) con su desviación estándar e índice de selectividad calculado como: $IS = \frac{IC_{50} \text{ en VERO}^{\circledR}}{IC_{50} \text{ en } T.cruzi}$.

Compuesto	IC ₅₀ tripomastigotes <i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ VERO®	Índice de Selectividad (IS)
A	24,5±1,4	49,3±2,8	2,01
B	10,3±1,0	97,4±4,8	9,47
C	9,9±1,9	66,7±2,6	6,76
D	49,1±7,3	53,0±5,7	1,08
Nifurtimox	10,0±0,4	>200	>20

En la Figura 24 y en la Tabla 7 se observa que los complejos B y C presentan actividad anti-*T. cruzi* muy similar, con valor de IC₅₀ cercano a 10 µM, siendo los más bajos de esta serie de complejos de Au(I). Por otra parte, en la Figura 25 y en la Tabla 7 se observa que el complejo B es el que presenta menor actividad citotóxica en comparación con los demás (mayor viabilidad celular a una concentración definida), presentando un IC₅₀ sobre células VERO® cercano a 100 µM, siendo además el complejo que presenta la mayor selectividad, aunque inferior a la del fármaco de referencia Nifurtimox. Los complejos A y D presentan una selectividad cercana a la unidad, por lo que son los peores de este grupo de cuatro

compuestos de Au(I). En términos generales, todos los complejos son más citotóxicos que Nifurtimox, y algunos tan activos como este frente a tripomastigotes de *T. cruzi*.

Los complejos de Au(I) son más activos que los ligantes reportados [37] frente a *T. cruzi*, pero menos selectivos. El complejo B presentó una mayor diferencia entre los valores de IC₅₀ frente a tripomastigotes de *T. cruzi*, con un índice de selectividad cercano a 10. Sin embargo, el complejo C que tiene una pequeña variación estructural respecto de B, presenta la misma actividad anti-*T. cruzi*, aunque con un índice de selectividad cercano a 7.

Determinación de especies radicalarias intraparasitarias mediante espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico a través de *Spin Trapping*

Con el objetivo de analizar la capacidad de estos complejos para generar especies radicalarias en medio biológico como mecanismo de acción potencial [68], se realizaron estudios de atrapamiento de radicales libres mediante REE sobre tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28, para lo que se utilizó la técnica de atrapamiento de espín o *Spin Trapping*.

Se usó 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) como atrapador de espín o *spin trap*. Este compuesto es una nitrona que se utiliza ampliamente por su capacidad de diferenciar las especies radicalarias atrapadas mediante el patrón hiperfino que genera en REE (Figura 26), siendo esta una ventaja frente a otros atrapadores que solamente pueden detectar radicales y no identificarlos. En sistemas biológicos, DMPO es capaz de atravesar membranas celulares y reaccionar con diferentes radicales libres centrados en carbono y oxígeno [69].

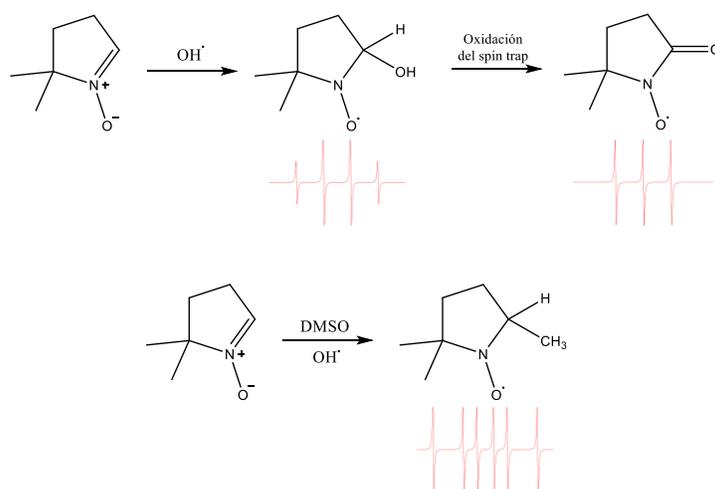


Figura 26. Ejemplos de aductos de espín de DMPO con radicales libres centrados en oxígeno y carbono, generados de manera química.

Los ensayos de atrapamiento de radicales fueron realizados en tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28, en los que se evaluaron los complejos y se registraron los espectros de REE (Figura 16), a partir de lo que se obtuvieron los patrones hiperfinos para cada complejo. Todos los

espectros obtenidos presentaron patrones hiperfinos muy similares, pero con distintas intensidades, lo que da cuenta de una diferencia en la concentración de especies radicalarias que atrapó el DMPO.

En la Figura 27 se muestran espectros con tres patrones característicos: un sexteto (*), un cuarteto (+) y un triplete (#). Los valores de constantes de acoplamiento hiperfino asociadas se encuentran en la Tabla 8.

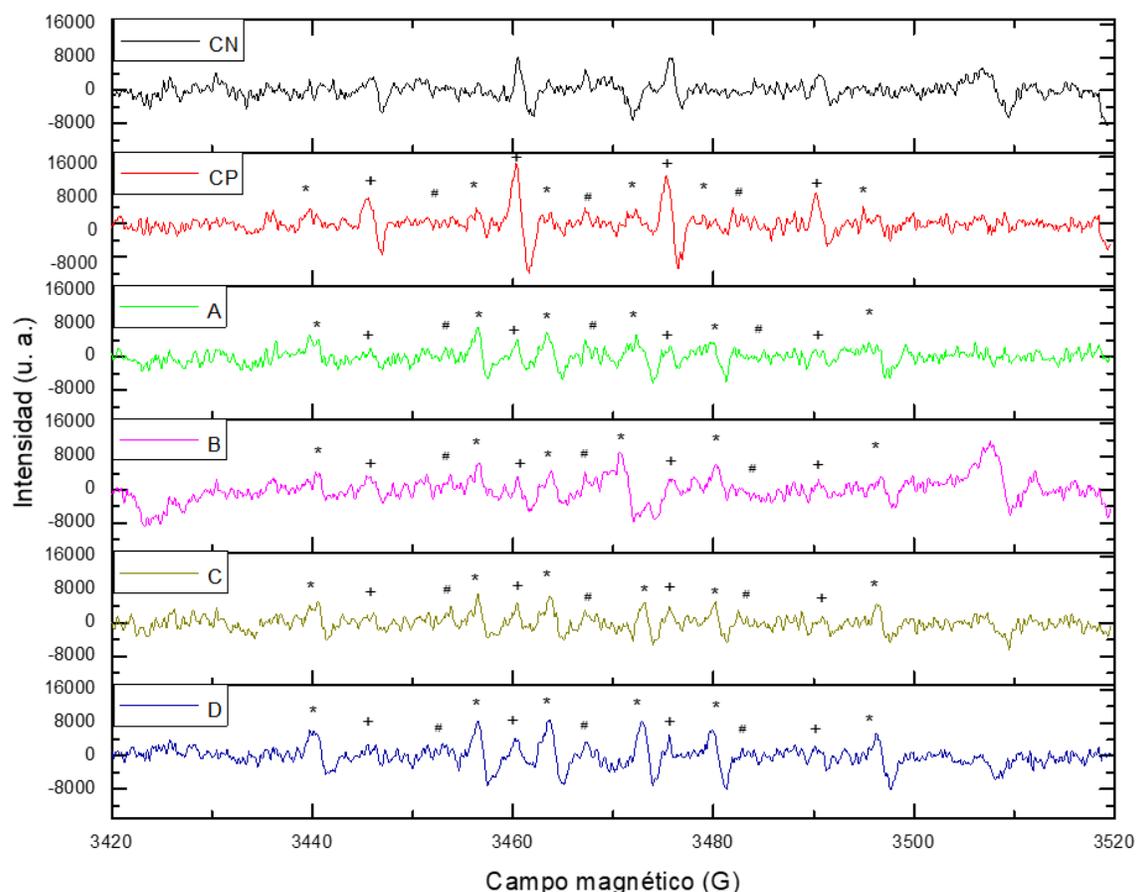


Figura 27. Espectro de resonancia de espín electrónico utilizando la técnica de atrapamiento de espín donde: **CN (control negativo):** parásitos en medio RPMI 1640, NADPH y DMPO; **CP (control positivo):** parásitos en medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y Nifurtimox disuelto en DMSO; **A:** parásitos en medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo A disuelto en DMSO; **B:** parásitos en medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo B disuelto en DMSO; **C:** parásitos en medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo C disuelto en DMSO; **D:** parásitos en medio RPMI 1640, NADPH, DMPO y complejo D disuelto en DMSO. **Símbolos:** * corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-CH₃; # corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPOX; + corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-OH.

Tabla 8. Valores de constantes de acoplamiento hiperfino para complejos estudiados y controles, para distintos aductos de espín formados en tripomastigotes de *T. cruzi*. Todos los ensayos tienen DMSO al 0,5% v/v. Donde, **CN = control negativo** (parásitos en medio RPMI 1640) y **CP = control positivo** (parásitos en medio RPMI 1640 con Nifurtimox 15 μ M).

Espectro	DMPO-OH (+)	DMPO-CH ₃ (*)	DMPOX (#)
CN	$a_N = a_H = 14,8$ G	-	-
CP	$a_N = a_H = 14,9$ G	$a_N = 16,5$ G $a_H = 23,9$ G	$a_N = 14,8$ G
A	$a_N = a_H = 15,1$ G	$a_N = 16,3$ G $a_H = 23,7$ G	$a_N = 14,3$ G
B	$a_N = a_H = 15,3$ G	$a_N = 16,1$ G $a_H = 23,6$ G	$a_N = 14,6$ G
C	$a_N = a_H = 15,3$ G	$a_N = 16,3$ G $a_H = 23,2$ G	$a_N = 14,3$ G
D	$a_N = a_H = 15,2$ G	$a_N = 16,4$ G $a_H = 23,3$ G	$a_N = 14,3$ G

En la Figura 28 se presenta el espectro de REE del complejo D, con una simulación con las constantes determinadas en la Tabla 8.

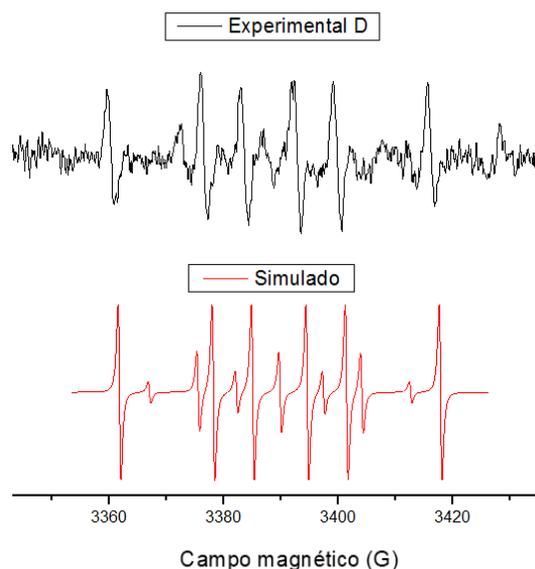


Figura 28. (arriba) Espectro de REE del complejo D obtenido experimentalmente; (abajo) Espectro de REE del complejo D simulado mediante *WINEPR-SimFonia 1.25*. Ambos espectros son representativos de los compuestos en estudio.

Referido al sexteto, este patrón corresponde al atrapamiento del radical metilo, DMPO-CH₃, el cual es producto de la reacción del radical hidroxilo con el vehículo, DMSO, presente en todos los experimentos en misma cantidad. Esto se representa en la Figura 18.

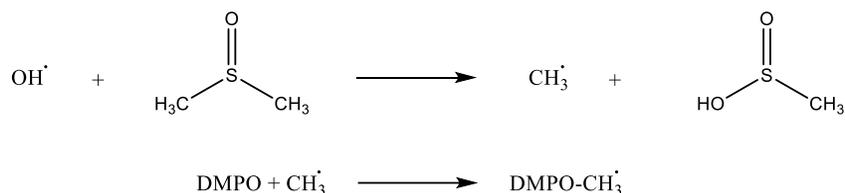


Figura 29. Reacción entre el radical hidroxilo y el vehículo (DMSO).

Por esto, se puede postular que los complejos en estudio generan radical hidroxilo (OH[·]) como posible mecanismo para la acción tripanocida mediante estrés oxidativo.

El triplete, corresponde a la descomposición del atrapador DMPO a su forma oxidada (DMPOX), la cual no es natural como se observa en el control negativo en la Figura 16, sino que se debe a la previa formación del aducto de espín DMPO-OH, que evoluciona rápidamente a DMPOX (Figura 19) a través del mecanismo propuesto por Burkitt [68].

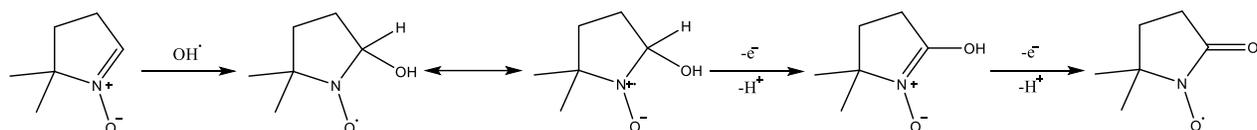


Figura 30. Mecanismo de descomposición del atrapador DMPO debido al radical hidroxilo.

El cuarteto observado corresponde a la formación del radical hidroxilo generado a partir de la interacción del radical nitro anión (RNO₂^{·-}) con el oxígeno molecular en el interior del parásito (reacción de Haber-Weiss). La baja intensidad de esta señal se debe a que parte del radical hidroxilo reacciona con el atrapador, el cual se descompone a DMPOX, o bien,

reacciona con otras moléculas generando el radical metilo que explica la formación del sexteto, como ya se mencionó.

Ya que los parásitos estaban enteros al momento de realizar los experimentos, es posible demostrar que estos complejos lograron atravesar la membrana celular y tener contacto con la nitrorreductasa para biorreducirse y generar, por lo tanto, los metabolitos radicalarios tóxicos iniciadores del estrés oxidativo a nivel intraparasitario. El complejo D, estudiado en condiciones experimentales iguales a los demás, presenta mayor intensidad en las señales (Figura 27), lo cual puede relacionarse con que es el más lipofílico de los cuatro compuestos estudiados, sin embargo, es el menos activo.

Así, se postula que los complejos de Au(I) interaccionan por un mecanismo de estrés oxidativo, mediante la generación intraparasitaria del radical hidroxilo como se mostró con esta técnica. Este radical pertenece a las ERO, cuya generación fue cuantificada a continuación.

Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28

Para cuantificar la generación de ERO en tripomastigotes de *T. cruzi*, se realizó la determinación de radicales libres intracelulares mediante cuantificación de la sonda 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). En la Figura 31 se esquematiza el mecanismo de entrada de la sonda DCFH-DA y su evolución hasta DCF.

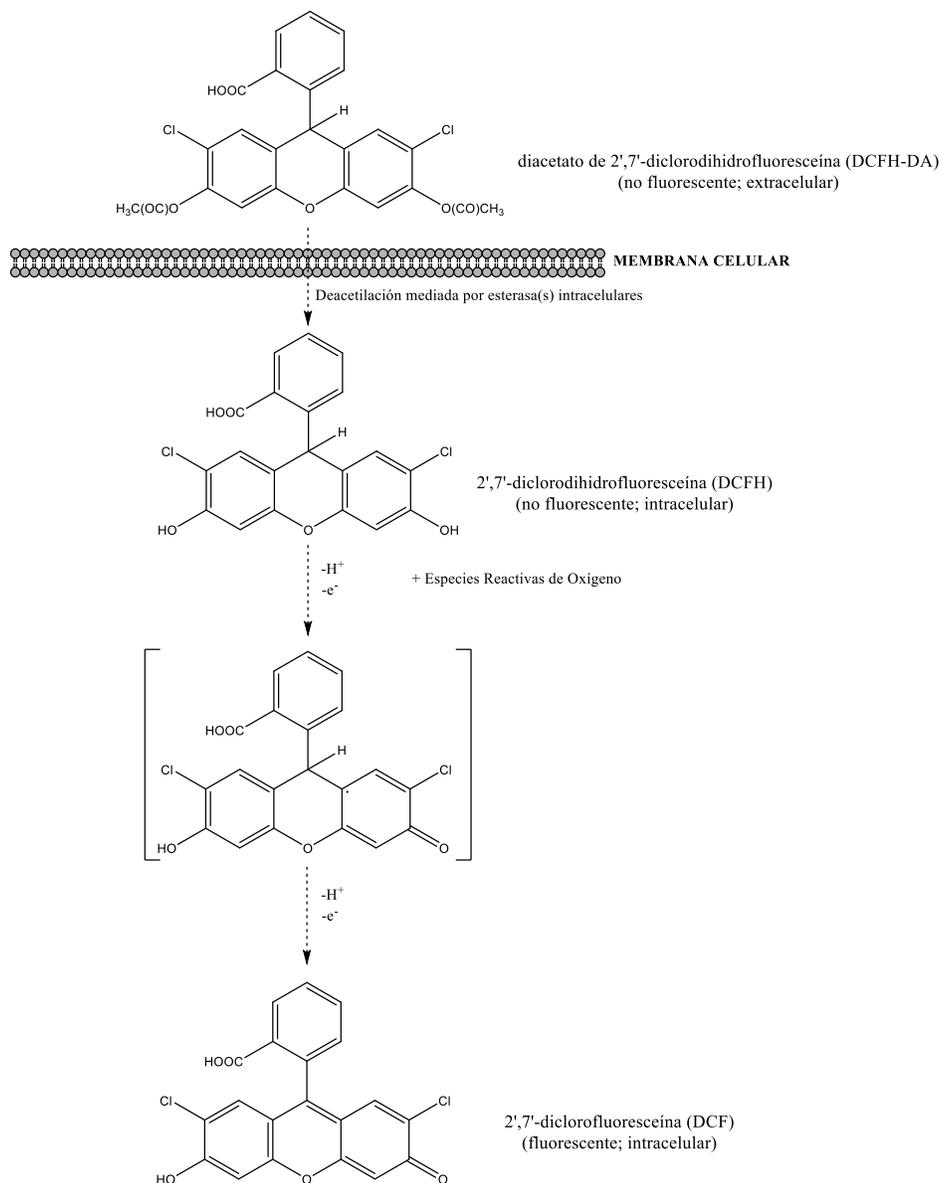


Figura 31. Mecanismo propuesto para la entrada de DCFH-DA al interior de las células, adaptado desde [70]. Luego de atravesar la membrana, ocurre una deacetilación a DCFH, que posteriormente es oxidada a la molécula fluorescente DCF mediante la presencia de ERO.

En la Figura 32 se observa que todos los complejos lograron atravesar la membrana celular generando un aumento en la razón de áreas de fluorescencia respecto del control negativo. Los compuestos A, B y C generaron el mayor aumento de la intensidad de fluorescencia relacionado con un aumento en la concentración de radicales libres intracelulares, con valores similares entre sí.

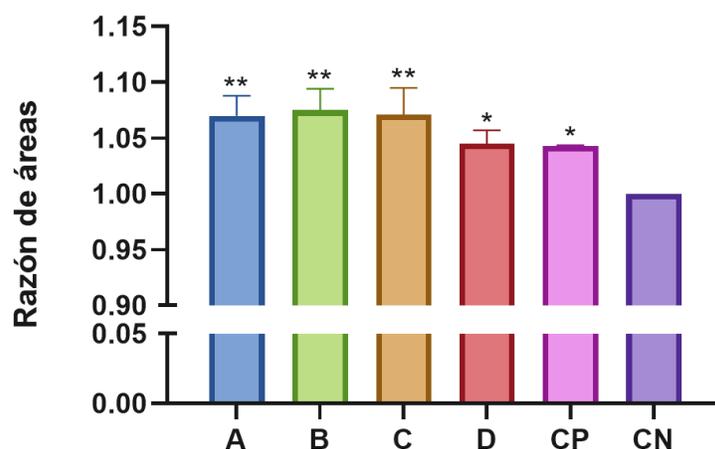


Figura 32. Gráfico de barras ilustrativo del efecto de los complejos A-D (razón de áreas de espectros de fluorescencia respecto del control negativo), asociado a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28, a concentración 10 μ M. Donde, CN = control negativo (parásitos en medio RPMI 1640) y CP = control positivo (parásitos en medio RPMI 1640 con Nifurtimox 10 μ M). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía con posterior prueba de Dunnett (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Tabla 9. Efecto de los complejos A-D a diferentes concentraciones sobre la generación de especies radicalarias en tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28, mediante la detección de la sonda fluorescente DCF (n=3).

Compuestos a concentración μM	Área de fluorescencia (veces respecto del control)
A 10	1,07 \pm 0,02
A 24,5	1,05 \pm 0,03
B 1	1,02 \pm 0,02
B 10,3	1,08 \pm 0,02
C 1	1,03 \pm 0,01
C 9,9	1,07 \pm 0,02
D 10	1,05 \pm 0,01
D 49,1	1,07 \pm 0,03
Nifurtimox 10	1,0422 \pm 0,0003
Nifurtimox 100	1,087 \pm 0,006

El efecto de Nifurtimox, como control positivo, fue similar al observado para los complejos de Au(I). Estos resultados son concordantes con los valores de viabilidad celular obtenidos sobre tripomastigotes de *T. cruzi*, en que los compuestos B y C tienen una actividad similar a Nifurtimox.

En *Spin Trapping* observamos que el complejo D fue el que generó una mayor intensidad en las señales de los aductos de espín formados, lo cual no es necesariamente concordante con este estudio porque aquí no se identifica qué especie radicalaria se forma, por lo que no son estudios comparables entre sí. Se puede concluir que la acción tripanocida implica la generación de estrés oxidativo como vía de acción potencial, sin embargo, no es la única vía probable.

Los valores bajos de aumento de razón de áreas se deben a diversas desventajas que se asocian a la sonda utilizada, así como también al efecto agudo que se evaluó, ya que el experimento duró 1 hora y, si bien los compuestos fueron estudiados a dosis cercanas a sus IC₅₀, ese valor se determinó con un tratamiento de 24 horas de incubación.

Análisis de la relación estructura-actividad

Respecto de la lipofilia, se observa una relación entre los valores de $\log(P_{ow})$ y R_M con la actividad tripanocida determinada para los complejos A, B y C, donde los complejos B y C tienen actividad, selectividad y lipofilia similares. Para el complejo D no se observa una correspondencia entre los valores de lipofilia $\log(P_{ow})$ y R_M determinados (Figura 23), probablemente por su solubilidad, por lo que en la Figura 33 solo se muestra la dependencia con el $\log(P_{ow})$. Así, mediante el coeficiente de reparto 1-octanol/agua como una medida de lipofilidad, observamos que los complejos más activos presentan un valor de $\log(P_{ow})$ cercano a cero y son los más activos y selectivos hacia *T. cruzi*.

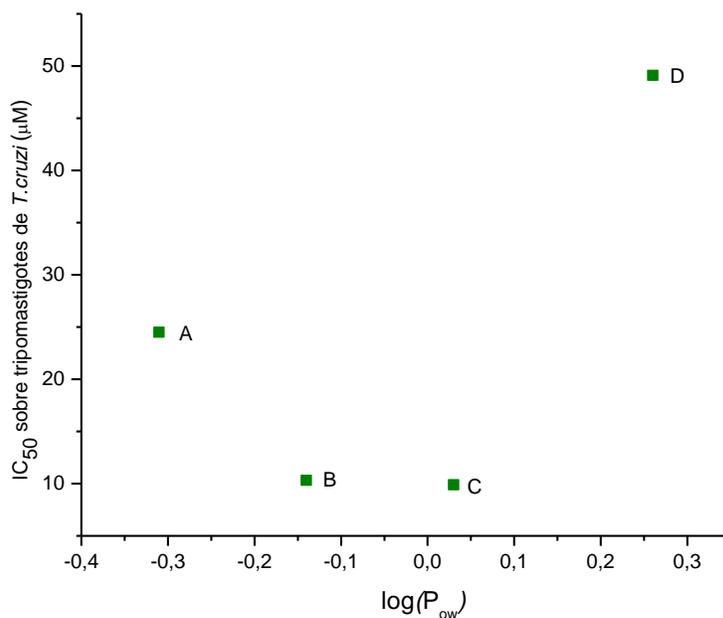


Figura 33. Relación coeficiente de reparto 1-octanol/agua vs. IC_{50} sobre *T. cruzi*.

Respecto del estudio electroquímico (Figura 34), el complejo B presenta un potencial de reducción cercano a -0,94 V para la cupla de generación del radical nitro anión, valor similar al de los demás complejos. No se aprecia una tendencia ni relación entre este valor y la actividad tripanocida.

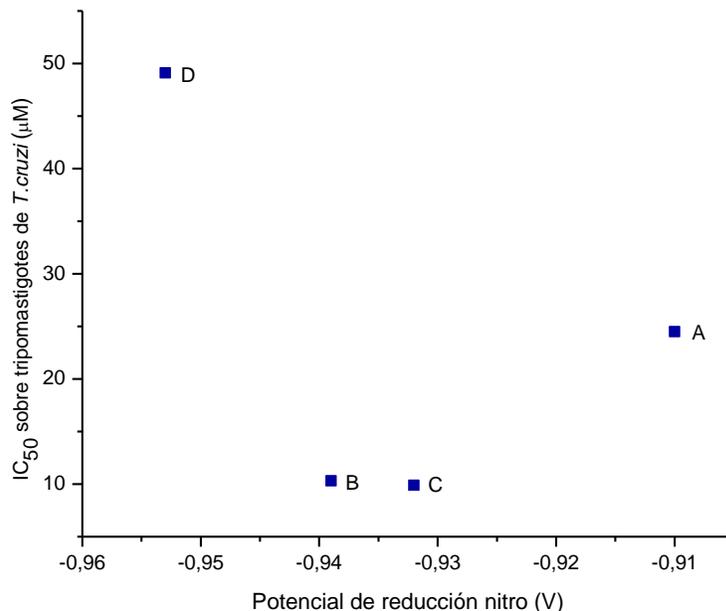


Figura 34. Relación potencial de reducción grupo nitro (Ep IIc) vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*.

El complejo B tiene la mayor constante de acoplamiento hiperfino de todos (Figura 35), sobre 9,1 G para el nitrógeno del grupo nitro, lo cual da cuenta de que mayoritariamente el radical generado se deslocaliza en ese átomo respecto de los demás. Este valor de constante de acoplamiento hiperfino es similar para el compuesto C, siendo ambos compuestos los de mayor constante de acoplamiento hiperfino para el grupo nitro de los cuatro compuestos estudiados. Por otro lado, esta relación o tendencia también se observa entre la generación de ERO y la actividad sobre parásitos (Figura 36). Consecuentemente, B y C son los dos compuestos que presentan la mayor actividad tripanocida.

Es por esto por lo que, podemos confirmar la existencia del mecanismo de estrés oxidativo como un mecanismo tripanocida potencial para los complejos de Au(I), aunque no es la única vía posible.

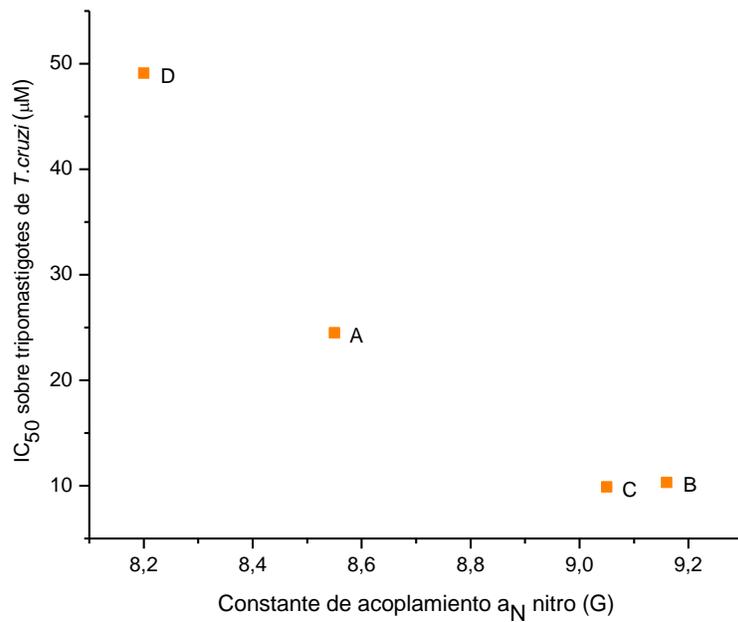


Figura 35. Relación constante de acoplamiento hiperfino a_N nitro vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*.

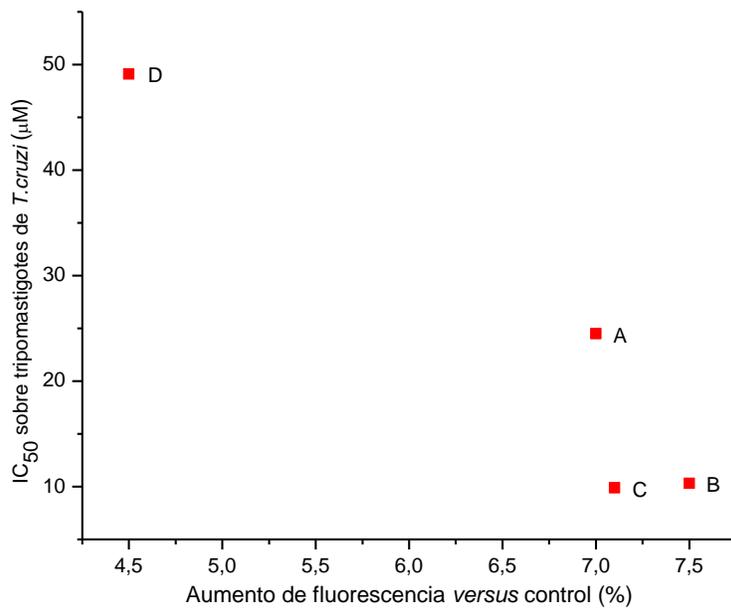


Figura 36. Relación porcentaje de aumento de generación de ERO intraparasitaria vs. IC₅₀ sobre *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

Los complejos estudiados tienen actividad biológica contra el parásito *Trypanosoma cruzi*, asociada a la formación de especies radicalarias generadas por la biorreducción del grupo nitro del ligante tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído.

La actividad tripanocida de los complejos indica que la formación de estos favorece la actividad biológica respecto del ligante libre; electroquímicamente se observan potenciales más cercanos a cero para procesos iguales en complejos *vs.* ligantes libres. La variación estructural del ligante permitió modular la lipofilia y relacionar su valor con la actividad biológica.

Oro(I) como centro metálico favorecería la labilidad del protón hidracínico en la tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofuraldehído, produciendo de esta manera en mayor cantidad el radical nitro anión de la especie deprotonada, radical que se deslocaliza a lo largo de la cadena hasta el nitrógeno hidracínico, predominantemente en el grupo nitro. Se caracterizó el patrón hiperfino asociado a la formación de este radical mediante reducción *in situ* utilizando espectroscopía de resonancia de espín electrónico.

Utilizando las técnicas de atrapamiento de espín y de fluorescencia fue posible identificar, caracterizar y cuantificar las especies radicalarias generadas dentro del parásito, junto con corroborar un mecanismo de estrés oxidativo potencial, aunque probablemente no sea el único mecanismo de acción.

PROYECCIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo resulta interesante estudiar, para los compuestos B y C, que tienen actividad similar al fármaco de referencia, la generación de especies reactivas de oxígeno intraparasitarias utilizando otras sondas que presenten menos desventajas y, por otro lado, den cuenta de especies reactivas específicas como el anión radical superóxido, por ejemplo, ya sea a nivel citoplasmático o mitocondrial, entre otras.

Adicionalmente, para los compuestos B y C, sería interesante estudiar su actividad sobre la forma amastigote de *T. cruzi* y su posible efecto en la inhibición de la cruzipaína, considerando la estructura de los ligantes bioactivos. Asimismo, se podría estudiar la permeabilidad de los compuestos en un modelo bidimensional de células Caco-2, utilizadas como modelo de barrera epitelial intestinal.

En cuanto a realizar variaciones estructurales a los compuestos formados, y considerando estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, sería interesante observar el efecto de intercambiar el coligante cloruro por yoduro, lo cual otorga una mayor polarizabilidad a la molécula y potencialmente podría mejorar su actividad biológica. Por otro lado, considerando que la variación en la amina terminal señalada como **R** en este trabajo, resultó ser más activa para metilo y etilo, es interesante proponer alargar dicha cadena a tres o cuatro carbonos, para observar su efecto en la actividad biológica.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

2021: *I Electronic Biological Inorganic Chemistry (I eBIC)* – Asistente. Virtual.

2022: *XVIII Encuentro de Química Inorgánica (XVIII EQI)* – Presentación formato póster y oral. Olmué, Región de Valparaíso, Chile.

2023: *VIII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry (VIII LABIC)* – Presentación formato póster. Viña del Mar, Región de Valparaíso, Chile.

REFERENCIAS

- [1] Social and economic impact review on Neglected Tropical Diseases, *Hudson Institute*, 2012.
- [2] Reithinger R, et al., Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**: 581–96.
- [3] Cerecetto H, et al. Anti-*T. cruzi* agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini Rev Med Chem*, 2008. **8**: 1355–83.
- [4] Buckner FS, et al. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis*, 2010. **23**: 609–16.
- [5] Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci*, 2012. **101**:888–94.
- [6] Perez CJ, et al. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol*. 2014, **30**: 176–82.
- [7] Gaspar L, et al. Current and future chemotherapy for Chagas Disease. *Curr Med Chem*, 2015. **22**:4293–312.
- [8] Morilla MJ, et al. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine (Lond)*, 2015. **10**: 465–81.
- [9] Santos, S. S., et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020. **55**(4), 105906.
- [10] Delaporte F. Chagas, the logic and the discovery. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 1994, **1**:39–53.
- [11] Sánchez Villamil, J., et al. Potential Role of Antioxidants as Adjunctive Therapy in Chagas Disease. *Oxidative. Medicine and Cellular Longevity*. 2020, 1-13.
- [12] Toloza González, J., et al. Estudio Físicoquímico y Biológico de una serie de complejos metálicos con ligantes bioactivos contra *Trypanosoma cruzi* y células neoplásicas. *Universidad de Chile*, 2016.
- [13] Ortega Campos, J., et al. Estudio físicoquímico y biológico de complejos metálicos de platino y paladio con ligantes bioactivos contra *Trypanosoma cruzi*. *Universidad de Chile*, 2020.
- [14] Pérez Molina, J., et al. Chagas disease. *Lancet*, 2018. **391**(10115): 82–94.
- [15] Malik, L. H., et al. The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease: Chagas heart disease. *Clinical Cardiology*. 2015. **38**(9), 565–569.

- [16] Barriga González, G., et al. Chapter 3-Use of Electron Spin Resonance and Spin Trapping Technique in the Studies of Tropical Parasitic Diseases. *Electron Spin Resonance Spectroscopy in Medicine*. 2018, 45–71.
- [17] Wegner DH, Rohwedder RW. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung*, 1972. **22**: 1624–35.
- [18] Laranja FS, et al. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 1956. **14**: 1035–60.
- [19] Pinto AY, et al. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008. **41**: 602–14.
- [20] Kemmerling, U., et al. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biological Research*, 2010. **43**(3), 307–316.
- [21] Muñoz-Saravia, S. G., et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Failure Reviews*, 2012. **17**(1), 45–64.
- [22] Moncada Basualto, M., et al. Síntesis y evaluación biológica de cumarinas con actividad tripanocida potencial en complejos de inclusión e hidrogeles supramoleculares. *Universidad de Santiago de Chile*, 2018.
- [23] Carvalho Bastos, A., et al. Cell therapies for Chagas disease. *Cytotherapy*. 2017, **19**(11): 1339-1349-
- [24] Salas R, P. (2020). Epidemiología de la enfermedad de Chagas: alta mortalidad y tasa de incidencia, Región de Coquimbo. *Revista chilena de infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, **37**(4), 402–412.
- [25] Enfermedad de Chagas, Informe Epidemiológico Anual 2021. *Ministerio de Salud Pública*, Chile.
- [26] Fuentes R, et al. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Rev Chilena Infectol*. 2012; **29**(1): 82-86.
- [27] Quiroga, N., Correa, J. P., Campos-Soto, R., San Juan, E., Araya-Donoso, R., Díaz-Campusano, G., González, C. R., & Botto-Mahan, C. Blood-meal sources and *Trypanosoma*

- cruzi* infection in coastal and insular triatomine bugs from the Atacama desert of Chile. *Microorganisms*. 2022, **10**(4), 785.
- [28]Correa, J. P., et al. Trypanosomatid infections among vertebrates of Chile: A systematic review. *Pathogens*. 2020, **9**(8), 661.
- [29]Garrido, R., Bacigalupo, et al. Potential impact of climate change on the geographical distribution of two wild vectors of Chagas disease in Chile: *Mepraia spinolai* and *Mepraia gajardoi*. *Parasites & Vectors*. 2019, **12**(1), 478.
- [30]Aravena Castro, María de los Angeles., et al. Estudio de la actividad tripanocida y de los mecanismos de acción antiparasitaria de dos nuevas familias de nitrocompuestos. *Universidad de Chile*.
- [31]Pérez-Molina, Jose A., et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed)*, 2020, **39**(9), 458–470.
- [32]Moreno, S., et al, A. Different behaviours of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1982, **218**(2): 585-91.
- [33]Otero, L., et al. Insight into the Bioreductive Mode of Action of Antitrypanosomal 5-Nitrofuryl Containing Thiosemicarbazones. *Medicinal Chemistry*. 2008, **4**(1): 11-17.
- [34]Rigol, C., et al. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005, **61**(13-14): 2933-2938.
- [35]Fuertes Villadangos, M., et al. Química Bionorgánica: Una ciencia interdisciplinar en desarrollo. *Encuentros Multidisciplinares*, 2000. **5**:1-5.
- [36]John Wiley, et al. Bioinorganic Chemistry: A Short Course, 2002. **7**: 265-268,
- [37]Cipriani, M., et al. Effect of the Metal on the anti *T.cruzi* Activity and Mechanism of Action of 5-Nitrofuryl-Containing Thiosemicarbazone Metal. Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014. **27**: 4677–4689.
- [38]Orvig, C., & Abrams, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chemical Reviews*, 1999. **99**(9), 2201–2204.
- [39]Glišić, B. Đ., & Djuran, M. I. Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. *Dalton Transaction*, 2014. **43**(16), 5950–5969.

- [40]Metalofarmacos: Una nueva perspectiva para la farmacología y medicina. Enrique J. Baran, 2014. *Anales Acad. Nac. de Cs. Ex., Fís. y Nat.* **66**: 5-21.
- [41]Mjos, K. D., & Orvig, C. (2014). Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Reviews*, **114**(8), 4540–4563..
- [42]Bruijninx, P., et al. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008, **12**(2):197–206.
- [43]Parrilha, G., et al. Metal complexes with 2-acetylpyridine-N(4)-orthochlorophenylthiosemicarbazone: Cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, **84**: 537- 544.
- [44]Vieites, M., et al. Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2008, **102**(5-6):1033–1043.
- [45]Rodríguez Riobó, R., et al. Complejos metálicos con tiosemicarbazonas derivadas de 2-pirazinaformamida. *Universidad de Santiago de Compostela*, 2007.
- [46]O.A. Soares, R., et al. Evaluation of thiosemicarbazonas and semicarbazonas as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 2011, **129**(4): 381–387.
- [47]Scharfstein, J. & Andrade, D. Chapter 5 - Infection-Associated Vasculopathy in Experimental Chagas Disease: Pathogenic Roles of Endothelin and Kinin Pathways. *In Advances in Parasitology*. 2011, **76**: 101-127.
- [48]Aguirre, G., et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazonas. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 2004, **12** (18): 4885-4893.
- [49]Gambino, D & Otero, L. *Inorg. Chim. Acta*. 2018, **472**: 58-75.
- [50]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 thiosemicarbazonas. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**(12), 4937–4943.
- [51]Maya, J. D., et al. 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*, 2007.**146**(4): 601-620.

- [52] Otero, L., et al. Novel Antitrypanosomal Agents Based on Palladium Nitrofurylthiosemicarbazone Complexes: DNA and Redox Metabolism as Potential Therapeutic Targets. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006, **49**(11): 3322-3331.
- [53] Huaizhi, Z., et al. China's Ancient Gold Drugs. *Gold Bulletin*. 2001, **34**(1):24-29.
- [54] Navarro, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*. 2009, **253**(11-12):1619–1626.
- [55] I.S. Maia, P., et al. Gold (III) complexes in medicinal chemistry. *Future Med Chem*. 2014, **6**(13):1515-1536.
- [56] J. Berners-Price, S., et al. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics*. 2011, **3**(9): 863–873.
- [57] A. Lessa, J., et al. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011, **105**(12):1729–1739.
- [58] R. Rettondin, A., et al. Gold (III) complexes with ONS-Tridentate thiosemicarbazones: Toward selective trypanocidal drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **120**: 217-226.
- [59] J. Barnard, P., et al. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coordination Chemistry Reviews*. 2007, **251**(13-14): 1889–1902.
- [60] Duque Lopes, C., et al. Organometallic Gold (III) Complex $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]^+$ ($\text{L1} = \text{SNSDonating Thiosemicarbazone}$) as a Candidate to New Formulations against Chagas Disease. *ACS Infect. Dis.* 2019, **5**(10): 1698–1707.
- [61] Vieites, M., et al. Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol N-oxide gold(I) complex with potent antiproliferative effect against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp.* insight into its mechanism of action. *J of Inorg Biochem*, 2009. **103**(10):1300–1306.
- [62] Nicholson, R. S. Semiempirical procedure for measuring with stationary electrode polarography rates of chemical reactions involving the product of electron transfer. *Analytical Chemistry*, 1966. **38**: 1406-1406.
- [63] E.C. Bate-Smith, R.G. Westall. Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1950. **4**, 427-440.

- [64] Aguilera-Venegas, B., et al. Electrochemical, ESR and theoretical insights into the free radical generation by 1,1'-hydrocarbylenebisindazoles and its evaluation as potential bio-active compound. *Future Med Chem*, 2012. **5**(15): 1843-1859.
- [65] Olea, C., et al. ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochim Acta A*, 2005. **63**: 36-42.
- [66] Aravena, C.M., et al. Potent 5-nitrofurantoin derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: electrochemical, spectroscopic and biological studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2011. **79**: 312-9.
- [67] Other guidelines describing methods for the determination of the n1-octanol/water partition coefficient (POW). *OECD guideline 107 and 117*, 2003.
- [68] Burkitt, M.J., et al. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, Ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Bio Chem*, 2003. **278**: 29410-9.
- [69] Finkelstein, E., et al. Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol*, 1979. **16**: 676-85.
- [70] Carl P. LeBel, et al. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992. **5**, 2, 227-231.