

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**Estudio comparativo de complejos
metálicos con ligandos bioactivos
frente a *Trypanosoma cruzi*: síntesis,
caracterización, evaluación biológica
e interacción con ADN**

MARISOL VIEITES

**Cátedra de Química Inorgánica
Departamento Estrella Campos
Facultad de Química
12 de abril de 2012**

**Orientadoras: Dras. Dinorah Gambino y
Beatriz Garat**

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Propuesta	44
Capítulo 3. Materiales y métodos	51
Capítulo 4. Complejos de Pd y Pt con tiosemicarbazonas bioactivas frente a <i>T. cruzi</i>	88
Capítulo 5. Complejos metálicos de <i>N</i> -óxido de 2-mercaptopiridina	183
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas	265
Apéndice 1. Algunas informaciones adicionales	
Apéndice 2. Trabajos publicados y solicitud de patente	

AGRADECIMIENTOS

- ✓ Directores de tesis: Dras. Dinorah Gambino y Beatríz Garat
- ✓ Cátedra de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química
- ✓ Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias
- ✓ Grupo Química Medicinal, Departamento de Química Orgánica, Facultades de Química y Ciencias, Dres. Hugo Cerecetto y Mercedes González
- ✓ Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) y LANADI, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Dres. Enrique Baran, Beatriz Parajón Costa, Oscar E. Piro
- ✓ Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Dra. Maribel Navarro
- ✓ Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Dr. Claudio Olea-Azar
- ✓ Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Dr. Juan Diego Maya
- ✓ Departamento de Química Inorgánica, Universitat Barcelona, Dra. Virtudes Moreno
- ✓ Centro de Biología Molecular Estructural, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Dr. Hernán Terenzi
- ✓ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, Madrid, España, Dra. Alicia Gómez-Barrio
- ✓ Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay, Dra. Antonieta Rojas
- ✓ Cátedra de Química Analítica, Facultad de Química, Dra. Mariela Pistón
- ✓ Universidad de Heidelberg, Alemania, Prof. Louise Krauth-Siegel
- ✓ Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Dra. Ana Denicola

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CONTENIDO

- 1.1- .ENFERMEDADES TROPICALES
- 1.2- ENFERMEDAD DE CHAGAS
 - 1.2.1- DISTRIBUCIÓN
 - 1.2.2- CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO Y TRANSMISIÓN
 - 1.2.3- SIGNOS Y SÍNTOMAS
 - 1.2.4- TRATAMIENTO: QUIMIOTERAPIA Y SUS LIMITACIONES:
NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL
 - 1.2.5- CONTROL Y PREVENCIÓN
 - 1.2.6- RESPUESTA DE LA OMS
 - 1.2.7- BLANCOS DESCRITOS PARA FÁRMACOS
TRIPANOSOMICIDAS
- 1.3- QUÍMICA INORGÁNICA MEDICINAL
- 1.4- COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON ACTIVIDAD CONTRA *T. cruzi*
 - 1.4.1- COMPLEJOS DE PLATINO
 - 1.4.2- COMPLEJOS DE RUTENIO
 - 1.4.3- OTROS COMPLEJOS METÁLICOS
 - 1.4.4- OTROS COMPLEJOS METÁLICOS MÁS RELEVANTES
- 1.5- METALES SELECCIONADOS: Pd, Pt Y Au
- 1.6- EL ADN COMO BLANCO DE METALOFÁRMACOS
- 1.7- BIBLIOGRAFÍA

1.1- ENFERMEDADES TROPICALES

Las enfermedades catalogadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades tropicales desatendidas (NTDs: Neglected tropical diseases) han afectado las vidas de millones de personas en todo el mundo y amenazan la salud de muchos millones. Las NTDs afectan a más de mil millones de personas (una sexta parte de la población mundial) y causan casi 550000 muertes al año [1]. Estas enfermedades debilitan a las poblaciones empobrecidas e impiden resultados globales de salud pública. El descubrimiento de fármacos para combatir las NTDs todavía es escaso. Durante años los bajos rendimientos de las inversiones en esta temática han desalentado a las compañías farmacéuticas para llevar adelante proyectos de investigación dedicados al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de las NTDs. Sin embargo, actualmente la evaluación de la importancia para la salud pública y la economía de estas enfermedades ha convencido a los gobiernos, la industria farmacéutica y otros organismos, incluidas las organizaciones no gubernamentales, para invertir en la prevención y el control de este grupo diverso de enfermedades.

Las enfermedades tropicales abarcan todas las enfermedades que se producen únicamente, o principalmente, en los trópicos. En la práctica, el término se toma a menudo para referirse a las enfermedades infecciosas que prosperan en ambientes cálidos y húmedos.

La OMS lista como enfermedades tropicales desatendidas a las siguientes, entre otras [2].

- úlcera de Buruli
- enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)
- cisticercosis
- dengue/dengue hemorrágico
- dracunculosis (enfermedad del gusano de Guinea)
- equinococosis

- fascioliasis
- tripanosomiasis africana humana
- leishmaniasis
- lepra
- filariasis linfática
- oncocercosis
- rabia
- esquistosomiasis
- helmintiasis
- tracoma

En este listado es posible reconocer una serie de enfermedades parasitarias e infecciosas. Este tipo de enfermedades son de especial interés debido a su alta incidencia en el global de las enfermedades a nivel mundial (Figura 1) y a su importante incidencia en las poblaciones de más bajos recursos como son las de la región latinoamericana (Figura 2).

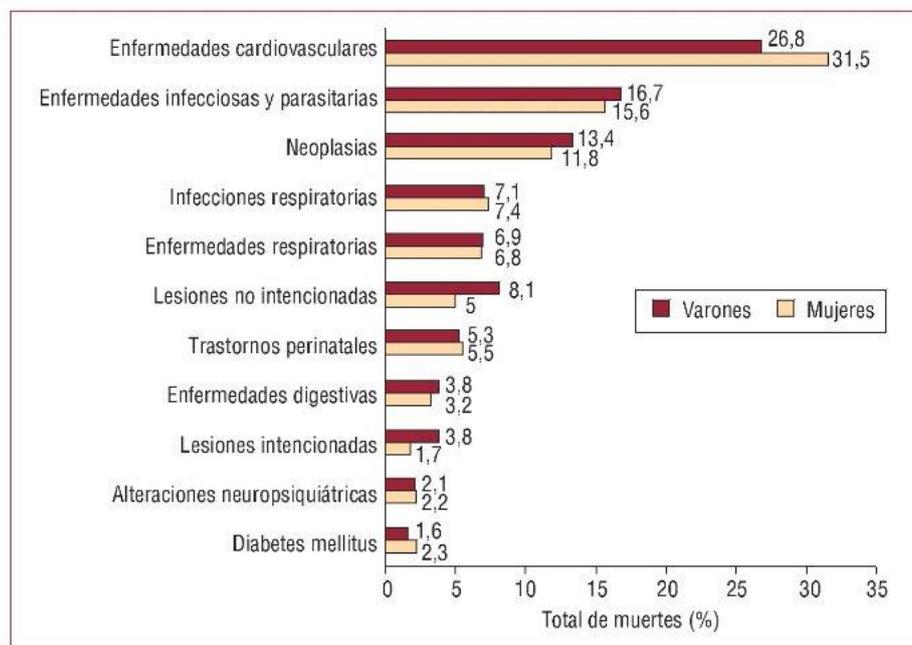


Figura 1. Incidencia de diferentes enfermedades indicando diferencias por sexo [3].

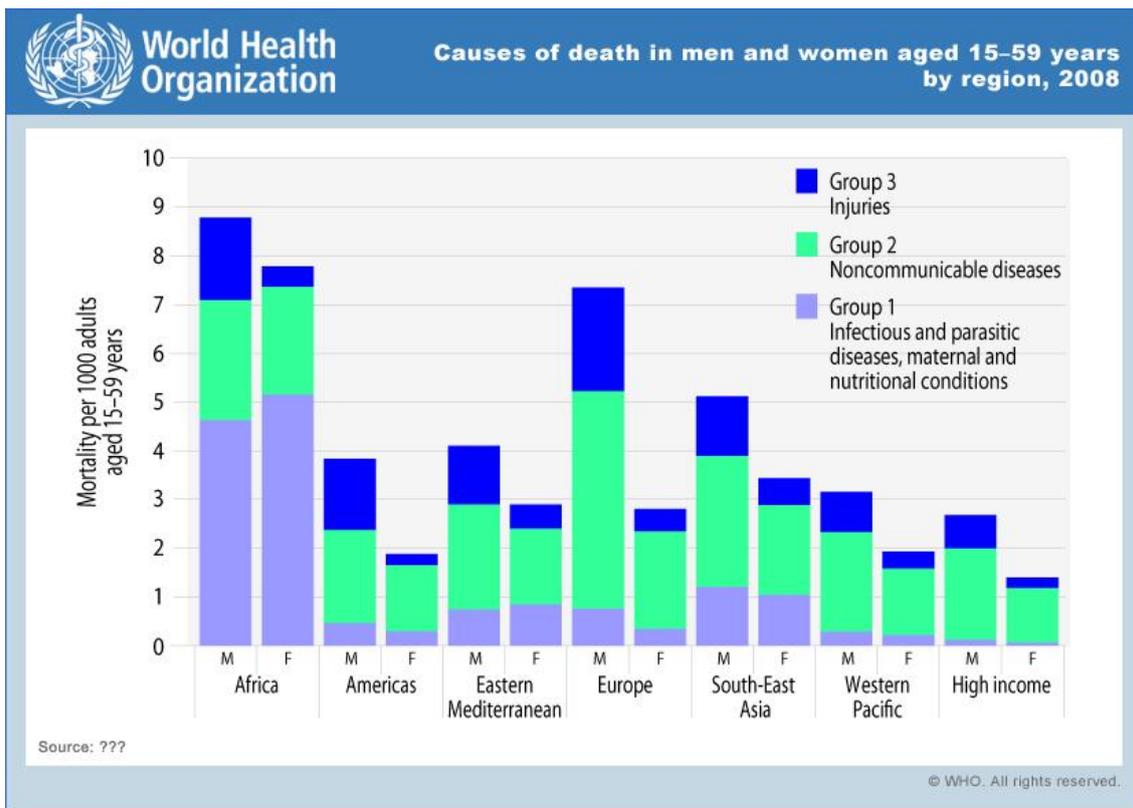


Figura 2. Incidencia de las enfermedades infecciosas y parasitarias en diferentes regiones [4].

Entre las NTDs, hay un grupo de enfermedades, cuyo agente etiológico pertenece a la familia taxonómica Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida, que son responsables de las infecciones parasitarias concentradas en las regiones más pobres del planeta, principalmente en las zonas rurales. En particular, los *Trypanosomas* son responsables de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) en América Latina y de la enfermedad del sueño en África (tripanosomiasis africana humana), mientras que *Leishmania spp* es responsable de infecciones cutáneas y viscerales de naturaleza endémica en 88 países en el norte de África, el sur de Asia, y América Latina. Tanto la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) como la leishmaniasis afectan de forma singular a la región latinoamericana (Figura 3). Debido a su presencia en países de bajo ingreso medio, las tripanosomiasis y leishmaniasis no son adecuadamente atendidas por la sociedad occidental, a pesar que la enfermedad de Chagas, la enfermedad del sueño y la leishmaniasis visceral

son las tres NTDs con las tasas más altas de muerte. Por estas razones, la OMS las caracteriza como las más desafiantes de las NTDs [1].

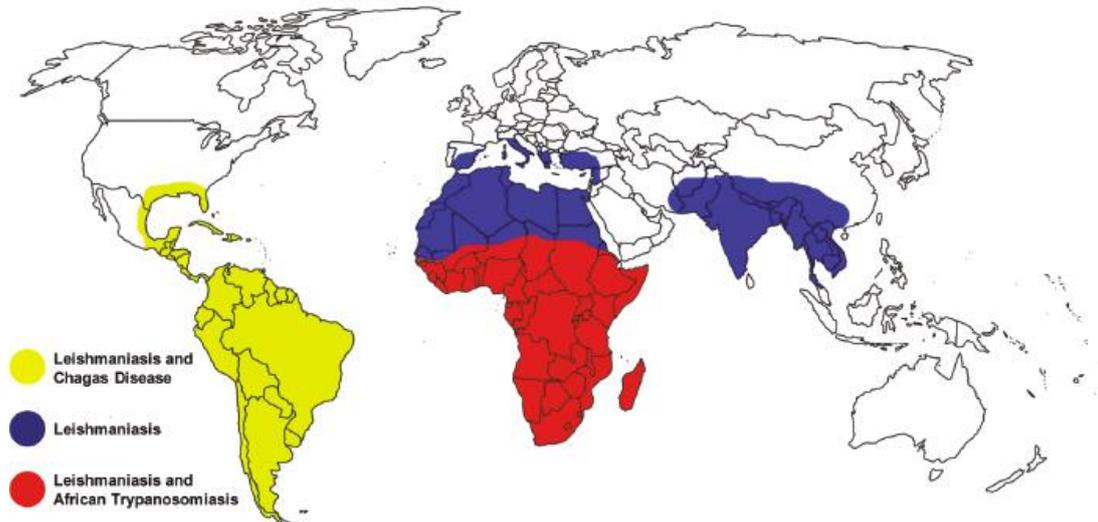


Figura 3. Regiones afectadas por las enfermedades producidas por protozoarios tripanosomátidos [1].

1.2- ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Exhibe un alto nivel de variación intraespecífica, por lo que la enfermedad es difícil de batallar para los científicos.

El nombre de la enfermedad proviene de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño que describió por primera vez la enfermedad en 1909, Figura 4.



Figura 4. Carlos Chagas, médico brasileño que describió por primera vez la enfermedad de Chagas en 1909 [4].

Se presenta principalmente en América Latina, donde se transmite a los mamíferos, particularmente a los humanos, por las heces de insectos triatomíneos hematófagos que durante la picadura defecan y por la herida generada ingresa el parásito a la circulación. Estos insectos difieren dependiendo de la zona geográfica. En nuestra región el vector es el *Triatoma infestans* conocido comúnmente como "vinchuca" (Figura 5).



Figura 5. Insecto hematófago conocido como vinchuca [5].

El riesgo de infección con la enfermedad de Chagas está directamente relacionado con la pobreza: la vivienda rural pobre latinoamericana (paredes de barro, techos de paja, tablas de madera), así como la presencia de gallineros y

chiqueros, proporciona con frecuencia un hábitat apropiado para los insectos que transmiten la enfermedad.

1.2.1- DISTRIBUCIÓN

Se estima que unos 10 millones de personas están infectados con *Trypanosoma cruzi*, principalmente en América Latina donde esta enfermedad es endémica. Aunque la enfermedad puede ser detectada en gran parte del continente americano, es más frecuente en 21 países de América del Sur y Central (Figura 6). Esta enfermedad originalmente rural se convirtió en Latinoamérica en un problema urbano cuando se realizaron importantes migraciones hacia las ciudades entre 1970 y 1980.



Figura 6. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas [6].

Sin embargo, esta enfermedad que originalmente se confinó casi exclusivamente a América Latina, ahora se ha extendido a otros continentes debido a la emigración de personas infectadas y a la ausencia en los países receptores de controles en los bancos de sangre y de órganos y a la transmisión madre infectada – hijo (Figura 7).

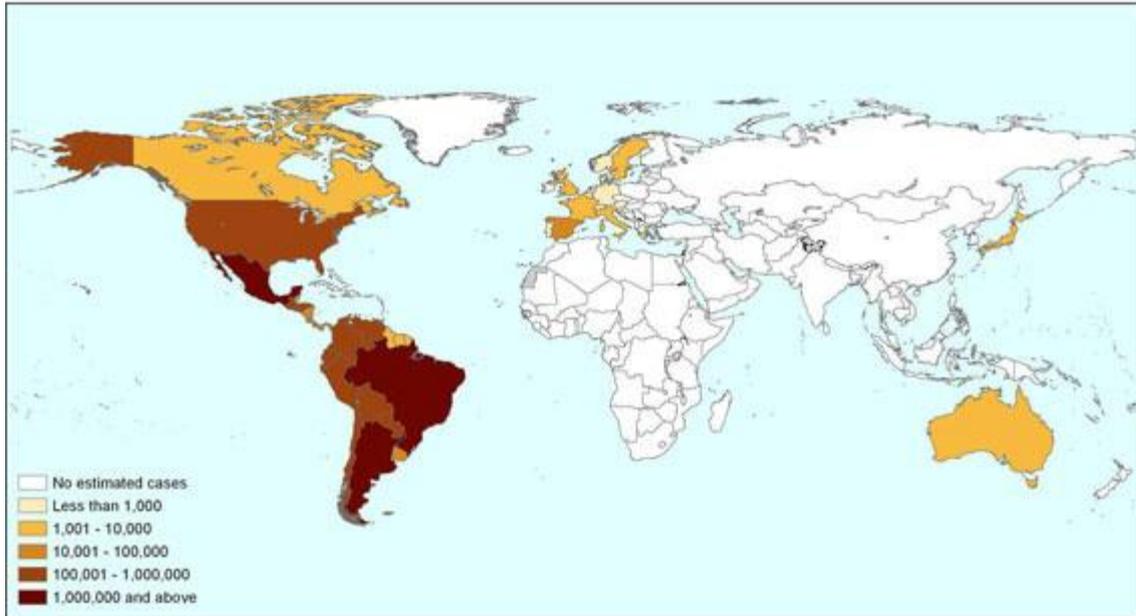


Figura 7. Distribución mundial de casos estimada en 2009 por la DNDi [7].

En particular, en las últimas décadas se ha detectado un número creciente de casos en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países de Europa y algunos países del Pacífico Occidental (Figura 7).

Esta enfermedad tropical afecta 16 a 18 millones de personas, 15.000 de los cuales mueren cada año. Se estima que hasta un 25% de la población de América Latina está en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas y que puede haber 100.000 personas infectadas en los Estados Unidos [8].

La situación en el cono Sur es la siguiente [9]:

- 1997. Uruguay. Interrupción de la trasmisión vectorial de *T. cruzi*.
- 1999. Chile. Interrupción de la trasmisión vectorial de *T. cruzi*.
- 2001. Argentina. Interrupción de la trasmisión vectorial en cinco provincias: Jujuy, Neuquén, Rio Negro, La Pampa, Entre Ríos.
- 2002. Paraguay. Interrupción de la trasmisión vectorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans* en el Departamento de Amambay.
- 2007. Brasil. Interrupción de la trasmisión vectorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans*.

- Bolivia presenta transmisión activa en todo su territorio.
- Perú presenta transmisión activa en focos.

En 1991 los ministros de salud de los seis países de América del Sur "cono sur" (Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Argentina y Bolivia) pusieron en marcha una iniciativa para eliminar el insecto vector de la enfermedad y así evitar la transmisión vectorial de la misma en esos países (programa INCOSUR-OMS). Como consecuencia de la aplicación de esta iniciativa, en 1997 Uruguay fue declarado libre de vector, y en 1999 ocurrió lo mismo con Chile. En el año 2000, gran parte de Brasil había eliminado la transmisión vectorial de la enfermedad. Existen iniciativas similares en curso en los países andinos y en Centroamérica.

En Uruguay la enfermedad de Chagas y su erradicación está bajo la supervisión de la Comisión Nacional Honoraria de Zoonosis y de la Comisión Nacional Honoraria de Lucha contra la Hidatidosis. Desde 1997 la transmisión vectorial de *T. cruzi* se encuentra interrumpida, no registrándose nuevos casos agudos por esta vía desde 1984. Se ha logrado la eliminación de *Triatoma infestans* en una extensa área del país quedando actualmente escasas poblaciones remanentes en los departamentos de Rivera, Tacuarembó y Colonia, de localización casi exclusivamente peridomiciliaria. Sobre éstas se está actuando con el fin de lograr la eliminación total en el territorio nacional [9]. La transmisión transfusional se encuentra controlada por la obligatoriedad del control de sangre a transfundir (prueba obligatoria por ley desde el año 1987 en el 100% de los donantes). La única vía de transmisión actualmente en el país es la vía de transmisión congénita. La forma congénita es curable y ocurre también fuera del área endémica. Debe detectarse por serología de las gestantes (obligatorio por ley en los exámenes del control obstétrico en los 13 departamentos endémicos del país y en la maternidad del Centro Hospitalario Pereira Rossell desde 1995) y diagnóstico en el recién nacido. Aunque la transmisión de la Enfermedad de Chagas se encuentra prácticamente detenida en Uruguay, se estima que existen aún 50.000 personas infectadas por *T. cruzi* en nuestro país (Figura 8) [9]. La detección de

un caso agudo es muy importante y un dato positivo debe notificarse a Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública [9].

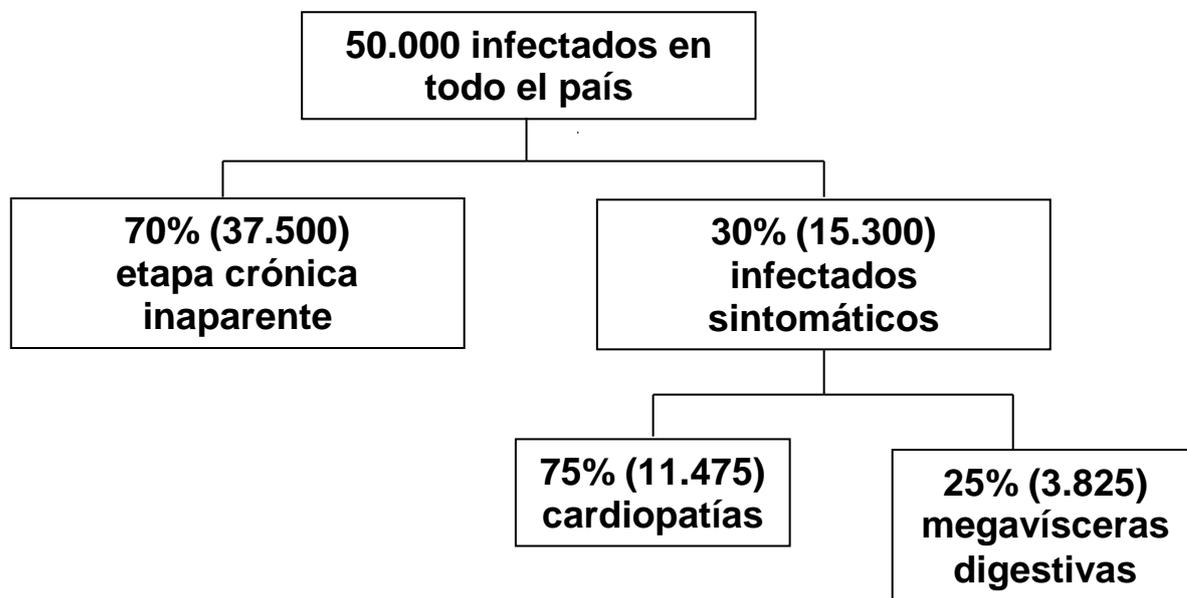


Figura 8. Estimación de infección por *T. cruzi* y casos clínicos de enfermedad de Chagas en Uruguay [9].

Se encuentra en curso un convenio entre Uruguay y el BID para la implementación de un Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina. Este convenio tiene el propósito de formalizar los términos del otorgamiento de una cooperación técnica regional no reembolsable a la Comisión Honoraria de Zoonosis hasta por un monto de 900 mil dólares. Abarca a Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Paraguay y Uruguay [10].

1.2.2- CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO Y TRANSMISIÓN

El *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo, que involucra estadios proliferativos, tanto en el vector (epimastigotas) como en el huésped vertebrado (amastigotas), y estadios infecciosos, no-proliferativos (tripomastigotas) presentes también en ambos (Figura 9) [11].

La etapa en el huésped vertebrado (hombre o animal) se inicia cuando los parásitos (tripomastigotas metacíclicos) son evacuados en las heces del insecto vector durante su picadura. Las heces contaminadas pueden entrar al organismo a través de la herida, otras áreas de la piel lesionada, o a través de las membranas mucosas, incluyendo la conjuntiva o la mucosa oral/digestiva. Los parásitos ingresan al cuerpo a través de las heces cuando la persona instintivamente frota la picadura, los ojos, la boca, o cualquier lesión en la piel. Los tripomastigotas metacíclicos invaden las células del huésped, pierden su flagelo y se convierten en la forma amastigota bajo la que se reproducen por división binaria hasta que terminan por destruir la célula que los alberga. Los amastigotas son liberados al torrente sanguíneo transformándose nuevamente en tripomastigotas. Estos tripomastigotas circulantes pueden invadir otras células y el proceso repetirse varias veces. El ciclo en el invertebrado comienza cuando la vinchuca chupa la sangre de un hombre o animal infectado. Los tripomastigotas sanguíneos pasan al tubo digestivo del insecto y allí se transforman en epimastigotas. Se multiplican aumentando extraordinariamente su número y llegan finalmente al recto donde se transforman en tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva) y son evacuados con las deyecciones del insecto. Las formas metacíclicas atraviesan las mucosas del huésped a través de las heridas dejadas por la picadura, recomenzando el ciclo [12].

Existe un ciclo doméstico que se cumple entre triatomíneos domiciliarios como el *Triatoma infestans* y el hombre, perro o gato y un ciclo silvestre entre triatomíneos silvestres como el *Triatoma rubrovaria* y animales también silvestres como zorros, comadrejas y armadillos, entre otros.



Figura 9. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* [4].

Otros medios de transmisión secundaria son las transfusiones de sangre con la sangre de donantes infectados, paso de una madre infectada a su bebé durante el embarazo o el parto, trasplantes de órganos con órganos de donantes infectados, y los alimentos mal cocidos que contengan heces de un insecto infectado [4]. El nivel de contaminación en bancos de sangre en América Central y América del Sur supera a la del SIDA o la hepatitis. También animales domésticos y silvestres pueden actuar como portadores, aunque esto no es tan común como vía de transmisión.

El principal factor de riesgo para contraer la enfermedad de Chagas es a nivel rural para quienes habitan una vivienda pobre, de barro, adobe o paja. Los insectos vectores habitan este tipo de ambiente. Cientos de insectos reducidos pueden estar en las grietas de estas viviendas durante el día y salen por la noche cuando los habitantes de la misma están durmiendo.

1.2.3- SIGNOS Y SÍNTOMAS

La enfermedad de Chagas se presenta en dos fases. La fase inicial, aguda con parasitemia elevada; normalmente dura alrededor de dos meses después de la infección. Durante la fase aguda, un gran número de parásitos circulan en la sangre. La mayoría de las veces esta fase es asintomática, pero dependiendo

del sitio de la inoculación, el primer signo puede ser un chancro en la piel (chagoma) o edema orbital unilateral morado (signo de Romaña) con linfadenopatías locales y fiebre durante varias semanas. Puede ser acompañado, entre otros, por dolor de cabeza, palidez, mialgias, disnea, edema de miembros inferiores o en la cara, dolor abdominal, tos, hepatomegalia, exantema, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado, diarrea, linfadenopatías múltiples, miocarditis (dolor en el pecho, insuficiencia cardíaca) y más raramente meningoencefalitis (convulsiones, parálisis). La morbilidad puede ser mayor en niños menores de cinco años, ancianos, inmunodeprimidos o en los casos de inóculos con alto contenido del parásito, tal como se ve en los casos de transmisión oral por alimentos contaminados.

Aproximadamente un tercio de las personas que sufren la fase aguda de Chagas desarrollan la crónica de diez a veinte años después de la infección inicial.

La fase crónica, con parásitos ocultos en los tejidos - en especial el corazón y el músculo liso digestivo- tiene diferentes formas clínicas posibles:

- a) asintomática (forma indeterminada), con más frecuencia en el inicio de la fase crónica y de duración de por vida en la mayoría de los pacientes,
- b) forma cardíaca, ocurre en hasta el 30% de los pacientes, con trastornos de la conducción, arritmias, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca y tromboembolismo secundario,
- c) forma con lesiones digestivas (megaesófago y megacolon) o formas mixtas (cardíaco más digestivo), hasta un 10% de los pacientes identificados hacia el sur de la cuenca del Amazonas [4].

1.2.4- TRATAMIENTO: QUIMIOTERAPIA Y SUS LIMITACIONES: NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL

Actualmente no hay vacuna ni tratamiento efectivo para la enfermedad de Chagas. La quimioterapia actual de la enfermedad se limita fundamentalmente a dos compuestos nitroheterocíclicos: Nifurtimox y Benznidazol (Figura 10). El Nifurtimox (Lampit®) fue desarrollado originalmente por la empresa Bayer y se

encuentra actualmente discontinuado. El Benznidazol (Radanil[®], Rochagan[®]) fue originalmente desarrollado por la empresa ROCHE y es producido actualmente en Brasil por el Laboratorio Farmacéutico do Estado do Pernambuco (LAFEPE).

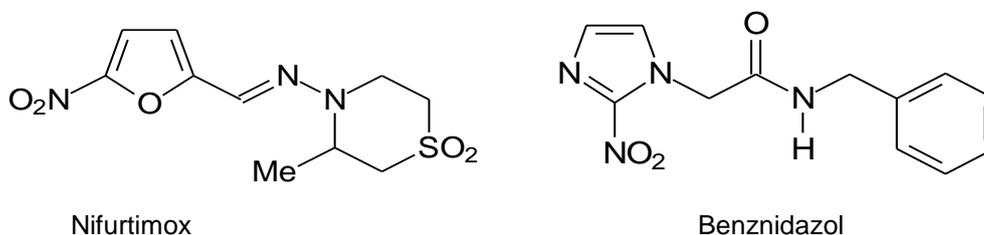


Figura 10. Estructuras de Nifurtimox (*N*-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina y Benznidazol (*N*-bencil-2-(2-nitroimidazolil)acetamida).

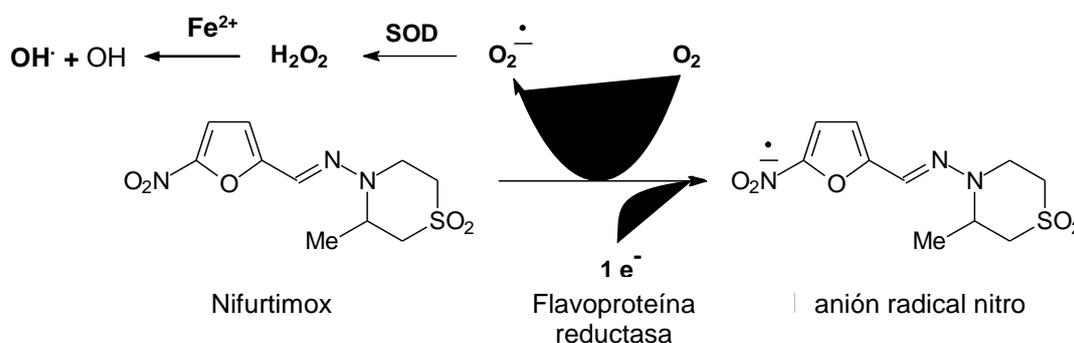


Figura 11. Mecanismo propuesto de la acción tóxica de Nifurtimox.

La actividad antichagásica de dichos fármacos fue descubierta hace más de 40 años de forma totalmente empírica y su eficacia es limitada. Ambos fármacos son activos frente a las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi* pero su mecanismo de acción parece ser diferente [13]. Nifurtimox actúa a través de la reducción metabólica del grupo nitro formando especies radicalarias tóxicas como se muestra en la Figura 11. El anión radical nitro formado reacciona para producir metabolitos reducidos del oxígeno que resultan altamente tóxicos (anión superóxido y peróxido de hidrógeno). La reacción, catalizada por metales de transición, entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno produce el radical hidroxilo [14]. Este último, un oxidante fuerte no específico, puede reaccionar y dañar moléculas de importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La generación de este estrés oxidativo afecta tanto

al parásito como al huésped mamífero. Sin embargo, las defensas antioxidantes del parásito son limitadas. En particular, la ausencia de catalasa trae aparejada la acumulación de peróxido de hidrógeno, haciendo al parásito más sensible al estrés oxidativo [15].

El mecanismo de acción del Benznidazol se relaciona con el metabolismo reductivo pero sin la generación de productos de reducción del oxígeno y con la unión covalente a macromoléculas de intermediarios de la nitrorreducción [16,17].

Tanto Nifurtimox como Benznidazol tienen una efectividad significativa en la fase aguda de la enfermedad de Chagas con más de un 80 % de cura parasitológica (resultados negativos de todos los ensayos parasitológicos y serológicos). Sin embargo, su efectividad varía según el área geográfica debido, probablemente, a diferencias en la susceptibilidad a los fármacos de diferentes cepas del parásito. Ambos fármacos presentan además importantes efectos secundarios como consecuencia del daño oxidativo o reductivo sobre los tejidos del huésped. Estos efectos secundarios incluyen anorexia, vómitos, polineuropatías periféricas y alergias que muchas veces llevan a discontinuar el tratamiento. El Benznidazol y el Nifurtimox no deben ser tomados por mujeres embarazadas o personas con insuficiencia renal o hepática. El Nifurtimox está también contraindicado para personas con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos. La mayor limitación de estos compuestos es la escasa actividad antiparasitaria en la fase crónica de la enfermedad: más del 80 % de los pacientes tratados con estos fármacos no se curan. A pesar de estas limitaciones existe consenso en que debe tratarse a todos los pacientes seropositivos para eliminar o reducir su carga parasitaria. Sin embargo, muchas veces no se recomienda el uso de estos fármacos en pacientes crónicos, ya que los riesgos superan los beneficios [16].

Estudios llevados a cabo en las últimas dos décadas han demostrado consistentemente que el *T. cruzi*, al igual que la mayoría de los hongos y levaduras patógenas, requiere de esteroides específicos para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo de vida y que inhibidores específicos de la biosíntesis del ergosterol (IBE) son potentes

agentes antiproliferativos de este parásito, tanto *in vitro* como *in vivo* [18]. Por otro lado, en la última década se ha demostrado que nuevos derivados triazólicos, inhibidores de la C14- α -demetilasa de esteroides en hongos y levaduras (Figura 12), como el posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, N.J., EUA), son capaces de inducir cura parasitológica radical en modelos murinos de enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica [18]. Más aún, los compuestos demostraron ser activos contra cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a Nifurtimox y/o Benznidazol, aún en hospederos inmunosuprimidos. La actividad tripanosomicida (los parásitos mueren por efecto del tratamiento) *in vivo* de estos compuestos ha sido atribuida a su potente y selectiva actividad intrínseca contra el parásito (las concentraciones mínimas inhibitorias contra la forma amastigota intracelular del parásito, cultivada en células de mamífero *in vitro*, está en el rango nanomolar a sub-nanomolar), así como a propiedades farmacocinéticas apropiadas para su aplicación (grandes volúmenes de distribución y largos tiempos de eliminación).

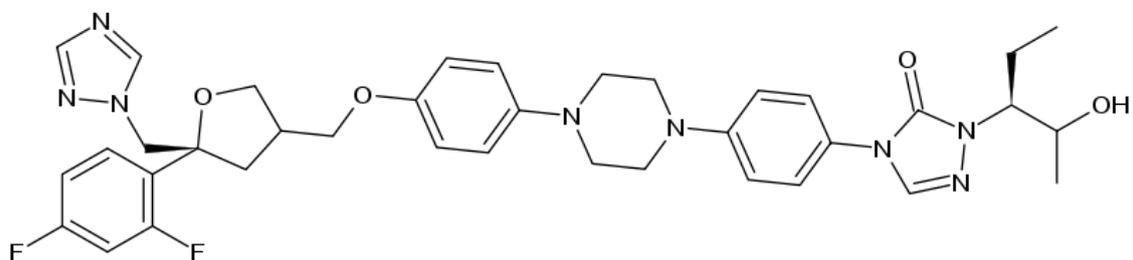


Figura 12. Estructura del Posaconazol.

El posaconazol presenta como ventaja adicional que ya fue aprobado y se comercializa en los Estados Unidos, la Unión Europea y otros países como suspensión oral Nofafil® para la profilaxis de las infecciones invasivas por *Aspergillus* y *Candida*. En 2011 se comenzó para el posaconazol oral antifúngico, una prueba de investigación para estudios clínicos contra la enfermedad de Chagas crónica asintomática, cuyos resultados se esperan para el año 2012 [19]. La propuesta de la Fase II del estudio realizado por Merck Research Laboratories, es un estudio de la suspensión de posaconazol oral,

400 mg dos veces al día, dado durante 60 días, ya sea como monoterapia o concomitantemente con Benznidazol. Con ese fin, Merck planeó inscribir a 160 pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica en sitios en América del Sur, que serán seguidos durante 360 días.

Sin embargo hasta que éste y/u otros medicamentos no estén disponibles, el protocolo estándar del tratamiento se mantiene en tratar los síntomas de la enfermedad.

1.2.5- CONTROL Y PREVENCIÓN

Dado que las vacunas no están disponibles y tampoco existen tratamientos eficaces, resulta fundamental para el control de la enfermedad insistir en la prevención de la misma. La mejor manera de prevenir la enfermedad de Chagas es la eliminación de la transmisión por el control del organismo vector y por el control de la sangre de donantes y de los órganos donados.

Se sabe que la enfermedad de Chagas existe en América desde hace más de 9000 años. En esa época el *T. cruzi* sólo afectaba a los animales salvajes [4]. Más tarde se extendió a los animales domésticos y a las personas. Este gran reservorio de parásitos de *T. cruzi* en animales salvajes de las Américas imposibilita la erradicación del parásito. Por lo tanto, los objetivos fundamentales deben ser la eliminación de la transmisión y el acceso a la atención de la salud de la población infectada.

En relación al control de la transmisión primaria, el *T. cruzi* puede infectar a varias especies de triatomíneos. Dependiendo de la zona geográfica, la OMS recomienda los siguientes enfoques para la prevención y el control:

- la fumigación con insecticidas de las casas y sus alrededores
- la mejora de las casas habitación para evitar la infestación por el vector
- la utilización de medidas preventivas personales tales como el uso de mosquiteros
- la implementación de buenas prácticas de higiene en la preparación de alimentos, transporte, almacenamiento y consumo
- el chequeo de donantes de sangre

- el chequeo de los donantes de órganos, tejidos o células, la detección en recién nacidos de madres infectadas, y en los hermanos de los niños infectados utilizando diagnóstico precoz para luego continuar con tratamiento

En general, el uso de insecticidas para el control puede tener inconvenientes debido a su costo, a la preocupación de que los vectores puedan desarrollar resistencia a los productos químicos y a los posibles efectos tóxicos de los insecticidas en las especies que no sean el objetivo de la fumigación. Una herramienta para el control de los vectores, que es barata y eficaz, es un recipiente que provee OMS llamado fumigante CIPEIN Pf-6. Su fácil manejo permite a las comunidades locales desempeñar un papel activo en el control de la enfermedad. Otra estrategia para el control de los vectores, que se está investigando, es tratar de eliminarlos destruyendo a las bacterias simbióticas presentes en el sistema digestivo de los insectos [20].

En cuanto a la prevención secundaria es importante el control de la transmisión congénita por medio del diagnóstico de las mujeres embarazadas infectadas y la detección de una posible infección del recién nacido con exámenes parasitológicos y serológicos después de los ocho meses de edad cuando ya los anticuerpos de la madre no están presentes.

En cuanto a la mejora en las viviendas rurales esto incluye sustituir los pisos y techos de barro y paja por pisos de cemento y techos de chapa y la colocación de yeso en las grietas de las paredes ya que en ellas habitan los insectos vectores.

1.2.6- RESPUESTA DE LA OMS

Como ya se indicó, desde la década de 1990 ha habido importantes logros en el control de parásitos y vectores en América Latina por iniciativas intergubernamentales promovidas por la Organización Panamericana de la Salud. Estas iniciativas multinacionales han conducido a importantes reducciones en la transmisión por vectores domésticos. Además, el riesgo de

transmisión por transfusión de sangre se ha reducido considerablemente en toda América Latina. Estos avances han sido posibles debido al fuerte compromiso de los Estados miembros endémicos, y la fuerza de sus organizaciones de investigación y control, junto con el apoyo de muchos socios internacionales.

Aún debe enfrentarse una serie de desafíos adicionales:

- la sostenibilidad, el mantenimiento y la consolidación de los avances de control
- la aparición de la enfermedad de Chagas en regiones que antes se consideraban libres de la enfermedad como la cuenca del Amazonas
- la reaparición de la enfermedad en las regiones donde el control había sido progresivo como la región del Chaco de Argentina y Bolivia
- la difusión, debida principalmente a la movilidad de población cada vez mayor entre América Latina y el resto del mundo
- el diagnóstico y tratamiento de millones de personas infectadas

Para alcanzar la meta de la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas y brindar atención médica a los pacientes infectados/enfermos, tanto en los países endémicos como no endémicos, la OMS tiene como objetivo aumentar la creación de redes a nivel mundial y reforzar las capacidades regionales y nacionales, concentrándose en:

- fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica mundial y los sistemas de información
- prevención de la transmisión por transfusión de sangre y trasplante de órganos en países endémicos y no endémicos
- promover la identificación de las pruebas de diagnóstico para la detección y diagnóstico de las infecciones
- ampliación de la prevención secundaria de la transmisión congénita y manejo de casos de infección congénita y no congénita
- promover el consenso sobre el manejo adecuado de casos

1.2.7- BLANCOS DESCRITOS PARA FÁRMACOS TRIPANOSOMICIDAS

La dificultad en la obtención de fármacos realmente adecuados para combatir la enfermedad se encuentra relacionada con alguna de las características de *T. cruzi*. Por un lado, ha sido difícil encontrar blancos terapéuticos específicos debido a la gran cantidad de rutas metabólicas comunes entre el parásito y los mamíferos. Por otro lado, no existe un órgano blanco único dónde debería actuar el fármaco, debido a la amplia distribución celular y tisular de las distintas formas del parásito, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad.[17,21,22] Sin embargo, el creciente aumento en el conocimiento profundo de la biología de *T. cruzi* y de otros organismos relacionados ha permitido detectar similitudes y diferencias entre parásito y huésped, identificando algunos procesos bioquímicos y/o moléculas que podrían constituir posibles blancos terapéuticos.

Algunas de las principales estrategias de la búsqueda de nuevos fármacos selectivos para combatir la enfermedad de Chagas se listan a continuación:

- Compuestos que sufren bio-reducción “no selectiva”
- Compuestos que inhiben la acción de ADN-topoisomerasas
- Inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos de purina
- Inhibidores de la dihidrofolato reductasa
- Inhibidores de enzimas del metabolismo de la glucosa
- Inhibidores del metabolismo de la tripanotona
- Inhibidores de la biosíntesis de esteroides de membrana
- Inhibidores de proteinasas

El análisis de la secuencia completa del genoma de *T. cruzi* reveló la presencia de más de 10.000 genes codificadores de proteínas, lo que abre la posibilidad de identificar nuevos potenciales blancos para el desarrollo de nuevos fármacos contra este parásito [23-26].

1.3- QUÍMICA INORGÁNICA MEDICINAL

A pesar de los importantes avances realizados en el estudio de la bioquímica y fisiología del *Trypanosoma cruzi* en busca de nuevos blancos terapéuticos para combatir la enfermedad, su farmacología es aún ineficiente. No existen, al día de hoy, métodos efectivos de inmunoprofilaxis o quimioterapia.

La Química Inorgánica aplicada al desarrollo de nuevos fármacos ha aportado un importante número de fármacos metálicos para el tratamiento de diferentes patologías. Un significativo número de ellos ha sido incluido en el vademecum internacional o se encuentra en fases clínicas. La Química Inorgánica Medicinal ha demostrado ofrecer posibilidades reales para el descubrimiento de nuevos fármacos con mecanismos de acción novedosos. Compuestos de diferentes metales han presentado actividad quimioterapéutica, como anticancerígenos, antivirales o antibacterianos. Sin embargo, poco énfasis ha sido puesto en el desarrollo de fármacos antiparasitarios [27-31].

1.4- COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON ACTIVIDAD CONTRA *T. cruzi*

Dado que algunas parasitosis propias de Latinoamérica, como la enfermedad de Chagas, no despiertan la atención de las empresas farmacéuticas internacionales por afectar, principalmente, a la población de más bajos recursos, en las últimas dos décadas algunos grupos académicos de bioinorgánicos han centrado su atención en el desarrollo de fármacos metálicos para combatirlas. Así, la búsqueda de una respuesta farmacológica a estas enfermedades derivó hace unos años en la síntesis de complejos metálicos de fármacos comerciales como pentamidina, clotrimazol y ketoconazol, a fin de mejorar su actividad y disminuir su toxicidad. En muchos casos, se obtuvieron productos metálicos con un perfil farmacológico mejorado [32].

Estos primeros intentos sistemáticos de generar compuestos metálicos con actividad tripanosomicida por coordinación de fármacos con actividad antichagásica con metales de importancia farmacológica se desarrollaron en la década de los 90s y desencadenaron con cierta lentitud una creciente investigación en esa área por parte de los químicos bioinorgánicos. A

continuación solamente se describirán ejemplos seleccionados. En particular, se describirán algunos de los ejemplos iniciales, desarrollados principalmente por el grupo del Prof. Sánchez-Delgado, que imprimieron un empuje inicial a esta área de la Química Inorgánica Medicinal.

1.4.1- Complejos de Platino

Debido al reconocimiento de algunas similitudes bioquímicas entre los tripanosomas y las células tumorales, en términos de metabolismo y la falta de protección enzimática por catalasas y peroxidasas, los primeros esfuerzos fueron dirigidos a la utilización de agentes antitumorales como tripanosomicidas (los parásitos mueren por efecto del tratamiento), en particular el cisplatino [33]. En el trabajo pionero de Farrell y Williamson [34] fue encontrada una buena correlación entre las propiedades antitumorales y tripanosomistáticas (disminuye la tasa de proliferación de los parásitos) de complejos de platino, tales como cisplatino y carboplatino. En general, los complejos de Pt resultaron ser activos contra *Trypanosoma rhodesiense* *in vitro*, pero no *in vivo* [33], a menos que se administraran en dosis altas junto con disulfiram o solución salina fisiológica [35]. Para evitar los problemas de toxicidad relacionados con el uso de cisplatino, se emplearon con éxito macromoléculas, como el ácido poliglútamico, mostrando una marcada actividad *in vivo* contra *T. congolense*, responsable de Nagana, enfermedad del ganado [36].

También se sabe que los complejos de Pt(II) con ligandos 2,2':6'2"-terpiridina (Figura 13) inhiben el crecimiento de la forma amastigota intracelular del *T. cruzi* en un 78% a una concentración de 1 μM , y, en un 100% para la forma tripomastigota de *T. brucei* a una concentración de 0,03 μM [37]. Los complejos más eficaces de esta serie [Pt(II)(4'-cloro-2,2':6'2"-terpiridina)(amina)] y [Pt(II)(4'-p-bromofenil-2,2':6'2"-terpiridina)(4-picolina)], inhibieron irreversiblemente y de forma selectiva a una de las enzimas responsables del mecanismo de desintoxicación más importante del parásito, la tripanotona reductasa [38].

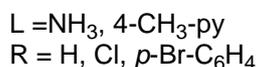
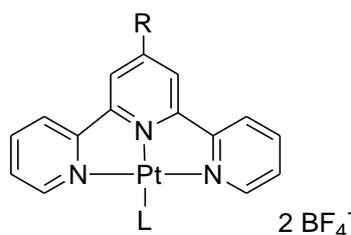


Figura13. Complejos Pt-terpiridina activos contra Trypanosoma.

En un ejemplo de la sinergia metal-ligando bioactivo de fármacos metálicos, el complejo de Pt(II) con el fármaco pentamidina (Figura 14), mostró ser más eficaz que la pentamidina libre frente a *T. brucei in vitro* así como también *in vivo* [39].

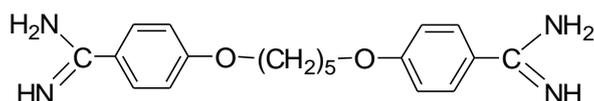


Figura 14. Pentamidina

1.4.2- Complejos de Rutenio

En los primeros trabajos de Farrell y Williamson, se reportó que la actividad antitumoral de una serie de complejos de Ru-amina y Ru-DMSO (DMSO = dimetilsulfóxido) fue importante, aunque inferior a las actividades alcanzadas por los compuestos de Pt [34].

La coordinación de rutenio a ligandos orgánicos inhibidores de la biosíntesis de esteroides (SBI's), como el clotrimazol (CTZ) y ketoconazol (KTZ), condujo a compuestos más efectivos que los ligandos libres como resultado de la sinergia metal-fármaco. Los SBI's se han utilizado en el diseño racional de nuevos agentes antiparasitarios, ya que pueden bloquear determinadas vías de la biosíntesis de lípidos, por ejemplo, por inhibición de la enzima citocromo P450 14 α -demetilasa involucrada en la producción de ergosterol, que es esencial para el parásito [40]. La coordinación del clotrimazol al rutenio en el complejo [RuCl₂(CTZ)₂] (Figura 15) dio como resultado una inhibición del 90% en la

proliferación de la forma epimastigota de *T. cruzi* a una concentración de 10^{-5} M, mientras que el CTZ dio sólo un efecto de inhibición modesto a la misma concentración. Algo muy importante es que mientras que el fármaco produce un efecto tripanosomistático el complejo de Ru fue tripanosomicida. En otros experimentos realizados con amastigotas intracelulares de *T. cruzi* cultivadas en células mamíferas (células Vero), la erradicación de la infección experimental se logró a una concentración del complejo de Ru de 10^{-8} M, lo que representa un aumento de la actividad de CTZ por un factor de alrededor de 10. Además, $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ no tuvo efectos nocivos en las células de mamífero en una concentración del fármaco 10 veces mayor que la requerida para erradicar la infección, mientras que CTZ si afectó a las células Vero a una concentración en la que fue efectivo. Esto indica que el complejo de Ru no sólo es mucho más activo, también es mucho menos tóxico que el CTZ libre [41].

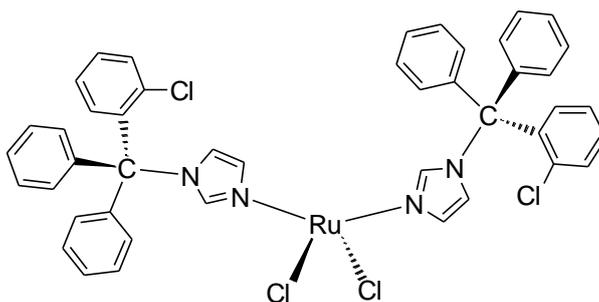


Figura 15. Complejo de $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ con propiedades tripanosomicidas.

El mecanismo de acción de este complejo ha sido investigado en detalle. Se piensa que se hidroliza sustituyendo ligandos cloruro por acuo para producir el intermediario bis(aquo), $[\text{Ru}(\text{CTZ})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, que interactúa con el ADN (a través de unión covalente). Esto se traduce en la liberación del ligando CTZ, que luego ejerce su acción "SBI's". La superposición de estos dos modos de acción (SBI's + unión al ADN) es la que determina la mayor actividad y menor toxicidad observada [32,42]. El análogo de Ru(III), $[\text{RuCl}_3(\text{CTZ})_3]$, también muestra una buena actividad, pero el aumento sinérgico no es tan bueno como el del compuesto de Ru(II) [43].

El Ketoconazol (KTZ) (Figura 16) es otro "SBI's" con mejores propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas que el CTZ que le permiten una mejor

penetración en el tejido, mayor vida media biológica y una amplia gama de acción. La actividad del KTZ es también mucho mayor por la coordinación con iones rutenio, mostrando aproximadamente 70% de inhibición de la proliferación de epimastigotas de *T. cruzi*, en comparación con 20% exhibido por el KTZ libre. Los complejos $[\text{RuCl}_2(\text{KTZ})_2]$ y $[\text{RuCl}_3(\text{KTZ})_2(\text{H}_2\text{O})]$ mostraron actividades muy similares [43]. Sin embargo, las pruebas realizadas con $[\text{RuCl}_3(\text{KTZ})_2(\text{H}_2\text{O})]$ en amastigotas de *T. cruzi* cultivados en células Vero mostraron un aumento de la actividad con la erradicación de la infección a concentraciones 10^{-10} M [32].

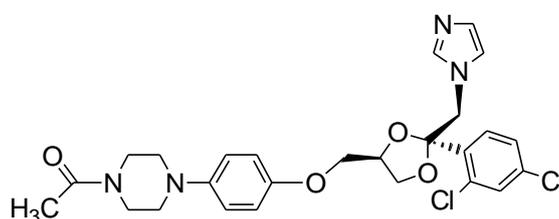


Figura 16. Ketoconazol

1.4.3. Otros complejos metálicos

La coordinación de CTZ a otros iones metálicos, como Rh y Au en los complejos $[\text{RhCl}(\text{COD})(\text{CTZ})]$ (COD = 1,5-ciclooctadieno) y $[\text{AuCl}_3(\text{CTZ})]$, también dio lugar a un aumento de la actividad del fármaco libre, mientras que para $[\text{Cu}(\text{CTZ})_2]\text{PF}_6$ y $\text{K}_2[\text{PtCl}_4(\text{CTZ})_2]$ el efecto sobre la proliferación de epimastigotas de *T. cruzi* fue ligeramente menor que el de CTZ libre en las mismas concentraciones [42]. La mayor eficacia de los compuestos de rutenio puede estar asociada a una similitud en el metabolismo de rutenio y hierro, que también se ha considerado como responsable de la baja toxicidad de los compuestos de rutenio como agentes antitumorales [44]. Otros estudios realizados con $[\text{Cu}(\text{CTZ})_4]\text{Cl}_2$, $[\text{Cu}(\text{CTZ})\text{Cl}_2]_2$, $[\text{Cu}(\text{KTZ})_3]\text{Cl}_2$, $[\text{Cu}(\text{KTZ})\text{Cl}_2]_2$, $[\text{Au}(\text{CTZ})\text{PPh}_3]\text{PF}_6$ y $[\text{Au}(\text{KTZ})\text{PPh}_3]\text{PF}_6$, también en epimastigotas de *T. cruzi*, mostraron que todos estos complejos eran mucho más activos que los ligandos libres, pero el aumento de la actividad no se vio afectado significativamente por

el número de ligandos unidos al centro metálico o la identidad de los iones metálicos [32,45].

El concepto de sinergia metal-fármaco contra el parásito se introdujo en los primeros trabajos de Farrell y Williamson que mostraron que el índice de selectividad de Berenil, Etidio y Samorin (Figura 17) se podía mejorar por la formación de complejos de Pt, Rh y Ru, ya sea por un aumento en la actividad, una disminución de la toxicidad, o ambos [34].

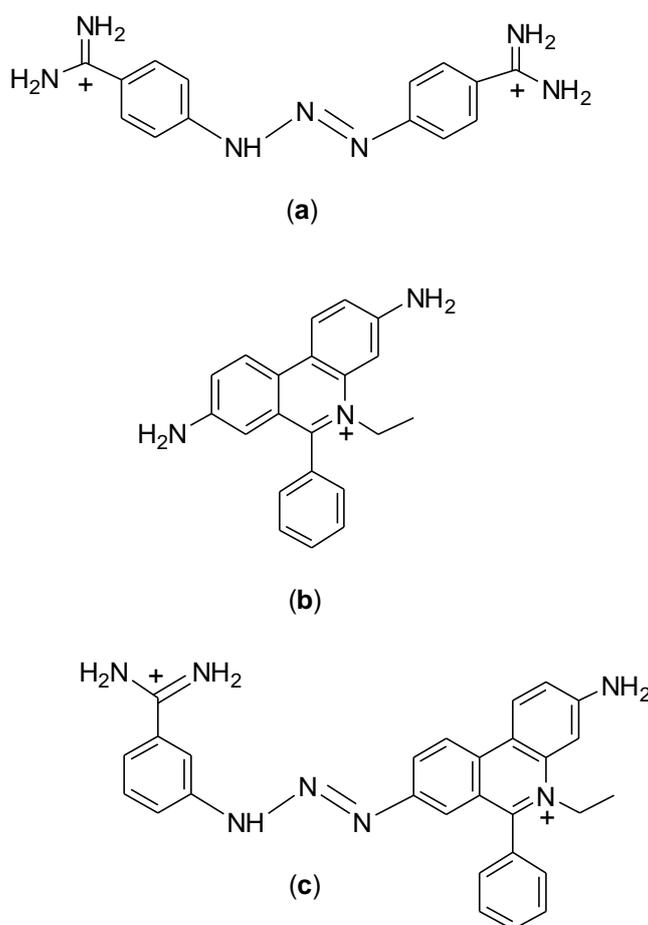


Figura 17. Cationes de Berenil (a), Etidio (b) y Samorin (c).

1.4.4. Otros complejos metálicos relevantes más recientes

El grupo de investigación que integro ha desarrollado en los últimos 10 años diferentes series de compuestos metálicos con actividad contra *T. cruzi* [46-48]. Varios de los trabajos del grupo en esta área involucran compuestos de Pd y

Ru con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano. Aquellos de Pd serán analizados más adelante en este Trabajo. Si bien varios de los compuestos desarrollados no forman parte de este Trabajo de Tesis directamente, la experiencia adquirida por la suscrita le permitió colaborar en diferentes aspectos de su desarrollo. Por ejemplo, se participó también en el desarrollo de compuestos bioactivos de oxovanadio(IV) y paladio (II) con N^1, N^4 -dióxidos de derivados 6(7) sustituidos de 2-carbonitrilo-3-aminoquinoxalinas [48]. También, otros integrantes del grupo han desarrollado compuestos de metales de la primera serie de transición d con bisfosfonatos bioactivos. En este sentido se han obtenido complejos de manganeso, cobalto, níquel y cobre con los bisfosfonatos comerciales risedronato (Ris), alendronato (Ale) y pamidronato (Pam) de fórmulas $[M^{II}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $[M_2^{II}(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{CuPam}] \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $[M^{II}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Para la mayoría de estos complejos se observó un aumento de la actividad *in vitro* anti *T. cruzi* como consecuencia de la coordinación tanto en la forma epimastigota como en la amastigota y una muy baja toxicidad en células mamíferas. Los complejos mantienen el mecanismo de acción principal de los ligandos, inhibiendo selectivamente la farnesil difosfato sintasa parasitaria (ruta biosintética de esteroides y poliisoprenoides) sin inhibir la enzima humana [49]. Por otro lado, el grupo utilizó una estrategia diferente para desarrollar compuestos de vanadio con actividad anti-*T. cruzi* que incluyen ligandos quelantes polipiridínicos (N-N) con capacidad intercalante del ADN comprobada a efectos de desarrollar compuestos capaces de interactuar con el ADN como blanco [47].

Otros grupos han desarrollado compuestos metálicos con propiedades tripanosomicidas interesantes a partir de la complejación de fármacos antichagásicos. Son de resaltar los trabajos de Franco, Santana Silva y col. [50-54]. Ellos desarrollaron el complejo de rutenio hidrosoluble, *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$, donde Bz es Benznidazol. Este compuesto mostró mayores efectos antiproliferativos *in vitro* en *T. cruzi* (epimastigotas) ($\text{Cl}_{50} = 127 \mu\text{M}$) que el Benznidazol ($\text{Cl}_{50} > 1 \text{ mM}$). Además, cuando se administró oralmente el compuesto metálico a ratones infectados (modelo agudo) a una dosis 1000 veces menor que la dosis óptima para el Benznidazol libre, el compuesto metálico eliminó las amastigotas de tejido miocárdico y

músculo esquelético. El compuesto también exhibió baja toxicidad *in vitro* en macrófagos J774 y muy baja toxicidad *in vivo* en ratones (Swiss mice) [50].

El mismo grupo desarrolló compuestos Ru-NO con actividad contra *T. cruzi*. Varios compuestos nitrosil amina de rutenio de fórmula *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L₂)](X)_n, capaces de liberar concentraciones de NO durante la fase inicial de la infección aguda, mostraron actividad *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos, donde L₂ = imidazol unido por el nitrógeno, piridina, isonicotinamida o trietilfosfito, exhibieron un índice terapéutico ≥ 10 para *T. cruzi*. Los resultados sugieren que el NO liberado luego de la reducción de los complejos en medio biológico podría ser responsable de la actividad de estos complejos de Ru donores de NO [51-54].

Por otro lado, las enzimas son blancos naturales de los fármacos inorgánicos. Algunos grupos han realizado esfuerzos para diseñar complejos metálicos que pudieran unirse específicamente a enzimas parasitarias específicas. En particular, el grupo de McKerrow y *col* testeó varios compuestos metálicos con ligandos no bioactivos como potenciales inhibidores de cisteína proteasas de tripanosomátidos [55]. La cruzipaína es la más abundante cisteína proteasa de *T. cruzi* y ha sido validada como blanco potencial para el desarrollo de quimioterápicos para la enfermedad de Chagas [56]. Este grupo ha encontrado que algunos complejos de Pd(II), Re(V) y Au(III) resultan potentes inhibidores de la enzima si bien no se ha observado una clara correlación entre la actividad inhibitoria de la enzima y la inhibición de la crecimiento de *T. cruzi*.

1.5- METALES SELECCIONADOS: Pd, Pt, Au

En este Trabajo de Tesis se planteó un estudio comparativo tanto fisicoquímico como biológico de complejos de metales del llamado “grupo del platino”, en particular Pd y Pt, con ligandos bioactivos pertenecientes a dos familias de compuestos orgánicos: tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano y *N*-óxidos de aminas aromáticas. Nuestro interés central es conocer el efecto de la naturaleza del metal central en complejos análogos o isoestructurales sobre las propiedades químico-estructurales, fisicoquímicas y biológicas de los mismos. Nuestro laboratorio contaba con experiencia previa con complejos de paladio de estas tiosemicarbazonas que indicaba que la conjunción de un metal de

transición de importancia terapéutica y estos ligandos bioactivos en una misma molécula convertía a los complejos metálicos resultantes en buenos candidatos para actuar como antichagásicos por un mecanismo dual, sinérgico o al menos aditivo. Estos antecedentes determinaron la selección de estos complejos de Pd para el estudio comparativo a desarrollarse en este Trabajo. Además, el estudio de complejos de Pd(II) constituye un área de interés creciente para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, principalmente antitumorales, y ofrece interesantes perspectivas para la consolidación de avances más sistemáticos en el área de la Química Inorgánica Medicinal [57].

En cuanto al platino, éste integra junto con paladio, rutenio, osmio, rodio e iridio el denominado “grupo del platino” caracterizado por que sus integrantes, de los grupos 8, 9 y 10 de los periodos 5 y 6 de la Tabla periódica, presentan importantes similitudes químicas. En particular, paladio y platino presentan importantes semejanzas químicas debido a que son metales de las series de transición 4d y 5d, respectivamente, pertenecientes al mismo grupo del sistema periódico. En particular, la notable analogía existente entre la química de coordinación de Pt(II) y de Pd(II) ha llevado al estudio de complejos de Pd, análogos al cisplatino, como potenciales fármacos antitumorales. Sin embargo, Pt y Pd muestran diferencias en reactividad que justificarían diferencias en su comportamiento biológico (actividad y toxicidad). Esto hace interesante el desarrollo de nuevos complejos de Pt análogos a los ya desarrollados por nuestro laboratorio a efectos de estudiar su química de coordinación y sus propiedades fisicoquímicas de interés biológico, de modular la actividad de estos ligandos y de disminuir o modificar la toxicidad de los compuestos metálicos obtenidos. También, los compuestos de platino han tenido y continúan teniendo una importancia terapéutica fundamental que nació hace más de 40 años con el descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino. Actualmente se realiza una intensa investigación para el desarrollo de nuevos compuestos de Pt con actividad antitumoral que presenten menor toxicidad y mayor espectro de acción de forma que pudieran sustituir al cisplatino y sus derivados de segunda generación en el uso clínico [58-62]. Como ya se indicó, la similitud entre el metabolismo de las células tumorales y del *T. cruzi* determinó que un alto porcentaje de fármacos antitumorales también resultarían tripanosomicidas o tripanosomistáticos. Por ejemplo, se ha descrito en items

anteriores que complejos de Pt(II) con ligandos terpiridina inhiben el crecimiento de la forma amastigota de *T. cruzi*. Este es entonces otra causa de nuestro trabajo con Pt.

Esta similitud metabólica célula tumoral-*T. cruzi* justificó también la inclusión del oro en el estudio comparativo de los compuestos de Pd y Pt con *N*-óxido de 2-mercapopiridina que se describirán en el capítulo 5 de este Trabajo de Tesis. Si bien la crisoterapia (uso de compuestos de oro en medicina) incluye el uso clínico de varios compuestos de oro (auranofina, aurotiomalato, entre otros) para el tratamiento de la artritis reumatoidea, actualmente se realizan intensos esfuerzos para el desarrollo de compuestos de oro con actividad antitumoral y el estudio de su mecanismo de acción. Diferentes compuestos de Au(I) y Au(III) han mostrado una reconocida potencialidad en terapia antitumoral [63-65].

1.6. EL ADN COMO BLANCO DE METALOFÁRMACOS

Dadas su estructura y su importancia biológica, los ácidos nucleicos, y en especial el ADN, constituyen blancos particularmente interesantes para los compuestos metálicos bioactivos. En particular, se ha demostrado que los antitumorales metálicos en uso clínico como el cisplatino ejercen su acción citotóxica por interacción con esta biomolécula. Dada la existencia de similitudes entre el metabolismo de las células tumorales y del *T. cruzi* y otros tripanosomátidos, éste constituye también un blanco de interés en el desarrollo de agentes contra *T. cruzi* [33,34]. Por esta causa, si bien se estudiarán otros potenciales blancos parasitarios, este Trabajo de Tesis se ha centrado especialmente en el estudio de la interacción de los potenciales metalofármacos desarrollados con el ADN y en el aprendizaje y adquisición de experiencia en diferentes técnicas de estudio de esa interacción. Entre ellas se ha dado un particular énfasis al uso de técnicas de electroforesis en gel debido principalmente a la riqueza de la información que puede brindar.

Los ácidos nucleicos están constituidos por cadenas poliméricas. Las unidades monoméricas o nucleótidos están formadas por una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo), un azúcar (ribosa o 2'-

deoxirribosa) y un grupo fosfato o varios (2 ó 3). La condensación de estos nucleótidos a través de los grupos 3'-hidroxilo y 5'-hidroxilo de los azúcares de dos nucleótidos vecinos por medio de un puente fosfato, formando un enlace fosfodiéster, conduce a la estructura primaria de los ácidos nucleicos (Figura 18) [66-68]. A su vez la bases pueden aparearse por medio de enlaces de hidrógeno lo que da lugar a la estructura secundaria (Figura 19). El ADN adopta una estructura de doble hélice donde los pares de bases se apilan en el interior de la estructura y los fosfatos se disponen en su parte exterior.

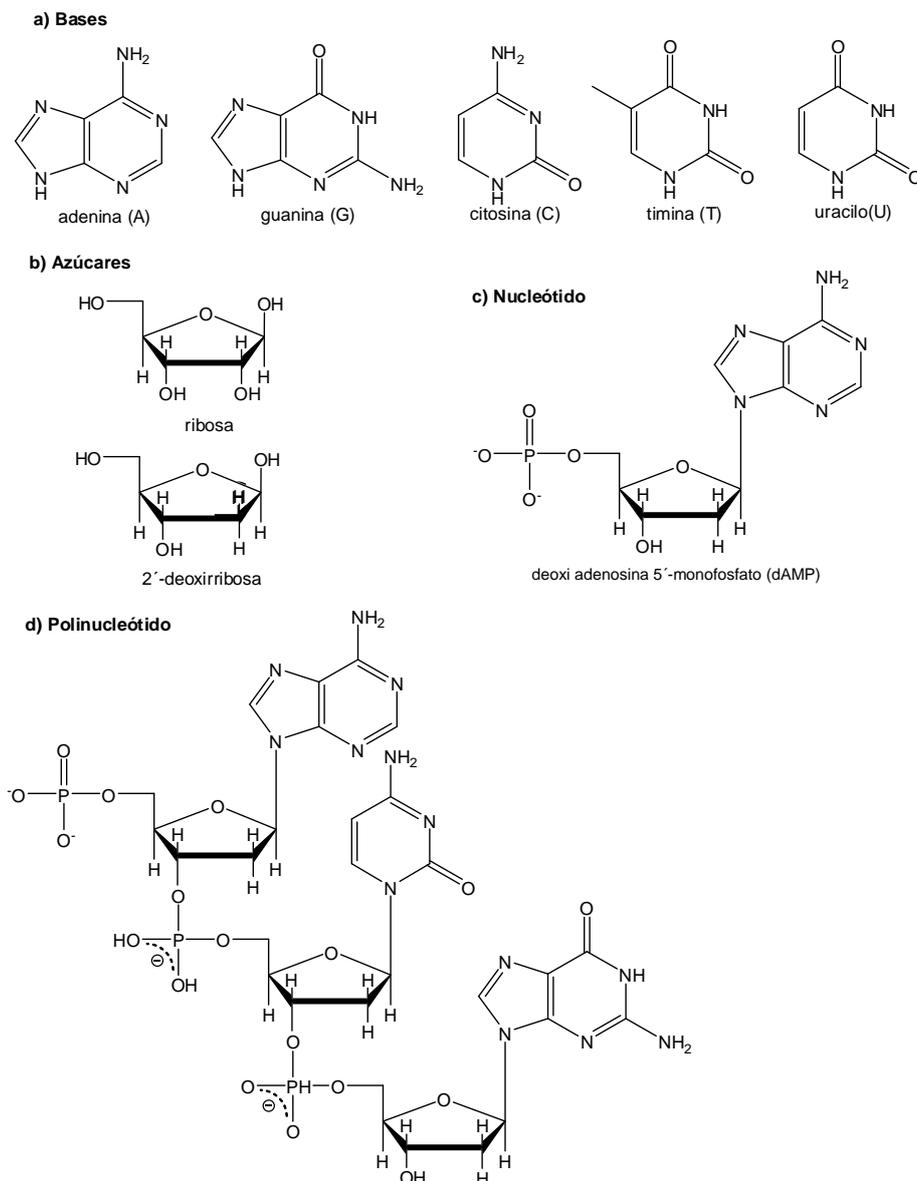


Figura 18. Unidades que forman la estructura de los ácidos nucleicos.

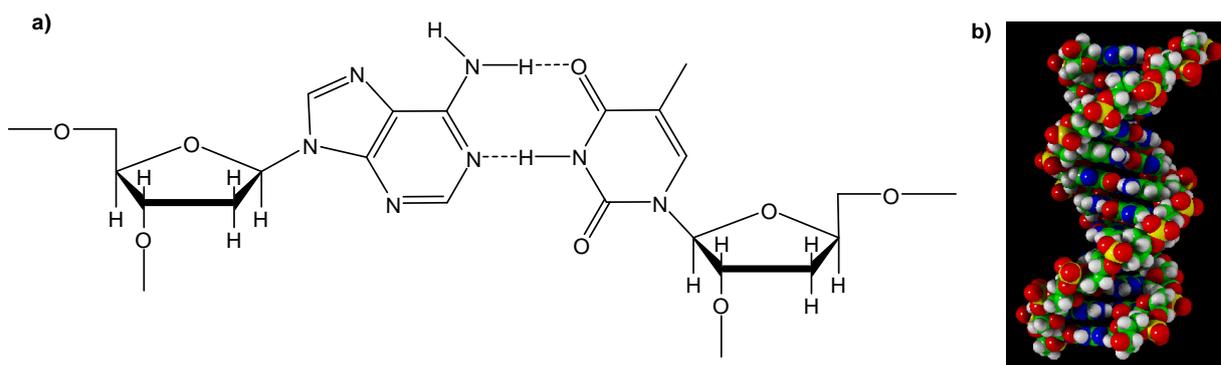


Figura 19. a) Esquema mostrando un ejemplo de la formación de enlaces de hidrógeno entre bases (apareamiento); b) Estructura B del ADN.

El rol fundamental del ADN en la duplicación celular y transmisión genética determina que éste sea una buena diana terapéutica para el diseño de nuevos fármacos. El ADN es un blanco particularmente importante para los complejos metálicos, ya que ofrece varios sitios potenciales donde el metal puede unirse, fundamentalmente mediante enlaces covalentes coordinados [69-72].

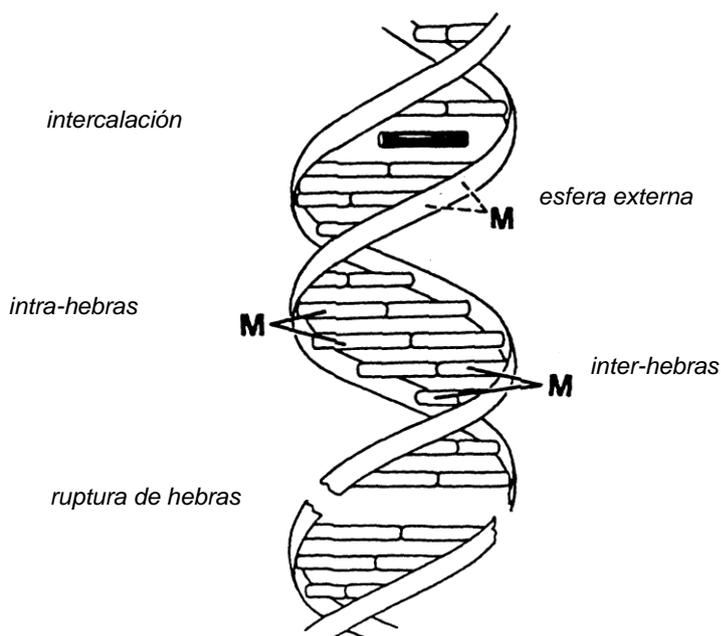


Figura 20. Modos de interacción de compuestos metálicos con el ADN [36].

Las nucleobases son ligandos ambidentados que aún formando parte de los nucleótidos y nucleósidos presentan diferentes sitios de coordinación, principalmente con N y/o O como átomos donores. Estas uniones ofrecen la posibilidad de crear entrecruzamientos intra e interhebras (Figura 20). También, son posibles uniones no covalentes, como enlaces de hidrógeno o uniones electrostáticas, y la intercalación de moléculas planas entre pares de bases. El tipo de interacción se ve afectado por la naturaleza del metal y su estado de oxidación, la naturaleza de los ligandos y la estereoquímica del complejo metálico, entre otros aspectos. En particular, los metales de la segunda y tercera serie de transición d, entre ellos los seleccionados en este Trabajo de Tesis, son aquellos para los que se ha descrito una más fuerte interacción con esta biomolécula [36].

1.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L. Neglected tropical diseases: Multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. J. Med. Chem. 2009, 52, 7339-7359.
2. http://www.who.int/neglected_diseases/, fecha de consulta 8/7/2011
3. Bonet Basiero, A.; Bardají, A. Epidemiología de la angina estable. Rev. Esp. Cardiol. 2010, 10(Supl.B), 3-10.
4. <http://www.who.int/> , fecha de consulta 8/7/2011
5. <http://chagasusach.wordpress.com/>, fecha de consulta 8/7/2011
6. <http://www.who.int./ctd/chagas>, fecha de consulta 10/7/2005
7. http://www.treatchagas.org/cp_chagas_globalview.aspx , fecha de consulta 10/9/2010
8. Ribeiro, I.; Sevcsik, A.M.; Alves, F.; Diap, G.; Don, R.; Harhay, M.O.; Chang, S.; Pecoul, B. New improved treatments for Chagas Disease: From the R&D pipeline to the patients. PLoS Negl. Trop. Dis. 2009, 3, e484. Doi:10.1371/journal.pntd.0000484.
9. www.smu.org.uy/dpmc/hmed/historia/articulos/chagas.pdf, fecha de consulta noviembre 2011.
10. www.archivo.presidencia.gub.uy/_web/noticias/2007/.../2007080103.htm fecha de consulta noviembre 2011.
11. Barrett, M. P.; Burchmore, R. J. S.; Stich, A.; Lazzari, J. O.; Frasc, A.; Cazzulo, J. J.; Krishna, S. The trypanosomiasis. The Lancet 2003, 362, 1469-1480.

12. Ossimani, J. J. Parasitología Médica; Librería Médica Editorial: Montevideo, Uruguay, 1982, Vol. I.
13. Moreno, S.; Docampo, R.; Mason, R.; León, W.; Stoppani, A. O. M. Different behaviours of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch. Biochem. Biophys. 1982, 218, 585-591.
14. Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Stoppani, A. O. M.; León, W.; Cruz, F. S.; Villalta, F.; Muniz, R. F. A. Mechanism of Nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol. 1981, 30, 1947-1951.
15. Turrens, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Mol. Aspects Med. 2004, 25, 211-220.
16. Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitol. 2003, 19, 495-501.
17. Cerecetto, H.; González, M. Chemotherapy of Chagas disease: status and new developments. Curr. Topics Med. Chem. 2002, 2, 1185-1234.
18. Urbina, J. A. New insights in Chagas' disease treatment. Drugs of the Future 2010, 35(5): 409-419.
19. www.rttnews.com/Content/BreakingNews.aspx?Id=1343130&SM=1, fecha consulta noviembre 2011.
20. www.bc.edu/.../research/infect/chagas, fecha consulta noviembre 2011.
21. Croft, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999, 94, 215-220.

22. Tan, H.; Andrews, N. W. Don't bother to knock – the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2002, 18, 427-428.
23. Merlino, A.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H. Targets for anti-*T. cruzi* drugs in the post-genomic era. Curr. Enzyme Inhib. 2010, 6, 195-210.
24. Urbina, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 2010, 115, 55-68.
25. Rivera, G.; Bocanegra-García, V.; Ordaz-Pichardo, C.; Noguera-Torres, B.; Monge, A. New-therapeutic-targets-for-drug-design-against-trypanosoma-cruzi-advances-and-perspectives. Curr. Med. Chem. 2009, 16, 3286-3293.
26. Maya, J. D.; Cassels, B.K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp. Biochem. Physiol., Part A 2007, 147, 601–620.
27. Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. Dalton Trans. 2008, 183–194.
28. Ronconi, L.; Peter J.; Sadler, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. Coord. Chem. Rev. 2007, 251, 1633–1648.
29. Thompson, K. H.; Orvig, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. Dalton Trans. 2006, 761–764.
30. Bruijninx, P.C.A; Sadler, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. Curr. Op. Chem. Biol. 2008, 12,197–206.
31. Storr, T.; Thompson, K. H.; Orvig, C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. Chem. Soc. Rev., 2006, 35, 534–544.

32. Sánchez-Delgado, R. A.; Anzellotti, A.; Suárez, L., Metal ions in Biological Systems, H. Sigel, A. Sigel (eds.), Marcel Dekker, New York 2004, 41, 379-419.
33. Kinnamon, K.; Steck, E. A.; Rane E. S. Activity of antitumour drugs against African trypanosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 157-160.
34. Farrell, N. P.; Williamson, J.; McLaren D. J. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. *Biochem. Pharmacol.* 1984, 33, 961.
35. Wysor, M. S.; Zwelling, L. A.; Sanders, J. E.; Grenan, M. M. Cure of mice infected with *Trypanosoma rhodesiense* by cis-diamminedichloroplatinum (II) and disulfiram rescue. *Science* 1982, 217, 454-456.
36. Farrell, N. P., In *Catalysis by Metal Complexes*, Ugo, R. and James, B. R., Eds.; Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, 1989; Vol. 11, cap. 10, pp. 222-242.
37. Lowe, G.; Droz, A. S.; Vilaivan, T.; Weaver G. W.; Tweedale, L.; Pratt, J. M.; Rock P.; Yardley V.; Croft S. L. Cytotoxicity of (2,2':6',2''-terpyridine)platinum(II) complexes to *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 999-1006.
38. Bonse, S.; Richards, J.M.; Ross, S.A.; Lowe, G.; Krauth-Siegel, R.L. (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4812-4821.
39. Dreyfuss, G; Pénicaut, B.; Nicolas, J. A.; Craciunescu, D.; Loiseau, P. Trypanocidal activity and platinum plasma kinetics of cis-Pt pentamidine iodide in *Trypanosoma brucei* sheep model. *Trop. Med. Parasitol.* 1993, 44, 95-98.
40. Urbina, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 1997, 114, S91-99.

41. Sánchez-Delgado, R. A.; Lazard, K.; Rincon, L.; Urbina, J. A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2041-2043.
42. Sánchez-Delgado, R. A.; Navarro, M.; Lazard, K.; Atencio, R.; Capparelli, M.; Vargas, F.; Urbina, J. A., Bouillez, A.; Noels, A. F.; Masi, D. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg. Chim. Acta.* 1998, 275-276, 528.
43. Navarro, M.; Lehmann, T.; Cisneros-Fajardo, E. J.; Fuentes, A.; Sánchez-Delgado, R. A.; Silva, P.; Urbina, J. A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. *Polyhedron* 2000, 19, 2319-2325.
44. Frasca, D.; Ciampa, J.; Emerson, J.; Umans, R. S. and Clarke, M. Effects of hypoxia and transferrin on toxicity and DNA binding of ruthenium antitumor agents in Hela cells. *Met.-Based Drugs.* 1996, 3, 197-209.
45. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo E. J.; Lehmann, T.; Sánchez-Delgado, R. A.; Atencio, R.; Silva, P.; Lira, R.; Urbina, J. A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 6. Synthesis and characterization of new copper(II) and gold(I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg. Chem.* 2001, 40, 6879-6884.
46. Navarro, M.; Gabbiani, G.; Messori, L.; Gambino, D. Metal based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis. Recent achievements and perspectives. *Drug Discov. Today* 2010, 15, 1070-1077.
47. Gambino, D. Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coord. Chem. Rev.*, 2011, 255, 2193– 2203.

48. Urquiola, C.; Vieites, M.; Aguirre, G.; Marín, A.; Solano, B.; Arrambide, G.; Lavaggi, M. L.; Torre, M. H.; González, M.; Monge, A.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N^1, N^4 -dioxide derivatives by complexation with vanadium. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 5503-5509.
49. Demoro, B.; Caruso, F.; Rossi, M.; Benítez, D.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Parajón-Costa, B.; Castiglioni, J.; Galizzi, M.; Docampo, R.; Otero, L.; Gambino, D. Risedronate metal complexes potentially active against Chagas disease. *J. Inorg. Biochem.* 2010, 104, 1252-1258.
50. Silva, J. J.N.; Pavanelli, W. R.; Salazar Gutierrez, F. R., Chagas Alves Lima, F.; Ferreira da Silva, B. F.; Santana Silva, J.; Franco, D. W. Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole improves solubility and efficacy. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 4104-4114.
51. Silva, J.J.N.; Osakabe, A.L.; Pavanelli, W.R.; Silva, J.S., Franco, D.W. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. *Brit. J. Pharmacol.* 2007, 152, 112–121.
52. Silva, J.J.N.; Pavanelli, W. R.; Pereira, J. C. M.; Silva, J.S.; Franco, D. W. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium NO-donors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 43, 4414-4421.
53. Silva, J.J.N.; Guedes, P. M. M.; Oliveira, F. S.; Gutierrez, F. R. S.; da Silva, G. K.; Rodrigues, G. J.; Bendhack, L. M.; Franco, D. W.; Do Valle Matta, M. A.; Zamboni, D. S.; Santana da Silva, R.; Santana Silva, J. Nitric oxide donor $trans$ -[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. *Brit. J. Pharmacol.* 2010, 160, 270–282.
54. Silva, J. J.N.; Guedes, P- M.M.; Zottis, A.; Balliano, T.L.; Silva, F.O.N.; Lopes, L.G.F.; Ellena, J.; Oliva, G.; Andricopulo, A.D.; Franco, D.W.; Santana Silva, J. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease:

enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. *Brit. J. Pharmacol.* 2010, 160, 260–269.

55. Fricker, S. P.; Mosi, R. M.; Cameron, B. R.; Baird, I.; Zhu, Y.; Anastassov, V.; Cox, J.; Doyle, P.S.; Hansell, E.; Lau, G.; Langille, J.; Olsen, M.; Qin, L.; Skerlj, R.; Wong, R. S. Y.; Santucci, Z.; McKerrow, J. H. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1839–1845.

56. Cazzulo, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Topics Med. Chem.* 2002, 2, 1261-1271.

57. Gómez Quiroga, A.; Navarro Ranninger, C. Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes. Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 119-133.

58. Hambley T. W. Metal-based therapeutics., *Science* 2007, 318, 1392-1393.

59. Hambley T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. *Dalton Trans.* 2007, 43, 4929-4937.

60. Hall, M. D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley T. W. Basis for design and development of Platinum(IV) anticancer complexes. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 3403-3411.

61. Hambley T. W. Platinum binding to DNA: structural controls and consequences. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2001, 2711-2718.

62. Hall, M.D.; Dolman, R.C.; Hambley, T.W. en: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents, Metal Ions in Biological Systems*, M. Dekker, N. York, 2004, 297.

63. Barnard, P.J.; Berners-Price, S.J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord. Chem. Rev.* 2007, 251, 1889–1902.
64. Berners-Price, S.J.; Bowen, R. J.; Galettis, P.; Healy, P. C.; McKeage, M. J. Structural and solution chemistry of gold(I) and silver(I) complexes of bidentate pyridyl phosphines: selective antitumour agents. *Coord. Chem. Rev.* 1999, 185–186, 823–836.
65. Hickey, J.L.; Ruhayel, R.A., Barnard, P.J.; Baker, M.V.; Berners-Price, S.J.; Filipovska, A. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of Gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 12570-12571.
66. Casas, J.; Moreno, V.; Sánchez, A.; Sánchez, J. L.; Sordo, J. *Química Bioinorgánica*, Madrid, Síntesis, 2002.
67. Dabrowiak, J. C; *Metals in Medicine*, Chichester, Wiley, 2009.
68. Metzler-Nolte, N; Severin, K. *Bioorganometallic Chemistry*. En: Kraatz H. B., Metzler-Nolte, N., editores. *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*. 1st ed. Weinheim, Wiley, 2006, pp. 113-136.
69. Hall, M.D.; Alderden, R.A.; Zhang, M.; Beale, P.J.; Cai, Z.; Lai, B.; Stampfl, A.P.J.; Hambley, T.W. The fate of platinum(II) and platinum(IV) anti-cancer agents in cancer cells and tumours. *J. Struct. Biol.* 2006, 155, 38-44.
70. Brabec, V.; Kasparkova, J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resistance Updates* 2005, 8, 131-146.
71. Lippert, B. Multiplicity of metal ion binding patterns to nucleobases. *Coord. Chem. Rev.* 2000, 200-202, 487-516.

72. Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. Artificial metallonucleases. Chem. Comm. 2005, 20, 2540-2548.

CAPÍTULO 2

PROPUESTA

CONTENIDO

2.1- ANTECEDENTES

2.2- PROPUESTA GENERAL

2.3- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.4. BIBLIOGRAFÍA

2.1. ANTECEDENTES

El grupo que integro ha generado complejos metálicos bioactivos frente a *T. cruzi* por medio de dos estrategias básicas:

-coordinación de iones metálicos de importancia farmacológica a ligandos orgánicos bioactivos frente a *T. cruzi*

-coordinación de iones metálicos de importancia biológica a ligandos intercalantes del ADN.

En cuanto a la primer estrategia, se han desarrollado compuestos metálicos bioactivos incluyendo en una misma molécula iones metálicos con potencialidad terapéutica y ligandos orgánicos activos frente a *T. cruzi*, con el fin de intentar mejorar el perfil farmacológico de estos últimos. En los últimos años, se ha encontrado que los complejos metálicos de muchos agentes terapéuticos han resultado más efectivos que el fármaco original. La unión a un metal de un ligando activo (fármaco orgánico) puede mejorar su biodisponibilidad (por modificación de propiedades como estabilidad, solubilidad y lipofilia) y/o mejorar su índice terapéutico (por incremento de la actividad, disminución de la toxicidad o ambos), así como eludir el desarrollo de resistencia, fenómeno que es un problema de trascendencia creciente en el proceso de descubrimiento y utilización de nuevos fármacos antiparasitarios. Las propiedades biológicas del complejo metal – ligando bioactivo serán fuertemente dependientes de la naturaleza del metal central y del ligando bioactivo y, fundamentalmente, de la estructura y propiedades fisicoquímico – estructurales del complejo formado. Además, la estrategia de coordinar un fármaco activo a un metal de importancia terapéutica puede ser una forma de potenciar la actividad antichagásica de los compuestos orgánicos elegidos, ya que los complejos metálicos obtenidos pueden actuar por un mecanismo de acción dual e incluso múltiple, debido, por un lado, al fármaco orgánico bioactivo y, por otro lado, al metal. Este sinergismo o efecto aditivo permitiría disminuir la dosis terapéutica y, así, disminuir los efectos secundarios del fármaco original.

En cuanto a la segunda estrategia, dada la existencia de similitudes entre el metabolismo de las células tumorales y del *T. cruzi* y otros tripanosomátidos,

un alto porcentaje de fármacos antitumorales también resultan ser efectivos tripanosomicidas [1]. En particular, que el cisplatino, fármaco antitumoral cuyo blanco principal es el ADN, resultara activo *in vitro* frente a este parásito determinó la evaluación de otros complejos metálicos con actividad antitumoral, encontrándose una buena correlación entre ambas actividades. Además, se ha propuesto que aquellos compuestos que interactúan eficientemente con el ADN tienen amplias posibilidades de mostrar actividad tripanosomicida [2]. Por esta causa, se han diseñado complejos metálicos que incluyen compuestos orgánicos intercalantes del ADN como ligandos e iones metálicos de importancia biológica.

2.2. PROPUESTA GENERAL

En este Trabajo de Tesis se desarrollarán nuevos compuestos con actividad anti-*T. cruzi* aplicando la primera de las dos estrategias delineadas previamente. Para tal fin se utilizarán dos familias de ligandos bioactivos: tiosemicarbazonas conteniendo el farmacóforo 5-nitrofurano y *N*-óxidos de aminas aromáticas. En los capítulos correspondientes se analizarán en detalle aquellos aspectos estructurales y biológicos de estos compuestos orgánicos que determinaron su selección como ligandos para desarrollar compuestos metálicos con actividad anti *T. cruzi*.

En cuanto a los compuestos de coordinación de tiosemicarbazonas conteniendo el farmacóforo 5-nitrofurano, la propuesta general concreta es generar compuestos de platino análogos estructuralmente a los de paladio que el grupo ha desarrollado previamente y realizar un estudio comparativo de ambas series en cuanto a aspectos fisicoquímico-estructurales, características espectroscópicas, actividad biológica y mecanismo de acción. Se pretende poner especial énfasis en el estudio comparativo de su interacción con ADN utilizando diferentes técnicas que permitan obtener una clara idea de cómo estos complejos interactúan con el ADN. Ya adelantamos en el capítulo anterior que el ADN constituye un blanco muy importante para los compuestos metálicos, tanto antitumorales como antiparasitarios. Además, la propuesta

incluye el aprendizaje y la adquisición de experiencia en la realización de estas técnicas y en la interpretación de los resultados emergentes de las mismas.

Un segundo aspecto de la propuesta general, involucra el desarrollo de compuestos metálicos con el ligando bioactivo *N*- óxido de 2-mercapto piridina. Si bien el énfasis inicial se puso en los complejos análogos de Pd y Pt con este ligando y su mecanismo de acción, también se incluirá el trabajo con Au. En el capítulo introductorio se justificó la selección del Au como metal central principalmente en función de su importancia actual en Química Inorgánica Medicinal en el desarrollo de potenciales agentes antitumorales metálicos. Se discutirá más adelante en detalle que el mecanismo de acción de estos compuestos ya se anticipaba como completamente diferente al del grupo anterior de compuestos, por lo que el estudio de los mismos resultará rico en otros aspectos y aprendizajes.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntesis de los complejos de:
 - platino con tiosemicarbazonas conteniendo el farmacóforo 5-nitrofurano
 - paladio, platino y oro con *N*- óxido de 2-mercapto piridina

- Caracterización estructural y fisicoquímica completa de los complejos obtenidos, utilizando diferentes técnicas: análisis elemental de C, H, N, S, estudios de conductividad, espectrometría de masas, espectroscopías IR, Raman y ¹H- y ¹³C-RMN, voltametría cíclica, EPR y difracción de rayos X en monocristal.

- Evaluación *in vitro* de la actividad anti *T. cruzi* de todos los complejos obtenidos y evaluación de la actividad anti *Leishmania* de algunos de ellos para comparar la susceptibilidad de diferentes tripanosomátidos.

- Estudios de toxicidad sobre células mamíferas de los complejos activos sobre *T. cruzi* y/o sobre *Leishmania*.

- Evaluación *in vivo* en ratones infectados de la actividad de los complejos activos obtenidos que ameriten por los resultados *in vitro* obtenidos la realización de estos estudios.
- Estudio del mecanismo o los mecanismos de acción antitripanosomal de los complejos que resulten activos. Este punto comprende:
 - estudio de la interacción de los complejos con ADN por medio de diferentes técnicas
 - estudio de inhibición de algunas enzimas parasitarias por efecto de los complejos
 - estudio de la generación de radicales libres intraparasitarios por técnicas de EPR y medida del efecto sobre el consumo de oxígeno parasitario
- Estudio comparativo de los resultados obtenidos:
 - comparación de ligandos y sus complejos sintetizados, para determinar el efecto de la complejación sobre las propiedades de importancia biológica y la actividad.
 - comparación entre complejos de una misma serie y entre series, para determinar, cualitativamente, las posibles relaciones existentes entre la estructura, las propiedades fisicoquímicas, la actividad biológica y el mecanismo de acción de los mismos.
 - comparación de compuestos análogos de los diferentes metales en estudio (Pd, Pt, Au) a efectos de analizar el efecto de la naturaleza del ion metálico central sobre las propiedades estructurales, fisicoquímicas y biológicas de los compuestos obtenidos.

2.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Farrell N., Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, J. A. McCleverty and T. J. Meyer (eds.), Elsevier 2003, 9,.809-840.
2. Kinnamon, K.; Steck, E. A.; Rane E. S. Activity of antitumour drugs against African trypanosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 157-160.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

CONTENIDO

3.1- INTRODUCCIÓN

3.2- MÉTODOS DE SÍNTESIS

3.2.1- SÍNTESIS DE LIGANDOS TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DEL 5-NITROFURANO

3.2.2- SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

3.2.2.1- Complejos de Pt(II) y Pd(II) con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano

3.2.2.2- Complejos de Pd(II), Pt(II), Au(I) y V(IV) con *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo)

3.3- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FISICOQUÍMICA

3.3.1- DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA

3.3.1.1- Análisis elemental de elementos livianos

3.3.1.2- Espectrometría de masas

3.3.1.3- Medidas de conductividad

3.3.2- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

3.3.2.1- ESTRUCTURA EN ESTADO SÓLIDO

3.3.2.1.1- Espectroscopía infrarroja y Raman

3.3.2.1.2- Difracción de rayos X en monocristal

3.3.2.2- ESTRUCTURA EN SOLUCIÓN

3.3.2.2.1- Espectroscopía RMN

3.3.2.2.2- Experimentos bidimensionales de RMN (HMQC, HMBC)

3.3.3- COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN

3.3.3.1- Voltametría cíclica

3.3.3.2- Espectroscopía EPR

3.4- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

3.4.1- ESTUDIOS *IN VITRO*

3.4.1.1- ACTIVIDAD ANTI *Trypanosoma cruzi* *IN VITRO*

3.4.1.1.1- Inhibición del crecimiento de epimastigotas, cepa Tulahuen 2

- 3.4.1.1.2- Inhibición del crecimiento de epimastigotas, cepa Dm28c
- 3.4.1.1.3- Ensayo de susceptibilidad de epimastigotas, cepa CL-B5
- 3.4.1.1.4- Efecto sobre la viabilidad de tripomastigotas (cepa Dm28c)
- 3.4.1.2- ACTIVIDAD ANTI *Leishmania*
 - 3.4.1.2.1- Efecto sobre *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis*
- 3.4.2- ESTUDIOS *IN VIVO*
- 3.5- ESTUDIOS DE MECANISMO DE ACCIÓN
 - 3.5.1- ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN
 - 3.5.1.1- ESTUDIOS CON ADN DE TIMO DE TERNERO
 - 3.5.1.1.1- Estudios de interacción primaria con ADN de timo de ternero
 - 3.5.1.1.2- Titulación espectrofotométrica
 - 3.5.1.1.3- Medidas de viscosidad del ADN
 - 3.5.1.1.4- Dicroísmo circular
 - 3.5.1.2- ESTUDIOS CON ADN PLASMÍDICO
 - 3.5.1.2.1- Migración electroforética en gel de agarosa
 - 3.5.1.2.2- Microscopía de fuerzas atómicas
 - 3.5.2- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN *T. cruzi* (CEPA Dm28c)
 - 3.5.3- CONSUMO DE OXÍGENO
 - 3.5.4- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA TRIPANOTIONA REDUCTASA (TR) DE *T. cruzi*
 - 3.5.5- MEDICIONES DE LA ACTIVIDAD DE LA NADH-FUMARATO REDUCTASA DE *T. cruzi*
- 3.6- ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD
 - 3.6.1- Citotoxicidad en macrófagos
 - 3.6.2- Citotoxicidad en fibroblastos
- 3.7- BIBLIOGRAFÍA

3.1- INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan los métodos utilizados en este Trabajo de Tesis para la síntesis, caracterización analítica, estructural y fisicoquímica de los complejos metálicos en estudio, así como también los ensayos biológicos, de citotoxicidad y estudios de mecanismos de acción.

3.2- MÉTODOS DE SÍNTESIS

3.2.1- SÍNTESIS DE LIGANDOS TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DEL 5-NITROFURANO

Las tiosemicarbazonas seleccionadas para este Trabajo de Tesis (tiosemicarbazona de 5-nitro-2-furaldehído (HL1), *N*⁴-metiltiosemicarbazona de 5-nitro-2-furaldehído (HL2), *N*⁴-etiltiosemicarbazona de 5-nitro-2-furaldehído (HL3), *N*⁴-feniltiosemicarbazona de 5-nitro-2-furaldehído (HL4), tiosemicarbazona de 3-(5-nitrofuril)acroleína (HL5), *N*⁴-metiltiosemicarbazona de 3-(5-nitrofuril)acroleína (HL6), *N*⁴-etiltiosemicarbazona de 3-(5-nitrofuril)acroleína (HL7) y *N*⁴-feniltiosemicarbazona de 3-(5-nitrofuril)acroleína (HL8)) fueron sintetizadas siguiendo metodologías previamente descritas [1], según el procedimiento general que se muestra en la Figura 1.

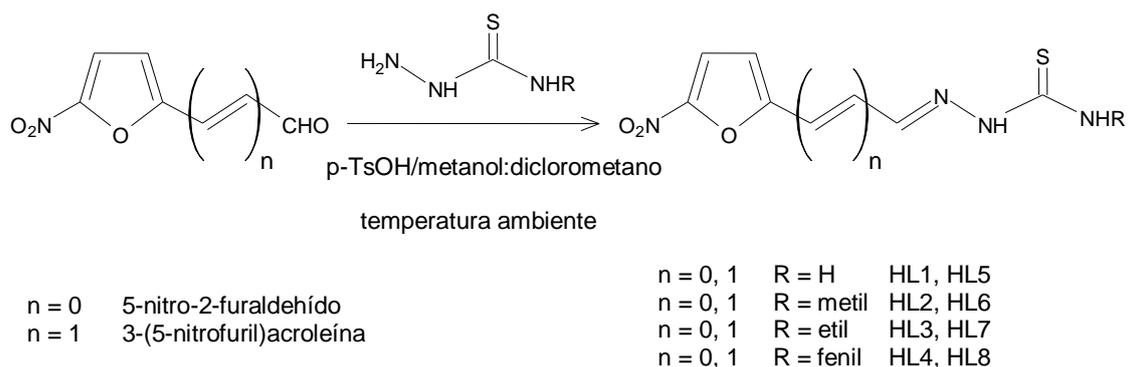


Figura 1. Síntesis de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano

Se parte de 5-nitro-2-furaldehído o 3-(5-nitrofuril)acroleína y la tiosemicarbazida correspondiente. Los detalles particulares de cada una de las síntesis fueron descritos previamente, así como también los detalles de su caracterización [1].

3.2.2- SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

3.2.2.1- Complejos de Pt(II) y Pd(II) con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano

Complejos [PtCl₂(HL)], HL: HL1-HL8

Se calienta a reflujo en metanol (10 mL) K₂[PtCl₄] (50 mg, 0,120 mmol) y el correspondiente ligando (0,120 mmol) durante 6 horas, separándose el complejo como un sólido que precipita del medio de reacción.

Complejos [Pt(L)₂], HL: HL1-HL8

Se calienta a reflujo en metanol (10 mL) K₂[PtCl₄] (50 mg, 0,120 mmol) y el correspondiente ligando (0,240 mmol) durante 6 horas, separándose el complejo como un sólido que precipita del medio de reacción.

En todos los casos, el sólido obtenido se filtra y se lava con metanol caliente seguido de agua caliente. Los compuestos se recrystalizan por la difusión lenta de agua en una solución de dimetilformamida (DMF) de cada compuesto.

Complejos [PdCl₂(HL)] y [Pd(L)₂], HL: HL1-HL8

Los complejos de Pd se sintetizaron según una técnica ya descrita [2] por calentamiento a reflujo en metanol (10 mL) de una mezcla de Na₂[PdCl₄] (100 mg, 0,34 mmol) y la tiosemicarbazona correspondiente (0,3-0,4 mmol ó 0,6-0,7 mmol), durante 3 horas, separándose los complejos [PdCl₂(HL)] y [Pd(L)₂], respectivamente, como sólidos que precipitan del medio de reacción. Todos los complejos se lavaron con metanol caliente seguido de agua tibia.

3.2.2.2- Complejos de Pd(II), Pt(II), Au(I) y V(IV) con *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo)

[Pd(mpo)₂]

El complejo de Pd(II) fue preparado por la modificación de un procedimiento previamente reportado [3]. Se calienta a reflujo en 23 mL de metanol/acetonitrilo (1:1, v/v), PdCl₂ (50 mg, 0,28 mmol) y Na mpo (168 mg,

1,13 mmol) en relación molar 1:4 durante 5 horas. Se obtuvieron monocristales por evaporación lenta de la solución.

[Pt(mpo)₂]

Se calienta a reflujo en 10 mL de metanol/acetonitrilo (1:1, v/v), K₂[PtCl₄] (50 mg, 0,12 mmol) y Na mpo (72 mg, 0,48 mmol) en relación molar 1:4 durante 5 horas. Se obtuvieron monocristales por evaporación lenta de la solución.

[Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂]

Se calientan a reflujo en 20 mL de metanol bajo N₂, el precursor [AuCl(PPh₃)] (100 mg, 0,20 mmol) y Na mpo (33,1 mg, 0,22 mmol) durante 6 horas. El sólido obtenido se separa del medio de reacción por filtración y se lava con agua, etanol y éter etílico, sucesivamente.

[VO(mpo)₂]

El complejo de V(IV) fue preparado por un procedimiento previamente reportado [4]. Se mezcla Na mpo (200 mg, 1,35 mmol) en 20 mL de etanol, y se burbujea con N₂ durante 20 minutos. Se adiciona una solución de VOSO₄·5H₂O (150 mg, 0,60 mmol) en 0,95 mL agua/1,6 mL etanol. Inmediatamente se forma un precipitado violeta que se filtra bajo N₂. Se lava con tres porciones de agua y dos porciones de etanol y se seca a vacío.

3.3- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FISICOQUÍMICA

3.3.1- DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA

3.3.1.1- ANÁLISIS ELEMENTAL DE ELEMENTOS LIVIANOS

Los complejos fueron caracterizados por análisis elemental de C, N, H y S mediante un analizador Carlo Erba EA1108, con un procesador de datos Eager 200, perteneciente a Facultad de Química. Los resultados obtenidos permiten verificar que éstos se ajustan a las correspondientes fórmulas propuestas.

3.3.1.2- ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas brinda información para la determinación de la fórmula de un compuesto. El patrón de fragmentación puede ayudar a la elucidación de la estructura del compuesto, en cuanto brinda información de que átomos o grupos atómicos están enlazados.

Se utilizó esta técnica para estudiar el patrón de fragmentación del complejo $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ y de los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$ y $[\text{Pt}(\text{L})_2]$ (HL: HL1-HL4), como apoyo para su caracterización y la determinación de su fórmula y estructura.

Los estudios de espectrometría de masas (ESI-MS) fueron realizados en un espectrómetro Thermo Finnigan LXQ perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas. Se utilizó metanol como disolvente. Esta determinación fue llevada a cabo durante una pasantía realizada en 2006 en el IVIC con apoyo de CSIC.

3.3.1.3- MEDIDAS DE CONDUCTIVIDAD

Las medidas de conductividad molar de los complejos en solución permiten determinar si se trata de un complejo neutro o cargado. Si éste resulta cargado también permiten determinar de qué tipo de electrolito se trata. Existen datos bibliográficos de conductividades molares para numerosos complejos en diferentes disolventes. Por comparación de la conductividad molar determinada para los complejos, con los datos de bibliografía en un mismo disolvente, se puede determinar el tipo de electrolito presente en solución [5].

Las medidas de conductividad se realizaron a 25 °C en soluciones 10^{-3} - 10^{-4} M de los complejos en distintos disolventes (DMSO, DMF). La conductividad se midió con un conductímetro 4310 Jenway.

3.3.2- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

3.3.2.1- ESTRUCTURA EN ESTADO SÓLIDO

3.3.2.2- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA Y RAMAN

La espectroscopía IR es una de las primeras técnicas de caracterización que se utiliza cuando se estudia un nuevo compuesto en química inorgánica. Puede brindar importante información estructural, además de aportar una “huella digital” del compuesto en estudio [6-9].

Esta técnica permite asegurar la presencia de los ligandos intactos en la esfera de coordinación por reconocimiento del espectro IR propio de cada uno de los grupos funcionales del mismo, con corrimientos resultantes de la coordinación. A su vez, estos corrimientos sugieren cuál es el sitio de unión del ligando al metal central y que sectores del ligando no están involucrados en la coordinación.

La simetría de la molécula en estudio determinará el número esperado de bandas activas en el IR. Además, la frecuencia de estiramiento de un determinado enlace estará relacionada con la fuerza y la distancia de enlace. Variaciones en esta frecuencia entre diferentes complejos de una familia permite deducir aspectos relacionados con la coordinación y con la naturaleza electrónica de los demás ligandos presentes en el complejo.

Por supuesto, que la información estructural resulta más completa cuando los complejos son estudiados no sólo por espectroscopía IR sino también por espectroscopía Raman, ya que ambos estudios vibracionales son complementarios.

Los espectros FTIR ($4000-200\text{ cm}^{-1}$) fueron medidos en pastillas de KBr o de CsI en un instrumento Bomem M102 de la Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química. Los espectros Raman se realizaron en un equipo Bruker IF 66 (accesorio FRA 106) perteneciente al Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

3.3.2.1.2- DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL

La cristalografía de rayos X es una técnica consistente en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal de la sustancia sujeta a estudio. El haz se escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, aplicando la ley de Bragg. Es una de las técnicas que goza de mayor prestigio para dilucidar estructuras cristalinas. Sus mayores limitaciones se deben a la necesidad de trabajar con sistemas cristalinos.

Es posible trabajar con monocristales o con polvo microcristalino, consiguiéndose diferentes datos en ambos casos. Para la resolución de los parámetros de la celda unidad puede ser suficiente la difracción de rayos X en polvo, mientras que para una dilucidación precisa de las posiciones atómicas es conveniente la difracción de rayos X en monocristal.

Los estudios de difracción de rayos X fueron realizados por el Dr. O. E. Piro (LANADI, Universidad Nacional de La Plata). Los datos cristalográficos obtenidos fueron procesados con el programa Mercury, versión 1.4.2 para analizar el empaquetamiento cristalino, ángulos de torsión, distancias entre átomos no enlazados, entre otros parámetros estructurales.

3.3.2.2- ESTRUCTURA EN SOLUCIÓN

3.3.2.2.1- ESPECTROSCOPIA RMN

La espectroscopía RMN es una fuente importante de información estructural para compuestos de coordinación. Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento entre núcleos brindan información del entorno químico del núcleo en estudio. Esta técnica permite determinar la naturaleza de los grupos químicos presentes y apoya la determinación de la geometría y la simetría molecular y las relaciones estereoquímicas entre grupos.

Estudiando el efecto de la complejación es posible conocer aspectos importantes del sitio de complejación. Estos son datos relevantes para el establecimiento de la estructura que el complejo en estudio presenta en

solución y para la comparación de esa estructura en solución con la determinada en estado sólido por difracción de rayos X en monocristal. Ambos estudios estructurales son complementarios en cuanto conducen al establecimiento de la estructura que el compuesto adopta en ambas fases.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron realizados en solventes deuterados en los que los complejos resultaron solubles. Los espectros fueron realizados en DMSO- d_6 a 30 °C en un instrumento Bruker DPX-400 (a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente) perteneciente al Departamento de Química Orgánica en Facultad de Ciencias y en DMSO- d_6 a 25 °C en un instrumento Bruker AVANCE300 en el Centro de Química del IVIC, Caracas. Se utilizó tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se informan en ppm.

Los experimentos de ^{31}P RMN fueron realizados con el mismo equipo del IVIC en DMSO- d_6 a 25 °C.

3.3.2.2- EXPERIMENTOS BIDIMENSIONALES DE RMN (HMQC, HMBC)

Éstos resultan útiles para determinar cómo se enlazan los diferentes átomos entre sí [6]. El experimento bidimensional de correlación heteronuclear a distancia de un enlace (HMQC heteronuclear multiple quantum correlation) permite correlacionar que carbono está enlazado directamente a un determinado protón. El experimento bidimensional de correlación heteronuclear a larga distancia (HMBC heteronuclear multiple bond correlation) correlaciona un protón con el carbono vecino y con carbonos que se encuentran a una distancia de hasta 3 enlaces. Los experimentos de correlación heteronuclear (2D-HETCOR), HMQC y HMBC, fueron realizados con el equipo de Facultad de Ciencias mencionado anteriormente y utilizando el software disponible.

3.3.3- COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN

3.3.3.1- VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Las técnicas electroquímicas constituyen herramientas útiles para la caracterización de complejos en solución. Sin embargo, en este trabajo se

utilizó la técnica de voltametría cíclica, principalmente, con el fin de determinar la variación del potencial de reducción del grupo nitro de los ligandos derivados del 5-nitrofurano como consecuencia de la coordinación. Uno de los mecanismos de acción antichagásica propuesto para los ligandos seleccionados (tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano) en este trabajo, por analogía con Nifurtimox, es la formación de radicales libres tóxicos para el parásito (anión radical nitro, derivados nitrosos, etc) como consecuencia de la reducción metabólica del grupo nitro [10, 11]. Esta capacidad de generar radicales libres depende entre otros factores del potencial de reducción del grupo nitro. Por lo tanto, es importante conocer como se modifica el potencial de reducción de ese grupo a fin de establecer una correlación con la actividad tripanosomicida. Estos estudios de comportamiento electroquímico por voltametría cíclica fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la supervisión del Dr. Claudio Olea-Azar, estudio llevado a cabo durante una pasantía realizada con apoyo de CSIC en 2007. Se utilizó un equipo Metrohm 693 VA con un convertidor voltaje-corriente (694 VA Stand) para medir la corriente resultante y un registrador X-Y (693 VA Processor). Los experimentos se realizaron en DMSO (aprox 10^{-3} M) bajo atmósfera de nitrógeno, utilizando fosfato de tetrabutilamonio (TBAP) (aprox 0,1 M) como electrolito soporte y una celda de tres electrodos. Se utilizó un electrodo de trabajo de gota colgante de mercurio, un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de calomel saturado (SCE).

Para los complejos de Pd(II) y Pt(II) con mpo también se estudió el comportamiento electroquímico por voltametría cíclica. Los voltamogramas cíclicos se obtuvieron con un potenciostato/galvanostato PAR modelo 263A controlado por el software 270/250 (EG&G Princeton Applied Research). El sistema se completó con una impresora y una celda estándar de tres electrodos de volumen de 10 ml. Los estudios de comportamiento electroquímico por voltametría cíclica para estos complejos fueron realizados en la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, en el laboratorio por la Dra. Beatriz Parajón Costa. Se empleó un disco de carbón vítreo como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de referencia Ag/ AgNO₃ 10^{-3} M en CH₃CN/ hexafluorofosfato de

tetrabutilamonio, (TBA)PF₆, 10⁻¹ M. Este electrodo fue calibrado contra el par redox [Fe(C₅H₅)₂]/[Fe(C₅H₅)₂]⁺, para lo cual se asumió un potencial de +0,4 V vs ENH (electrodo normal de hidrógeno) [12, 13]. Todos los potenciales informados para estos complejos se refieren al ENH en voltios. Las mediciones se realizaron en soluciones 10⁻³ M en DMF y contienen 0,1 M de (TBA)PF₆, como electrolito soporte. Se utilizó DMF de alta pureza (Baker, grado espectroscópico) que se secó sobre tamices moleculares (Merck) y se usó sin mayor purificación. El (TBA)PF₆ fue adquirido a Fluka (grado electroquímico). Las soluciones se desoxigenaron por purga con nitrógeno extra puro durante 15 minutos antes de las mediciones. Se pasó un flujo continuo de ese gas sobre las soluciones durante las mediciones.

3.3.3.2- ESPECTROSCOPIA EPR

Para los complejos de Pt(II) de tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano, se generaron los radicales libres derivados de nitrofurano por reducción electroquímica *in situ* en las mismas condiciones de temperatura, disolvente y concentraciones utilizadas en los experimentos de voltametría cíclica. Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar si, luego de la complejación, los ligandos continúan formando especies radicalarias estables en solución y las características de las mismas en relación con los generados por los ligandos libres. Estos resultados constituyen una primera aproximación hacia la eventual formación de dichos radicales intraparasitariamente.

Estos estudios de EPR fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile bajo la supervisión del Dr. Claudio Olea-Azar. La generación electroquímica de los radicales fue realizada *in situ* a los potenciales de reducción del grupo nitro obtenidos en los experimentos de voltametría cíclica, a una concentración de compuesto de 10⁻³ M y 0,1 M de TBAP usando DMSO como disolvente. Los espectros fueron registrados en banda X (9.85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Las constantes de acoplamiento fueron obtenidas por personal especializado mediante comparación y simulación de espectros usando el programa Simfonia Versión 1.25 [14].

Para los complejos de Pd(II) y Pt(II) con mpo, las condiciones de EPR fueron previamente establecidas mediante la realización de experimentos de voltametría cíclica en el instrumento Metrohm 693 VA con TBAP (aprox 0,1 M) como electrolito soporte y una celda de tres electrodos. Se utilizó un electrodo de trabajo de gota colgante de mercurio, un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de calomel saturado (SCE), según se describió en la sección anterior. La optimización de la geometría del mpo se realizó en vacío por el método semiempírico AM1. Las constantes de acoplamiento hiperfino teóricas, fueron calculadas utilizando la metodología UB3LYP con la base 6-31G* (personal especializado). Todos estos cálculos fueron realizados por personal especializado.

3.4- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

3.4.1- ESTUDIOS *IN VITRO*

3.4.1.1- ACTIVIDAD ANTI *Trypanosoma cruzi* *IN VITRO*

El manejo de *T. cruzi* se realizó de acuerdo a las directrices de trabajo establecidas [15]. Los estudios fueron realizados por personal especializado. Los compuestos fueron evaluados frente a la forma epimastigota de dos cepas de *T. cruzi*, Tulahuen 2 y Dm28c. Los compuestos de Pt con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano también se evaluaron sobre la forma tripomastigota de *T. cruzi* (Dm28c).

3.4.1.1.1- Inhibición del crecimiento de epimastigotas, cepa Tulahuen 2

La forma epimastigota del parásito de la cepa Tulahuen 2 fue cultivada a 28 °C en un medio axénico (infusión de cerebro-corazón (BHI)-triptosa agar), complementado con un 5-10% de suero fetal bovino. Las células de un cultivo de 5 días de edad fueron inoculadas en 50 mL de medio de cultivo fresco para dar una concentración inicial de 1×10^6 células/mL. El crecimiento de las células fue seguido por medidas diarias de la absorbancia del cultivo a 600 nm durante

11 días. Antes de la inoculación, se agregaron a los medios dosis fijas de los compuestos a evaluar a partir de una solución stock de DMSO (en general 5, 10 o 25 μM). La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no superó el 0,4% (vol/vol). Se comprobó que este % de DMSO no tiene ningún efecto por sí mismo sobre la proliferación de los parásitos (no se observó efecto en el crecimiento de epimastigotas por la presencia de hasta 1% DMSO en los medios de cultivo). La capacidad de los compuestos de inhibir el crecimiento del parásito se evaluó, por triplicado, en comparación con el control (ningún fármaco añadido al medio). El control se realizó con la presencia de DMSO 0,4% y con la ausencia de cualquier compuesto a testear. El porcentaje de inhibición del crecimiento (PGI) se calculó como sigue: $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$ donde $A_p = A_{600}$ del cultivo que contiene el fármaco en el día 5; $A_{0p} = A_{600}$ del cultivo que contiene el fármaco después de la adición de los inóculos (día 0), $A_c = A_{600}$ del cultivo en ausencia de cualquier fármaco (control) en el día 5; $A_{0c} = A_{600}$ en ausencia del fármaco en el día 0. Se utilizaron Nifurtimox y Benznidazol como fármacos tripanosomicidas de referencia. Una vez establecida la actividad a dosis fija se determinaron curvas dosis-respuesta y se calcularon valores de CI_{50} (concentración inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito) [16]. Los valores reportados son la media de tres experimentos independientes.

3.4.1.1.2- Inhibición del crecimiento de epimastigotas, cepa Dm28c

Se utilizaron epimastigotas del parásito de la cepa Dm28c de la colección del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Estos fueron cultivados a 28 °C en el medio monofásico Diamond pero sustituyendo la sangre por hemina 4 μM [17]. Se agregó suero fetal bovino hasta una concentración final de 4%. Se añadieron los compuestos disueltos en DMSO (concentración final 1%) a una suspensión de 3×10^6 epimastigotas/mL. El crecimiento del parásito fue seguido por nefelometría (procedimiento analítico similar a la turbidimetría que se basa en la medida de la dispersión de la radiación que atraviesa un medio con partículas en suspensión) durante 10 días. Para la curva de crecimiento exponencial de epimastigotas se calculó la constante de crecimiento de cultivo (k_c) para cada

concentración de compuesto y para los controles (coeficiente de regresión > 0,9, P <0,05). Esta constante corresponde a la pendiente resultante de trazar el logaritmo natural (Ln) de la lectura nefelométrica en función del tiempo [18]. Clc_{50} es la concentración de fármaco necesaria para reducir la kc en el 50% y se calculó mediante el análisis de regresión lineal de los valores de kc y las concentraciones utilizadas en las concentraciones empleadas. Los valores reportados son la media de al menos tres experimentos independientes.

En el caso del complejo $[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$, los epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Dm28c, se mantuvieron en crecimiento exponencial a 28 °C, en medio Liver Infusion Tryptose (LIT) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). El efecto sobre el crecimiento celular fue analizado incubando una concentración inicial de 1×10^6 células/mL con varias concentraciones de los compuestos por 5 días. Los compuestos se añadieron como soluciones stock en DMSO inmediatamente después de su preparación. El porcentaje de crecimiento celular fue seguido por medidas de la absorbancia A, del cultivo a 595 nm y calculada como: $\% = (A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c}) \times 100$, donde $A_p = A_{595}$ del cultivo con la droga el día 5; $A_{0p} = A_{595}$ del cultivo que contiene el fármaco en el día 0, $A_c = A_{595}$ del cultivo en ausencia de cualquier droga (control) en el día 5; $A_{0c} = A_{595}$ en ausencia de la droga en el día 0. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no superó nunca el 0,4% (vol/vol) y por lo tanto su presencia no tuvo ningún efecto por sí misma sobre la proliferación de los parásitos [19, 16]. Se utilizó Nifurtimox como fármaco tripanosomicida de referencia. Se registraron las curvas de dosis-respuesta y se determinó la concentración inhibitoria 50% (Cl_{50}).

3.4.1.1.3- Ensayo de susceptibilidad de epimastigotas, cepa CL-B5

Se utilizó epimastigotas de *T. cruzi* Clon CL-B5 transfectadas establemente con el gen β -galactosidasa, *Escherichia coli* (lacZ) [20]. La prueba se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos con un cultivo que no alcanzó la fase estacionaria. Los epimastigotas, cepa CL-B5, se sembraron a una concentración de 1×10^5 /mL. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 72 horas con diferentes concentraciones de los compuestos ensayados. Se añadió 50 μ L de una solución de sustrato clorofenol rojo β -D-galactopiranosido

(CPRG) para dar un volumen final de 200 μ L. Las placas se incubaron a 37 °C durante 6 horas y luego se leyeron a 595 nm. Cada concentración fue ensayada por triplicado. En cada experimento se incluyeron control del medio, control negativo y control de los compuestos. Las soluciones de los compuestos a ensayar se prepararon en DMSO y se añadieron a los cultivos para obtener una concentración final de DMSO inferior a 0,2% [21]. Los valores de CI_{50} de los compuestos de *T. cruzi* se determinaron mediante el análisis de 10 concentraciones que van desde 0,25 hasta 256 μ M.

3.4.1.1.4- Efecto sobre la viabilidad de tripomastigotas (cepa Dm28c)

Se infectaron células Vero con cultivos envejecidos de epimastigotas (cepa Dm28c), que contienen tripomastigotas metacíclicos. Posteriormente, se cosecharon tripomastigotas a partir de este cultivo para infectar más cultivos de células Vero hasta una densidad de 1×10^6 parásitos / 25 cm^2 . Estos tripomastigotas que infectaron cultivos de células Vero fueron incubados de 5 a 7 días a 37 ° C en aire humidificado y con 5% de CO_2 . Después de ese tiempo, el medio de cultivo fue centrifugado a 3.000xg durante 5 min, y los pellets de tripomastigotas se resuspendieron en medio RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 5% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina hasta una densidad final de 1×10^7 parásitos/mL (210×10^6 tripomastigotas son equivalentes a 1 mg de proteína o 12 mg de peso húmedo). Los ensayos fueron realizados utilizando el método de reducción MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). Esta reducción metabólica produce formazán de color azul cuya concentración se determina espectrofotométricamente y permite determinar viabilidad celular [22]. En forma breve, se incubaron 1×10^7 tripomastigotas en medio de cultivo RPMI-suero fetal bovino a 37 °C durante 48 horas. Una alícuota de la suspensión de parásitos se incubó con el compuesto metálico (concentración igual a la CI_{50} previamente determinada en cultivos de epimastigotas) en una placa de 96 pocillos de fondo plano durante 48 horas, se adicionó MTT hasta una concentración final de 0,5 mg/mL y se incubó a 28 °C durante 4 horas. Luego se solubilizó con 10% de dodecil sulfato de sodio 0,1 mM en HCl y se incubó durante toda la noche. La

formación de formazán se midió a 570 nm con la referencia a 690 nm en un lector de pocillos múltiples (Labsystems Multiskan MS).

3.4.1.2- ACTIVIDAD ANTI *Leishmania*

3.4.1.2.1- Efecto sobre *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis*

Cultivos *in vitro* de promastigotas de *Leishmania (L.) mexicana* (cepa NR aislada en 1980 de un paciente humano con leishmaniasis cutánea difusa en el Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela) y *Leishmania (V.) braziliensis* (cepa M2903, WHO) se mantuvieron a 26 °C en medio Schneider *Drosophila* suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Los parásitos en la fase exponencial de crecimiento fueron tratados por triplicado con concentraciones micromolares del complejo en estudio disuelto en DMSO. La cinética de inhibición del crecimiento fue seguida durante 48 horas por conteo directo en una cámara de Neubauer y conteo indirecto con un espectrofotómetro a 560 nm. La viabilidad celular se midió por la exclusión de trypan blue [23].

3.4.2- ESTUDIOS *IN VIVO*

La actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi* fue evaluada *in vivo* en ratones machos Swiss albinos (6 a 8 semanas de edad, 30 g de peso) infectados experimentalmente (tripomastigotas circulantes de la cepa CL, clon Brener de *T. cruzi*, que produce su pico de parasitemia 21 a 25 días después de la infección) por vía intraperitoneal con 5000 parásitos (fase aguda) [24]. Éstos fueron tratados luego del noveno día de infección y durante 2 semanas con Benznidazol (50 mg/Kg/día) o con los compuestos en estudio (5 mg/Kg/día), administrados por vía oral. Los ratones infectados no tratados recibieron 200 µL de una solución salina fosfatada. Se evaluó la eficacia del tratamiento por conteo semanal del número de parásitos en sangre periférica [25] durante 8 semanas y observación de la mortandad [24, 26-28]. Estos estudios fueron realizados por personal especializado en el Departamento de

Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

3.5- ESTUDIOS DE MECANISMO DE ACCIÓN

3.5.1- ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN

3.5.1.1- ESTUDIOS CON ADN DE TIMO DE TERNERO

3.5.1.1.1- Estudios de interacción primaria con ADN de timo de ternero

Los estudios de interacción primaria con ADN de timo de ternero permiten determinar niveles de unión al ADN y, en particular, permiten determinar la existencia de interacción y estimar su intensidad.

Los complejos fueron probados utilizando ADN de timo de ternero (CT ADN) (tipo I) por una modificación de un procedimiento previamente reportado [29]. Se disolvió 50 mg de CT ADN en 30 mL de agua y se dejó agitando durante toda la noche. Se determinó la concentración de ADN por espectroscopía de absorción UV utilizando un coeficiente de absortividad molar de $6.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm. Las soluciones de los complejos en DMSO (grado espectroscópico) (1 mL, 10^{-3} M) se incubaron a 37° C con una solución de CT ADN (1 mL) durante 96 horas para los complejos Pt-tiosemicarbazona y durante 72 horas para el complejo de Au(I). Luego de la separación del complejo metálico no unido por precipitación del ADN con complejo unido con etanol y cloruro de sodio se lava exhaustivamente este precipitado y se redisuelve (se repite 3 veces este procedimiento). Se determina la cantidad de metal unida al ADN por espectroscopía de absorción atómica (equipo Perkin Elmer 380 o 5000 de Facultad de Química, para los complejos Pt-tiosemicarbazona o Perkin Elmer Optimal 3000 perteneciente al Centro de Química del IVIC, Caracas, para el complejo de Au(I)) y se cuantifica el ADN unido por espectroscopía electrónica utilizando el valor ya mencionado de coeficiente de absortividad molar [30, 16]. Los estándares de absorción atómica para realizar la curva de calibración que permite dosificar el metal presente se prepararon por dilución de una solución estándar del metal en cuestión.

3.5.1.1.2- Titulación espectrofotométrica

Las titulaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo mediante la adición de cantidades crecientes de CT ADN a una solución en DMSO del complejo, a una concentración fija contenida en una celda de cuarzo. Después de cada adición se registró el espectro UV-Vis (A_{obs} vs. λ). La constante intrínseca (K_b) de unión al ADN se determinó a partir del gráfico $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[\text{ADN}]$, donde $[\text{ADN}]$ es la concentración de ADN en pares de bases, y los coeficientes de absorción aparente ϵ_a , ϵ_f , ϵ_b corresponden a $A_{\text{obs}}/[\text{complejo}]$ (a la longitud de onda λ del máximo de absorción del complejo), el coeficiente de extinción para el complejo libre (a la longitud de onda λ del máximo de absorción del complejo) y el coeficiente de extinción del complejo en forma totalmente unida, respectivamente. Los datos se ajustaron a la ecuación (1), con una pendiente igual a $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ y una ordenada en el origen igual a $1/[K_b (\epsilon_a - \epsilon_f)]$ y K_b se obtuvo de la relación entre la pendiente y la ordenada en el origen [31].

$$[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{ADN}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b (\epsilon_a - \epsilon_f)] \quad (1)$$

El valor de K_b obtenido por este método podría utilizarse para realizar una comparativa con los correspondientes a compuestos de conocida naturaleza intercalante como el bromuro de etidio.

3.5.1.1.3- Medidas de viscosidad del ADN

Dependiendo del tipo de interacción puede observarse diferentes modificaciones de la viscosidad de soluciones de ADN al adicionar compuestos a las mismas. Los compuestos metálicos que se unen al ADN covalentemente como el cisplatino producen generalmente una disminución de la viscosidad de sus soluciones. Los compuestos con actividad intercalante clásica del ADN producen un incremento de la viscosidad [32, 33]. Con esta técnica se puede entonces determinar, por ejemplo, la capacidad de intercalación de un complejo

en el ADN, analizando los cambios en la viscosidad del ADN generados por la interacción con los complejos metálicos.

Los experimentos de medidas de viscosidad fueron realizados en un viscosímetro AND-SV-10 utilizando un baño de agua y un recipiente adecuado para la termostatación a 25 °C. Las soluciones de cada complejo se prepararon por disolución en la mínima cantidad de DMSO necesaria y adición de agua. La solución de ADN de timo de ternero se diluyó 1:4 con Tris-EDTA (clorhidrato de Tris (hidroximetil) aminometano-sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético, TE) (pH 7,4). Para cada complejo se añaden a la solución de ADN de timo de ternero cantidades cada vez mayores de la solución de complejo madre para llegar a relaciones molares complejo/ADN (r_i) en el rango de 0 – 1,0. La cantidad de DMSO en las muestras nunca superó el 2%. Las mezclas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La viscosidad de cada muestra se midió varias veces a 25 °C después que se lograra el equilibrio térmico (10-15 min). Los valores medios de las seis mediciones realizadas en intervalos de un minuto se utilizaron para evaluar la viscosidad de cada muestra [34-36]. Los resultados se expresaron como viscosidad relativa (η/η_0) donde η_0 es la viscosidad de la solución de ADN original ($r_i=0$).

Los estudios de viscosidad fueron realizados en el Departamento de Química Inorgánica, Universitat Barcelona, con el apoyo de la Dra. Virtudes Moreno. Se recibió un entrenamiento en esta técnica durante una pasantía realizada en 2010 con apoyo de la Red CYTED RIIDFCM 209RT0380.

3.5.1.1.4- Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica de espectroscopía ampliamente utilizada para determinar la manera como el ADN interacciona con pequeñas moléculas [37]. El espectro de dicroísmo circular de la doble hélice derecha de la forma B del ADN consiste de dos bandas: una positiva (275 nm) debida al apilamiento de bases del ADN y una negativa (245 nm) debida a la helicidad derecha del ADN. De esta forma, los cambios observados en las señales de los espectros de dicroísmo circular del ADN corresponden a cambios ocurridos en la estructura del mismo cuando hay interacciones con otras moléculas [38].

Los estudios de dicroísmo circular fueron realizados en un espectropolarímetro Jasco (modelo J-815) a 20 °C y pH 7,0 buffer Pipes (ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico)) 25 mM con CT ADN (200 μM). Las muestras fueron preparadas con relaciones molares complejo-pares de bases, r_i , de 0,25, 0,5 y 1,0. Se incubó a 20 °C durante 5-10 minutos y los espectros se registraron en el rango de 200 - 500 nm. Estos estudios fueron realizados en 2009 en el Centro de Biología Molecular Estructural, Universidad Federal de Santa Catarina, durante una pasantía con apoyo del proyecto FRP BI/73/01 PDT Subprograma III: cooperación bilateral con Brasil.

3.5.1.2- ESTUDIOS CON ADN PLASMÍDICO

3.5.1.2.1- Migración electroforética en gel de agarosa

Se estudió el mecanismo de interacción de los complejos con ADN analizando los cambios introducidos por la interacción en la migración electroforética de diferentes conformaciones del ADN. Se determinó tanto las posibles variaciones en la migración del ADN plasmídico circular covalentemente cerrado (superenrollado), debidas a intercalación, como la aparición de las formas circular o lineal, debido a la introducción de uno o más eventos de corte. Además, se estudió el efecto de competidores, por ejemplo, el efecto inhibitorio de compuestos que se unen al surco menor como la distamicina, lo que permitió detectar regiones específicas de unión de los complejos al ADN [39].

Se utilizó 300 ng de ADN plasmídico (pBSK BlueScript II-Stratagene) por reacción. El plásmido se obtuvo y purificó de acuerdo con técnicas estándar [40]. En forma breve, células de *Escherichia coli* XL1 se transformaron con pBSK II. La transformación se verificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y el plásmido de ADN fue purificado (Qiagen Kit Maxi plásmido). La cuantificación de ADN se llevó a cabo espectrofotométricamente a 260 nm asumiendo una absorptividad molar a 260 nm de 0,02 mL/μg cm⁻¹ [39].

Los complejos de Pd(II) con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano y los de Pd(II), Pt(II) y Au(I) con mpo fueron disueltos en agua-1% de DMSO. Para los compuestos de Pt(II) con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano, que resultaron menos solubles, las soluciones se prepararon en DMSO en su

totalidad. No se observó ningún efecto sobre el ADN, debido al agregado de DMSO. Tampoco se observó ningún efecto usando concentraciones de DMSO mayores que las utilizadas [39]. El ADN purificado se incubó en presencia de los complejos metálicos durante 24 horas a 37 °C (volumen final: 20 μ L), buffer de reacción: Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4 o HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) 25 mM, pH 7,0. Se ensayaron diferentes relaciones molares (r_i) y diferentes tiempos de incubación. Cuando correspondía, se añadió distamicina (0,1 mM) a la incubación de la reacción 10 minutos antes de la adición del complejo metálico. Después de la incubación, las reacciones fueron detenidas por la adición de buffer de carga (25% azul de bromofenol, 50% glicerol, 25 mM EDTA pH 8,0). En todos los casos, las muestras se sometieron a electroforesis en agarosa al 0,7% tamponada con TB (90 mM Tris-borato) a 70-80 V durante 2 horas. El gel fue posteriormente teñido con una solución de bromuro de etidio (EtBr) 0,5 mg/mL durante 30 minutos y desteñido en agua durante 20 minutos. Las bandas fueron visualizadas con luz ultravioleta y fueron cuantificadas utilizando el programa OneDSCAN.

Los estudios de interacción de los complejos con ADN plasmídico fueron realizados en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias, bajo la supervisión de la cotutora de este Trabajo de Tesis, Dra. Beatriz Garat.

3.5.1.2.2- Microscopía de fuerzas atómicas

La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) resulta una excelente herramienta para el seguimiento de los efectos producidos en la estructura y conformación del ADN, permitiendo incluso cuantificar las modificaciones introducidas en los parámetros topológicos [41-47]. Se utilizó AFM para visualizar moléculas individuales de ADN y analizar los efectos inducidos por la interacción de los complejos sobre la conformación de las mismas. Esta técnica permite analizar los cambios en la longitud de contorno y la distancia entre los extremos de las moléculas de ADN en función de la concentración de los complejos a nivel de moléculas individuales [48-53].

A fin de optimizar la observación de los cambios conformacionales en la estructura terciaria del ADN plasmídico, el plásmido pBR322 se calentó a 60 °C

durante 30 minutos para obtener mayoritariamente la forma circular. Se incubaron 15 ng de ADN pBR322 en un volumen adecuado con la concentración de compuestos necesaria para obtener una relación molar (r_1) 1:5. Los complejos fueron disueltos en una mínima cantidad de DMSO y a continuación se añadió buffer HEPES pH 7,4 hasta la concentración requerida. Las diferentes soluciones así como el agua Milli-Q se pasaron por filtros 0,2 μm FP030/3 (Schleicher & Schuell GmbH, Alemania). Se llevaron a cabo incubaciones a 37 °C durante 3 y 22 h. Las muestras fueron preparadas colocando en una mica (TED PELLA, Inc. California, EE.UU.) una gota de solución de ADN o de ADN en solución de los compuestos. Después de la adsorción durante cinco minutos a temperatura ambiente, las muestras se enjuagaron durante 10 segundos en un chorro de agua deionizada ($18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ = agua Milli-Q). Las muestras se secaron con argón comprimido y luego se registraron las imágenes de AFM. Las muestras fueron exploradas utilizando un instrumento NanoScope multimodo III AFM (Digital Instrumentals Inc., Santa Barbara, CA) que funcionó en el modo de “tapping” en aire a una velocidad de barrido de 1-3 Hz. La sonda de AFM fue de 125 nm de longitud. Se utilizó un cantilever rectangular de silicio monocristalino con “tip” de Si cónico integrado (Nanosensores GmbH, Alemania), con una frecuencia de resonancia promedio $f_0 = 330 \text{ KHz}$ y constante de resorte $K = 50 \text{ N/m}$. Se utilizaron “tips” de radio 10 nm, ángulo de cono de 35°. En general, las imágenes fueron obtenidas a temperatura ambiente ($T = 23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y la humedad relativa se mantuvo generalmente inferior al 40% [54].

Los estudios de AFM fueron realizados en el Departamento de Química Inorgánica, Universitat Barcelona (Dra. Virtudes Moreno). Se recibió un entrenamiento en 2010 en esta técnica durante una pasantía realizada en ese centro con apoyo de la Red CYTED RIIDFCM 209RT0380.

3.5.2- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN *T. cruzi* (CEPA Dm28c)

La capacidad de producción de radicales libres de los complejos se evaluó en el parásito por EPR utilizando 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO) como atrapador de radicales de vida corta. Cada compuesto fue disuelto en DMF

(grado espectroscópico) (aprox. 1 mM) y la solución fue adicionada a una mezcla conteniendo la forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28c, concentración final de proteínas 4-8 mg/mL) y DMPO (concentración final de 250 mM para los complejos de Pt(II) con las tiosemicarbazonas, o DMPO 100 mM en buffer fosfato 50 mM pH 7,4 para los complejos de Pd(II) y Pt(II) con mpo. La mezcla se transfirió a un capilar de 50 μ L. Los espectros EPR se registraron en la banda X (9,85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106, con una cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Todos los espectros se registraron en la misma escala después de 15 barridos [1]. Los espectros fueron parcialmente realizados en 2009 durante una pasantía en la Universidad de Chile financiada por CSIC.

3.5.3- CONSUMO DE OXÍGENO

Se cosechó epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) por centrifugación a 500xg, seguida de lavado y re-suspensión en buffer fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4, conteniendo cloruro de sodio 0,107 M. Se llevaron a cabo mediciones de respiración polarográficamente con un electrodo Clark (Yellow Springs Instruments, modelo 53 YSI) [16, 55]. Se añadió una cantidad de parásitos equivalente a 1,0 mg de proteína/mL a una cámara de 0,6 mL y se registró el consumo de oxígeno a 28 °C. La tasa de respiración del control corresponde a 28 nanoátomos gramos de oxígeno/min/mg de proteína. Con la finalidad de evaluar el reciclaje redox, se inhibió la respiración mitocondrial con cianuro de potasio 2 mM. Con fines comparativos y con el fin de mantener una proporción similar parásito-compuesto a testear en los estudios de inhibición del crecimiento y en los experimentos de consumo de oxígeno, se utilizaron concentraciones de los compuestos metálicos iguales a sus CI_{kc50} o 1,25 mM. Los resultados fueron corregidos por el efecto producido por el DMSO.

3.5.4- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE TRIPANOTIONA REDUCTASA (TR) DE *T. cruzi*

Se midió la actividad TR por espectrofotometría a 25 °C en buffer de ensayo TR (HEPES 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) [56]. Se prepararon soluciones stock

(4 mM) de los complejos y del ligando libre en DMSO. Las mezclas de ensayo (1 mL) resultaron 100 μ M en NADPH, 100 μ M en disulfuro de tripanotona (TS₂) y contienen distintas concentraciones de complejo potencialmente inhibidor. Se mezclaron NADPH, la enzima recombinante y el inhibidor. La reacción se inició mediante la adición de TS₂ y se siguió la disminución de la absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADPH. Los controles contienen la respectiva cantidad de DMSO en lugar de complejo inhibidor [16]. Estos estudios fueron realizados totalmente por la Prof. Luise Krauth-Siegel de la Universidad de Heidelberg, Alemania.

3.5.5- MEDICIONES DE LA ACTIVIDAD DE LA NADH-FUMARATO REDUCTASA DE *T. cruzi*

Para los ensayos de actividad de la enzima se prepararon extractos de proteínas de *T. cruzi* según una técnica ya descrita a la que se le hicieron algunas modificaciones [57]. Se cultivaron epimastigotas de *T. cruzi* (clon Dm28c) a 28 °C en medio LIT (triptosa infusión de hígado) suplementado con 10% de (FBS) inactivado por calor [58]. Se recolectaron parásitos (5×10^7 /mL) a 500xg que fueron resuspendidos en manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7,4 con varios inhibidores de la proteasa (10 μ g/mL leupeptina, 10 μ g/mL bestatina y 10 μ g/mL pepstatina). Las suspensiones celulares se homogeneizaron en presencia de Triton X-100 0,1% y KCl 200 mM en hielo con un homogeneizador Potter-Elvehjem teflón-vidrio para romper las membranas celulares y extraer la enzima. La preparación se utilizó inmediatamente para el ensayo espectrofotométrico de la actividad fumarato reductasa dependiente de la oxidación de NADH a 340 nm (coeficiente de absortividad molar = $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando NADH 250 μ M en buffer HEPES 30 mM pH 7,0 con KCl 125 mM y fumarato 0,5 mM [59].

Los estudios de mediciones de la actividad de NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi* fueron realizados en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias, bajo la supervisión de la cotutora de este Trabajo de Tesis, Dra. Beatriz Garat.

3.6- ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

3.6.1- CITOTOXICIDAD EN MACRÓFAGOS

La toxicidad y la actividad biológica de los nitroderivados están íntimamente relacionadas ya que la formación de radicales tóxicos para el parásito genera también daño en el huésped. Con el fin de determinar el grado de selectividad en la acción citotóxica de los complejos de platino obtenidos en este trabajo se realizaron ensayos de citotoxicidad inespecífica frente a macrófagos murinos.

Dichos ensayos fueron realizados por la Dra. Alicia Gómez-Barrio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, Madrid, España, según métodos descritos previamente [60]. Se cultivaron macrófagos J774 en 200 μ L de medio RPMI 1640 durante 24 horas a 37 °C. A continuación éstos fueron puestos en contacto por 24 horas con soluciones de los compuestos Pt-tiosemicarbazona ensayados en concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/mL en DMSO. Luego de ese período las células fueron lavadas e incubadas con MTT. Se cuantificó la reducción del MTT por medidas de absorbancia a 595 nm obteniéndose el porcentaje de citotoxicidad inespecífica en macrófagos.

Para los complejos de Au, Pd y Pt con mpo, se sembraron macrófagos J774 (70.000 células/pocillo) en microplacas de 96 pocillos de fondo plano (Nunclon) con 200 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor. Las células se expusieron durante 24 horas en un ambiente humidificado 5% CO₂/95% de aire a 37 °C. Luego, éstas fueron expuestas a los compuestos de Au (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156 μ g/mL) y de Pd y Pt (1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 y 0,025 μ g/mL) durante 24 horas. Posteriormente las células se lavaron con buffer fosfato salino y se incubaron a 37 °C con 0,4 mg/mL de MTT durante 60 minutos. A continuación, el formazan producido fue disuelto en DMSO (100 μ L) y se midieron las absorbancias a 595 nm. Se ensayó cada concentración en tres ocasiones y se utilizaron seis controles de crecimiento en cada prueba. Se determinaron los porcentajes de citotoxicidad (% C) como $\% C = 100 - (A_d - A_{dm}) / (A_c - A_{cm}) \times 100$, donde A_d es la

medida de las A_{595} de pocillos con los macrófagos y diferentes concentraciones de los compuestos, A_{dm} es la medida de las A_{595} de pocillos con diferentes concentraciones de compuestos en el medio, A_c es el control de crecimiento y A_{cm} es la medida de las A_{595} de pocillos con medio solamente [61].

Para los complejos de oro y vanadio con mpo se realizaron estudios complementarios con macrófagos J774 que fueron cultivados en medio RPMI 1640. El medio fue suplementado con 10% de SFB inactivado, penicilina G (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Los macrófagos J774 fueron sembrados (5×10^4 células/pocillo) en microplacas de 96 pocillos de fondo plano con 100 mL de medio RPMI 1640. Las células se colocaron durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂, a continuación, el medio fue reemplazado por diferentes concentraciones de los compuestos en 200 µl de medio, y se expusieron por 24 horas adicionales. También, fueron incluidos controles de crecimiento. La viabilidad celular se evaluó con resazurina por un método colorimétrico [62]. Se añadieron 20µL de solución de resazurina 2 mM y las placas fueron devueltas a la incubadora por 3 horas para evaluar la viabilidad celular. Estos estudios fueron realizados por personal especializado en el Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

3.6.2- CITOTOXICIDAD EN FIBROBLASTOS

Las células fibroblásticas NCTC clon 929 fueron cultivadas en MEM (minimal essential médium). El medio fue suplementado con 10% de SFB inactivado, penicilina G (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Se sembraron fibroblastos NCTC clon 929 en microplacas, 3×10^4 células por pocillo en 100µL medio de cultivo. Las células fueron cultivadas durante la noche a 37 °C en 5% de CO₂. Posteriormente, el medio fue removido y los compuestos se agregaron en 200 µL de medio durante 24 horas. Después de la incubación, se añadieron a cada pocillo 20 µL de solución 2mM de resazurina. Las placas se incubaron durante 3 horas para permitir óptima

oxidación-reducción. Las placas se leyeron a 490 y 595 nm en un lector de microplacas [62]. Los valores de CI_{50} de los compuestos en estudio se determinaron utilizando 6 concentraciones en el rango de 8 hasta 256 μ M. Estos estudios fueron realizados por personal especializado en el Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

3.7- BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Fernández, M.; González, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Faundez, M. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4885-4893.
2. Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R. L.; Piro, O. E.; Castellano, E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322-3331.
3. Shi, J. C.; Wen, T. B.; Zheng, Y.; Zhong, S. J.; Wu, D. X.; Liu, Q. T.; Kang, B. S.; Wu, B. M.; Mak, T. C. W. Palladium complexes with simultaneous O:S coordination, syntheses, structures and characterization of complexes with 2-mercaptophenol or 2-mercaptopyridine *N*-oxide. *Polyhedron* 1997, 16, 369-375.
4. Hodge, A.; Nordquest, K.; Blinn, E. L. Oxovanadium(IV) complexes containing bidentate nitrogen-sulfur and oxygen-sulfur ligands. *Inorg. Chim. Acta* 1972, 6, 491-498.
5. Geary, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* 1971, 7, 81-146.
6. Ebsworth, E. A. V.; Rankin, D. W. H.; Craddock, S. *Structural Methods in Inorganic Chemistry*, CRC Press, Blackwell Scientific Publications, London, Second edition, 1991.
7. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 5th ed., J. Wiley&Sons, New York, 1997.

8. Baran, J. E.; Química Bioinorgánica, McGraw-Hill, Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
9. Weidlein, J.; Müller, U.; Dehnicke, K. Schwingungsspektroskopie. Eine Einführung. Georg Thieme verlag Stuttgart, New York, 1982.
10. Olea-Azar, C.; Atria, A. M.; Di Maio, R.; Seoane, G.; Cerecetto, H. Cyclic voltammetry and electron paramagnetic resonance studies of some analogues of Nifurtimox. *Spectroscopy Lett.* 1998, 31, 849-857.
11. Maya, J. D.; Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; Repetto, Y.; Morello, A.; Périé, J.; Chauvière, G. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 999-1006.
12. Koepp, H. M.; Went, H.; Strehlow, H., Der Vergleich der Spannungsreihen in verschiedener Solventien.2. *Z. Elektrochem.* 1960, 64, 483-491.
13. Gagné, R. R.; Koval, C. A.; Lisensky, G. C., Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. *Inorg. Chem.* 1980, 19, 2854-2855.
14. Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Mendizábal, F.; Otero, L.; Gambino, D.; González, M.; Cerecetto, H. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochim. Acta Part A* 2005, 61, 2933–2938.
15. Huang, L.; Lee, A.; Ellman, J. A. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain using solid-phase parallel synthesis. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 676-684.
16. Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R. L.; Piro, O. E.; Castellano,

E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322-3331.

17. Maya, J. D.; Morello, A.; Repetto, Y.; Tellez, R.; Rodriguez, A.; Zelada, U.; Puebla, P.; Bontá, M.; Bollo, S.; San Feliciano, A. Effects of 3-chloro-phenyl-1,4-dihydropyridine derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 2000,125, 103-109.

18. Cuellar, M. A.; Salas, C.; Cortés M. J.; Morello, A.; Maya, J. D.; Preitea, M. D. Synthesis and *in vitro* trypanocide activity of several polycyclic drimane-quinone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2489–2497.

19. Urquiola, C.; Vieites, M.; Aguirre, G.; Marín, A.; Solano, B.; Arrambide, G.; Lavaggi, M. L.; Torre, M. H.; González, M.; Monge, A.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile *N*¹,*N*⁴-dioxide derivatives by complexation with vanadium. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 5503-5509.

20. Buckner, F. S.; Verlinde, C. L.; La Flamme, A. C.; Van Voorhis, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing betagalactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40, 2592–2597.

21. Vera, C.; Rolon, M.; Martinez-Fernandez, A. R.; Escario, J. A.; Gomez-Barrio, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing β -galactosidase. *Parasitol. Res.* 2005, 95, 296–298.

22. Faundez, M.; Pino, L.; Letelier, P.; Ortiz, C.; López, R.; Seguel, C.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Morello, A.; Maya, J. D. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of Nifurtimox and Benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 126-130.

23. Galan, A.; Garcia-Bermejo, M. J.; Troyano, A.; Vilaboa, N. E.; de Blas, E.; Kazanietz, M. J.; Aller, P. Stimulation of p38 Mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 11418-11424.
24. Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1962, 4:389-396.
25. Ferro, E.; de Arias, A. R.; Ferreira de Paredes, M. E. Procedimiento cuantitativo para el micrométodo de hemoconcentración directa en la infección aguda con *T. cruzi*. *Veterinaria* 1987, 60: 34-35.
26. Fournet, A.; Ferreira, M. E.; De Arias, A. R.; Schinini, A.; Nakayama, H.; Torres, S.; Sanabria, R.; Guinaudeau, H.; Bruneton, J. The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1997, 8, 163–170.
27. Fournet, A.; Rojas de Arias, A.; Ferreira, M. E.; Nakayama, H.; Torres de Ortiz, S.; Schinini, A.; Samudio, M.; Vera de Bilbao, N.; Lavault, M.; Bonte, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000, 13, 189-195.
28. Ferreira, M. E.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Schinini, A.; Vera de Bilbao, N.; Serna, E.; Layoutte, D.; Soriano-Agatón, F.; Poupon, E.; Hocquemiller, R.; Fournet, A. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J Ethnopharmacol.* 2007, 109, 258-263.
29. Mahnken, R. E.; Billadeau, M. A.; Nikonowicz, E. P.; Morrison, H. Development of photo cis-platinum reagents. Reaction of *cis*-dichlorobis(1,10-phenanthroline)rhodium(III) with calf thymus DNA, nucleotides and nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9253-9265.

30. Cabrera, E.; Cerecetto, H.; González, M.; Gambino, D.; Noblía, P.; Otero, L.; Parajón-Costa, B.; Anzellotti, A.; Sánchez-Delgado, R.; Azqueta, A.; López de Ceráin, A.; Monge, A. Ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes: New DNA binding agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2004, 39, 377-382.
31. Wolf, A.; Shimer, G. H.; Meehan, T., Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry* 1987, 26, 6392-6396.
32. Xiong, Y.; Ji, L. Synthesis, DNA-binding and DNA-mediated luminescence quenching of Ru(II) polypyridine complexes. *Coord. Chem. Rev.* 1999, 185-186, 711-733.
33. Ramachandra, R., 1990, http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/southern/southern8.html
34. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E. J.; Fernández-Mestre, M.; Arrieché, D.; Marchan, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄, *J. Inorg. Biochem.* 2003, 97, 364–369.
35. Barton, J. K.; Danishefsky, A. T.; Goldberg, J. M. Tris(phenanthroline)ruthenium(II): stereoselectivity in binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 2172-2176.
36. Long, E. C.; Barton, J. K. On demonstrating DNA intercalation. *Acc. Chem. Res.* 1990, 23, 271-273.
37. Garbett, N. C.; Ragazzon, P. A.; Chaires, J. B., Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand–DNA interactions. *Nature Protocols* 2007, 2, 3166-3172.

38. Chen, L.; Liu, J.; Chen, J.; Shi, S.; Tan, C.; Zheng, K.; Ji, L. Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dpq})]^{2+}$. *J. Mol. Struct.* 2008, 881, 156-166.
39. Otero, L.; Smircich, P.; Vieites, M.; Ciganda, M.; Cardoso Severino, P.; Terenzi, H.; Cerecetto, H.; Gambino, D.; Garat, B. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes, *J. Inorg. Biochem.* 2007, 101, 74-79.
40. Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. in: (Ed.), *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*, Wiley, New York, 1999.
41. Bustamante, C.; Rivetti, C.; Keller, D.J. Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7, 709-16.
42. Hansma, H. G.; Pietrasanta, L. Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998, 2, 579-584.
43. Fisher, T. E.; Marszalek, P. E.; Fernandez, J. M. Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nature Struct. Biol.* 2000, 7, 719-724.
44. Golan, R.; Pietrasanta, L. I.; Hsieh, W.; Hansma, H. G. DNA toroids: stages in condensation. *Biochemistry* 1999, 38, 14069-14076.
45. Pietrasanta, L. I.; Thrower, L.; Hsieh, W.; Rao, S.; Stemmann, O.; Lechner, J.; Carbon, J.; Hansma, H. Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, 96, 3757-62.
46. Anselmetti, D.; Fritz, J.; Smith, B.; Fernández-Busqueta, X. Single molecule DNA biophysics with atomic force microscopy, *Single Mol.* 2000, 1, 53-58.

47. Pietrasanta, L. I.; Smith, B. L.; MacLeod, M. C. A novel approach for analyzing the structure of DNA modified by Benzopyrene diol epoxide at single-molecule resolution. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 351-355.
48. Gómez-Segura, J.; Prieto, M. J.; Font, M.; Solans, X.; Moreno, V. Crystal structure and DNA interaction of the facial-type *rac*-Tris[2-(aminomethyl)benzimidazole]cobalt(III) complex. *Inorg. Chem.* 2006, 45, 10031-10033.
49. de Mier-Vinué, J.; Gay, M.; Montaña, Á. M.; Sáez, R.; Moreno, V.; Kasparkova, J.; Vrana, O.; Heringova, P.; Brabec, V.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Natile, G. Synthesis, biophysical studies, and antiproliferative activity of platinum(II) complexes having 1,2-bis(aminomethyl)carbocyclic ligands. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 424-431.
50. Ruiz, J.; Cutillas, N.; Vicente, C.; Villa, M. D.; López, G.; Lorenzo, J.; Avilés, F.X.; Moreno, V.; Bautista, D. New palladium(II) and platinum(II) complexes with the model nucleobase 1-methylcytosine: Antitumor activity and interactions with DNA. *Inorg. Chem.* 2005, 44, 7365-7376.
51. Ruiz, J.; Lorenzo, J.; Vicente, C.; López, G.; López, J. M.; Monge, M.; Avilés, F. X.; Bautista, D.; Moreno, V.; Laguna, A. New palladium(II) and platinum(II) complexes with 9-aminoacridine: Structures, luminiscence, theoretical calculations, and antitumor activity. *Inorg. Chem.* 2008, 47, 6990-7001.
52. Ruiz, J.; Villa, M. D.; Cutillas, N.; López, G.; de Haro, C.; Bautista, D.; Moreno, V.; Valencia, L. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with 4,7-dihydro-5-methyl-7-oxo[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine. Antitumor activity of the platinum compounds. *Inorg. Chem.* 2008, 47, 4490-4505.

53. Ruiz, J.; Lorenzo, J.; Sanglas, L.; Cutillas, N.; Vicente, C.; Villa, M. D.; Avilés, F. X.; López, G.; Moreno, V.; Pérez, J.; Bautista, D. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with the model nucleobase anions of thymine, uracil, and cytosine: Antitumor activity and interactions with DNA of the platinum compounds. *Inorg. Chem.* 2006, 45, 6347-6360.
54. Benítez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Costa Pessoa, J.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 303-311.
55. Letelier, M. E.; Rodríguez, E.; Wallace, A.; Lorca, M.; Repetto, Y.; Morello, A.; Aldunate, J. *Trypanosoma cruzi*: a possible control of transfusion induced Chagas' disease by phenolic antioxidants. *Exp. Parasitol.* 1990, 71, 357-363.
56. Jockers-Scherübl, M. C.; Schirmer, R. H.; Krauth-Siegel, R. L. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem.* 1989, 180, 267-272.
57. Denicola, A.; Rubbo, H.; Prodanov, E.; Turrens, J. F. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 54, 43-50.
58. Contreras, V. T.; Araujo-Jorge, T. C.; Bonaldo, M. C.; Thomaz, N.; Barbosa, H. S.; Meirelles de, N. M.; Goldenberg, S. Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1988, 83, 123-133.
59. Christmas, P. B.; Turrens, J. F. Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Letters* 2000, 183, 225-228.

60. Muelas, S.; DiMaio, R.; Cerecetto, H.; Seoane, G.; Ochoa, C.; J. A. Escario; Gómez-Barrio, A. New thiadiazine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Folia parasitol.* 2001, 48, 105-108.

61. Arán, V. J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Montero, D.; Nogal, J. J.; Gómez-Barrio, A.; Azqueta, A.; López de Ceraín, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 3197–3207.

62. Rolón, M.; Seco, E. M.; Vega, C.; Nogal, J. J.; Escario, J. A.; Gomez-Barrio, A.; Malpartida, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006, 28,104–109.

CAPÍTULO 4

COMPLEJOS DE Pd y Pt CON TIOSEMICARBAZONAS BIOACTIVAS FRENTE A *T. cruzi*

CONTENIDO

4.1- INTRODUCCIÓN

- 4.1.1- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS TIOSEMICARBAZONAS
- 4.1.2- TIOSEMICARBAZONAS COMO LIGANDOS
- 4.1.3- COMPLEJOS METÁLICOS DE Pd Y Pt CON TIOSEMICARBAZONAS
- 4.1.4- TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DEL 5-NITROFURANO
- 4.1.5- COMPLEJOS DE Pd CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DEL 5-NITROFURANO

4.2- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.2.1- SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DE Pt(II)
- 4.2.2- CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA
 - 4.2.2.1- Análisis elemental de los elementos livianos
 - 4.2.2.2- Estudios de conductividad
 - 4.2.2.3- Estudios de ESI-MS
 - 4.2.2.4- Estudios de espectroscopía IR y Raman
 - 4.2.2.5- Estudios de resonancia magnética nuclear
 - 4.2.2.6- Estudios de voltametría cíclica
 - 4.2.2.7- Estudios de producción de radicales libres por EPR
- 4.2.3- ACTIVIDAD BIOLÓGICA
 - 4.2.3.1- Actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro*
 - 4.2.3.2- Viabilidad de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c)
- 4.2.4- ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN MACRÓFAGOS
- 4.2.5- ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN
 - 4.2.5.1- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN *T. cruzi*
 - 4.2.5.2- CONSUMO DE OXÍGENO

4.2.5.3- ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN DE LOS COMPLEJOS $[MCl_2(HL)]$ y $[M(L)_2]$

4.2.5.3.1- Determinación de la existencia de interacción primaria con ADN de timo de ternero

4.2.5.3.2- Análisis de la afinidad de la interacción para los complejos $[PdCl_2(HL)]$: Titulación espectrofotométrica

4.2.5.3.3- Estudio del mecanismo molecular de los complejos de Pd y Pt de la serie $[MCl_2(HL)]$

4.2.5.3.3.1- Migración electroforética en gel de agarosa

4.2.5.3.3.1.1- Complejos de Pd

4.2.5.3.3.1.2- Complejos de Pt

4.2.5.3.3.1.3- Comparación de los complejos de Pd y Pt de la serie $[MCl_2(HL)]$

4.2.5.3.3.2- Medidas de viscosidad del ADN para los complejos de Pd y Pt

4.2.5.3.3.3- Dicroísmo circular

4.2.5.3.3.3.1- Complejos de Pd

4.2.5.3.3.3.2- Complejos de Pt

4.2.5.3.3.4- Microscopía de fuerzas atómicas para los complejos de Pd y Pt

4.2.5.3.4- Estudio del mecanismo molecular de los complejos de Pd y Pt de la serie $[M(L)_2]$

4.2.5.3.4.1- Complejos de Pd

4.2.5.3.4.2- Complejos de Pt

4.3- CONCLUSIONES

4.4- BIBLIOGRAFÍA

4.1- INTRODUCCIÓN

Como ya se ha descrito previamente, la hipótesis general de este Trabajo de Tesis implica la síntesis y caracterización de compuestos de Pt(II) y Pd(II) con ligandos que muestran actividad contra *Trypanosoma cruzi* y su estudio comparativo tanto químico-estructural como biológico y de mecanismo de acción. En particular, este capítulo trata de los estudios fisicoquímico-estructurales, biológicos y de mecanismo de acción realizados a compuestos de Pt(II) con tiosemicarbazonas bioactivas derivadas del 5-nitrofurano (Figura 1) y su comparativa con los compuestos análogos de Pd(II) desarrollados previamente en el grupo de trabajo que integro.

Como parte de la elucidación del mecanismo de acción, y con el fin de abordar si la interacción con el ADN podría ser parte de éste, se llevaron a cabo para estos compuestos de Pt(II) y Pd(II) experimentos con ADN de timo de ternero y ADN plasmídico. Para ello se usaron, entre otras, técnicas de biología molecular que permiten caracterizar en mayor profundidad la interacción de los complejos metálicos con el ADN. Además, se evaluó la generación de radicales libres intraparasitarios como parte del esperado mecanismo dual de acción, fundamento del diseño de estos compuestos.

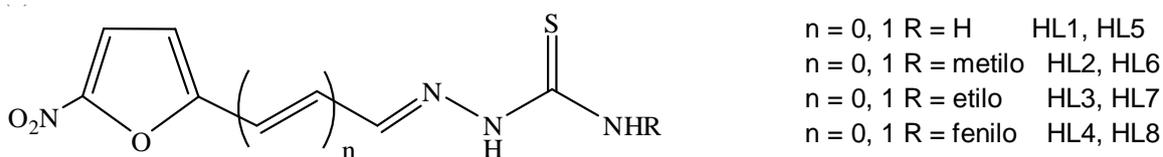


Figura 1. Tiosemicarbazonas bioactivas derivadas de 5-nitrofurano ($n=0$, 5-nitrofuraldehído, $n=1$, 3-(5-nitrofuril) acroleína).

4.1.1- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS TIOSEMICARBAZONAS

Las tiosemicarbazonas (Figura 2) tienen un amplio perfil farmacológico y representan una clase importante de compuestos cuyas propiedades han sido intensamente estudiadas en la Química Médica y, en particular, en la Química

Medicinal Inorgánica, debido a su capacidad quelante y al papel que juega la coordinación a metales en su mecanismo de acción farmacológica.

Las propiedades biológicas de las tiosemicarbazonas suelen estar relacionados con su coordinación a iones metálicos. En primer lugar, la lipofilidad, propiedad fisicoquímica que controla el ingreso de los compuestos a la célula, es modificada por la coordinación. Por otra parte, el complejo metálico puede ser más activo que el ligando libre, y algunos efectos secundarios de la tiosemicarbazona pueden disminuir al complejarse. Además, el complejo puede exhibir bioactividades que el ligando libre no presenta. Inclusive el mecanismo de acción puede implicar la unión a un metal *in vivo* o el complejo metálico puede ser un vehículo para la activación del ligando como agente citotóxico. Por otra parte, la coordinación puede dar lugar a una importante reducción de la resistencia al fármaco ya que por efecto de la coordinación a un metal este fármaco puede verse enmascarado y así lograr ejercer su acción [1]. Las tiosemicarbazonas muestran actividad como agentes antitumorales, antivirales, antifúngicos, antibacterianos y antimaláricos, entre otras actividades. La actividad antitumoral ha sido sin duda la más estudiada. Como ejemplo relevante, la Tiaprina (3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona) ha ingresado a fases clínicas como potencial antileucémico hace algunos años [2,3]. Constituye un quelante del hierro y un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa, enzima que cataliza la conversión de ribonucleótidos en deoxiribonucleótidos requerida para la biosíntesis del ADN y, por lo tanto, indispensable para la supervivencia, crecimiento y proliferación celular [4].

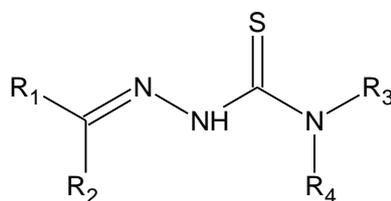


Figura 2. Estructura general de las tiosemicarbazonas. R₁ y R₂ pueden ser grupos alquilo o arilo y R₃ y R₄ pueden ser grupos alquilo o arilo o hidrógeno.

Las tiosemicarbazonas actúan como inhibidores de enzimas a través de la complejación de metales endógenos inhibiendo enzimas que participan en la síntesis del ADN como la ribonucleótido reductasa. Además, algunos complejos de metales de estos ligandos tienen la capacidad de mimetizar la acción de ciertas enzimas [5]. Por ejemplo, algunos complejos de cobre (II) imitan la acción de la superóxido dismutasa [1]. También, los complejos de tiosemicarbazonas, particularmente los de Cu, Tc y Re, tienen la posibilidad de usarse como radiofármacos, tanto con fines de diagnóstico como para radioterapia [5].

4.1.2- TIOSEMICARBAZONAS COMO LIGANDOS

Estos ligandos se forman por la condensación de tiosemicarbazida o sus derivados con un aldehído. Desde el punto de vista Químico Inorgánico, las tiosemicarbazonas son ligandos versátiles y flexibles que actúan, fundamentalmente, como bidentados, uniéndose al átomo central a través del azufre tiocarbonílico y del nitrógeno azometínico, formando complejos de adecuada estabilidad [1, 6-9].

Estos ligandos pueden también coordinar por más de dos sitios, dependiendo de el o los sustituyentes en el aldehído. Evidencia de esta característica se puede encontrar en la enorme cantidad de trabajos que se han publicado de complejos de metales de transición con este tipo de ligandos. Muchos de ellos presentan coordinación tridentada por la presencia de átomos donores adicionales en la tiosemicarbazona [10].

4.1.3- COMPLEJOS METÁLICOS DE Pd Y Pt CON TIOSEMICARBAZONAS

Complejos de Pd(II) y Pt(II) con tiosemicarbazonas con actividad citotóxica o antitumoral:

El interés en el desarrollo de complejos antitumorales de platino, nace del descubrimiento de Rosenberg de que este complejo inhibe la división celular, lo que le sugirió que podía tener actividad contra el cáncer [11-13]. El *cis* (diaminodicloro) platino(II) (Figura 3) entró en fase I de ensayos clínicos en

1971 y fue aprobado para el tratamiento de los cánceres de ovario y testículo en 1978. Es aún hoy uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de tumores. Alrededor del 90% de los tratamientos utilizan cisplatino como fármaco único o en terapia de combinación. El cisplatino contribuye al tratamiento de los carcinomas de faringe y del cuello uterino, linfoma, osteosarcoma, melanoma y neuroblastoma, entre otros.

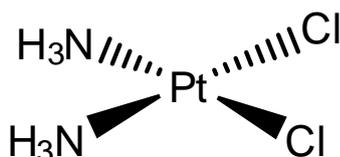


Figura 3. Estructura del cisplatino (cis-DDP).

Desde entonces, miles de complejos de platino fueron evaluados como posibles agentes antitumorales, debido a los inconvenientes presentados por cis-DDP, tales como neurotoxicidad, nefrotoxicidad y el desarrollo de resistencia al fármaco. La literatura reciente presenta estudios de complejos de paladio(II) y platino(II) con tiosemicarbazonas que mostraron ser activos contra células tumorales resistentes al cisplatino. Por ejemplo, los complejos de la fenilacetaldéido tiosemicarbazona de fórmula $[M(HL)Cl_2]$, donde M es Pd(II) o Pt(II), son citotóxicos contra una variedad de células tumorales y presentan un buen índice terapéutico y valores de concentración inhibitoria (CI_{50}) mucho más pequeños en las células resistentes al cisplatino (Pam-ras) que en las células normales (Pam) (Tabla 1) [5].

Tabla 1. Concentración inhibitoria Cl_{50} de la fenilacetaldehído tiosemicarbazona (HL) y de sus complejos de Pd(II) y Pt(II).^a

$Cl_{50}(\mu M)\pm ds$		
	PAM-RAS	PAM
ligando HL	84±1	128±5
[Pt(II)(HL)Cl ₂]	65±1	200±9
[Pd(II)(HL)Cl ₂]	23±0,2	124±3
cis-DDP	157±6	164±6
adriamicina	156±5	150±3
etopósido	136±10	180±12

^a Se incluyen los valores para cis-DDP, adriamicina y etopósido para comparación.

Sin embargo, ambos presentan mayor citotoxicidad que los fármacos utilizados clínicamente, adriamicina y etopósido. Los estudios de mecanismo de acción, mediante el análisis de la interacción de los complejos con el ADN, indican que los complejos forman principalmente enlaces interhebra, a diferencia del cisplatino, que forma preferentemente enlaces intrahebra. El complejo de paladio(II) presenta una mayor actividad citotóxica en células resistentes y más interacciones interhebra que su análogo de platino(II), probablemente debido a la mayor reactividad del primero [5].

Los mismos autores mostraron que los complejos binucleares de platino(II) y paladio(II) con *p*-isopropilbenzaldehído tiosemicarbazona también tienen actividad citotóxica contra los diferentes linajes de células humanas y murinas sensibles (HL-60, U937, HeLa y 3T3) y fueron activos en células resistentes al cisplatino (Pam-ras), con un buen índice terapéutico [1, 5]. Una vez más el complejo realiza conexiones interhebra con el ADN. Complejos de estos ligandos que contienen sustituyentes en el nitrógeno terminal de la cadena tuvieron comportamiento similar y, en células resistentes, inducirían apoptosis a dosis menores que las necesarias para dañar las células normales. Muchos otros complejos de paladio(II) y platino(II) con tiosemicarbazonas revelaron la existencia de un comportamiento similar [5]. También los complejos de

paladio(II) y platino(II) con diferentes derivados de la 2-formilpiridina tiosemicarbazona fueron probados *in vivo* en ratones con leucemia P388. La actividad antitumoral parece estar relacionada con la facilidad de ataque reductivo de los complejos por tioles celulares. Complejos de paladio(II) de 2-acetilpiridina tiosemicarbazonas fueron activos *in vitro* contra leucemias P388 y L121046 [5]. Los complejos de Pt(II) de *N*⁴-etil-2-formil- y 2-acetilpiridina tiosemicarbazona mostraron citotoxicidad superando la resistencia al cisplatino de las células A2780/Cp8 [1].

Otros autores relatan que el complejo bencil bis (tiosemicarbazona) Pd(II) podría tener importantes propiedades antitumorales, ya que tiene un valor de dosis inhibitoria Cl_{50} similar al cis-DDP y muestra una citotoxicidad significativa contra células Pam-ras resistentes al cisplatino. El complejo provoca cambios conformacionales en la estructura del ADN diferentes de los inducidos por el cis-DDP [5].

El grupo de C. Navarro-Ranninger ha trabajado intensamente en el desarrollo de nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con tiosemicarbazonas y bis(tiosemicarbazonas) como ligandos como potenciales agentes antitumorales y realizado intensos estudios comparativos de compuestos análogos de Pd(II) y Pt(II) intentando establecer relaciones estructura-actividad [10].

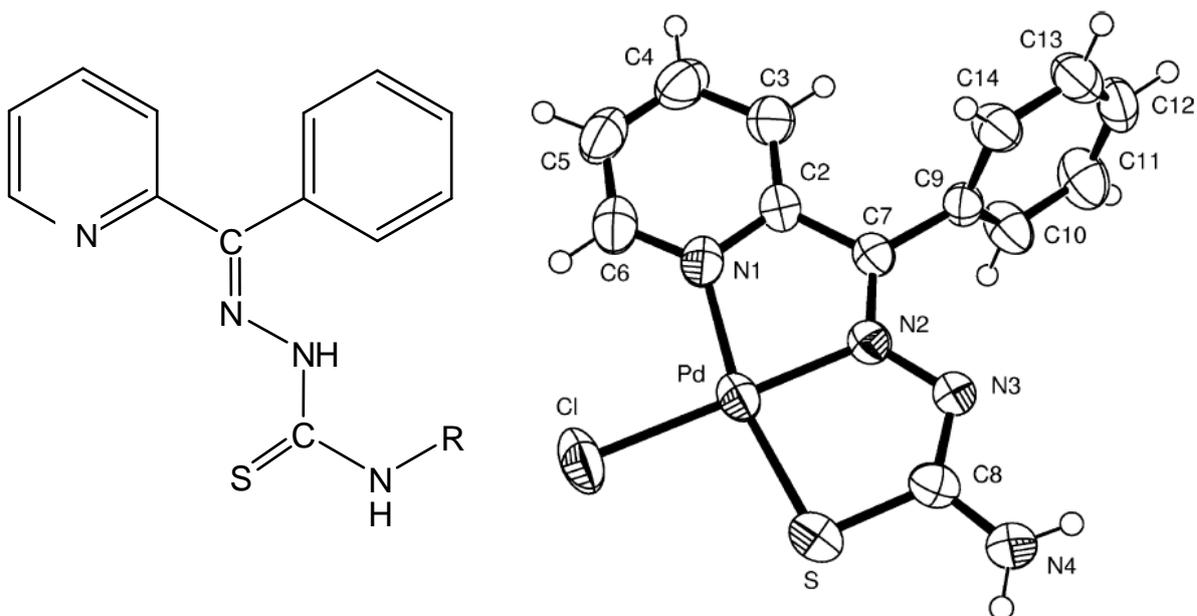


Figura 4. Estructura genérica de las tiosemicarbazonas de la 2-benzoylpiridina (isómero *E*) y diagrama ORTEP de uno de los complejos de Pd obtenidos ($[(Pd(2Bz4DH)Cl)]$).

Como parte del grupo de investigación de la Dra. Gambino también he participado en el desarrollo de complejos de Pd(II) de 2-benzoilpiridina tiosemicarbazonas que mostraron actividad citotóxica en líneas de células tumorales MCF-7, TK-10 y UACC-62 (Figura 4) [14].

Este grupo también ha reportado la actividad antileucémica potencial de compuestos de Pd(II) y Pt(II) isoestructurales con tiosemicarbazonas derivadas de la 1-indanona como ligandos, resultando los complejos de Pt(II) más selectivos, hacia las células leucémicas, que sus análogos de Pd(II) (Figura 5) [15].

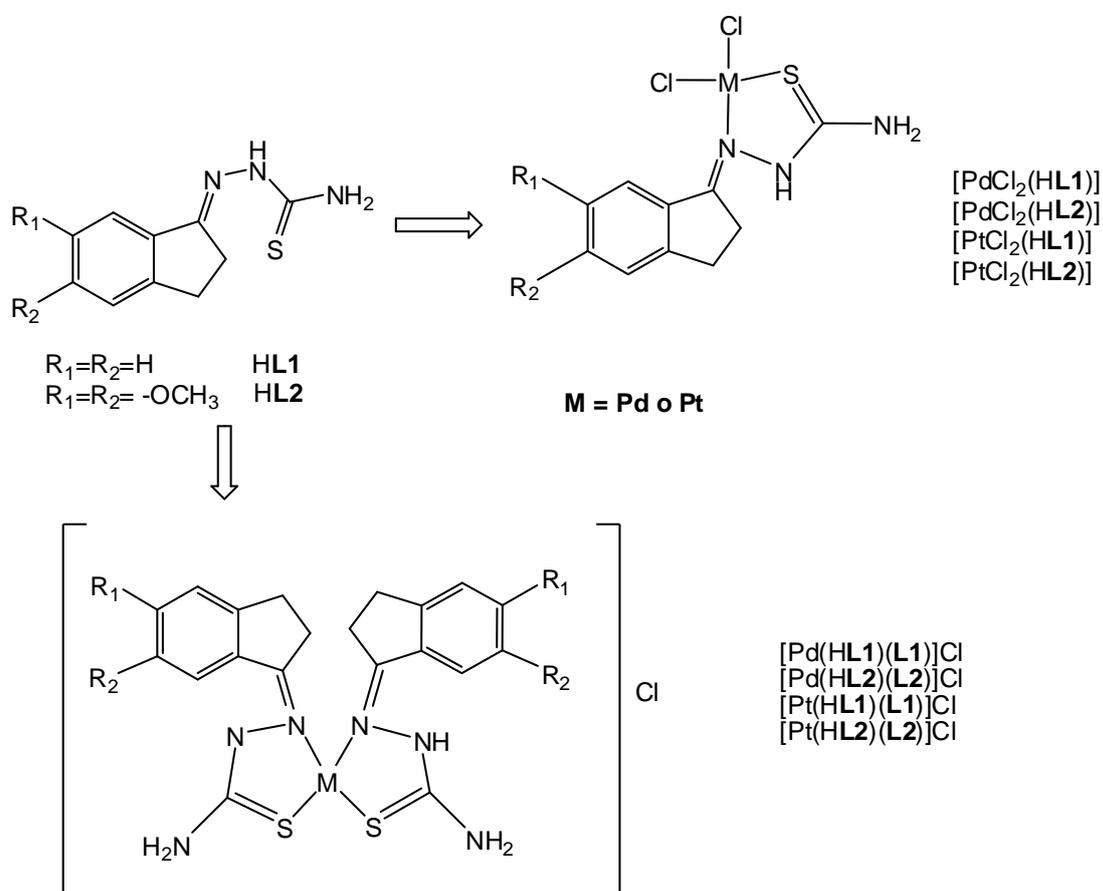


Figura 5. Tiosemicarbazonas derivadas de 1-indanonas y sus complejos de Pd(II) y Pt(II).

Complejos de Pd(II) y Pt(II) con tiosemicarbazonas con actividad antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria):

Es de interés mencionar aquí resultados recientes de tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrotiofeno-2-carboxaldehído que presentan actividad amebicida y cuya actividad aumenta por la formación de complejos con platino. La posibilidad de uso clínico de estos complejos se dificulta debido a su alto costo por tratarse la amebiasis de una enfermedad catalogada por la OMS como desatendida (NTD), pero la investigación se muestra igualmente relevante debido a que el metronidazol, fármaco de uso común como amebicida, ha mostrado tener efectos carcinogénicos y mutagénicos lo que estimula la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad [5, 16].

Las tiosemicarbazonas y sus complejos metálicos presentan una amplia actividad antimicrobiana. Una variedad de 2-acetilpiridina tiosemicarbazonas fueron evaluadas y resultaron capaces de inhibir a los siguientes microorganismos: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis* y *Enterococcus D* [5]. Por otro lado, mostraron pobre actividad antibacteriana contra los bacilos gram-negativos, es decir, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, y *Proteus*. Se obtuvieron resultados similares con tiosemicarbazonas de la 2-acetilquinolina y las 1- y 3-acetilisquinolina. El complejo de Pt(II) de la 2-acetilpiridina tiosemicarbazona también mostró un comportamiento similar, es decir, resultó letal para las bacterias gram-positivas, pero inactivo frente a bacterias gram-negativas. Los complejos fueron activos contra levaduras [1].

Además, se estudió la actividad *in vitro* antibacteriana, antifúngica y amoebicida de o-vanillin tiosemicarbazonas N^4 -sustituidas y algunos de sus complejos metálicos del grupo del platino. Los complejos presentaron una significativa actividad contra un amplio espectro de microorganismos [1].

Complejos de Pt(II) con tiosemicarbazonas con otras propiedades biológicas:

Algunas ariltiosemicarbazonas produjeron importantes aumentos en el tiempo de supervivencia media de ratones infectados con *T. cruzi*, aunque no se observó cura a dosis cercanas a las tóxicas. Algunas exhibieron una potente actividad contra la cruzipaina, la más importante cisteína proteasa de *T. cruzi*, así como actividad tripanosomicida. Se han realizado amplios estudios de relación estructura-actividad. También, quelatos de Pt(II) con derivados o-vanillin tiosemicarbazona y 2 acetilpiridina tiosemicarbazona han sido evaluados como antimaláricos en ratones infectados con *Plasmodium berghei*, mostrando una actividad significativa [1].

4.1.4- TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 5-NITROFURANO

Estos compuestos (Figura 1) combinan en la misma molécula el grupo 5-nitrofurano, un promotor de estrés oxidativo y la función tiosemicarbazona, descrita como un potente inhibidor de la cruzipaina [17].

Los experimentos llevados a cabo para el Nifurtimox, fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sugieren que la reducción intraparasitaria del grupo nitro seguida de reciclaje redox con producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) puede ser su principal modo de acción contra *T. cruzi* (Figura 6). Estas especies pueden causar daño celular directamente al reaccionar con diversas macromoléculas biológicas, o indirectamente por la generación de radicales hidroxilo altamente reactivos via las reacciones Haber–Weiss y Fenton mediadas por Fe(II) [18]. Se ha demostrado que el *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación de los radicales del oxígeno y es por lo tanto más sensible al estrés oxidativo que las células de sus huéspedes vertebrados [19].

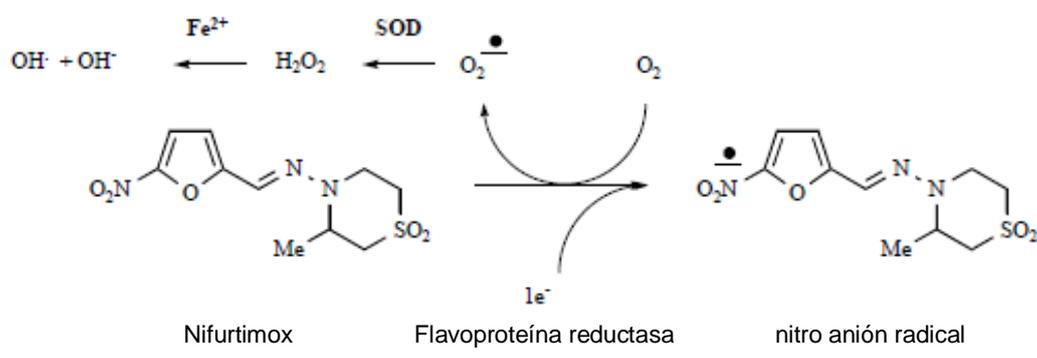


Figura 6. Vía bio-reductiva del Nifurtimox.

El metabolismo redox en tripanosomátidos es específico de estos parásitos y se basa en la tripanotiona (bis-glutationilespermidina) como sustrato y la flavoenzima tripanotiona reductasa (TR). El sistema tripanotiona/tripanotiona reductasa (TR), que sustituye al sistema glutatión/glutatión reductasa (GR) propio del huésped mamífero, protege a los parásitos del daño oxidativo, entre otros fenómenos. La conocida sensibilidad de los tripanosomátidos hacia las especies radicalarias del oxígeno hace que esta enzima sea una prometedora diana para el desarrollo de fármacos específicos contra estos parásitos.

La reducción de la familia de tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano seleccionada como ligandos a coordinar al Pd(II) y Pt(II) en este Trabajo de Tesis (Figura 1) fue estudiada con anterioridad usando voltametría cíclica. Las especies radicalarias generadas fueron caracterizadas utilizando EPR [18, 19]. Los diferentes procesos de reducción de los compuestos implicados fueron estudiados y caracterizados en detalle. Sin embargo, a efectos de comprender su actividad antitripanosoma resultó de especial interés el potencial de reducción del grupo nitro que daría una idea de la posibilidad de que estos compuestos fueran reducidos en los rangos de potencial existentes en el medio biológico. Estos derivados del 5-nitrofurano mostraron menores potenciales de reducción del grupo nitro $E_{1/2}$ que el Nifurtimox, lo que implicó la posibilidad de que desarrollaran una actividad antitripanosoma promisoría. La capacidad donador/aceptor de los sustituyentes no pareció afectar significativamente los potenciales de reducción de los derivados, sólo los derivados no sustituidos mostraron diferencias significativas en sus potenciales [18]. Con el fin de saber

si el principal modo de acción de estos compuestos era el del Nifurtimox se realizaron experimentos de EPR intraparasitarios utilizando la técnica de “spin trapping” para atrapar los radicales de vida corta y experimentos de medida del consumo de oxígeno para evaluar los compuestos como agentes de reciclaje redox. Los resultados de los estudios biológicos y los experimentos de EPR en el sistema *T. cruzi* indicaron que ambas familias de derivados tiosemicarbazona estudiados poseen diferente mecanismo principal de acción tripanosomicida. Mientras que los derivados del furaldehído (HL1, HL2, HL3 y HL4) pueden actuar por producción de estrés oxidativo, los derivados furilacroleína (HL5, HL6, HL7 y HL8) parecen poseer diferentes mecanismos de toxicidad hacia *T. cruzi*. En este sentido, los estudios sobre la inhibición de la enzima específica de *T. cruzi*, la cruzipaína, podrían indicar un segundo potencial blanco [19]. Esta proteasa se expresa en todas las etapas del ciclo de vida del parásito y es esencial para la replicación de la forma intracelular [14]. Esta enzima está también involucrada en la alimentación del parásito a partir de las proteínas del huésped, en la evasión de los mecanismos de defensa del huésped y en el ingreso del parásito a las células, entre otras funciones [19-21]. La inhibición de la cruzipaína es actualmente una de las estrategias más ampliamente estudiadas en el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana. Recientemente, Cohen y colaboradores han descrito que algunos derivados tiosemicarbazona exhiben una potente actividad inhibitoria de la cruzipaína así como actividad tripanosomicida contra parásitos en cultivos celulares. Los estudios mecanísticos sugieren el ataque covalente de la Cys25 de la enzima al carbono tiocarbonílico de la tiosemicarbazona asistido por la transferencia del protón His159 al azufre tiocarbonílico (Figura 7) [17].

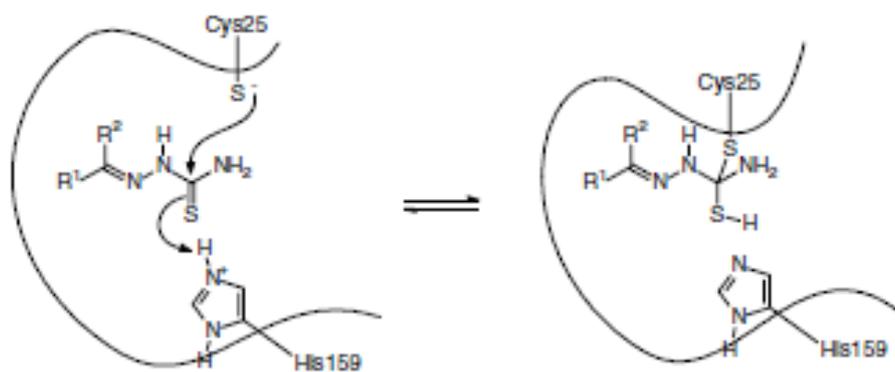


Figura 7. Mecanismo de inhibición de la cruzipaina por los derivados tiosemicarbazona propuesto por Cohen y colaboradores [17].

Los estudios de actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Tulahuen 2 y Brener) indicaron que estos compuestos son 1,5-1,7 veces más activos que el compuesto de referencia, Nifurtimox. Para ambas cepas, los compuestos derivados de 3-(5-nitrofuril) acroleína resultaron más activos que los análogos derivados de 5-nitrofuraldehído. Para todos los compuestos se detectó producción de radicales libres cuando los compuestos se incubaron en presencia de microsomas de hígado de mamíferos. También, se evaluó para dos de los derivados más activos (HL3 y HL7), la toxicidad aguda *in vivo* en ratones, demostrando tener una toxicidad similar a la del Nifurtimox [17].

4.1.5- COMPLEJOS DE Pd CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DEL 5-NITROFURANO

Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo que integro como parte de un Trabajo de Tesis anterior. El paladio(II) fue seleccionado como centro metálico para coordinar estos ligandos bioactivos (Figura 1) debido a las postuladas similitudes metabólicas entre las células tumorales y el *T. cruzi* y a la probada capacidad de sus compuestos citotóxicos para unirse al ADN como principal mecanismo de acción antitumoral. En ese contexto fueron sintetizados dieciseis complejos de fórmula $[PdCl_2(HL)]$ y $[Pd(L)_2]$ (Figura 8) con los ligandos indicados en la Figura 1 [22]. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados

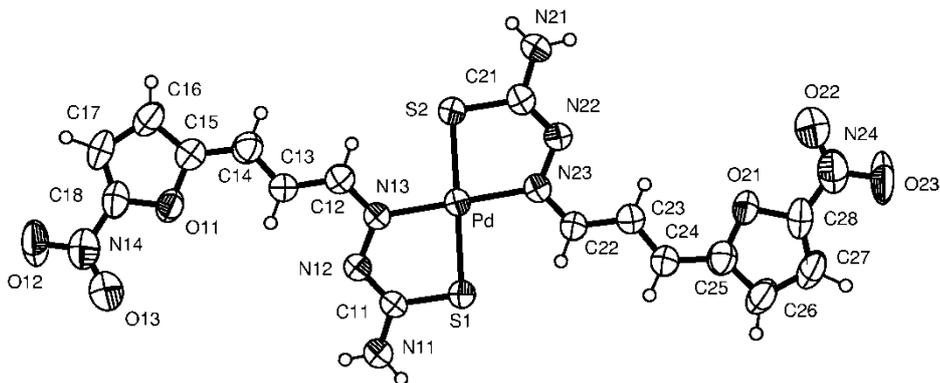


Figura 9. Representación ORTEP del complejo $[Pd(L5)_2] \cdot 3DMSO$.

Los estudios del comportamiento electroquímico de los complejos por voltametría cíclica se enfocaron especialmente al estudio del efecto de la coordinación al Pd sobre el potencial de reducción del grupo nitro del ligando. Este potencial de reducción resultó similar en los complejos y en sus respectivos ligandos. Es de hacer notar que se observaron valores de $E_{1/2}$ mayores que el correspondiente al Nifurtimox. Esto demostró una mayor capacidad de los compuestos de ser biorreducidos para generar especies radicalarias potencialmente tóxicas para el parásito [22].

Tabla 2. Efecto de algunos compuestos de Pd sobre el crecimiento de la forma epimastigota de *T. cruzi* [22].

Compuesto	rPIC	CI ₅₀ (μ M)
$[PdCl_2(HL6)]$	1,4	2,7
$[Pd(L6)_2]$	1,5	4,3
HL6	1,3	4,5
$[PdCl_2(HL7)]$	1,4	2,4
$[Pd(L7)_2]$	1,4	5,2
HL7	1,6	4,1
Nifurtimox	1,0	7,7

rPIC: porcentaje de inhibición de crecimiento relativo a Nifurtimox (5μ M, 5^o día de exposición)

En cuanto a su actividad antiparasitaria, la mayoría de los compuestos de paladio resultaron igual o más activos frente al parásito que los ligandos y resultaron hasta 1,7 veces más activos que el Nifurtimox a la misma dosis (excepto los complejos para los ligandos HL4 y HL8) Tabla 2 [22].

Para esta serie de complejos se estudiaron diferentes aspectos potencialmente relacionados con el mecanismo propuesto que involucraría un modo de acción dual o incluso múltiple. Los estudios de EPR en *T. cruzi* incubado con complejos activos de Pd mostraron las señales típicas del aducto DMPO-OH \cdot y del aducto DMPO-nitroheterociclo. Se observó una buena correlación entre las intensidades de las señales de EPR, y por lo tanto la concentración de especies radicalarias, y los valores de CI₅₀ en *T. cruzi*. Además, algunos de los complejos de la serie [PdCl₂(HL)] inhibieron irreversiblemente la tripanotona reductasa, enzima parasitaria ausente en el mamífero huésped y fundamental para la defensa del parásito frente al estrés oxidativo. Los estudios preliminares de interacción primaria de los complejos con ADN de timo de ternero mostraron que existe una fuerte interacción de los complejos con esta biomolécula comparable a la descrita en bibliografía para otros compuestos de Pd con actividad antitumoral. Eso permite postular que estos compuestos podrían interactuar con el ADN de *T. cruzi* [22]. Resumiendo entonces el mecanismo principal de acción de los compuestos de Pd previamente desarrollados parece transcurrir principalmente a través de su biorreducción en el parásito, lo que produce especies químicas radicalarias desencadenantes de daño celular irreversible que conduce a la muerte del parásito (estrés oxidativo). Algunos de los compuestos inhiben irreversiblemente la tripanotona reductasa, enzima propia del parásito y participante de su mecanismo de protección contra radicales libres. Los resultados de estudios preliminares parecen indicar que los compuestos también podrían afectar al ADN. En suma, la inclusión en una misma molécula del farmacóforo 5-nitrofurano y de un metal de importancia farmacológica como el Pd condujo a compuestos activos contra *T. cruzi* que actúan por un mecanismo al menos dual.

Tomando en consideración estos resultados previos, en este Trabajo de Tesis se emprendió el estudio exhaustivo del mecanismo de interacción con el ADN de estos complejos de Pd con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano por medio de diferentes técnicas. Los resultados de estos estudios fueron

comparados con los mostrados por los compuestos análogos de Pt(II) desarrollados también en este Trabajo de Tesis.

4.2- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1- Síntesis de los complejos de Pt(II)

Los complejos de Pt(II) con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano (HL) desarrollados en este Trabajo de Tesis fueron sintetizados como se indicó en el capítulo 3. En la Tabla 3 se detalla el color y el rendimiento obtenido para cada uno de ellos.

Tabla 3. Color y rendimiento obtenido para los complejos de Pt(II) con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano.

Complejo	Color	Rendimiento (%)
[PtCl ₂ (HL1)]	Marrón	52
[PtCl ₂ (HL2)]	Rojo marrón	54
[PtCl ₂ (HL3)]	Marrón	44
[PtCl ₂ (HL4)]	Rojo naranja	42
[PtCl ₂ (HL5)]·1/2 DMF	Marrón	52
[PtCl ₂ (HL6)]	Marrón	80
[PtCl ₂ (HL7)]·DMF	Marrón	43
[PtCl ₂ (HL8)]·1/2 DMF	Rojo marrón	30
[Pt(L1) ₂]	Marrón oscuro	52
[Pt(L2) ₂]	Marrón	36
[Pt(L3) ₂]	Rojo naranja	78
[Pt(L4) ₂]	Rojo naranja	46
[Pt(L5) ₂]·2 DMF	Marrón	49
[Pt(L6) ₂]	Marrón	60
[Pt(L7) ₂]·1/2 DMF	Marrón	47
[Pt(L8) ₂]·2 DMF	Rojo marrón	46

Ambas series, [PtCl₂(HL)] y [Pt(L)₂], fueron obtenidas con buenos rendimientos. Si bien la síntesis de estos complejos se realizó de forma similar a la sus análogos de Pd, para el caso de los compuestos de Pt fue necesario poner a punto los tiempos de reflujo duplicándolos para lograr rendimientos y purezas adecuados.

4.2.2- Caracterización fisicoquímica

4.2.2.1- Análisis elemental de los elementos livianos

Tabla 4. Fórmulas globales propuestas para los complejos de Pt con tiosemicarbazonas del 5-nitrofurano (Figura 1).

Complejo	Fórmula global propuesta
[PtCl ₂ (HL1)]	C ₆ H ₆ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt
[PtCl ₂ (HL2)]	C ₇ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt
[PtCl ₂ (HL3)]	C ₈ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt
[PtCl ₂ (HL4)]	C ₁₂ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt
[PtCl ₂ (HL5)]·1/2 DMF	C ₈ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt·1/2C ₃ H ₇ NO
[PtCl ₂ (HL6)]	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt
[PtCl ₂ (HL7)]·DMF	C ₁₀ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt·C ₃ H ₇ NO
[PtCl ₂ (HL8)]·1/2 DMF	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O ₃ SPt·1/2C ₃ H ₇ NO
[Pt(L1) ₂]	C ₁₂ H ₁₀ N ₈ O ₆ S ₂ Pt
[Pt(L2) ₂]	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₆ S ₂ Pt
[Pt(L3) ₂]	C ₁₆ H ₁₈ N ₈ O ₆ S ₂ Pt
[Pt(L4) ₂]	C ₂₄ H ₁₈ N ₈ O ₆ S ₂ Pt
[Pt(L5) ₂]·2 DMF	C ₁₆ H ₁₄ N ₈ O ₆ S ₂ Pt·2C ₃ H ₇ NO
[Pt(L6) ₂]	C ₁₈ H ₁₈ N ₈ O ₆ S ₂ Pt
[Pt(L7) ₂]·1/2 DMF	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₆ S ₂ Pt·1/2C ₃ H ₇ NO
[Pt(L8) ₂]·2 DMF	C ₂₈ H ₂₂ N ₈ O ₆ S ₂ Pt·2C ₃ H ₇ NO

Las fórmulas propuestas para los complejos de Pt obtenidos se muestran en la Tabla 4. Se postula una coordinación bidentada del ligando, a través del N

azometínico y del S tiocarbonílico, quedando el ligando no deprotonado en el grupo NH para los compuestos [PtCl₂(HL)] y deprotonado para los compuestos [Pt(L)₂]. Los resultados del análisis elemental de C, H y N correspondientes se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del análisis elemental de C, H y N para los complejos de Pt con las tiosemicarbazonas de trabajo.

Complejo	Teórico				Experimental			
	%C	%H	%N	%S	%C	%H	%N	%S
[PtCl ₂ (HL1)]	15,01	1,26	11,67	6,68	15,18	1,25	11,70	6,67
[PtCl ₂ (HL2)]	17,01	1,64	11,34	6,49	16,81	1,67	11,22	6,35
[PtCl ₂ (HL3)]	18,90	1,98	11,02	6,30	19,02	2,02	11,24	6,42
[PtCl ₂ (HL4)]	25,91	1,81	10,07	5,76	26,01	1,80	10,29	5,82
[PtCl ₂ (HL5)]·1/2 DMF	21,02	2,14	11,61	5,91	20,99	2,03	12,02	6,37
[PtCl ₂ (HL6)]	20,78	1,94	10,77	6,16	21,05	2,02	11,02	6,15
[PtCl ₂ (HL7)]·DMF	25,71	3,15	11,53	5,28	25,56	2,98	11,57	5,48
[PtCl ₂ (HL8)]·1/2 DMF	30,08	2,52	10,18	5,18	30,48	2,34	9,99	5,22
[Pt(L1) ₂]	23,19	1,62	18,03	10,31	23,08	1,68	18,01	10,08
[Pt(L2) ₂]	25,88	2,17	17,25	9,87	25,79	2,13	16,93	9,65
[Pt(L3) ₂]	28,36	2,67	16,53	9,46	28,06	2,60	16,39	9,29
[Pt(L4) ₂]	37,26	2,34	14,48	8,28	36,83	2,35	14,28	8,24
[Pt(L5) ₂]·2 DMF	32,24	3,44	17,09	7,82	32,26	3,42	16,78	7,53
[Pt(L6) ₂]	30,81	2,59	15,97	9,14	30,92	2,61	15,88	8,73
[Pt(L7) ₂]·1/2 DMF	33,70	3,35	15,54	8,37	33,33	3,11	15,11	8,68
[Pt(L8) ₂]·2 DMF	42,02	3,73	14,41	6,60	42,07	3,48	14,23	6,70

Los resultados experimentales están de acuerdo con las fórmulas propuestas. La técnica, puesta a punto en este trabajo conduce a la obtención de los complejos deseados con una alta pureza.

4.2.2.2- Estudios de conductividad

La conductividad observada para soluciones 10^{-3} M de los compuestos en DMSO resultó similar a la del solvente. Por lo tanto, todos los compuestos resultaron neutros, lo que está de acuerdo con las fórmulas propuestas para los mismos.

4.2.2.3- Estudios de ESI-MS

Los resultados de los estudios de espectrometría de masas (ESI-MS) para los complejos de Pt se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Relación m/z de los picos obtenidos por ESI-MS para los complejos de Pt estudiados.

Complejo	m/z				
	(M+H) ⁺	(M) ⁻	(M-H) ⁻	(M-H-Cl) ⁻	(M-2Cl) ⁻
[PtCl ₂ (HL1)]		478,96		442,98	408,98
[PtCl ₂ (HL2)]			491,99	457,01	
[Pt(L1) ₂]	621,96		620,07		

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas ESI-MS están de acuerdo con las fórmulas propuestas. Algunos de los complejos resultaron muy poco solubles por lo cual para ellos no se obtuvieron resultados útiles en los experimentos realizados por esta técnica. De todas formas los resultados obtenidos resultaron un importante apoyo para confirmación de la estructura propuesta.

4.2.2.4- Estudios de espectroscopía IR y Raman

Para todos los complejos se registraron los espectros IR y Raman en el rango $4000-200\text{ cm}^{-1}$ en pastillas de KBr o CsI. En la Figura 10 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros IR de los complejos [PtCl₂(HL5)], [Pt(L5)₂] \cdot 2 DMF, y del ligando HL5.

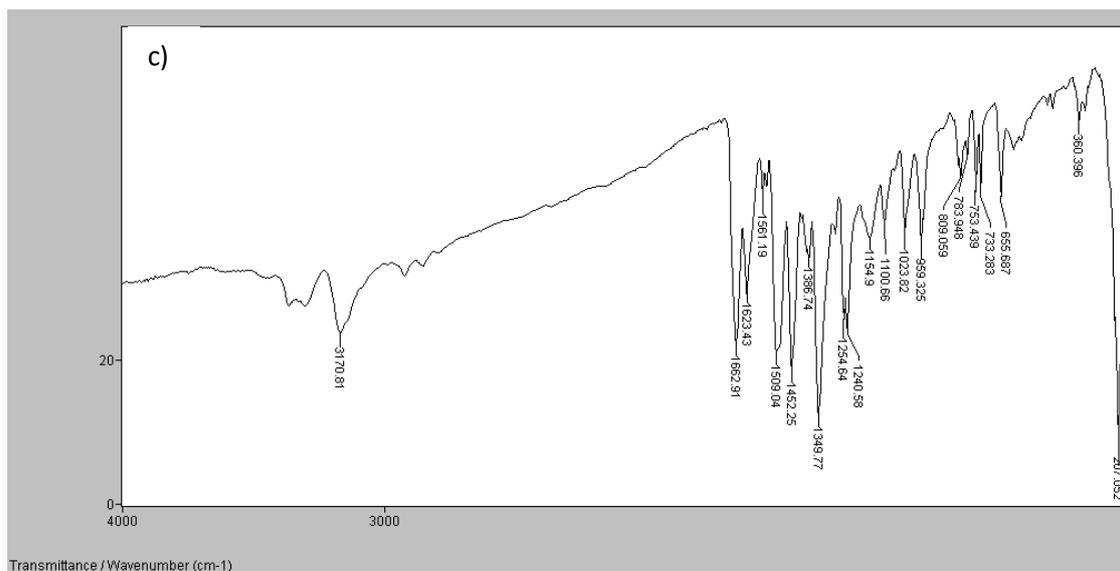
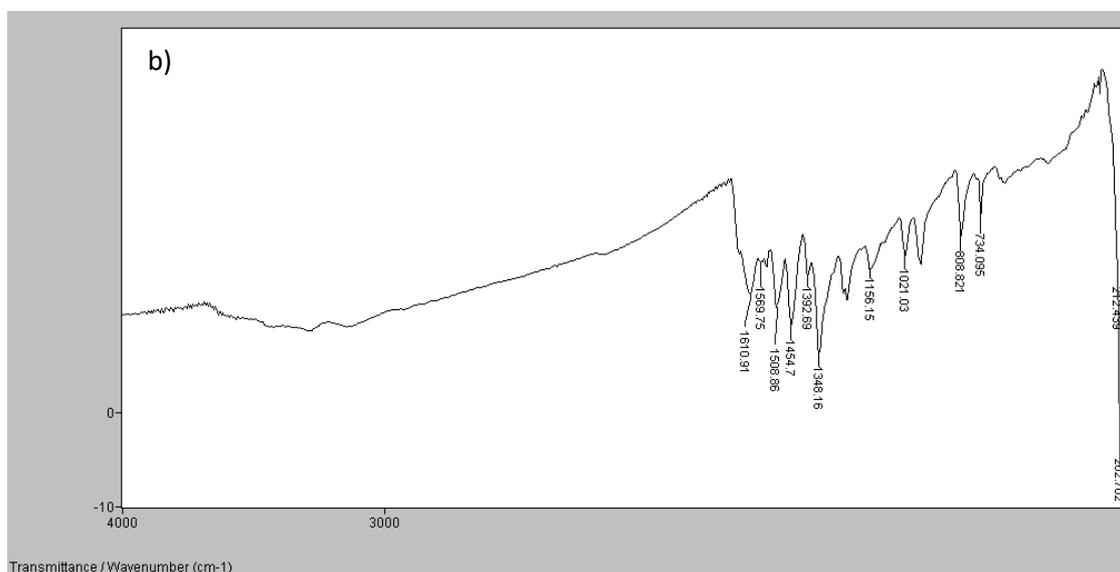
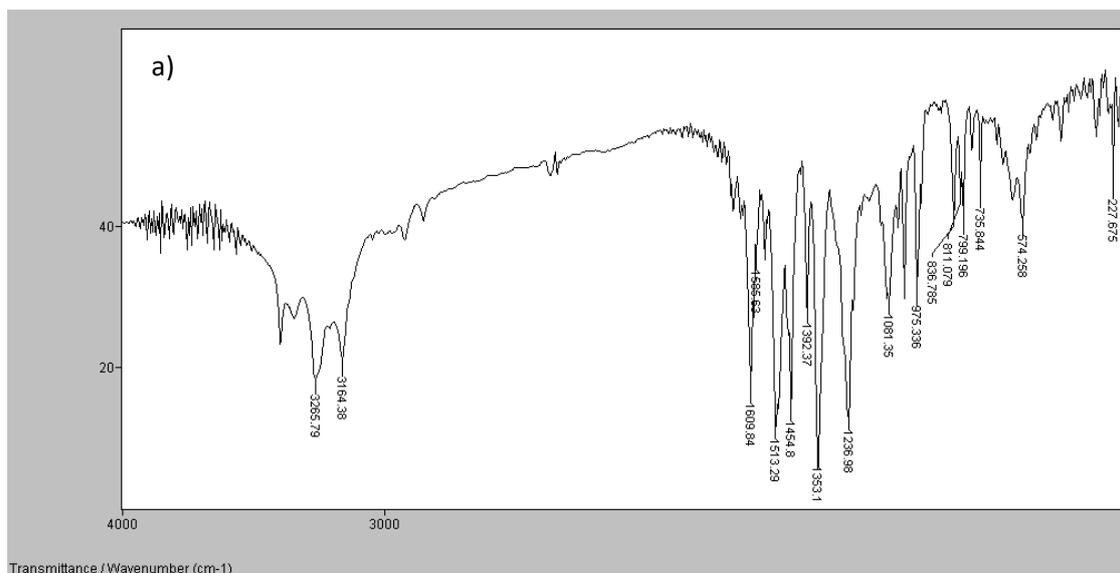


Figura 10. Espectros IR de en el rango 4000-200 cm^{-1} : a) ligando HL5, b) $[\text{PtCl}_2(\text{HL5})]$ y c) $[\text{Pt}(\text{L5})_2] \cdot 2 \text{DMF}$.

También se registraron los espectros Raman. Las Figuras 11-14 muestran, a modo de ejemplo, los espectros Raman de los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL1})]$, $[\text{Pt}(\text{L1})_2]$, $[\text{PtCl}_2(\text{HL5})]$ y $[\text{Pt}(\text{L5})_2]$.

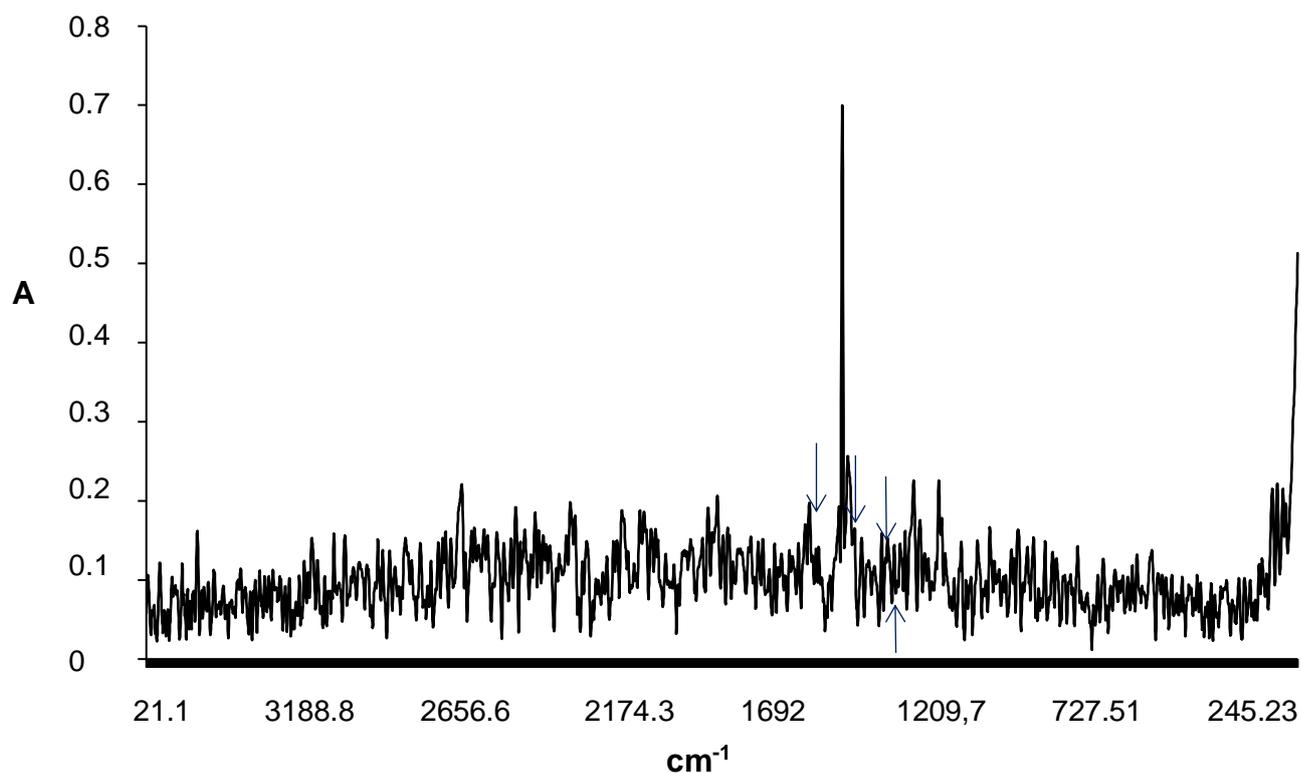


Figura 11. Espectro Raman del complejo $[\text{PtCl}_2(\text{HL1})]$.

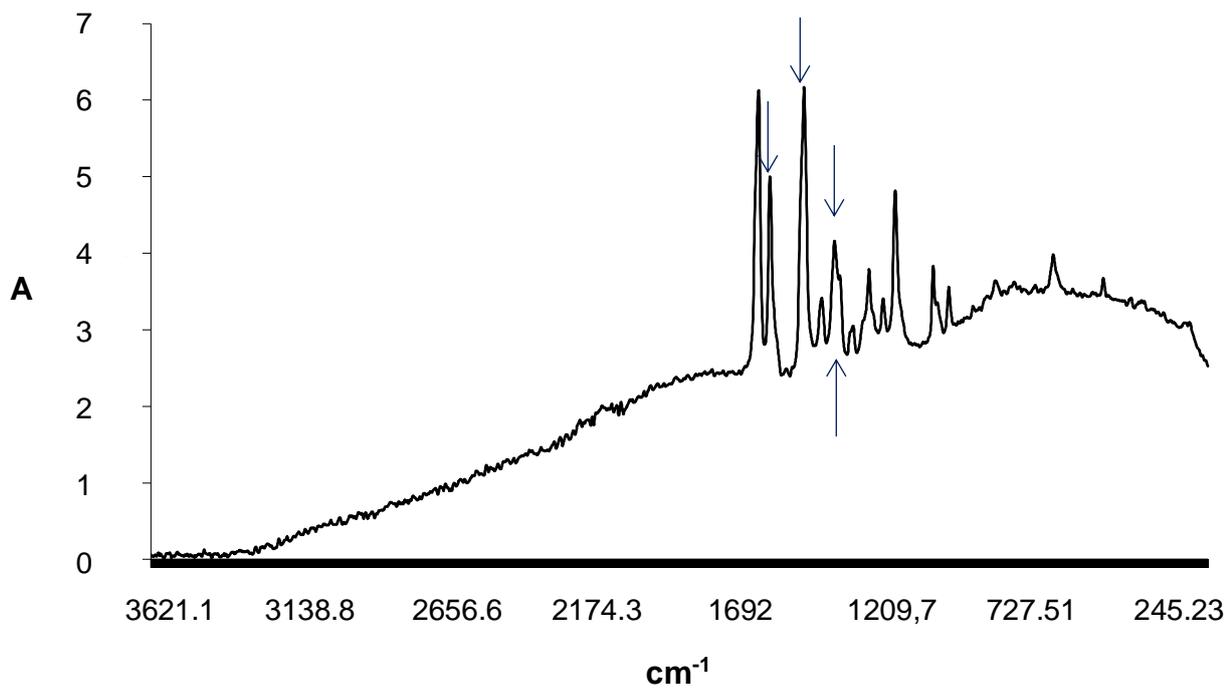


Figura 12. Espectro Raman para el complejo [Pt(L1)₂].

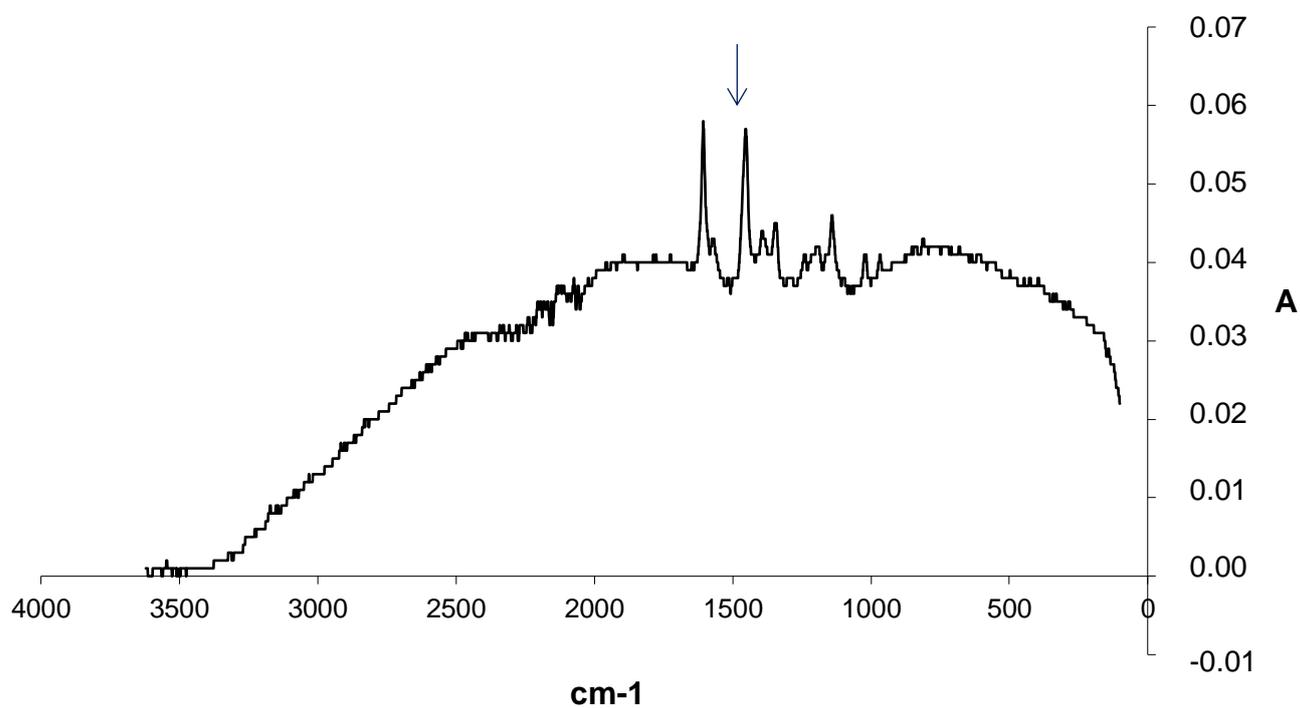


Figura 13. Espectro Raman del complejo [PtCl₂(HL5)].

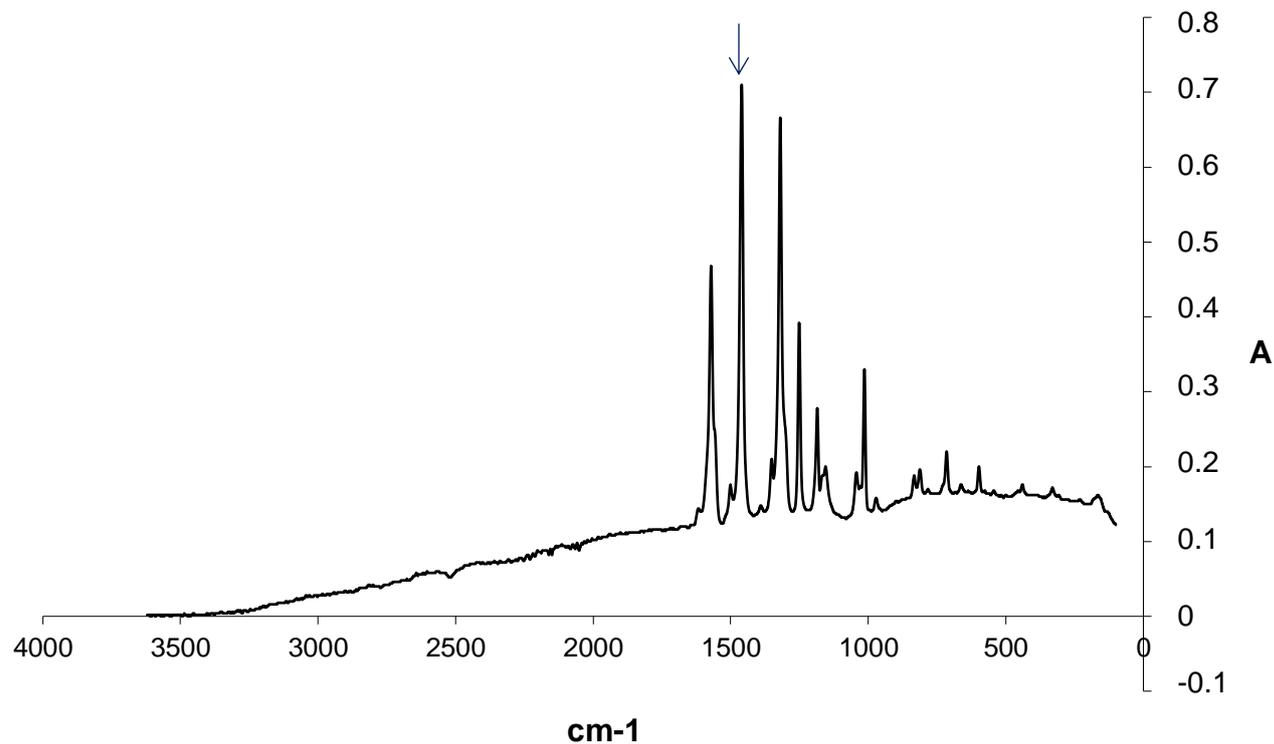


Figura 14. Espectro Raman del complejo [Pt(L5)₂].

Sobre la base de espectros experimentales y de estudios de DFT realizados por integrantes del grupo del Dr. Cerecetto, se pudo definir el patrón espectroscópico vibracional (IR y Raman) de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano utilizadas como ligandos y de sus complejos de Pd(II). Este conocimiento permitió analizar con mayor certeza el comportamiento espectroscópico de los dieciseis nuevos complejos de Pt desarrollados. Los espectros IR y Raman de éstos se compararon con los reportados para los ligandos libres y para los compuestos análogos de Pd(II). Este estudio comparativo facilitó la asignación tentativa de las bandas principales de los compuestos de Pt(II) [23]. Las asignaciones se presentan en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Asignación tentativa de las principales bandas IR y Raman de los complejos de platino con los ligandos HL1, HL2, HL3 y HL4. Las bandas de los ligandos libres se incluyen para comparación [23].

Compuesto	IR / cm ⁻¹						Raman / cm ⁻¹			
	v(C=N)	v _s (NO ₂)	v (C-O-C) + C-C "contract" ^a	v(N-N) ^b	v(C-S) ^c	δ(NO ₂) + furano ^d	v(C=N)	v (C=C) ^e	v _s (NO ₂)	v (C-O-C) +C-C "contract" ^a
HL1	1602 i	1356 i	na	1108	846	811	1592 m	1455 i	1351 m	1339 m
[PtCl ₂ (HL1)]	1570 md	1347 i	na	1170	-	812	1568 m	1454 i	1354 d	na
[Pt(L1) ₂]	1557 d	1352 i	1335 i	1157	-	812	1563 i	1450 i	1348 m	1329 m
HL2	1599 d	1354 i	na	1114	820	808	1585 a	1474 i	1347 i	1312 m
[PtCl ₂ (HL2)]	1560 i	1349 i	na	1173	-	812	1554 h	1470 i	na	1335 i
[Pt(L2) ₂]	1579 d	1350 i	1338 m	1169	-	811	1580 i	1469 i	1343 h	1332 m
HL3	1602 d	1352 i	na	1104	823	805	1601 m	1470 i	1351 i	1331 m
[PtCl ₂ (HL3)]	1590 d	1344 i	na	1175	-	811	1594 m	1470 i	1355 h	1324 m
[Pt(L3) ₂]	1577 d	1350 i	1333i	1156	-	810	1575 i	1471 i	1349 m	1330 i
HL4	1595 m	1344 i	na	1104	822	811	1596 m	1474 i	1346 m	1321 m
[PtCl ₂ (HL4)]	1600 m	1347 i	na	1175	-	811	1599 i	1466 i	1340 i	1319 h
[Pt(L4) ₂]	1584 md	1353 i	1339 h	1084	-	812	1578 i	1472 i	1333 i	1312 h

v: estiramiento; δ: deformación; s: intensa, m: media; d: débil; h: hombro; a: ancha ^a: estiramiento en fase del C-O-C del furano + C-C "contract"; ^b: media; ^c: débil o muy débil; ^d: δ(NO₂) + modos del furano o modos simétricos de "wagging" de hidrógenos del furano; ^e: estiramiento en fase de C=C del furano; na: no asignado

Tabla 8. Asignación tentativa de las principales bandas IR y Raman de los complejos de platino para los ligandos HL5, HL6, HL7 y HL8. Las bandas que se informaron anteriormente para los ligandos libres se incluyen para comparación [23].

Compuesto	IR / cm ⁻¹						Raman / cm ⁻¹
	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu_s(\text{NO}_2)$	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C}) +$ C-C "contract" ^a	$\nu(\text{N}-\text{N})$ ^b	$\delta(\text{NO}_2)$ + furano ^c	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{DMF}}$ ^d	$\nu(\text{C}=\text{C})$ ^e
HL5	1586 d	1353	1392 m	1081	811	-	1456 i
[PtCl ₂ (HL5)]	1570 d	1348	1393 m	1156	809	1661	1454 i
[Pt(L5) ₂]	1561 m	1350	1387 d	1155	809	1663	1460 i
HL6	1579 h	1352	1393 m	1093	807	-	1465 i
[Pt(L6) ₂]	1559 m	1348	1400 m	1174	810	-	-
HL7	1568 h	1353	1387 m	1109	812	-	1462 i
[PtCl ₂ (HL7)]	1587 i	1348	1389 m	1188	811	1662	1451 i
[Pt(L7) ₂]	1564 m	1346	1390 m	1188	810	1662	1449 i
HL8	1571 h	1352	1399 m	1087	807	-	1459 i
[PtCl ₂ (HL8)]	1579 d	1347	1391 m	1187	810	1656	1460 i
[Pt(L8) ₂]	1560 d	1346	1387 m	1185	809	1664	1457 i

v: estiramiento; δ : deformación; i: intenso, m: media; d: débil; h: hombro; ^a: estiramiento en fase del C-O-C del furano + C-C "contract"; ^b: media; ^c: $\delta(\text{NO}_2)$ + modos del furano o modos simétricos de "wagging" de hidrógenos del furano; ^d: [24]; ^e: estiramiento en fase de C=C del furano

A pesar de que los ligandos tiosemicarbazona son potencialmente capaces de interactuar con los centros metálicos de diferentes maneras, por lo general coordinan a los metales como ligandos bidentados a través del N azometínico y del S tiocarbonílico. Hay por lo menos tres vibraciones de estiramiento que presentan valor diagnóstico importante en relación con el modo de unión de estos ligandos: $\nu(\text{C}=\text{N})$, $\nu(\text{C}=\text{S})$ y $\nu(\text{N}-\text{N})$. Como se informó anteriormente, para la tiosemicarbazonas seleccionadas que contienen el grupo 5 nitrofurano estas bandas se encuentran en regiones espectrales que muestran señales de un

patrón complicado, que ha hecho difícil la tarea de asignación [23]. En particular, los estiramientos C=N y C=S de las tiosemicarbazonas se encuentran en las regiones de número de onda donde ocurren las vibraciones de otras partes de los ligandos, como ser $\nu_{as}(\text{NO}_2)$ y la vibración fuera de fase de los furanos 2-sustituídos. En la región de estiramiento C=N (1650 a 1500 cm^{-1}) y de estiramiento C=S (850 a 700 cm^{-1}) ocurren las vibraciones de tijereteo del furano y modos de “wagging” simétrico de hidrógenos del furano y sus combinaciones. La combinación de métodos experimentales y teóricos DFT permitió con anterioridad explicar la complejidad observada de los espectros de estos ligandos y sus complejos de Pd(II) y sirvió para llevar a cabo una asignación de los estiramientos C=N y N-N. Sin embargo, en estos estudios previos aunque se observaron cambios claros en la región espectral alrededor de 750 a 900 cm^{-1} , el estiramiento C=S, que resulta útil para comprobar la coordinación del metal al azufre tiocarbonílico, no pudo ser asignada en los complejos de paladio debido a la gran complejidad de los espectros [23]. Los espectros de vibración de los complejos de platino mostraron un patrón muy similar al de los complejos correspondientes de paladio. A pesar de la complejidad creciente de los espectros infrarrojos de los ligandos y, concomitantemente de los complejos metálicos, al pasar de HL1 a HL4, como resultado del aumento de la complejidad del sustituyente R, se observa un patrón espectral común para cada serie de compuestos de platino ($[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$ y $[\text{Pt}(\text{L})_2]$). Como se muestra en las Tablas 5 y 6, como resultado de la coordinación la banda $\nu(\text{C}=\text{N})$ del ligando libre se corre a números de onda más bajos. Esta modificación está de acuerdo con la coordinación de los ligandos tiosemicarbazona a través del nitrógeno azometínico. Por otro lado, el corrimiento de la banda $\nu(\text{N}-\text{N})$ a números de onda más altos, observada en los complejos de platino, también ha sido relacionado con la deslocalización electrónica producida como consecuencia de la coordinación a través del átomo de nitrógeno azometínico y/o la deprotonación del ligando tiosemicarbazona [23]. La banda $\nu(\text{C}=\text{S})$ debe pasar a números de onda más bajos cuando las tiosemicarbazonas coordinan a través del azufre tiocarbonílico. Para los complejos de Pt se detectaron un conjunto de bandas muy débiles en la región de 700 a 850 cm^{-1} , algunos de ellas asociadas

probablemente con vibraciones $\nu(\text{CS})$. Al igual que para el caso de los complejos análogos de Pd, la complejidad de los espectros en esta región debido a las vibraciones asignadas a la fracción nitrofurano y a la mezcla de vibraciones superpuestas, sumada a la habitual y muy significativa disminución de la intensidad de las bandas C=S observadas experimentalmente cuando las tiosemicarbazonas se coordinan a un metal, han hecho la asignación de las bandas C=S muy difícil. Sin embargo, los cambios observados en esta región espectral están de acuerdo con la coordinación del azufre tiocarbonílico al platino [23]. En concordancia con las fórmulas propuestas, la banda $\nu(\text{NH})$, a aproximadamente $3120\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$, está presente en todos los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$ lo que indica que el ligando no está deprotonado en estos compuestos. Por el contrario la banda $\nu(\text{NH})$, no se observa en todos los complejos $[\text{Pt}(\text{L})_2]$ debido a la deprotonación de los ligandos. Teniendo en cuenta la estructura cristalina del complejo $[\text{Pd}(\text{L}5)_2]\cdot 3\text{DMSO}$, previamente reportada [22], y las grandes similitudes en el patrón espectral de vibración mostradas por los complejos de Pd y sus compuestos análogos de Pt, se propone una configuración *trans* para los complejos de fórmula $[\text{Pt}(\text{L})_2]$ (Figura 9). Los cálculos realizados anteriormente para los complejos $[\text{Pd}(\text{L})_2]$ también están de acuerdo con esta propuesta [23]. Las vibraciones asociadas a las porciones de los ligandos que no están involucradas en la coordinación al metal también fueron reconocidas en los espectros de los complejos y se muestran en las Tablas 7 y 8 [24].

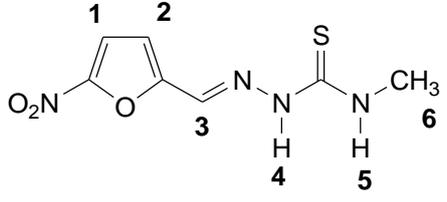
El análisis simultáneo de los espectros IR y Raman nos ha permitido realizar una mejor asignación de algunas bandas de vibración como ser el modo simétrico $\nu(\text{NO}_2)$ y las vibraciones características de la porción furano 2-sustituido que se muestran en las Tablas 7 y 8.

En suma, los estudios por espectroscopía IR y Raman aportan pruebas adicionales del modo de coordinación bidentado de las tiosemicarbazonas seleccionadas en los complejos en estudio y de la analogía estructural existente entre los complejos análogos de Pd(II) y Pt(II).

4.2.2.5- Estudios de Resonancia Magnética Nuclear

Los complejos se caracterizaron por espectroscopía de ^1H -RMN. La baja solubilidad de muchos de los complejos no permitió adquirir la serie completa de los espectros de ^1H -RMN. Los complejos de platino y sus análogos de paladio mostraron similar comportamiento y espectros de ^1H -RMN [22]. Los resultados de estos experimentos están de acuerdo con las estructuras propuestas y con los resultados obtenidos por medio de la otras espectroscopías. Las integraciones y la multiplicidad de las señales de ^1H -RMN están de acuerdo con las fórmulas propuestas. En la Tabla 9 se indican los resultados correspondientes al complejo $[\text{PtCl}_2(\text{HL}_2)]$. Se incluyen los desplazamientos químicos (δ) del ligando y del complejo en ppm, y las diferencias de estos desplazamientos expresadas como $\Delta\delta$. La figura incluida en esta tabla muestra el esquema de numeración utilizado para el ligando libre HL2. Los complejos de Pt y Pd mostraron similares desplazamientos químicos de la porción nitrofuriltiosemicarbazona común de sus moléculas [22]. Cuando el ligando se coordina, el efecto del metal es más aparente para los protones que se encuentran cerca del sitio de coordinación, en particular el protón NH intercambiable H4 (ver Tabla 9). Para este protón se observa la mayor diferencia $\Delta\delta$. La presencia de una señal que corresponde al protón H4 está de acuerdo con la coordinación del ligando en una forma no deprotonada en la serie de los complejos de fórmula $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$.

Tabla 9. Valores de desplazamientos químicos (δ) en ppm para los espectros de ^1H -RMN de HL2 [22] y de $[\text{PtCl}_2(\text{HL2})]$ a 30 °C.

			
^1H -RMN	HL2	$[\text{PtCl}_2(\text{HL2})]$	$\Delta\delta^a$
H	$\delta_{\text{Ligando}}^b$	$\delta_{\text{Complejo}}^c$	
1	7,79	7,67	- 0,12
2	7,30	7,54	0,24
3	7,98	7,84	- 0,14
4	11,87	8,90	- 2,97
5	8,52	8,40	- 0,14
6	3,03	3,10	0,07

^a $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{Ligando}})$; ^b DMSO- d_6 ; ^c acetona- d_6

4.2.2.6- Estudios de Voltametría Cíclica

Los estudios de voltametría cíclica fueron realizados principalmente para analizar el efecto de la complejación sobre el potencial de reducción del grupo nitro ya que, como ya se discutió, la biorreducción en el parásito de este grupo generando un nitro anión radical tóxico se postula como principal paso del mecanismo de acción de los ligandos. La Figura 15 muestra, a modo de ejemplo, el voltamograma cíclico de los complejos $[\text{Pt}(\text{L8})_2]$ y $[\text{PtCl}_2(\text{HL8})]$.

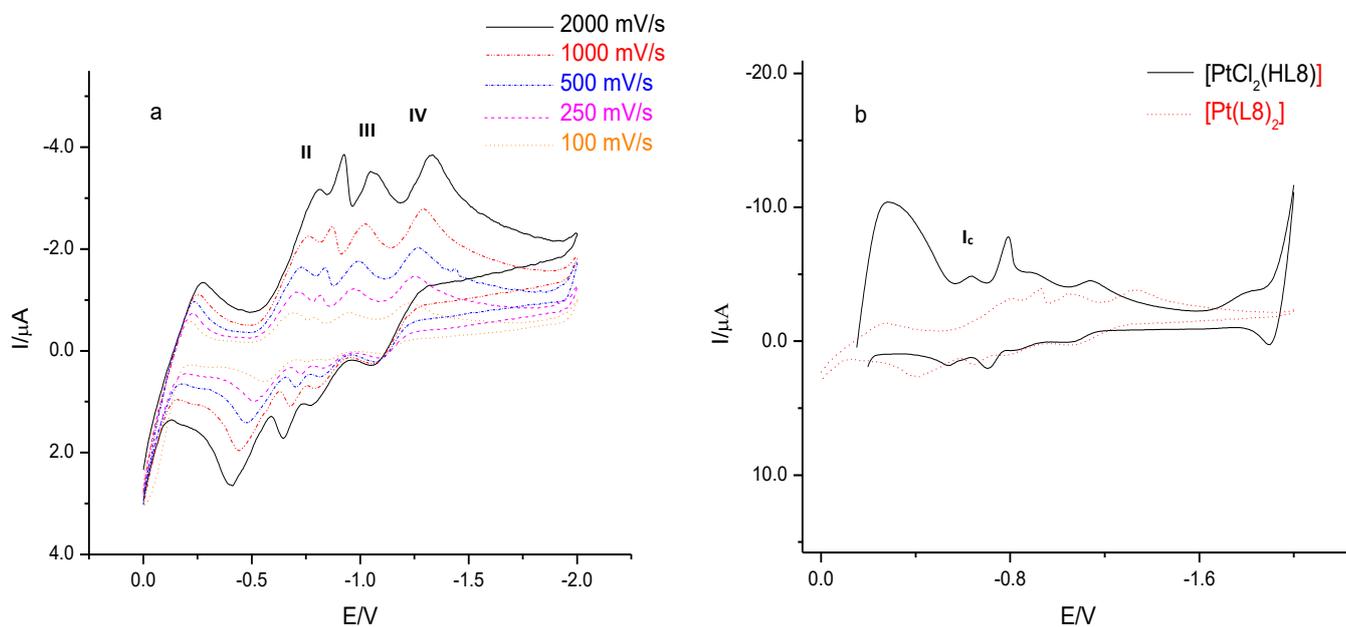


Figura 15. Voltamograma cíclico de soluciones 1mM en DMSO de a) $[\text{Pt}(\text{L}8)_2]$ cuando la velocidad de barrido varía entre 100 y 2000 mV/s y b) $[\text{Pt}(\text{L}8)_2]$ y $[\text{PtCl}_2(\text{HL}8)]$ a 2000 mV/s.

La Tabla 10 incluye los potenciales correspondientes a las cuplas II, pico Ic, IIIc y IVc medidos en DMSO a 2000 mV/s. Los potenciales se indican en voltios vs el electrodo de calomel saturado.

Tabla 10. Potenciales correspondientes a las cuplas II, pico Ic, IIIc y IVc medidos en DMSO a 2000 mV/s. Los potenciales se indican en voltios vs el electrodo de calomel saturado.

Compuesto	E_{pic}^a	E_{pIIc}^a	E_{pIIIa}^b	E_{pIIIc}^a	E_{pIVc}^a
[PtCl ₂ (HL1)]	-0,43	-0,70	-0,66	-1,209	-1,51
[Pt(L1) ₂]	-	-0,69	-0,56	-1,22	-1,49
[PtCl ₂ (HL2)]	-0,49	-0,73	-0,60	-1,17	-1,37
[Pt(L2) ₂]	-	-0,68	-0,70	-1,34	-1,65
[PtCl ₂ (HL3)]	-0,58	-0,84	-0,58	-1,25	-1,46
[Pt(L3) ₂]	-	-0,77	-0,61	-1,22	-1,49
[PtCl ₂ (HL4)]	na	-0,78	-0,56	-1,17	-1,37
[Pt(L4) ₂]	-	-0,72	-0,62	-1,09	-1,26
[PtCl ₂ (HL5)]	-0,65	-0,80	-0,72	-1,14	-
[Pt(L5) ₂]	-	-0,78	-0,62	-1,18	-
[PtCl ₂ (HL6)]	-0,68	-0,80	-0,68	-1,14	-
[Pt(L6) ₂]	-	-0,78	-0,65	-1,12	-
[PtCl ₂ (HL7)]	na	-0,88	-0,60	-1,13	-1,37
[Pt(L7) ₂]	-	-0,87	-0,50	-1,14	-1,40
[PtCl ₂ (HL8)]	-0,63	-0,80	-0,70	-1,14	-
[Pt(L8) ₂]	-	-0,81	-0,65	-1,07	-1,33
Nfx	-	-0,91	-0,85	-	-

^a E_{pc} : potencial de pico catódico; ^b E_{pa} : potencial de pico anódico; Nfx: Nifurtimox; na: no asignado

Los potenciales de los picos voltamétricos correspondientes al grupo nitro de los ligandos libres cambian levemente como consecuencia de la coordinación al platino, resultando los potenciales de los complejos ligeramente más favorables que los de los ligandos y que los de los complejos análogos de paladio. Es de hacer notar que los complejos de platino muestran en iguales condiciones una mayor capacidad de ser reducidos que el Nifurtimox ($E_{1/2}=0,88$ V). Como consecuencia, es de esperar que presenten una mayor habilidad para generar especies radicalarias potencialmente tóxicas para el parásito que éste.

4.2.2.7- Estudios de producción de radicales libres por EPR

Los complejos fueron evaluados en cuanto a su capacidad de producir radicales libres en condiciones reductoras. Los radicales libres caracterizados por EPR fueron preparados "*in situ*" por reducción electroquímica en DMSO, por aplicación de un potencial que corresponde al primer par de reducción (IIc/IIa) obtenido de los experimentos de voltametría cíclica, que corresponde a la reducción del grupo nitro. La interpretación de los espectros de EPR por medio de un proceso de simulación, realizada por el Prof. Olea-Azar de la Universidad de Chile, llevó a la determinación de las constantes de acoplamiento hiperfino para todos los núcleos magnéticos. La Figura 16 muestra el espectro EPR del complejo [Pt(L2)₂].

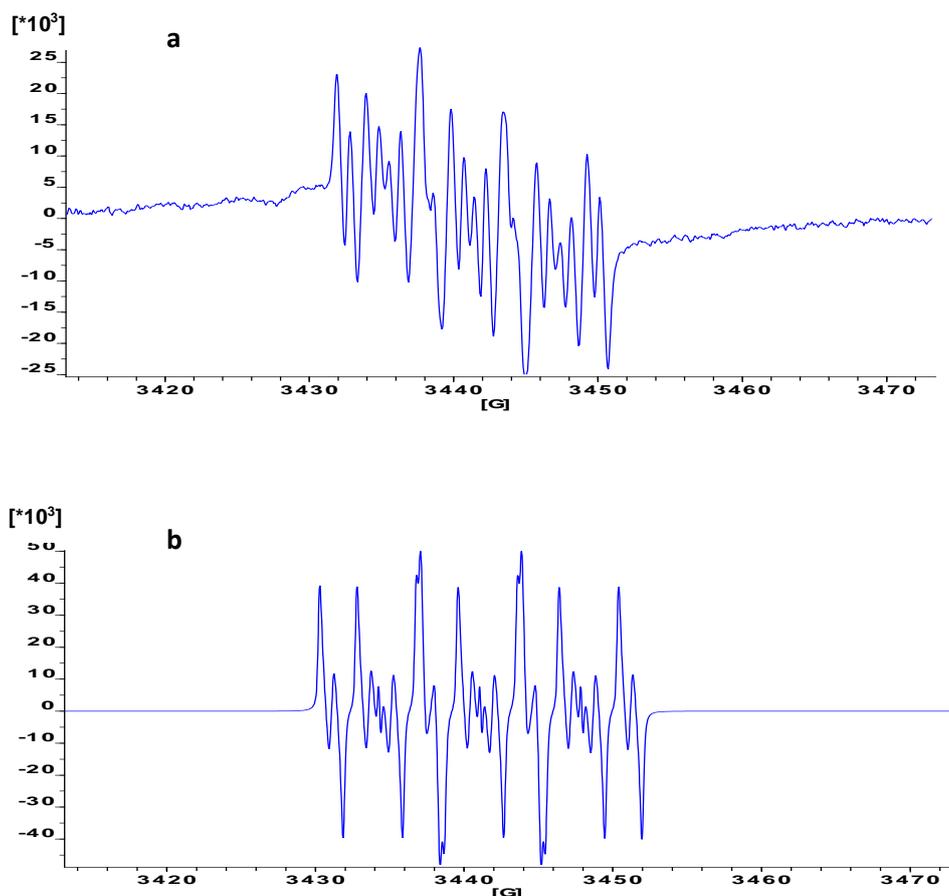


Figura 16. a) Espectro experimental EPR de $[\text{Pt}(\text{L}2)_2]$. Condiciones espectrométricas: frecuencia de microondas 9,71 GHz; potencia de microondas 20 mW; amplitud de modulación 0,2 G; velocidad de barrido de 1,25 G/s. b) Espectro simulado de $[\text{Pt}(\text{L}2)_2]$.

La presencia de diferentes sustituyentes en la cadena de tiosemicarbazona de los ligandos coordinados no parece afectar el patrón hiperfino de los complejos de platino, aspecto que ya había sido observado previamente para los correspondientes complejos de paladio. Sin embargo, el número de ligandos coordinados por átomo de Pt parece determinar la distribución de la densidad de spin y el patrón hiperfino de los complejos. Para los complejos $[\text{Pt}(\text{L})_2]$, la densidad de spin se encuentra más localizada en el anillo nitrofurano, mientras que para los compuestos $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$, la densidad de spin está más deslocalizada en todo el radical.

Para los complejos de paladio, no se habían observado diferencias entre $[\text{PdCl}_2(\text{HL})]$ y $[\text{Pd}(\text{L})_2]$. Ambas series de compuestos de paladio presentan un patrón hiperfino muy similar al observado para los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$. Las diferencias observadas en el patrón EPR para $[\text{M}(\text{L})_2]$, cuando se cambia paladio por platino podrían estar relacionadas con pequeñas diferencias en la estructura de los complejos. Este hecho también podría estar de acuerdo con un comportamiento biológico muy diferente.

4.2.3- Actividad biológica

4.2.3.1- Actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro*

La evaluación biológica se realizó en primera instancia en la forma epimastigota de *T. cruzi* ya que es la disponible en el laboratorio especializado de Facultad de Ciencias. Fue realizada por personal especializado del grupo Cerecetto-González. Se ha confirmado recientemente la existencia de la forma tipo epimastigota de *T. cruzi* como etapa obligada intracelular en mamíferos [25, 26]. Los compuestos fueron evaluados *in vitro* contra la forma epimastigota del parásito, cepa Tulahuen 2. En la Tabla 11 y 12 se muestran las concentraciones inhibitorias 50% (CI_{50}) obtenidas a partir de las curvas dosis-respuesta. Algunos complejos también se evaluaron frente a una segunda cepa de epimastigotas de *T. cruzi*, Dm28c, en Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Tabla 11. Actividad biológica *in vitro* de los complejos de Pt con los ligandos HL1, HL2, HL3 y HL4. Se incluyen para comparación valores de CI_{50} en *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) de los ligandos libres, de los complejos análogos de Pd y de los fármacos de referencia [23].

Compuesto	<i>T. cruzi</i> (Tulahuen 2)		<i>T. cruzi</i> (Dm28c)	Compuesto	<i>T. cruzi</i> (Tulahuen 2)	
	PIC ^a		CI_{50}^b		CI_{50}^c	CI_{50}^b
	10 μ M	25 μ M				
				HL1	2,7	
[PtCl ₂ (HL1)]	10,9	38,2	> 25	nd	[PdCl ₂ (HL1)]	2,4
[Pt(L1) ₂]	3,4	20,8	> 25	nd	[Pd(L1) ₂]	4,5
				HL2	5,0	
[PtCl ₂ (HL2)]	41,5	60,5	13,1	36,7	[PdCl ₂ (HL2)]	4,3
[Pt(L2) ₂]	68,4	100	6,9	10,2	[Pd(L2) ₂]	4,7
				HL3	4,9	
[PtCl ₂ (HL3)]	26,9	44,1	27,5	nd	[PdCl ₂ (HL3)]	5,9
[Pt(L3) ₂]	100	100	0,8	28,8	[Pd(L3) ₂]	> 25
				HL4	> 25	
[PtCl ₂ (HL4)]	33,8	72,0	15	28,4	[PdCl ₂ (HL4)]	> 25
[Pt(L4) ₂]	18,9	12,1	> 25	41,3	[Pd(L4) ₂]	> 25
Benznidazol	-	-	7,4	38,0		
Nifurtimox	-	-	6,1 [17]	22,8		

^a PIC: porcentaje de inhibición de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* a la dosis especificada; ^b $CI_{50} \pm 10\%$; ^c CI_{50} [23]; nd: no determinado.

Tabla 12. Actividad biológica *in vitro* de los complejos de Pt con los ligandos HL5, HL6, HL7 y HL8. Se incluyen para comparación valores de CI_{50} en *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) de los ligandos libres, de los complejos análogos de Pd y de los fármacos de referencia [23].

Compuesto	<i>T. cruzi</i> (Tulahuen 2)			<i>T. cruzi</i> (Dm28c)	Compuesto	<i>T. cruzi</i> (Tulahuen 2)
	PIC ^a		CI_{50} ^b μM	CI_{kc50} ^b μM		CI_{50} ^c μM
	10 μM	25 μM				
					HL5	3,5
[PtCl ₂ (HL5)]	56,1	78,6	8,6	37,04	[PdCl ₂ (HL5)]	6,4
[Pt(L5) ₂]	37,7	50,0	25	6,12	[Pd(L5) ₂]	4,3
					HL6	4,5
[PtCl ₂ (HL6)]	50,0	74,8	10,0	26,96	[PdCl ₂ (HL6)]	2,7
[Pt(L6) ₂]	54,3	80,5	9,1	5,89	[Pd(L6) ₂]	4,3
					HL7	4,1
[PtCl ₂ (HL7)]	40,2	65,1	13,7	24,40	[PdCl ₂ (HL7)]	2,4
[Pt(L7) ₂]	6,4	21,3	> 25	33,63	[Pd(L7) ₂]	5,2
					HL8	3,6
[PtCl ₂ (HL8)]	31,5	34,5	>25	63,23	[PdCl ₂ (HL8)]	>>25
[Pt(L8) ₂]	4,3	8,5	> 25	48,22	[Pd(L8) ₂]	>>25
Benznidazol	-	-	7,4	38,00		
Nifurtimox	-	-	6,1[17]	22,79		

^a PIC: porcentaje de inhibición de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* a la dosis especificada; ^b $CI_{50} \pm 10\%$; ^c CI_{kc50} [23]; nd: no determinado

Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos en la evaluación de los ligandos libres y los complejos análogos de Pd. Por lo tanto, en ambas tablas se incluyen valores de CI_{50} en *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) del ligando

libre y de los complejos de Pd [17,23]. La mayoría de los complejos de Pt son activos contra epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2), mostrando algunos de ellos valores de CI_{50} del mismo orden de Nifurtimox y de los ligandos libres correspondientes. De acuerdo con el valor de CI_{50} $[Pt(L3)_2]$ y $[Pt(L2)_2]$ resultan los complejos de Pt más activos contra esta cepa del parásito para los complejos con HL1-HL4, siendo $[Pt(L3)_2]$ significativamente más activo que HL3 y que Nifurtimox. Para los complejos de Pt con HL5-HL8, cabe destacar que de acuerdo con los valores de CI_{50} , $[PtCl_2(HL5)]$ y ambos complejos de HL6 son los complejos de Pt más activos contra esta cepa del parásito, mostrando valores de CI_{50} similares a los de Nifurtimox y Benznidazol. Cuando se comparan los resultados para los complejos de Pt HL1-HL4, con los complejos de Pt HL5-HL8 no se observa que exista una tendencia regular en la actividad anti *T. cruzi* al cambiar la longitud de la cadena de los ligandos (HL1-HL4 a HL5-HL8). Cuando los resultados se comparan con los reportados para los ligandos libres y los compuestos análogos de paladio, se puede afirmar que el patrón de actividad se modifica significativamente al cambiar el átomo central. La actividad de los complejos de Pd sigue la tendencia general: $[PdCl_2(HL)] > HL > [Pd(L)_2]$. Esta tendencia no se observó para los compuestos análogos de Pt. Este comportamiento puede estar relacionado con diferencias en la biodisponibilidad, la toxicidad no específica y/o el mecanismo de acción de ambas series de complejos metálicos. Similares conclusiones generales se pueden obtener a partir del análisis de los resultados de la actividad contra *T. cruzi* en la cepa Dm28c, a pesar que se pueden observar algunas diferencias de susceptibilidad de las cepas. La cepa Dm28c es un clon del parásito que ha demostrado previamente ser menos susceptible al efecto tripanosomicida del Nifurtimox y del Benznidazol que la cepa Tulahuen 2, que tiene un mayor contenido de tioles que la primera [27]. Los complejos $[Pt(L5)_2]$ y $[Pt(L6)_2]$ fueron significativamente más activos, en este caso, que los fármacos de referencia.

4.2.3.2- Viabilidad de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c)

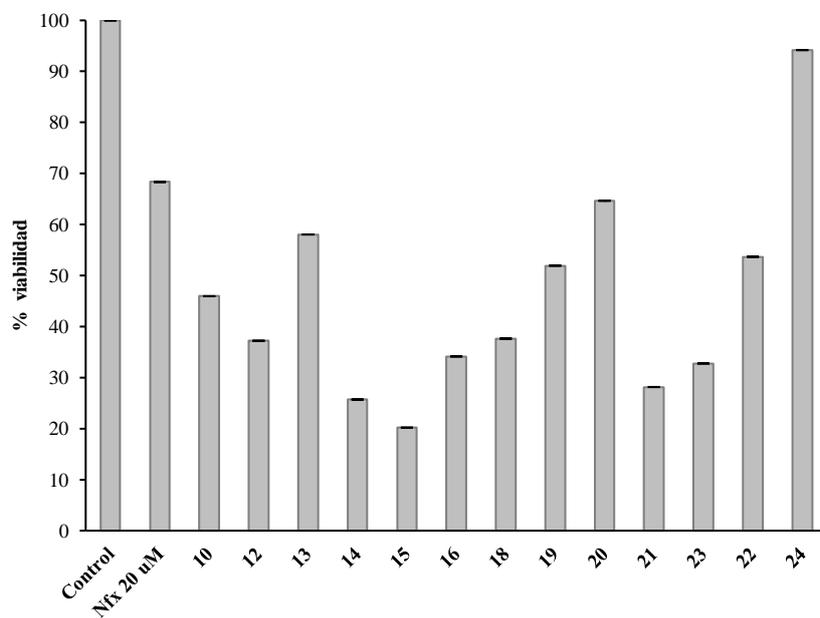


Figura 17. Efecto en la viabilidad de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) de los complejos de Pt. El código de identificación de los complejos de esta figura se indica en la Tabla 13.

En la Tabla 13 y Figura 17 se presenta el efecto de los complejos de Pt sobre la viabilidad de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c).

Tabla 13. Efecto en la viabilidad de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) luego de la incubación con los complejos metálicos (expresados como porcentaje respecto al control).

Compuesto	Código	% de viabilidad respecto al control
Nifurtimox 20 μ M	Nfx 20 μ M	68,3
[PtCl ₂ (HL2)]	10	45,9
[PtCl ₂ (HL4)]	12	37,2
[PtCl ₂ (HL5)]	13	58,0
[PtCl ₂ (HL6)]	14	25,7
[PtCl ₂ (HL7)]	15	20,2
[PtCl ₂ (HL8)]	16	34,1
[Pt(L2) ₂]	18	37,6
[Pt(L3) ₂]	19	51,9
[Pt(L4) ₂]	20	64,7
[Pt(L5) ₂]	21	28,2
[Pt(L6) ₂]	22	53,7
[Pt(L7) ₂]	23	32,8
[Pt(L8) ₂]	24	94,2

1x10⁷ tripomastigotas/mL de la cepa Dm28c son incubados durante 48 horas (n=8) con los complejos de Pt a una concentración igual a la CI₅₀ reportada en las Tablas 11 y 12.

Mientras que el Nifurtimox (20 μ M) inhibió el crecimiento de epimastigotas en un 50%, sólo disminuyó la viabilidad de los tripomastigotas en un 30%. Sin embargo, los compuestos de Pt mostraron un comportamiento biológico muy diferente. El compuesto menos activo contra epimastigotas cepa Dm28c, [PtCl₂(HL8)], disminuyó la viabilidad de las tripomastigotas aproximadamente en un 70% y el [Pt(L8)₂], que mostró efecto inhibitor sobre el crecimiento de epimastigotas cepa Dm28c, carece de actividad frente a tripomastigotas. Del

mismo modo, $[\text{PtCl}_2(\text{HL6})]$ disminuyó la viabilidad en un 75% y el $[\text{Pt}(\text{L6})_2]$ en un 44%. Los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL7})]$ y $[\text{Pt}(\text{L7})_2]$ presentaron un efecto similar en tripomastigotas, y resultaron de los más activos. Curiosamente, existe una relación inversa entre el efecto en el crecimiento de epimastigotas y la actividad en tripomastigotas de $[\text{PtCl}_2(\text{HL5})]$ y $[\text{Pt}(\text{L5})_2]$ con 40% y 70% de disminución en la viabilidad, respectivamente. La mayoría de los compuestos de Pt resultaron más activos contra la forma infecciosa tripomastigota que contra la forma epimastigota del parásito. Además, la mayoría de los compuestos fueron más activos en tripomastigotas que el Nifurtimox. Este resultado es importante teniendo en cuenta que los tripomastigotas son las formas infectivas en el hospedero mamífero. Se sabe que la actividad contra el parásito de una forma no garantiza una actividad similar contra otras formas del parásito. Para explicar este hecho es necesario tener en cuenta los cambios morfológicos que se producen durante la transformación entre las formas a lo largo del ciclo biológico del parásito, la que implica importantes cambios en el contenido metabólico y macromolecular que altera la sensibilidad a los fármacos. Cuando se comparan todos los compuestos de Pt, es claro que $[\text{PtCl}_2(\text{HL7})]$ es el compuesto más activo contra tripomastigotas y que éste resulta un mejor inhibidor que el Nifurtimox.

4.2.4- ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN MACRÓFAGOS

Con el fin de determinar si los complejos de platino obtenidos en este Trabajo de Tesis resultaban selectivamente tóxicos para los parásitos y, en particular, menos tóxicos que sus análogos de Pd previamente desarrollados por el grupo, se ensayó la citotoxicidad inespecífica en macrófagos J 774 de algunos de ellos según el procedimiento descrito en el capítulo Materiales y Métodos.

Compuestos que presentan un porcentaje de citotoxicidad entre 90 y 100% a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se consideran muy tóxicos [28]. Tomando en consideración esto, tanto las tiosemicarbazonas libres como los complejos de paladio estudiados previamente resultaron tóxicos. Además, los complejos de paladio resultan más tóxicos que los ligandos correspondientes a las concentraciones más bajas estudiadas (10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Tabla 14. En cuanto a los

compuestos de Pt, si bien deben considerarse tóxicos resultan menos tóxicos que sus análogos de Pd previamente desarrollados.

Tabla 14. Porcentajes de citotoxicidad respecto a controles \pm desviaciones estándar para distintas concentraciones de las tiosemicarbazonas HL2, HL3, HL5, HL6 y HL7 y para los complejos de Pd y Pt que se indican. Los valores informados corresponden al promedio de tres determinaciones.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	100	10	1
HL2	91 \pm 7	23 \pm 18	0 \pm 1
HL3 ^a	100 \pm 3	21 \pm 8	1,9 \pm 0,9
HL5 ^a	100 \pm 11	68 \pm 5	0 \pm 0,9
HL6 ^a	100 \pm 9	59 \pm 9	5,5 \pm 0,9
HL7 ^a	100 \pm 8	24 \pm 3	0 \pm 1
[Pt(L2) ₂]	96 \pm 12	62 \pm 10	50 \pm 8
[Pt(L3) ₂]	86 \pm 15	75 \pm 10	5 \pm 6
[PtCl ₂ (HL5)]	100 \pm 8	62 \pm 16	11 \pm 10
[PtCl ₂ (HL7)]	91 \pm 34	43 \pm 11	0 \pm 1
[PdCl ₂ (HL3)] ^a	100 \pm 4	92 \pm 2	23 \pm 6
[PdCl ₂ (HL5)] ^a	100 \pm 6	100 \pm 10	14 \pm 9
[Pd(L5) ₂] ^a	100 \pm 7	40 \pm 2	23 \pm 8
[PdCl ₂ (HL6)] ^a	100 \pm 11	82 \pm 11	7 \pm 4
[PdCl ₂ (HL7)] ^a	100 \pm 7	87 \pm 3	11 \pm 11
[Pd(L7) ₂] ^a	100 \pm 7	73 \pm 4	17 \pm 3

^a Trabajo de Tesis de la Dra. Lucía Otero

4.2.5- ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN

4.2.5.1- Producción de radicales libres en *T. cruzi*

Los complejos fueron incubados con epimastigotas intactos de *T. cruzi* (cepa Dm28c), en presencia de DMPO como agente atrapador de radicales, con el fin de detectar las especies radicalarias de vida media corta producidas por biorreducción. Luego, se evaluó la capacidad de producción de radicales libres de los compuestos mediante EPR. Todos los compuestos fueron capaces de producir radicales libres en el parásito intacto dando un espectro de EPR. La Figura 18 muestra, como ejemplo, el espectro EPR obtenido cuando se incubó [PtCl₂(HL₂)] con *T. cruzi* en presencia de DMPO. Se detectó el patrón de señales correspondientes al aducto DMPO-nitro anion radical. Se observó el patrón hiperfino típico de aductos obtenidos por el atrapador de radicales DMPO centrados en el átomo de C ($a_N=16,7$ G y $a_H=22,5$ G). También se detectó un triplete producido por la descomposición de DMPO [29]. Los estudios de EPR mostraron que los complejos de Pt con estas tiosemicarbazonas se biorreducen en el parásito, lo que indica que estos complejos podrían mantener el mecanismo de acción del farmacóforo 5-nitrofurano.

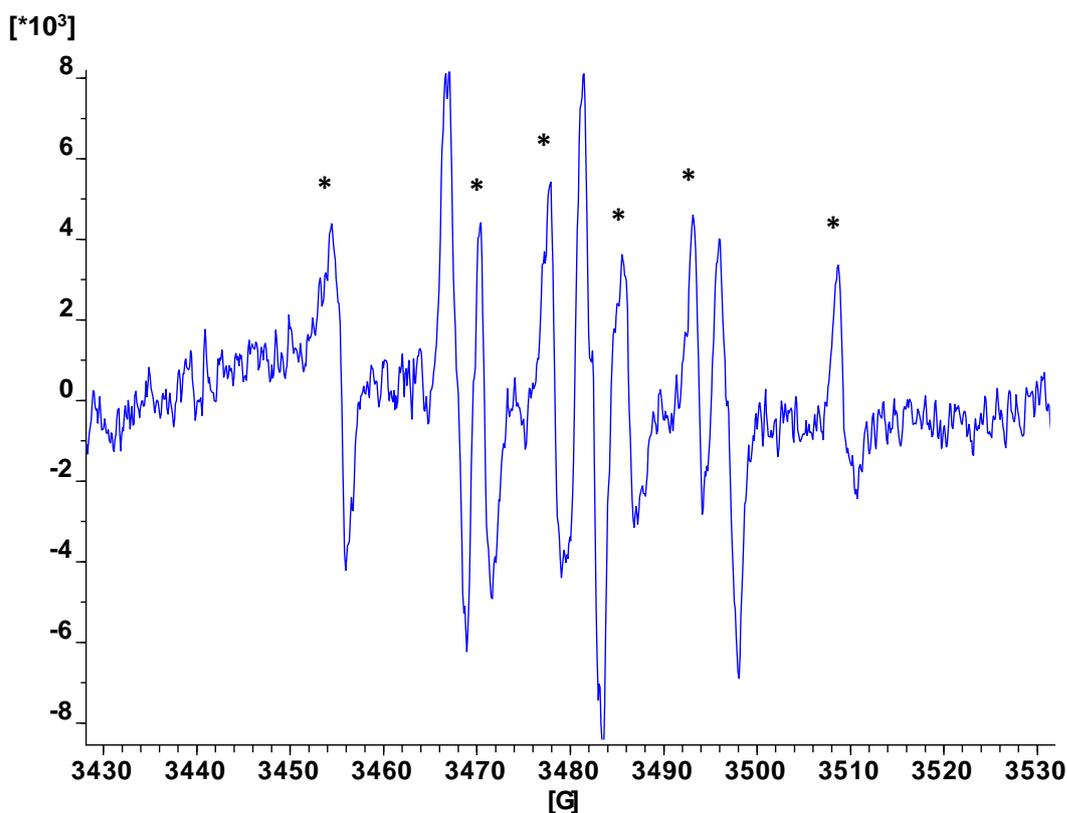


Figura 18. Espectro de EPR del complejo $[PtCl_2(HL_2)]$ obtenido luego que éste se incubó con epimastigotas de *T. cruzi* en presencia de DMPO. Condiciones espectrométricas: frecuencia de microondas 9,71 GHz; potencia de microondas 20 mW; amplitud de modulación 0,2 G; velocidad de barrido de 1,25 G/s.

*señales correspondientes al aducto DMPO-nitro anion radical.

4.2.5.2- Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno del parásito debería aumentar por incubación con los complejos de platino si estos complejos participan en los procesos de reciclaje redox. Por lo tanto, para verificar esto se mide el efecto de los compuestos en el consumo de oxígeno por parte del parásito. En la Figura 19 se muestra el efecto del complejo $[Pt(L_2)_2]$ sobre el consumo de oxígeno en epimastigotas de *T. cruzi* con y sin la inhibición de la respiración con KCN. En la Figura 20 se muestra el efecto del complejo $[Pt(L_7)_2]$ sobre el consumo de oxígeno sin la inhibición de la respiración con KCN. Ambas series de complejos aumentan el

consumo de oxígeno del parásito excepto los complejos con HL7 (Tabla 15 y 16). Este efecto fue más evidente cuando la respiración mitocondrial se inhibió con KCN 2 mM (Tabla 16). En algunos casos, como por ejemplo para $[\text{PtCl}_2(\text{HL}2)]$ y $[\text{Pt}(\text{L}6)_2]$, la inhibición de la respiración y el reciclaje redox ocurren simultáneamente, siendo el reciclaje sólo observado cuando la respiración es completamente inhibida con cianuro.

Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo de acción bioreductivo y con la existencia de reciclaje redox como se informó anteriormente para las tiosemicarbazonas libres que contienen 5-nitrofurano, sus complejos de paladio y otros derivados del nitrofurano como el Nifurtimox. A su vez estos resultados están de acuerdo con la producción de radicales libres observada por EPR [22, 30]. Para ambas series de compuestos, el efecto sobre la respiración del parásito parece estar relacionada con los valores de Cl_{50} . Por ejemplo, el complejo $[\text{Pt}(\text{L}3)_2]$ que fue el más activo, mostró el mayor incremento en el consumo de oxígeno.

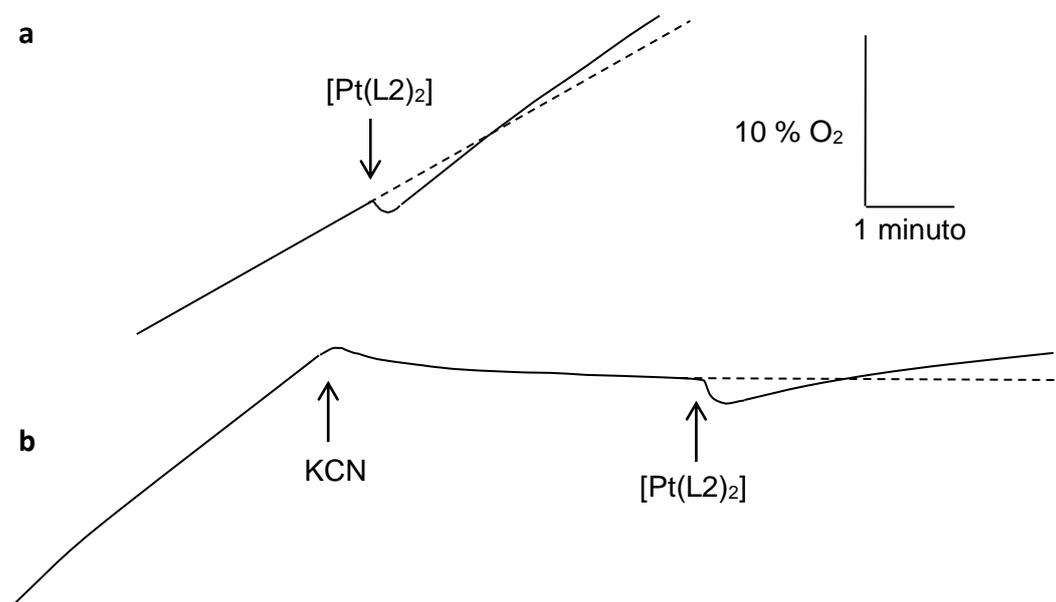


Figura 19. a) Efecto del compuesto $[\text{Pt}(\text{L}2)_2]$ sobre el consumo de oxígeno del parásito (*T. cruzi*, cepa Dm28c) comparado con el control (línea punteada). b) Efecto del compuesto $[\text{Pt}(\text{L}2)_2]$ sobre el consumo de oxígeno del parásito (*T. cruzi*, cepa Dm28c) después de la inhibición de la respiración con KCN comparado con el control (línea punteada).

Tabla 15. Efecto de la adición de los complejos de platino sobre el consumo de oxígeno por epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c).

Compuesto	Respiración (nanoátomo-gramo de O/min/mg proteína)	Aumento del consumo de oxígeno (%)^a
Control	28,0 ± 2,0	
[PtCl ₂ (HL ₂)]	32,2 ± 3,2	15
[Pt(L ₂) ₂]	31,3 ± 1,7	12
[Pt(L ₃) ₂]	39,2 ± 4,2	40
[PtCl ₂ (HL ₄)]	35,5 ± 3,2	27
[Pt(L ₄) ₂]	32,0 ± 1,3	14
Nifurtimox	35,6 ± 0,8	27

^a% aumento del consumo de oxígeno después de la adición de 1,25 mM de compuesto con respecto al control (sin compuesto añadido)

Tabla 16. Efecto de la adición de los complejos de platino (a concentración equivalente a Cl_{Kc50}) sobre el consumo de oxígeno por epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c).

Compuesto	Consumo de oxígeno (%)^a	Aumento del consumo de oxígeno (%) en presencia de KCN^b 2 mM
[Pt(L2) ₂]	93	18
[Pt(L5) ₂]	104	15
[Pt(L6) ₂]	115	9
[Pt(L7) ₂]	60	0
[PtCl ₂ (HL2)]	128	18
[PtCl ₂ (HL5)]	108	22
[PtCl ₂ (HL6)]	46	20
[PtCl ₂ (HL7)]	80	0

^a% consumo de oxígeno después de la adición de compuesto con respecto al control (sin compuesto añadido)

^b% consumo de oxígeno después de la adición de complejo, con respecto al control (sin compuesto añadido) con KCN 2 mM

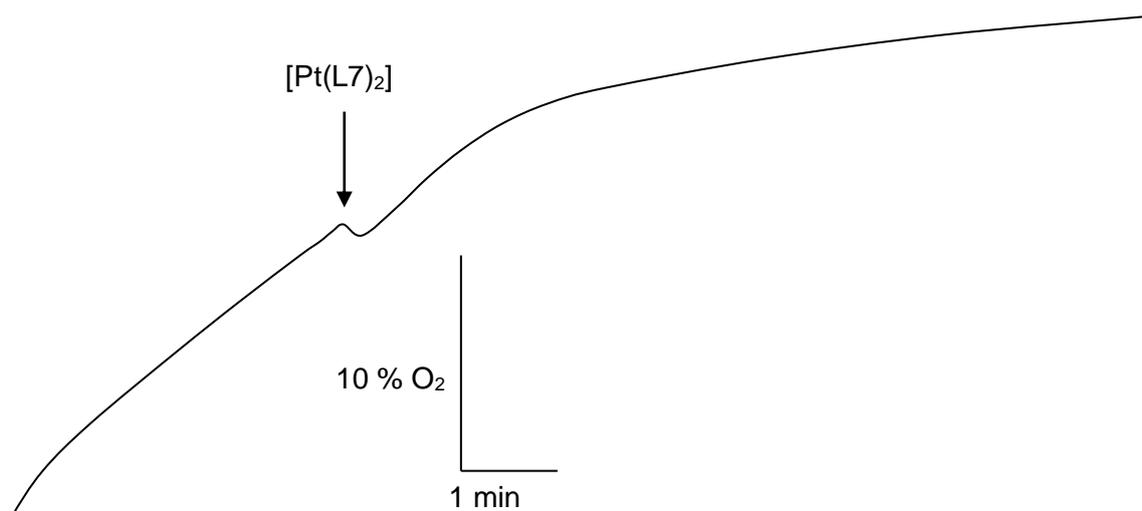


Figura 20. Efecto del compuesto $[Pt(L7)_2]$ sobre el consumo de oxígeno del parásito (*T. cruzi*, cepa Dm28c) comparado con el control (línea punteada).

4.2.5.3- Estudios de interacción con ADN de los complejos $[MCl_2(HL)]$ y $[M(L)_2]$

Como ya se indicó en el capítulo introductorio, el ADN es un blanco particularmente importante de los compuestos metálicos bioactivos. Los nucleótidos presentan diferentes sitios de coordinación a iones metálicos, principalmente con N y/o O como átomos donores, pudiéndose generar uniones covalentes intra- o interhebras. Los efectos debidos al metal pueden sumarse a habilidades particulares de los ligandos presentes en su esfera de coordinación como intercalación entre pares de bases y la habilidad de producir cortes en una o ambas hebras del ADN. También, son posibles enlaces de hidrógeno o uniones electrostáticas [31]. El tipo de interacción dependerá principalmente de la naturaleza y el estado de oxidación del metal, la naturaleza de los ligandos y la estereoquímica del complejo metálico. Por otra parte, un complejo metálico puede tener más de un mecanismo de interacción con el ADN. Todos estos efectos conducen a un efecto global en la dinámica del ADN afectando sus funciones, tanto en la replicación celular y la síntesis de proteínas a través de la transcripción y posterior traducción del mensaje.

La coordinación de iones metálicos a compuestos orgánicos bioactivos puede introducir un segundo blanco de acción para la molécula generada. En

particular, los compuestos de Pt(II) han demostrado su posibilidad de interactuar con el ADN. En consecuencia, se llevaron a cabo experimentos con ADN de timo de ternero y ADN plasmídico con el fin de estudiar si la interacción con el ADN podría ser parte del mecanismo de acción de los complejos. Este enfoque no sólo permite la detección de la existencia de interacción con el ADN, sino que también revela los posibles mecanismos de interacción involucrados a través de la visualización de modificaciones del ADN que podrían ser introducidas por los complejos metálicos.

Se usaron técnicas de biología molecular ya descritas en el capítulo Materiales y Métodos que permiten caracterizar en mayor profundidad la interacción de los complejos metálicos con el ADN. Por medio de estas técnicas se pretende determinar naturaleza de la interacción y regiones específicas de unión al ADN. En particular, se aplicaron estas técnicas para los compuestos de platino desarrollados en este trabajo de Tesis y sus análogos de paladio con igual ligando tiosemicarbazona derivada del 5-nitrofurano, previamente desarrollados, a efectos de conocer en profundidad el mecanismo de la interacción para ambas series de 16 compuestos y realizar estudio comparativo de la interacción con ADN al cambiar la naturaleza del metal central.

En suma, se estudiaron ambas series de complejos ($[MCl_2(HL)]$, $[M(L)_2]$) utilizando diferentes técnicas: interacción primaria con ADN de timo de ternera, estudios de titulación espectrofotométrica, estudios de viscosidad, migración electroforética en gel de agarosa, dicroísmo circular (DC) y Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM). Únicamente los estudios de interacción primaria con ADN de timo de ternera para los complejos de Pd fueron hechos previamente en el trabajo de Tesis de la Dra. Lucía Otero y se utilizarán con fines comparativos.

4.2.5.3.1- Determinación de la existencia de interacción primaria con ADN de timo de ternero

El primer abordaje para determinar si la interacción con el ADN podría ser parte del mecanismo de acción de los complejos se basó en la determinación de la unión de los complejos de platino con el ADN de timo de ternero mediante el análisis por absorción atómica del metal unido al ADN y la cuantificación de

ADN por espectroscopía electrónica. Esta aproximación es ampliamente usada como caracterización primaria de moléculas que establecen interacciones con el ADN. Se usa ADN de timo de ternera adquirido comercialmente. Los resultados obtenidos indican que los complejos de platino son buenos agentes ligantes para el ADN de timo de ternero (Tabla 17). Su unión fue similar a las conocidas para complejos metálicos antitumorales pero resultó más baja que para los complejos análogos de paladio [22, 10]. No pudimos detectar un patrón general para la unión a ADN de timo de ternero para las dos series de compuestos de platino. En forma general, los niveles de unión no se ven afectados por la naturaleza del ligando tiosemicarbazona. Los complejos $[MCl_2(HL)]$, que presentan ligandos lábiles cloruro, probablemente podrían interactuar con el ADN a través de un mecanismo similar al reportado previamente para el cisplatino, que es activado por hidrólisis y se une covalentemente con las nucleobases del ADN [32]. Los complejos $[Pt(L)_2]$ en principio no pueden actuar de esta manera, pero podrían intercalarse en el ADN o interactuar a través de otros mecanismos. Los complejos $[MCl_2(HL)]$ debido a su planaridad parcial, también podrían intercalarse. Es interesante notar que $[Pt(L3)_2]$, que resultó ser el compuesto más potente anti-*T. cruzi* de la serie de compuestos con HL1-HL4, mostró la mayor interacción con el ADN en este análisis. Sin embargo, $[Pt(L1)_2]$ que resultó casi inactivo, interactuó fuertemente con el ADN

Tabla17. Interacción de los complejos de platino con ADN de timo de ternera después de 96 horas de incubación a 37 °C.

Compuesto	nmol Pt/mg ADN	metal/base ^a	base/metal
[PtCl ₂ (HL1)]	209	0,069	14
[Pt(L1) ₂]	390	0,129	8
[PtCl ₂ (HL2)]	236	0,078	13
[Pt(L2) ₂]	224	0,074	14
[PtCl ₂ (HL3)]	191	0,063	16
[Pt(L3) ₂]	527	0,174	6
[PtCl ₂ (HL4)]	170	0,056	18
[Pt(L4) ₂]	170	0,056	18
[PtCl ₂ (HL5)]	216	0,071	14
[Pt(L5) ₂]	254	0,083	12
[Pt(L6) ₂]	201	0,066	15
[PtCl ₂ (HL7)]	216	0,071	14
[Pt(L7) ₂]	206	0,067	15
[PtCl ₂ (HL8)]	244	0,080	12
[Pt(L8) ₂]	374	0,123	8

^a mol de platino por mol de bases de ADN

4.2.5.3.2- Análisis de la afinidad de la interacción para los complejos [PdCl₂(HL)]. Titulación espectrofotométrica.

El método de titulación espectrofotométrica estudia la modificación de la absorción de los complejos metálicos debido a la adición de cantidades crecientes de ADN de timo de ternero (modificación del coeficiente de extinción y corrimientos de las bandas espectrales). Como resultado del análisis se puede determinar la constante de unión (K_b) entre el complejo metálico y el ADN cuya magnitud permite evaluar la existencia de intercalación [33, 34].

Un complejo unido al ADN a través de la intercalación generalmente resulta en hipocromismo y batocromismo (corrimiento al rojo) del espectro de absorción. Generalmente es aceptado que la medida del hipocromismo de la banda UV-vis tiene relación con la fuerza de interacción intercalativa (no en todos los

casos) y que los compuestos intercalantes perturban con mayor intensidad los espectros que los complejos que se unen a los surcos del ADN [35, 36].

Como consecuencia del agregado de cantidades crecientes de ADN de timo de ternero sobre soluciones de los complejos $[\text{PdCl}_2(\text{HL})]$ se observa (Figura 21): presencia de puntos isobásticos, disminución de la absorbancia y corrimiento del máximo de absorción hacia mayores longitudes de onda.

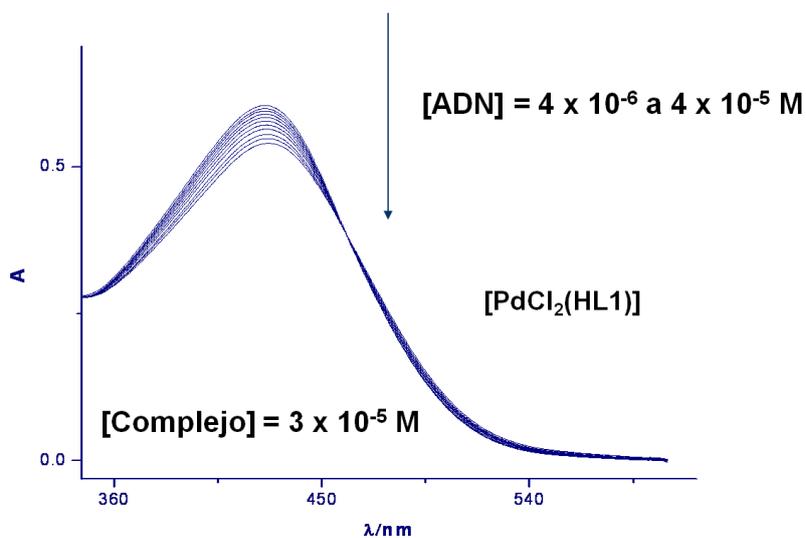


Figura 21. Absorbancia vs longitud de onda para el complejo $[\text{PdCl}_2(\text{HL1})]$.

Dependiendo de las relaciones iniciales $[\text{ADN}]/[\text{complejo}]$ se obtuvieron valores de K_b que varían en varios rangos de magnitud (10^3 - 10^4). El valor reportado para un intercalante clásico como el BrEt es del orden de 10^6 , lo que indicaría que la fuerza de unión de este complejo al ADN es bastante menor. Dado que la constante intrínseca (K_b) de unión a ADN obtenida por esta técnica para el complejo $[\text{PdCl}_2(\text{HL1})]$ varía de orden según la relación inicial $[\text{ADN}]/[\text{complejo}]$ sólo se realizó este estudio para este complejo y se pasó a trabajar con otro tipo de técnicas que se consideró más confiables.

4.2.5.3.3- Estudio del mecanismo molecular de los complejos de Pd y Pt de la serie $[MCl_2(HL)]$

4.2.5.3.3.1- Migración electroforética en gel de agarosa

Con el fin de caracterizar mejor la interacción del ADN previamente identificada se llevó a cabo un método de electroforesis en gel de agarosa. Este método permite la visualización de modificaciones que podrían introducirse en los complejos metálicos tales como la aparición de los “nicks” en una sola hebra en el ADN circular covalentemente cerrado (CCC o ADN superenrollado o Forma I) dando el ADN circular relajado (Forma II), y/o la existencia de más de un evento de escisión en diferente hebra para obtener la forma lineal (Forma III). Además, por este método también se puede visualizar la aparición de cambios conformacionales del ADN, debidos a la formación de estructuras anómalas, provocadas por la disminución de supervueltas negativas. Esto provoca una disminución de la movilidad o migración de la Forma I en el gel de agarosa [31, 37]

Para detectar los efectos sobre el ADN debido a la interacción con los complejos, los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de BrEt. Estas condiciones (el gel se prepara sin BrEt, luego de la corrida electroforética el gel se tiñe con una solución de BrEt y se lava con agua MilliQ) permiten la detección de los cambios en la movilidad electroforética del ADN superenrollado y también permiten la detección de “nicks” en el ADN. Se evita agregar bromuro de etidio ya que su presencia en el gel podría suprimir la visualización de la disminución de la movilidad del ADN superenrollado por cambio conformacional si la interacción de éste con el complejo metálico fuera de tipo no covalente.

4.2.5.3.3.1.1- Complejos de Pd

Se determinó el efecto de los complejos de paladio sobre el ADN plasmídico utilizando diferentes r_i a 37 °C durante 24 horas de incubación.

El análisis detallado de la relación de movilidades nos permite concluir que los complejos de la serie $[PdCl_2(HL)]$ (Figura 22) introducen claros cambios

conformacionales. La interacción de estos complejos con el ADN conduce a una disminución de la movilidad de la forma superenrollada. Este efecto podría deberse a la pérdida de supervueltas negativas en la estructura terciaria del ADN generando una familia de topoisómeros. Este comportamiento es típico de los compuestos que alteran la topología del ADN como intercalantes. Sin embargo, también se ha reportado que no intercalantes unidos al surco menor podrían tener un efecto similar [38]. La Figura 22 también muestra que el efecto sobre la migración es dosis dependiente.

No se observan cambios en las proporciones de ADN circular relajado y superenrollado ni aparición de ADN lineal por lo que se descarta la producción de cortes.

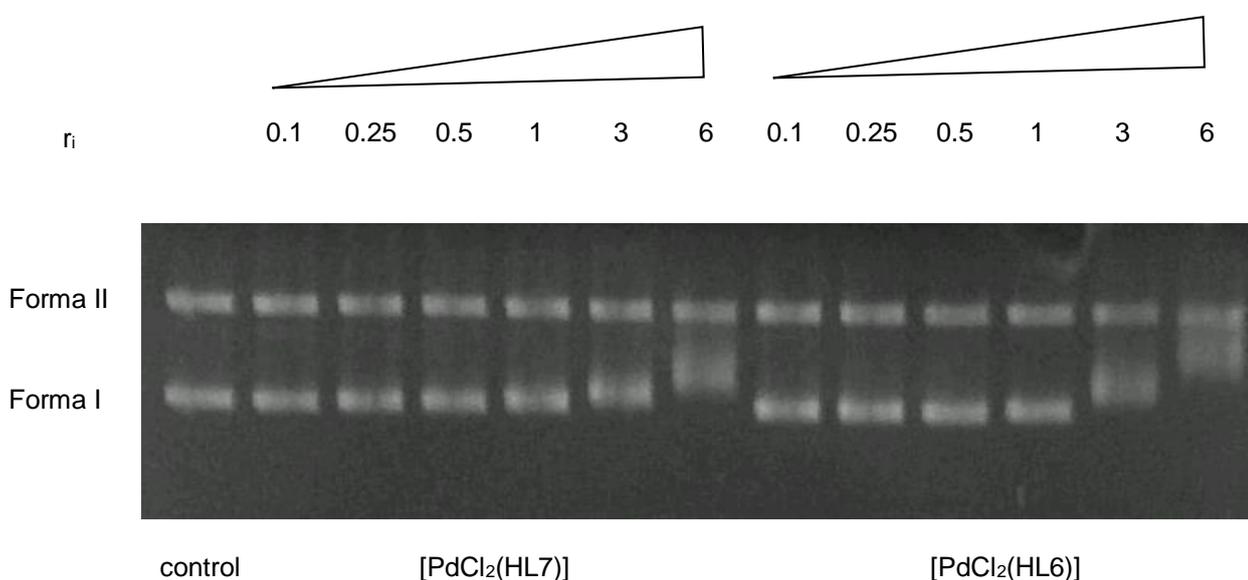


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para los complejos $[PdCl_2(HL6)]$ y $[PdCl_2(HL7)]$. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl (clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano) 10 mM, EDTA disódico 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_1 = mol de complejo/mol de par de bases. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

El efecto observado para todos los complejos fue similar. Si bien algunos complejos no pudieron ser estudiados debido a su muy baja solubilidad ([PdCl₂(HL2)], [PdCl₂(HL3)] y [PdCl₂(HL8)]), todos los demás fueron estudiados mostrando un efecto similar al indicado en la Figura 22. En forma general todos los compuestos muestran un comportamiento asimilable al de un intercalante modificando la conformación del ADN superenrollado lo que produce una disminución de su movilidad.

También se comparó la velocidad con que se observa el efecto para diferentes complejos de la serie [PdCl₂(HL)]. La Figura 23 muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la migración del ADN superenrollado para los complejos [PdCl₂(HL6)] y [PdCl₂(HL7)].

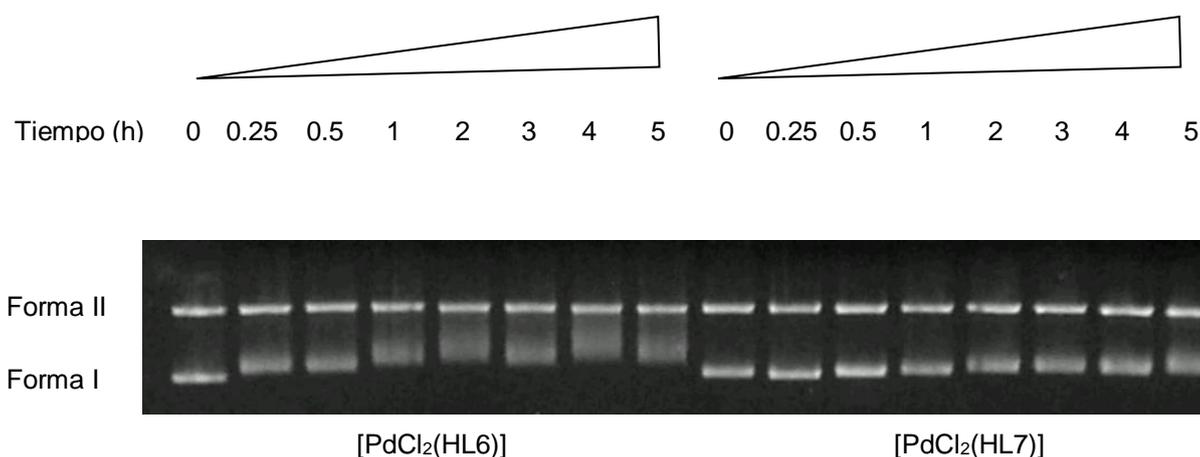


Figura 23. Evolución de la interacción de los complejos [PdCl₂(HL6)] y [PdCl₂(HL7)] con el ADN plasmídico con el tiempo. Los complejos [PdCl₂(HL6)] y [PdCl₂(HL7)] se incubaron en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μL, con pBSK II (300 ng) a r_i=3 para los períodos de tiempo indicados (h). El gel de agarosa se preparó en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

La Tabla 18 y la Figura 24 muestran el porcentaje de migración de la forma superenrollada del ADN en relación al control, tiempo 0 en la incubación. Los cambios conformacionales en la forma superenrollada ya se hacen evidentes a los 15 minutos, llegando a un máximo a las 2 horas de incubación a 37 °C. Los complejos de Pd producen una rápida reducción de la superhelicidad del ADN plasmídico. Los resultados indican que la intensidad del efecto observado depende de la naturaleza del ligando HL.

Tabla 18. Porcentaje de migración del ADN en su forma superenrollada para los complejos [PdCl₂(HL6)] y [PdCl₂(HL7)] en relación al control.

Tiempo (h)	Migración ADN superenrollado	
	[PdCl ₂ (HL6)]	[PdCl ₂ (HL7)]
0	100	100
0,25	90,07	97,00
0,5	88,38	95,07
1	80,45	93,34
2	76,22	90,35
3	80,18	90,07
4	74,12	91,49
5	78,02	89,62

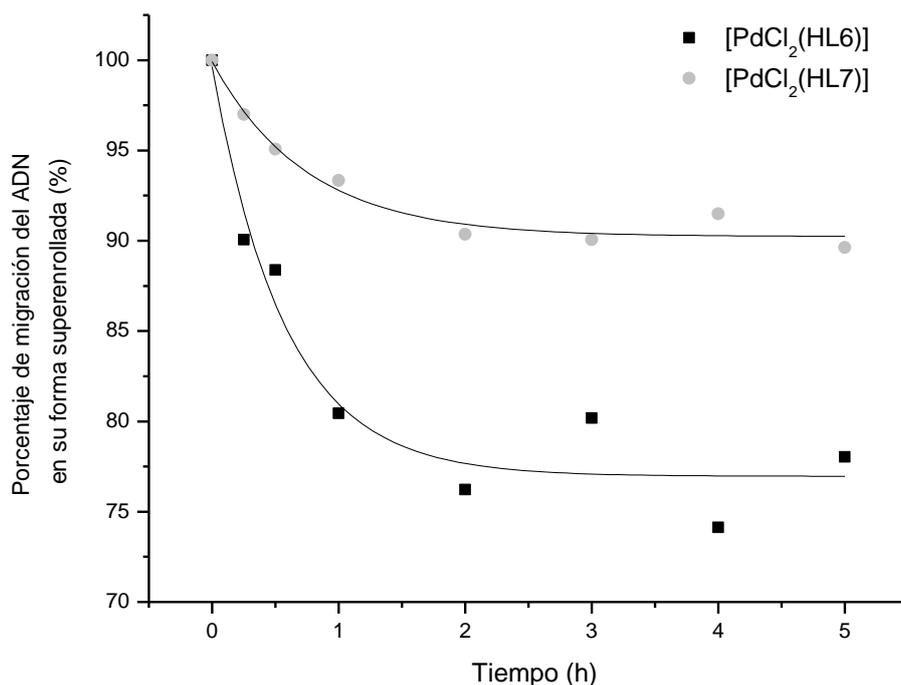


Figura 24. Porcentaje de migración del ADN plasmídico superenrollado respecto al control (t=0) para los complejos [PdCl₂(HL6)] y [PdCl₂(HL7)] en función del tiempo.

Con el fin de analizar más a fondo la interacción con el ADN de los complejos de la serie [PdCl₂(HL)] se decidió estudiar el efecto de la distamicina sobre la interacción. La distamicina es un antibiótico oligopeptídico que ha demostrado una alta afinidad de unión por el surco menor del ADN, en particular en las secuencias AT [39]. Como se muestra en la Figura 25 la distamicina, no inhibe el efecto observado de los complejos [PdCl₂(HL)] sobre el ADN plasmídico. Sin embargo, a pesar de que se obtiene el mismo cambio de movilidad, se pudo observar una disminución de la dispersión de topoisómeros a los valores más altos de r_i .

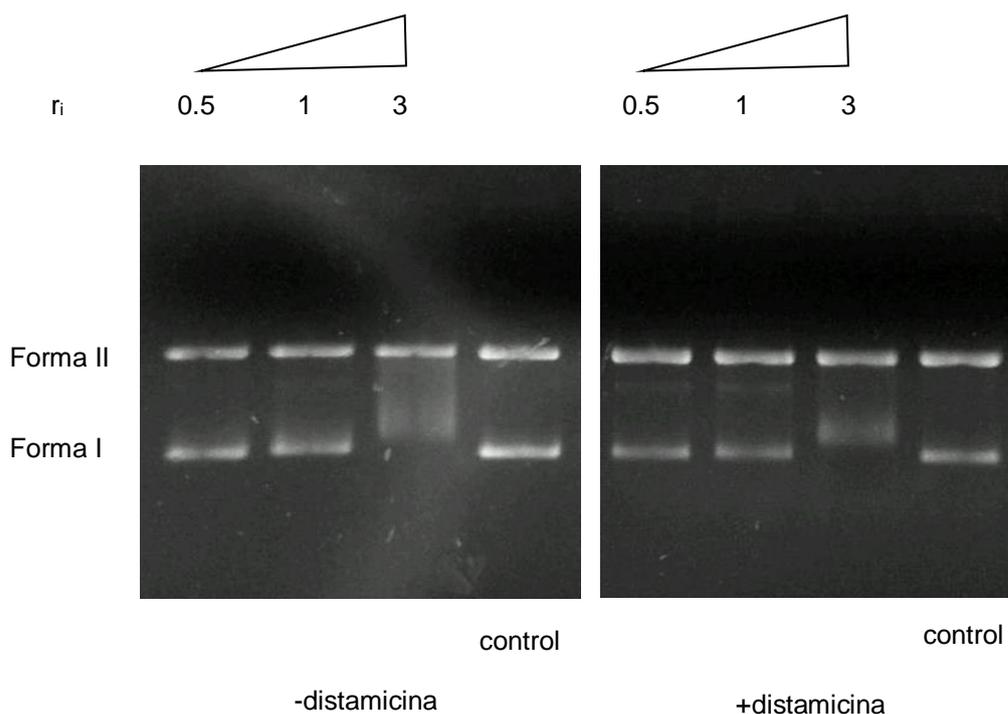


Figura 25. Interacción del ADN plasmídico con $[\text{PdCl}_2(\text{HL5})]$ con distamicina. La incubación se hizo en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μL , durante 24 horas con pBSK II en diferentes r_i (0,5; 1,0; 3,0) con (panel derecho) o sin distamicina (panel izquierdo), 0,1 mM. El gel de agarosa se preparó sin BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética.

4.2.5.3.3.1.2- Complejos de Pt

Para los complejos de platino se realizó el mismo estudio, en las mismas condiciones que se indicó para los complejos de paladio.

Al igual que para los complejos de paladio, el análisis detallado de la relación de movilidades nos permitió concluir que los complejos de la serie $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$ introducen claros cambios conformacionales. A modo de ejemplo las Figuras 26 y 27 muestran el comportamiento electroforético de los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL5})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{HL7})]$, y $[\text{PtCl}_2(\text{HL3})]$ (Figura 26) y $[\text{PtCl}_2(\text{HL1})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{HL2})]$ y $[\text{PtCl}_2(\text{HL4})]$ (Figura 27). La interacción de estos complejos con el ADN también conduce a una disminución de la movilidad de la forma superenrollada generando una familia de topoisómeros. De la misma manera que para los complejos de Pd, interpretamos que este efecto podría deberse a la pérdida de supervueltas negativas en la estructura terciaria del ADN, comportamiento

típico de los compuestos intercalantes. También en estos casos el efecto sobre la migración es dosis dependiente.

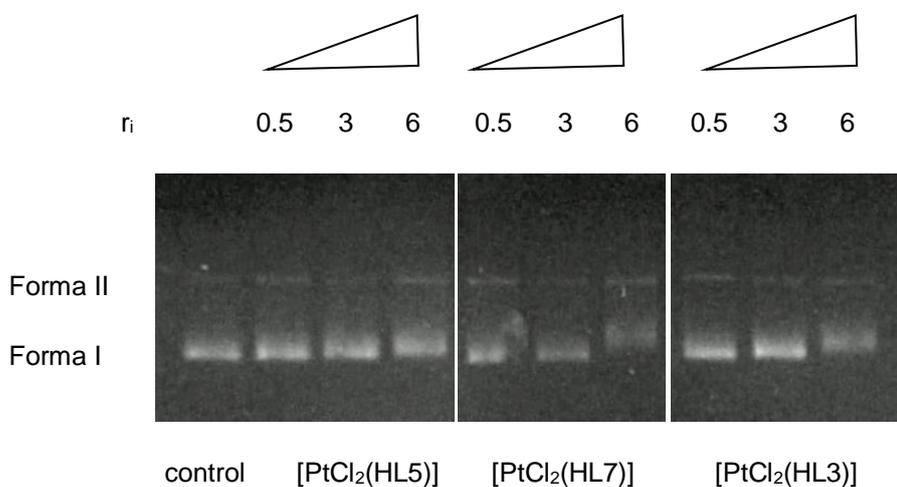


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para complejos de platino. Los diferentes complejos utilizados se indican en la parte inferior de cada sección del gel. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA disódico 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

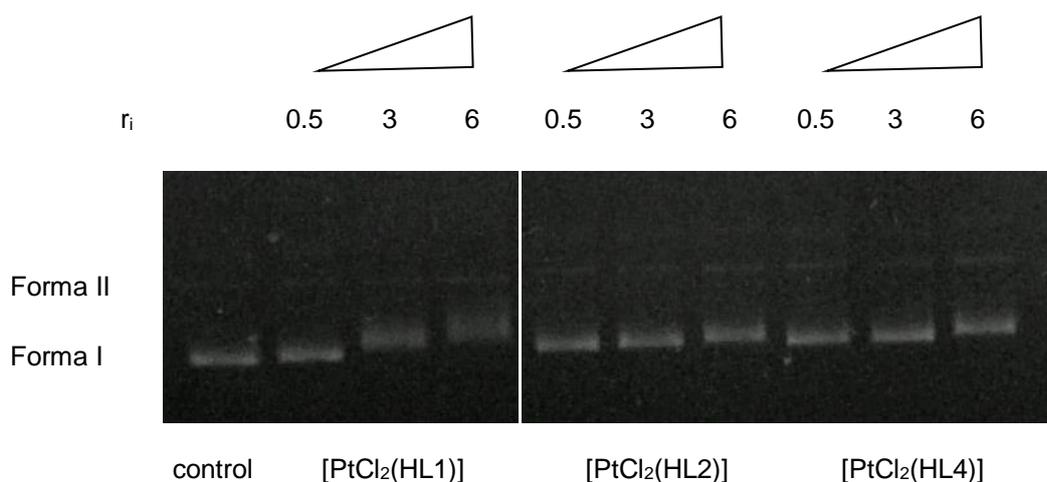


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para complejos de platino.

Los diferentes complejos utilizados se indican en la parte inferior de cada sección de gel. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base.

Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

En forma general los 8 compuestos de Pt de fórmula $[PtCl_2(HL)]$ muestran un comportamiento asimilable al de un intercalante modificando la conformación del ADN superenrollado y produciendo una disminución de su movilidad. Su comportamiento es similar al de los 8 complejos análogos de Pd, pero menos intenso. Los complejos de la serie $[PtCl_2(HL)]$ muestran entonces un comportamiento similar al de los intercalantes clásicos.

Estudios previos de interacción de complejos metálicos con ADN plasmídico en diferentes sistemas de amortiguación, indican que la modificación de la estructura terciaria del ADN depende de la naturaleza del buffer utilizado en los experimentos de electroforesis [40, 41]. Por ejemplo, para el cisplatino si se utiliza buffer Tris se requiere una concentración 10 veces mayor de complejo que si se trabaja en buffer HEPES para producir un nivel similar de daño en el

ADN [42]. En consecuencia, también se estudió el efecto de los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$ sobre el ADN superenrollado en buffer HEPES (25 mM, pH 7). En la Figura 28 se muestran los resultados para algunos de los complejos $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$.

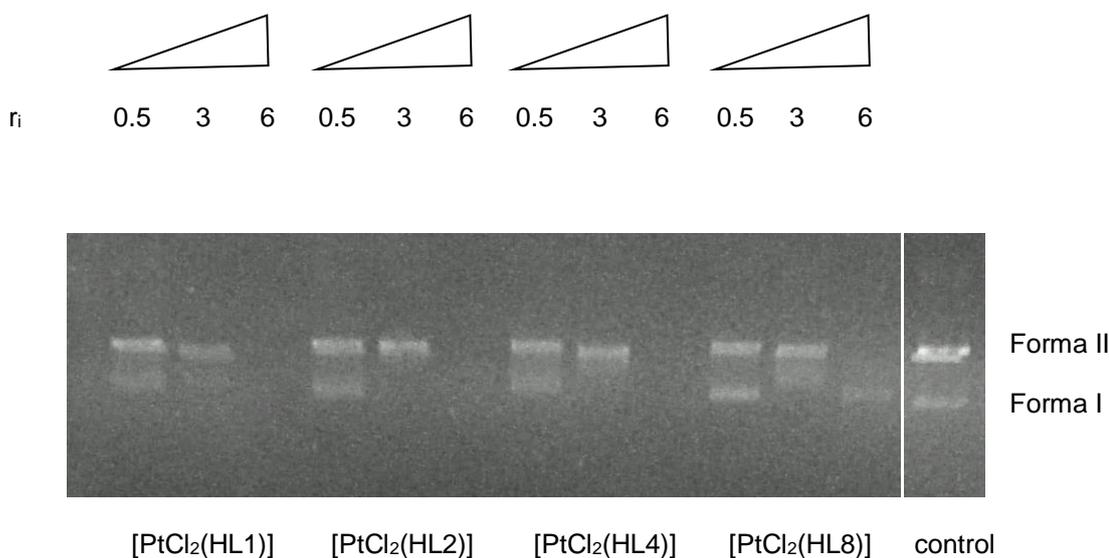


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para complejos de platino.

Los diferentes complejos utilizados se indican en la parte inferior de cada sección de gel. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer HEPES (25 mM, pH 7) en un volumen final de 20 μL , durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

Con buffer HEPES se sigue observando el mismo patrón de interacción con el ADN plasmídico encontrado para estos complejos utilizando buffer Tris-HCl. Sin embargo, se observa una intensificación de los efectos sobre la estructura terciaria del ADN plásmidico usando buffer HEPES. La Figura 29 muestra los resultados comparativos para algunos complejos de Pt en los dos buffers. En efecto, con buffer HEPES se puede observar a r_i bajos la pérdida total de supervueltas negativas que conduce a una completa relajación, así como el

cambio de movilidad de la forma de relajada, debido a la distorsión de la hélice y la formación de los supervueltas positivas. En el r_i máximo ensayado, la casi desaparición de las bandas observada en buffer HEPES, se podría interpretar como debida a la dispersión de las formas del ADN plasmídico en varios topoisómeros. Sin embargo, en estos casos, no se puede excluir un efecto de degradación.

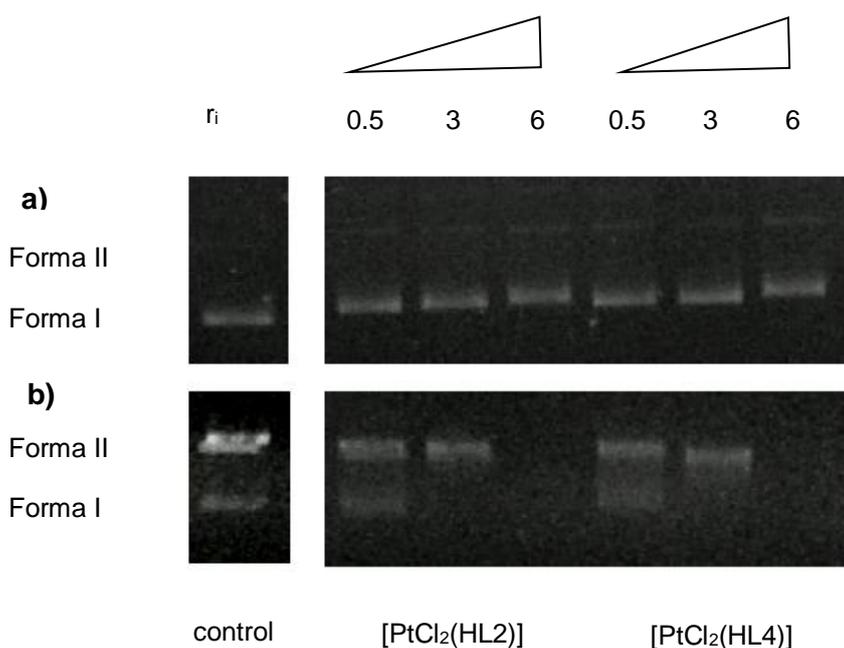


Figura 29. Interacción de los complejos $[PtCl_2(HL)]$ con el ADN plasmídico (HL = HL2 y HL4). Los diferentes complejos estudiados se indican en la parte inferior de cada sección de gel. Todas las reacciones se incubaron (a) en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 o (b) en HEPES 25 mM pH 7,0 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. Control: ADN plasmídico incubado a 37 $^{\circ}$ C durante 24 h. pBSK BlueScript II (Stratagene) (I) ADN superenrollado y (II) de ADN circular. r_i = relación molar complejo metálico: pares de bases del ADN. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética.

4.2.5.3.3.1.3- Comparación de los complejos de Pd y Pt de la serie $[MCl_2(HL)]$

Los diferentes complejos de paladio y platino mostraron un comportamiento similar. La cuantificación de las cantidades relativas de las dos formas de ADN demostró que los complejos no fueron capaces de introducir eventos de escisión en el ADN superenrollado (forma I) aumentando la cantidad de ADN circular relajado (forma II). Por otro lado, el análisis detallado de la movilidad relativa demostró que los complejos introducen claros cambios conformacionales. La interacción de estos complejos con el ADN plasmídico produce una disminución de la movilidad acompañada de una dispersión de la banda de la forma superenrollada. La Figura 30 también muestra que el efecto sobre la migración depende de la dosis. De hecho, depende de la naturaleza del metal y del ligando (Figura 30). En general, el efecto producido por los complejos de paladio fue significativamente más intenso que el que se observó para los correspondientes de platino.

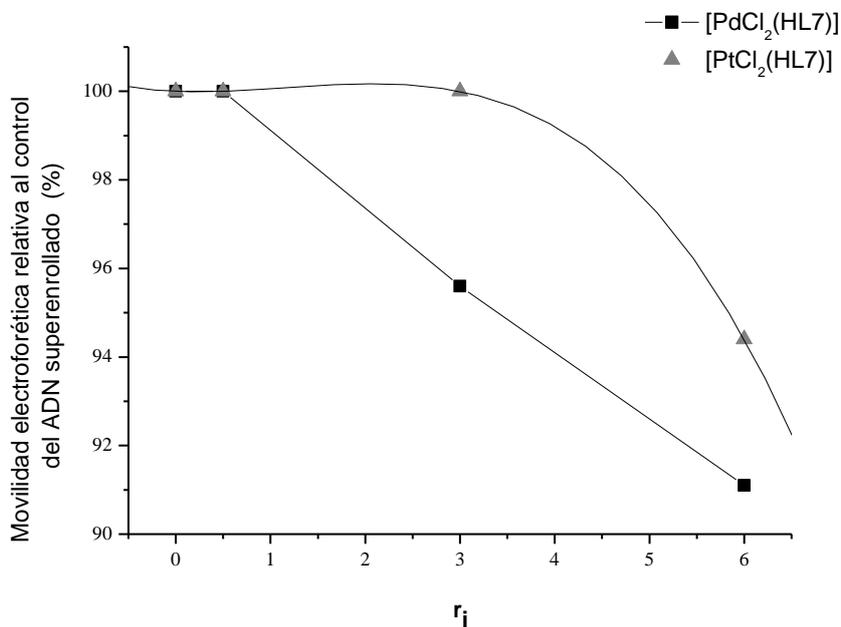


Figura 30. Porcentaje de movilidad electroforética de la forma superenrollada relativa al control ($r_i=0$, no se adicionó complejo metálico) vs r_i para $[PtCl_2(HL7)]$ y $[PdCl_2(HL7)]$.

4.2.5.3.3.2- Medidas de viscosidad del ADN para los complejos de Pd y Pt

Las mediciones hidrodinámicas que son sensibles a los aumentos de longitud de la doble hélice del ADN, como por ejemplo la medida de viscosidad, se consideran como las menos ambiguas y la prueba más crítica de un modelo de unión en solución al ADN en ausencia de datos cristalográficos y de datos estructurales de RMN [36, 43-46]. Un modelo clásico de intercalación resulta en el alargamiento de la hélice debido a que los pares de bases se separan con el fin de acomodar el ligando unido, lo que lleva a un aumento de la viscosidad del ADN [36]. Por ejemplo, el intercalante BrEt aumenta la viscosidad relativa específica, como se esperaría para el alargamiento de la doble hélice del ADN resultante de la intercalación [43, 47]. Por otro lado, se podría dar la disminución de la viscosidad relativa específica del ADN. Este comportamiento puede explicarse por un modo de unión que produce dobleces o torceduras en la hélice del ADN [48]. El cisplatino se une covalentemente a bases adyacentes de una misma hebra y como resultado produce una torcedura del ADN que conduce a la reducción de la viscosidad del ADN de forma dosis dependiente [48]. La disminución de la viscosidad se explica en algunos otros casos por un modelo en el que los ligandos están obligados a unirse de un modo parcial de intercalación clásica en la que la fracción aromática planar no puede ser plenamente insertada entre los pares de bases. El resultado de tal unión, se propuso, puede ser un codo (“kink”) en la hélice del ADN, lo que reduciría su longitud efectiva y, concomitantemente, su viscosidad. Por lo tanto, una intercalación parcial y/o intercalación no clásica también puede doblar (o generar “kink”) la hélice de ADN, resultando en una disminución de la longitud y, concomitantemente, de la viscosidad del ADN [43, 49].

Con el fin de verificar el modo de unión de los complejos $[MCl_2(HL)]$ en estudio, se llevaron a cabo las mediciones de viscosidad de ADN de timo de ternero en función de la variación de los valores de r_i . Todos los complejos estudiados aumentaron la viscosidad de soluciones de ADN de timo de ternero a medida que aumenta r_i . Los resultados para los complejos $[PdCl_2(HL1)]$ y $[PtCl_2(HL3)]$ se ilustran en la Figura 31.

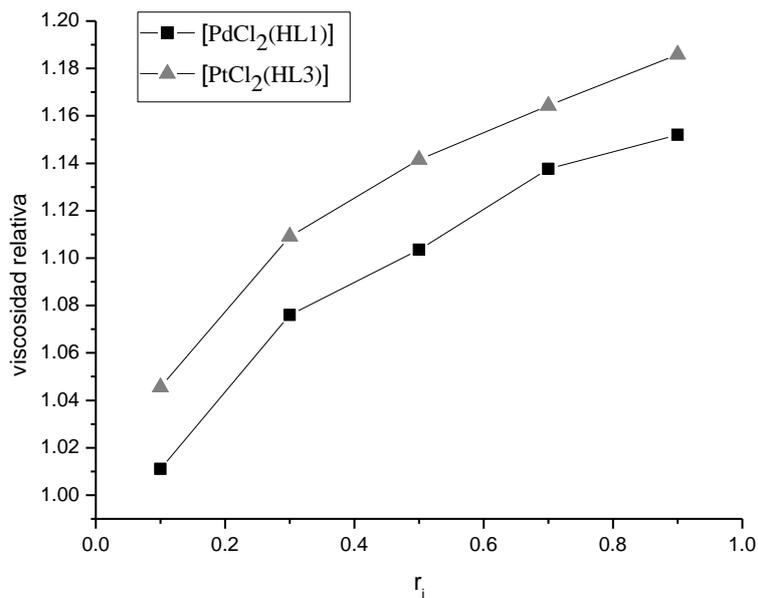


Figura 31. Viscosidad relativa al control (sin agregado de ADN) del ADN de timo de ternero en función del r_i para los complejos $[\text{PdCl}_2(\text{HL1})]$ y $[\text{PtCl}_2(\text{HL3})]$.
 $r_i = \text{mol de complejo/mol de pares de bases de ADN}$.

4.2.5.3.3- Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica muy útil para la determinación de los cambios en la morfología del ADN durante la interacción del mismo con fármacos pues las señales de DC son muy sensibles a la forma de interacción del ADN con moléculas pequeñas [50, 51].

Las modificaciones en la señal de DC en el rango 200-300 nm se han utilizado para seguir los cambios en la conformación de las diversas formas de las cadenas de ADN, [52-54] o para obtener información sobre la ruptura o daño [55] de la cadena por la acción de un ion metálico (o complejo metálico). Si no hay cambios, se ve un espectro de dicroísmo circular del ADN normal en el rango 200-300 nm, esto es una indicación de que la conformación de la cadena de ADN no ha cambiado, pero no es una prueba clara de que el ion metálico no está unido [56]. El espectro de dicroísmo circular de la doble hélice derecha de la forma B del ADN consiste de dos bandas: una positiva (275 nm) debida al apilamiento de bases del ADN y una negativa (245 nm) debida a la helicidad derecha del ADN [52]. De esta forma, los cambios observados en las señales

de los espectros de dicroísmo circular del ADN corresponden a cambios ocurridos en la estructura del mismo cuando hay interacciones con otras moléculas [57]. En general se acepta que la intercalación clásica mejora el apilamiento de bases y estabiliza la helicidad, y por lo tanto aumenta la intensidad de las bandas de ambos, mientras que la interacción en uno de los surcos y las interacciones electrostáticas de moléculas pequeñas muestran una menor o ninguna perturbación en el apilamiento de bases y banda de helicidad y, por lo tanto, el espectro DC casi no cambia [58].

4.2.5.3.3.1- Complejos de Pd

Las Figuras 32 y 33 muestran el efecto de los complejos $[PdCl_2(HL6)]$ y $[PdCl_2(HL7)]$ sobre el espectro DC del ADN de timo de ternero. La adición de los complejos a la solución de ADN produjo una disminución de la intensidad de las dos bandas del ADN, y causó el desplazamiento de estas bandas para la región del rojo. Estos resultados indican que estos complejos interactúan con el ADN de timo de ternero, causando un cambio conformacional de la forma B-ADN a la forma Z-DNA y causan disturbios en la disposición de las nucleobases [35, 59]. Sin embargo, los cambios inducidos por el complejo $[PdCl_2(HL6)]$ en el espectro son más notorios que los inducidos por el complejo $[PdCl_2(HL7)]$, lo que sugiere que el complejo de $[PdCl_2(HL6)]$ tiene más afinidad por el ADN que el complejo $[PdCl_2(HL7)]$. Estos resultados están de acuerdo con los que se muestran para los dos complejos en el enfoque de electroforesis y análisis de viscosidad. Además, se observó una nueva banda negativa en el rango de 325-350 nm después de la incubación con el complejo de Pd(II). Cada complejo de Pd(II) está originalmente en un entorno no-quiral y, por lo tanto, no muestra bandas en los experimentos de DC. Esta nueva señal en el espectro de DC sugiere la unión, o al menos la formación de un aducto entre el ADN y el complejo metálico.

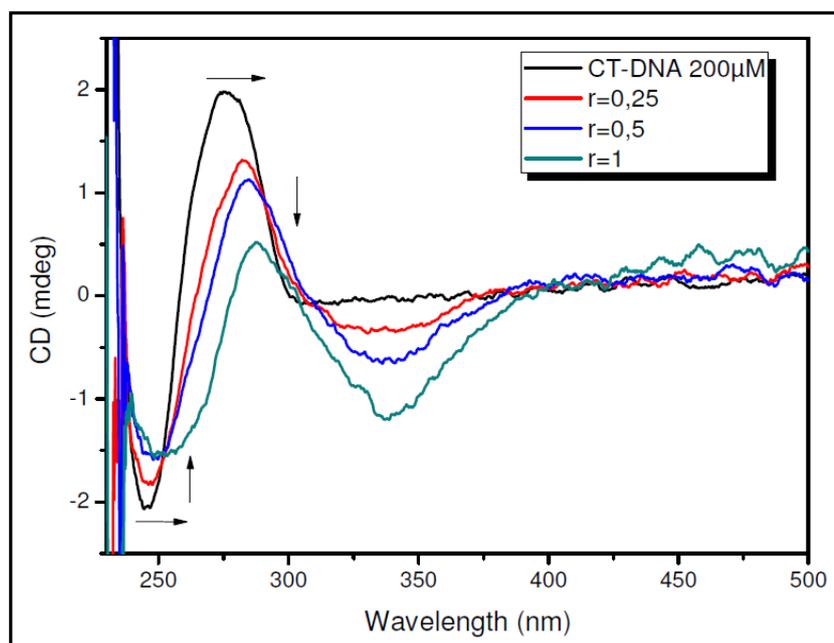


Figura 32. Espectro de dicroísmo circular de ADN de timo de ternero 200 μM en buffer Pipes 25 mM pH=7, en ausencia ($r=0$) y en presencia de concentraciones variadas de complejo $[\text{PdCl}_2(\text{HL6})]$ ($r=0,25$; $r=0,5$ y $r=1$), donde $r = \frac{[\text{PdCl}_2(\text{HL6})]}{[\text{ADN timo de ternero}]}$.

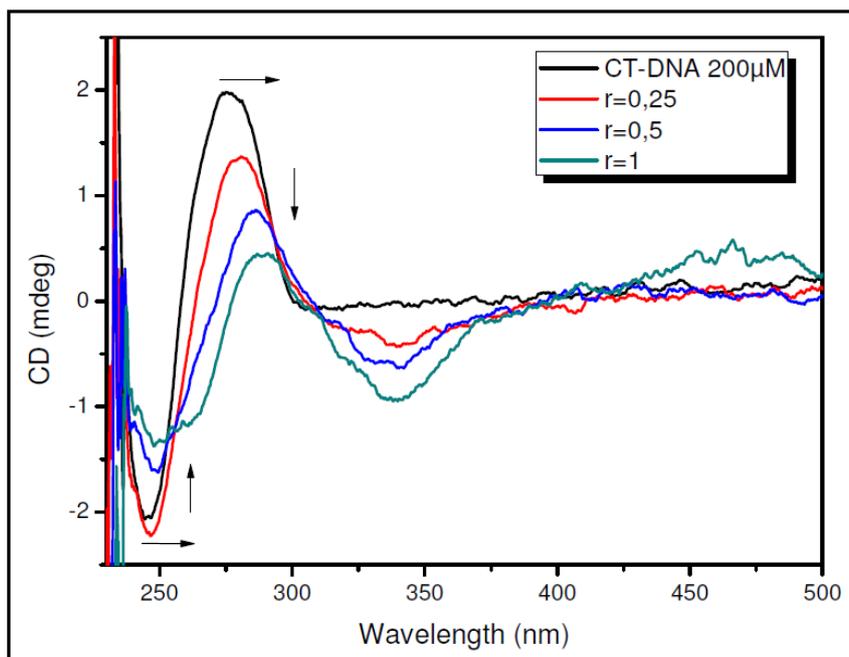


Figura 33. Espectro de dicroísmo circular de ADN de timo de ternero 200 μM en buffer Pipes 25 mM pH=7, en ausencia ($r=0$) y en presencia de concentraciones variadas de complejo $[\text{PdCl}_2(\text{HL7})]$ ($r=0,25$; $r=0,5$ y $r=1$), donde $r = \frac{[\text{PdCl}_2(\text{HL7})]}{[\text{ADN timo de ternero}]}$.

4.2.5.3.3.2- Complejos de Pt

La incubación de ADN de timo de ternero con los complejos de Pt(II) produce un efecto muy diferente en el espectro de DC del ADN. La Figura 34 muestra el efecto cuando se incubaba ADN con el complejo $[\text{PtCl}_2(\text{HL3})]$.

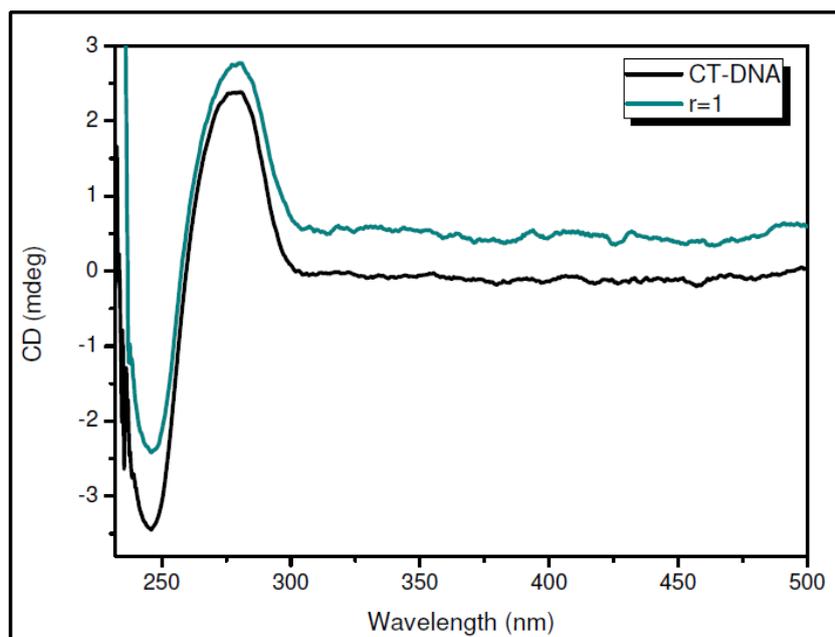


Figura 34. Espectro de dicroísmo circular de ADN de timo de ternero 200 μM en buffer Pipes 25 mM pH=7, en ausencia ($r=0$) y en presencia de complejo $[\text{PtCl}_2(\text{HL3})]$ ($r=1$), donde $r = [\text{PtCl}_2(\text{HL3})]/[\text{ADN timo de ternero}]$.

No se observaron cambios en el espectro de DC del ADN de timo de ternero en el rango de 200-300 nm para el valor más alto de r_i probado ($r_i = 1,0$). Esto es una indicación de que la conformación de la cadena de ADN no se ha cambiado de manera significativa, pero no es una prueba de que el complejo de Pt(II) no interactúa en las condiciones ensayadas con el ADN. De hecho, los resultados de las otras técnicas ensayadas demostraron que los complejos de Pt interactúan con el ADN. Teniendo en cuenta que Pt(II) es más inerte que el Pd(II), es probable que el tiempo de incubación no fuera suficiente para permitir la producción de interacciones detectables en experimentos de DC.

4.2.5.3.3.4- Microscopía de fuerzas atómicas para los complejos de Pd y Pt

La modificación de la conformación del ADN inducida por los complejos metálicos puede ser también examinada mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Ésta resulta ser una excelente herramienta para el seguimiento de las alteraciones estructurales producidas en la conformación

del ADN [60-66]. En particular, esta metodología se utiliza para visualizar moléculas individuales de ADN y puede ser utilizada para analizar los efectos inducidos por la interacción de complejos metálicos sobre la conformación general de las moléculas de ADN. Se pueden medir los cambios en la longitud de contorno y la distancia de extremo a extremo de las moléculas de ADN individuales en función de la concentración de los nuevos compuestos. Es así que la técnica ha sido utilizada para obtener imágenes de una sola cadena de ADN, ADN de doble cadena, complejos ADN- proteínas y complejos ADN-compuesto metálico [67].

Entonces, en este Trabajo de Tesis se llevaron a cabo experimentos de AFM para proporcionar una visión más profunda del probable mecanismo de interacción de los complejos $[MCl_2(HL)]$ con el ADN. Al igual que fuera observado en los experimentos de electroforesis, los 16 complejos modificaron la estructura terciaria del ADN plasmídico pBR322. A modo de ejemplo la Figura 35 muestra imágenes de AFM del plásmido pBR322 incubado con dos complejos análogos de Pd y Pt $[MCl_2(HL)]$ en concentraciones que corresponden a una relación molar compuesto: pares de bases del ADN $r_i=0,2$. Después de una incubación de 3 horas, se pueden observar cambios en la forma del ADN plasmídico, superenrollamiento y torceduras. Estos cambios fueron más significativos después de 22 horas de incubación ya que la interacción progresiva produce el superenrollamiento de un mayor número de formas plasmídicas. Como ya se observó por otras técnicas, los efectos parecen ser más intensos para los complejos de Pd que para los análogos de Pt para igual tiempo de incubación. Los compuestos de Pd produjeron también un aumento del grosor de ADN.

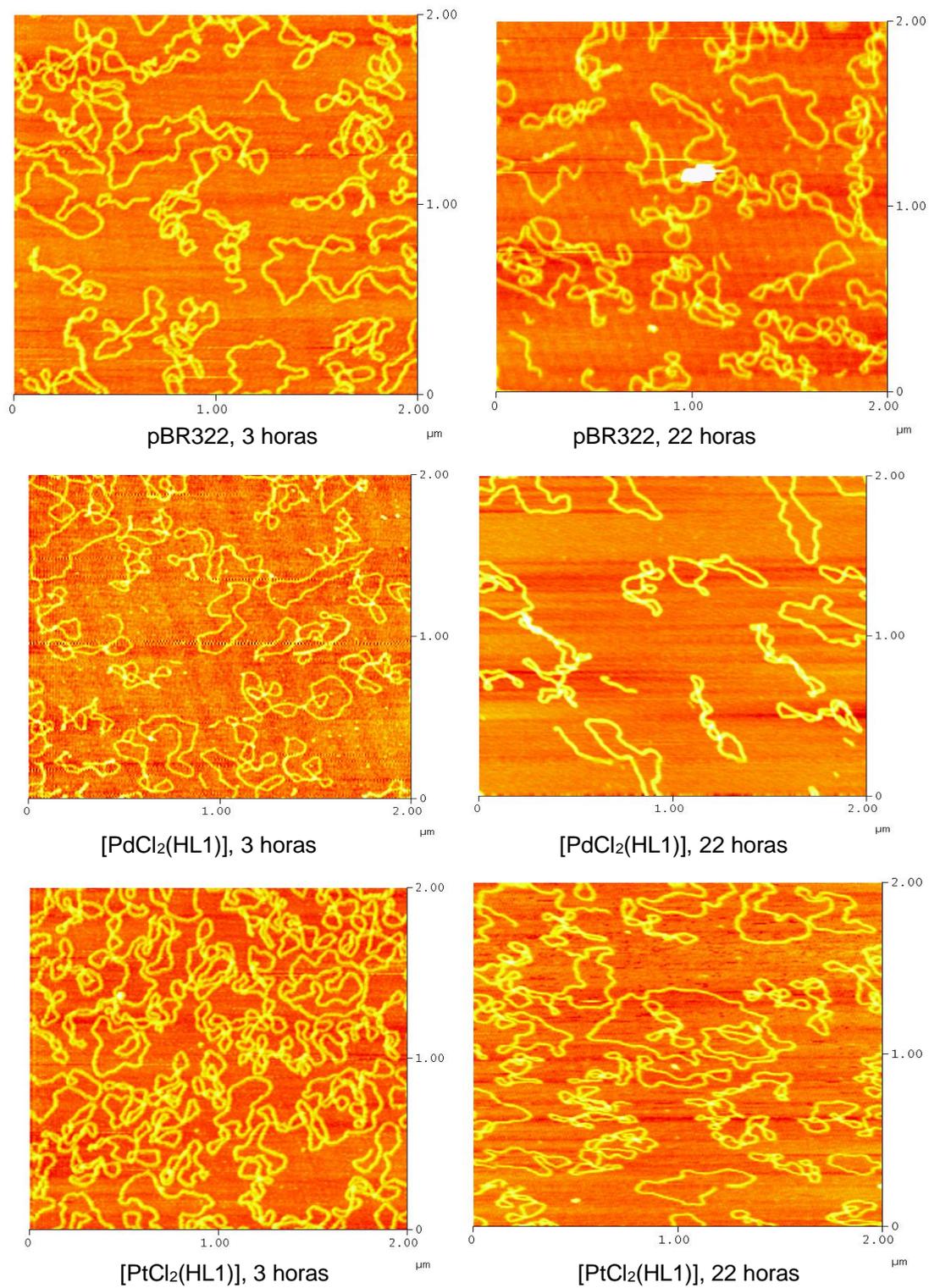


Figura 35. Imágenes de AFM que muestran las modificaciones sufridas por el ADN pBR322 pretratado por calor debidas a la interacción con [PdCl₂(HL1)] y [PtCl₂(HL1)] para diferentes tiempos de incubación (3 y 22 h) y una relación molar complejo: pares de bases del ADN $r_i = 0,2$.

4.2.5.3.4- Estudio del mecanismo molecular de los complejos de Pd y Pt de la serie $[M(L)_2]$

4.2.5.3.4.1- Complejos de Pd

Para los complejos de la serie $[Pd(L)_2]$, no se observa ningún efecto sobre el ADN plasmídico. Estos complejos no producen “nicks” ni introducen cambios conformacionales a las dosis ensayadas. La Figura 36 muestra a modo de ejemplo resultados de electroforesis en gel para uno de los complejos de Pd de esta serie.

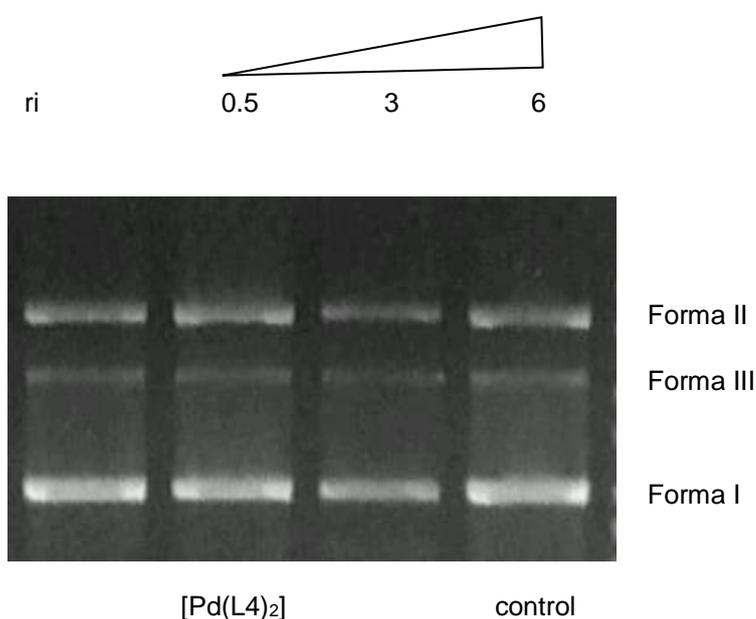


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para el complejo $[Pd(L4)_2]$. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado, Forma III: ADN lineal.

Todos los complejos de la serie siguieron este patrón general, exceptuando al complejo $[\text{Pd}(\text{L3})_2]$, el cual al interactuar con ADN condujo a una disminución de la movilidad de la forma superenrollada.

Este resultado está de acuerdo con los resultados de viscosidad. La Figura 37 revela que para el complejo $[\text{Pd}(\text{L3})_2]$ la viscosidad del ADN aumentó con el tiempo.

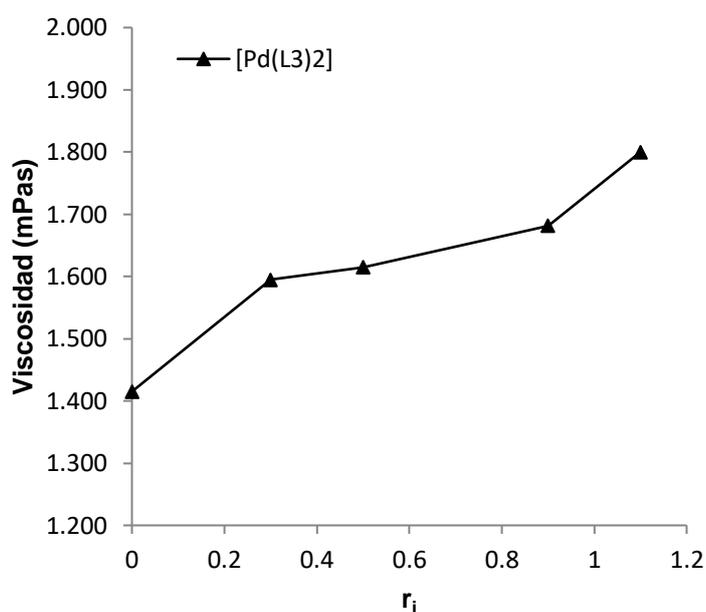
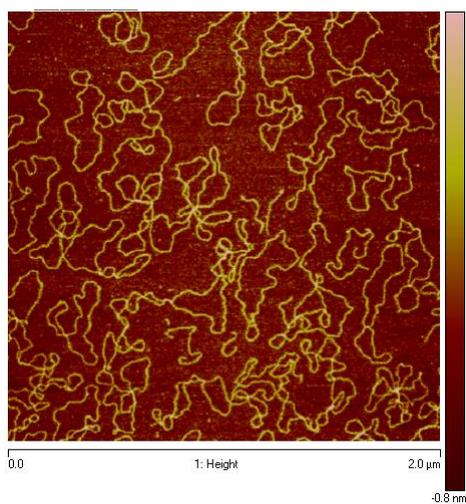
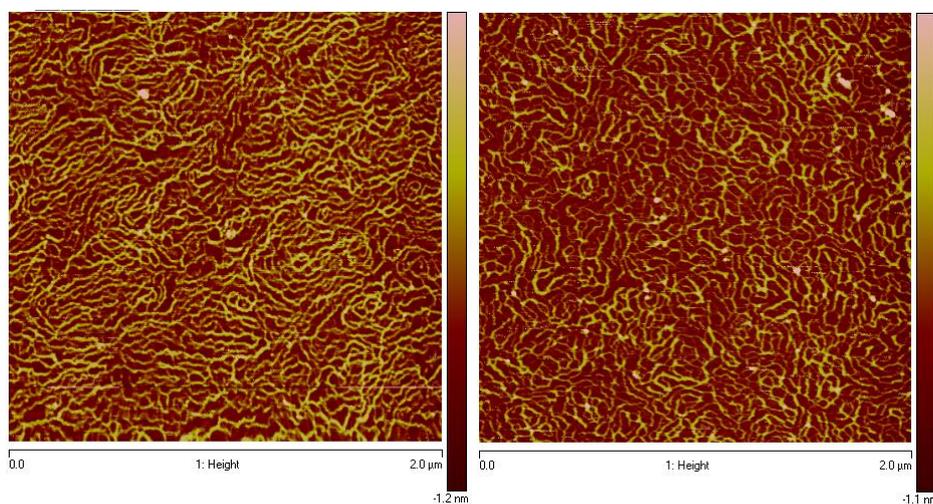


Figura 37. Viscosidad del ADN de timo de ternero en función de r_i para el complejo $[\text{Pd}(\text{L3})_2]$.

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por microscopía de fuerzas atómicas (Figura 38). La figura muestra para el complejo $[\text{Pd}(\text{L3})_2]$ una interacción más evidente que para los otros complejos de la serie.



pBR322, 3 horas



[Pd(L2)₂], 3 horas

[Pd(L3)₂], 3 horas

Figura 38. Imágenes de AFM para los complejos [Pd(L2)₂] y [Pd(L3)₂].

La adición de los complejos de la serie [Pd(L)₂] a la solución de ADN de timo de ternero (Figura 39) no produce cambios en el espectro de dicroísmo circular de éste. Se observa el espectro de dicroísmo circular del ADN normal en el rango 200-300 nm. Esto es una indicación de que la conformación de la cadena de ADN no se ha modificado de manera significativa, pero no es una prueba de que el complejo de Pd(II) no interactúa con el ADN en las condiciones ensayadas.

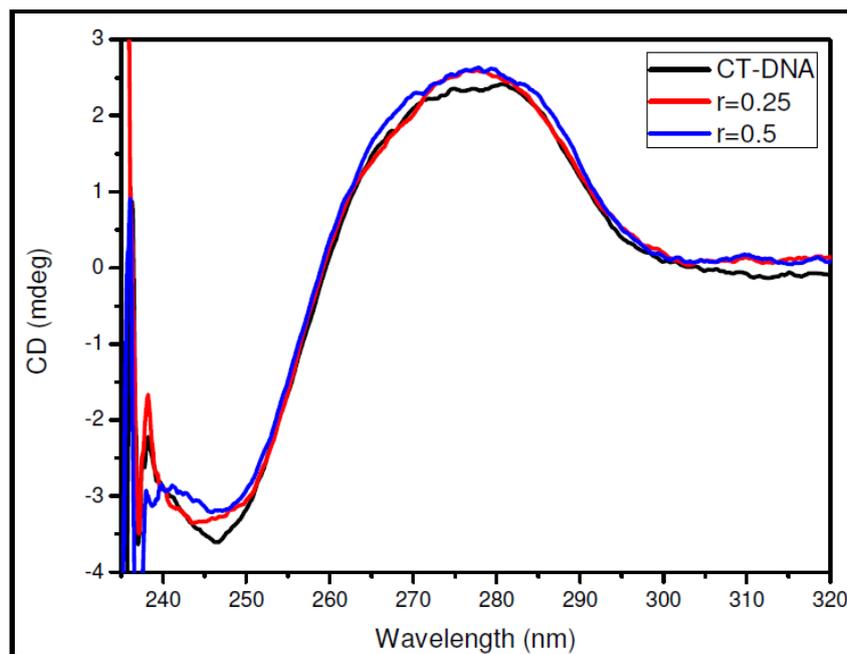


Figura 39. Espectro de dicroísmo circular de ADN de timo de ternero 200 μM en buffer Pipes 25 mM pH=7, en ausencia ($r=0$) y en presencia de diferentes concentraciones relativas de complejo $[\text{Pd}(\text{L7})_2]$ ($r=0,25$ y $r=0,5$), donde $r = \frac{[[\text{Pd}(\text{L7})_2]]}{[\text{ADN timo de ternero}]}$.

4.2.5.3.4.2- Complejos de Pt

En forma general, para los complejos de la serie $[\text{Pt}(\text{L})_2]$, no se observa ningún efecto sobre el ADN plasmídico. Estos complejos no introducen cambios conformacionales en el ADN a las dosis ensayadas (Figura 40). Resulta interesante que el complejo $[\text{Pt}(\text{L2})_2]$ (Figura 41) no siguió el patrón general y al interactuar con el ADN produjo una leve disminución de la movilidad de la forma superenrollada.

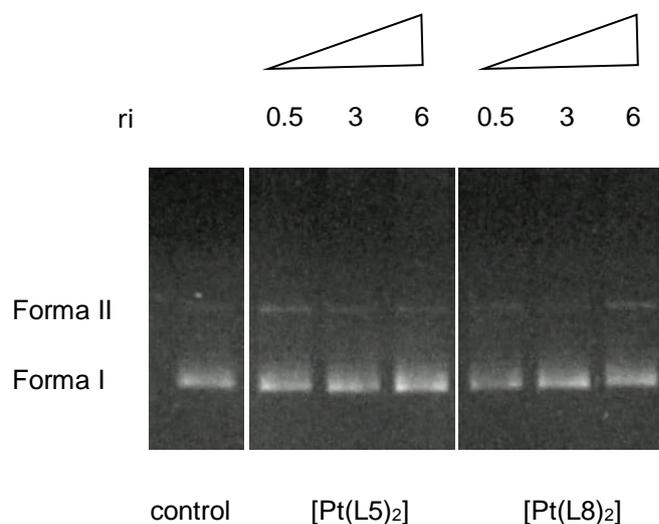


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para complejos de platino. Los diferentes complejos utilizados se indican en la parte inferior de cada sección de gel. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

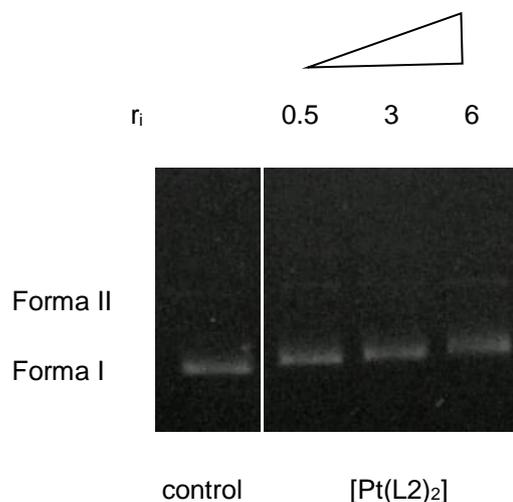


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para el complejo. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 °C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

Para algunos complejos de platino se decidió realizar el mismo estudio pero usando HEPES como buffer de incubación (25 mM, pH 7) como se indicó previamente. Con buffer HEPES se siguió respetando el mismo patrón de interacción con el ADN plasmídico encontrado utilizando buffer Tris-HCl. La Figura 42 muestra los resultados electroforéticos obtenidos para los complejos [Pt(L1)₂], [Pt(L2)₂], [Pt(L3)₂] y [Pt(L4)₂].

Se observa una intensificación del efecto del complejo [Pt(L2)₂] sobre la estructura terciaria del ADN plásmido usando buffer HEPES (Figura 42).

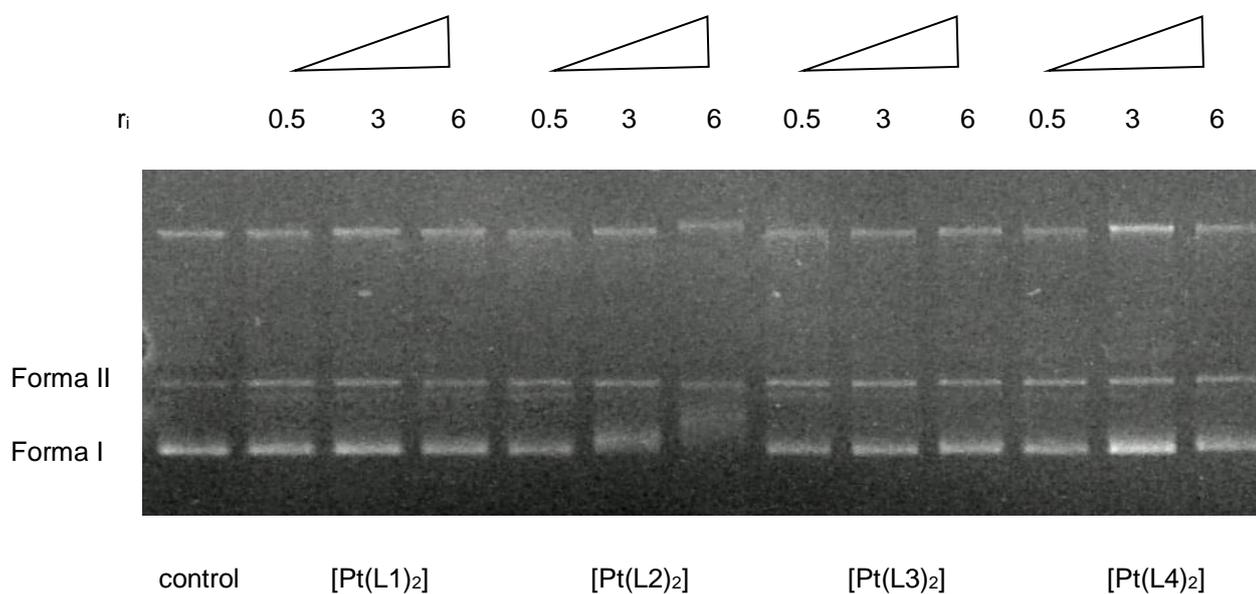


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para complejos de platino.

Los diferentes complejos utilizados se indican en la parte inferior de cada sección de gel. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer HEPES 25 mM, pH 7 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 °C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado.

Además, algunos complejos que en buffer Tris no mostraron efecto, en buffer HEPES si lo hicieron ([Pt(L5)₂] (Figura 43) y [Pt(L7)₂]).

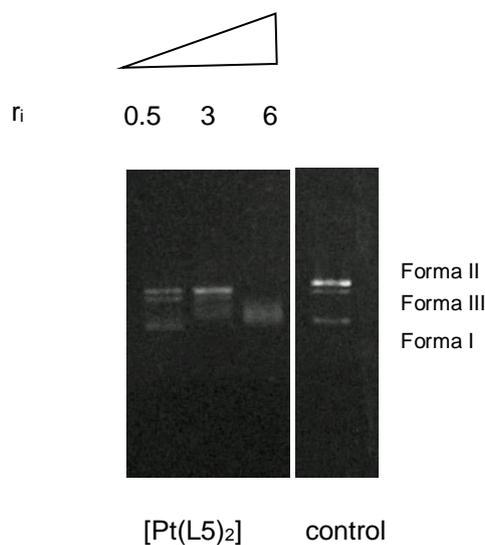
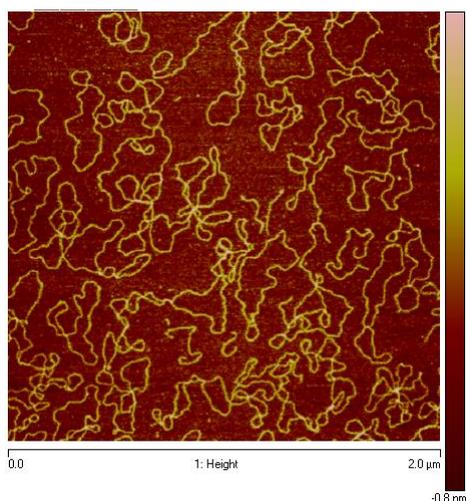
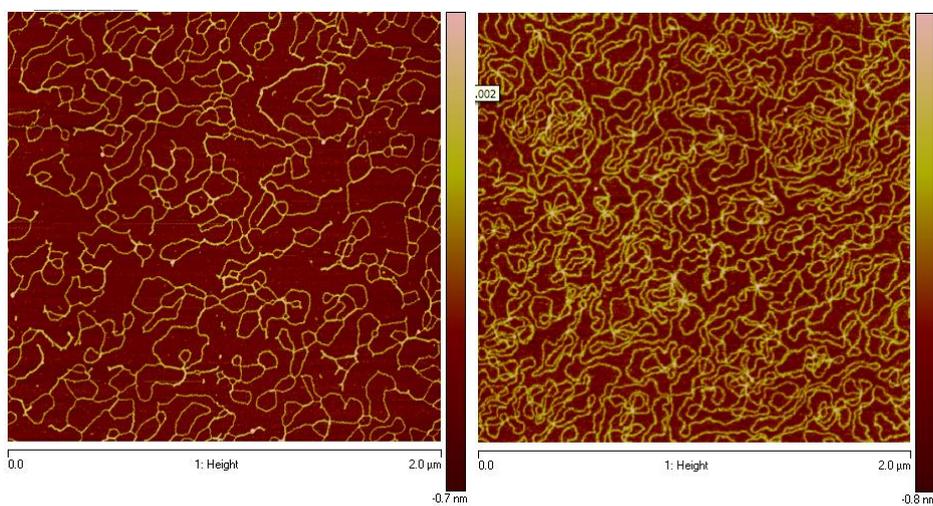


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) para el complejo $[Pt(L5)_2]$. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer HEPES 25 mM, pH 7 en un volumen final de 20 μ L, durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de BrEt. El gel fue teñido después de la corrida electroforética. ADN plasmídico (pBSK II BlueScript (Stratagene) 300 ng por reacción), r_i = mol de complejo/mol de par de base. Control: ADN plasmídico incubado sin complejo. Forma II: ADN circular relajado, Forma I: ADN superenrollado, Forma III: ADN lineal.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por microscopía de fuerzas atómicas (Figura 44). La figura muestra que existió una mayor interacción para el complejo $[Pt(L2)_2]$ que para otros complejos de la serie. Lo mismo ocurrió con los complejos $[Pt(L5)_2]$ y $[Pt(L7)_2]$.



pBR322, 21 horas



[Pt(L4)₂], 21 horas

[Pt(L2)₂], 21 horas

Figura 44. Imágenes de AFM para los complejos [Pt(L4)₂] y [Pt(L2)₂].

La adición de los complejos de la serie [Pt(L)₂] a la solución de ADN de timo de ternero (Figura 45) no produjo cambios en el espectro de dicroísmo circular del ADN. Se obtuvo un espectro de dicroísmo circular del ADN normal en el rango 200-300 nm. Nuevamente, esto es una indicación de que la conformación de la cadena de ADN no ha cambiado, pero no es una prueba absoluta de que el complejo de Pt(II) no ha interactuado con el ADN en las condiciones ensayadas. La Figura 45 muestra a modo de ejemplo los resultados de DC para el complejo [Pt(L2)₂].

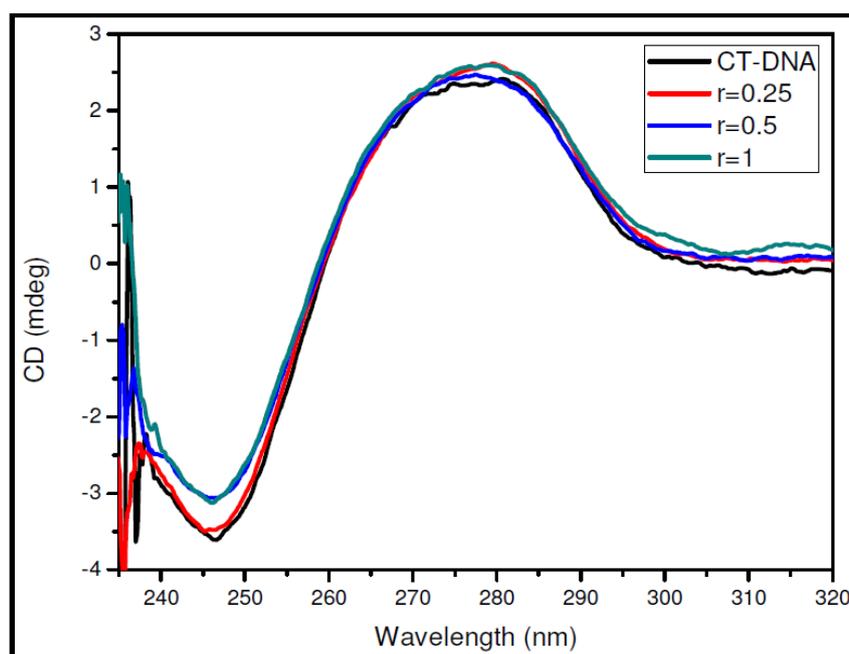


Figura 45. Espectro de dicroísmo circular de ADN de timo de ternero 200 μ M en buffer Pipes 25 mM pH=7, en ausencia ($r=0$) y en presencia de concentraciones variadas de complejo $[\text{Pt}(\text{L}2)_2]$ ($r=0,25$; $r=0,5$ y $r=1$), donde $r = [\text{Pt}(\text{L}2)_2]/[\text{ADN timo de ternero}]$.

4.3- CONCLUSIONES

Se sintetizaron dieciséis complejos de Pt(II) de fórmula $[\text{PtCl}_2(\text{HL})]$ y $[\text{Pt}(\text{L})_2]$ utilizando como ligandos orgánicos tiosemicarbazonas bioactivas frente a *T. cruzi* derivadas del 5-nitrofurano. Se realizó una caracterización analítica, fisicoquímica y estructural exhaustiva de los compuestos obtenidos y se estudió propiedades fisicoquímicas potencialmente relacionadas con la actividad biológica como el comportamiento electroquímico. También, se determinó la actividad biológica *in vitro* de los compuestos sobre la forma epimastigota y tripomastigota del parásito.

Los estudios de caracterización realizados demostraron que los nuevos complejos de Pt(II) con ligandos bioactivos tiosemicarbazona desarrollados resultaron isoestructurales de los análogos de Pd(II) previamente estudiados en el marco del grupo que integro.

Estos complejos mostraron una buena actividad antitripanosoma sobre la forma epimastigota de dos cepas del parásito. En particular, la coordinación de L3 con Pt(II) para la formación de $[Pt(L3)_2]$ produjo una actividad casi cinco veces mayor que la mostrada por el ligando libre. Los complejos de Pt(II) con ligandos bioactivos 3-(5-nitrofuril) acroleína tiosemicarbazona también mostraron actividad antitripanosoma. Si se comparan los resultados para los complejos de Pt con los ligandos HL1-HL4, con los complejos de los ligandos HL5-HL8 no se observa que exista una tendencia regular en la actividad anti *T. cruzi* cuando se cambia la longitud de la cadena de los ligandos (HL1-HL4 a HL5-HL8). Cuando los resultados se comparan con los previamente reportados para los ligandos libres y los compuestos análogos de Pd(II), se puede afirmar que el patrón de actividad se modifica significativamente al cambiar el átomo central. La actividad de los complejos de Pd(II) siguió la tendencia general: $[PdCl_2(HL)] >$ ligando libre $> [Pd(L)_2]$. Esta tendencia no se observó para los compuestos análogos de Pt(II). Éstos mostraron una mayor variabilidad y una ausencia de un patrón asociado a la naturaleza del ligando o a la pertenencia a una u otra serie de compuestos $[PtCl_2(HL)]$ y $[Pt(L)_2]$. Este comportamiento podría estar relacionado con diferencias en la biodisponibilidad, la toxicidad no específica y/o el mecanismo de acción de ambas series de complejos metálicos.

La mayoría de los compuestos de Pt(II) resultaron más activos contra la forma infecciosa tripomastigota que contra la forma epimastigota del parásito. Además, la mayoría de los compuestos fueron más activos en tripomastigotas que el Nifurtimox. Este resultado es importante teniendo en cuenta que la tripomastigota es la forma infectiva en el hospedero mamífero.

Si bien los compuestos de Pt desarrollados presentaron citotoxicidad inespecífica elevada, los compuestos testeados mostraron un índice de selectividad hacia el parásito ligeramente mayor que el de los ligandos libres y sus complejos de Pd. Esto constituye un punto de partida para continuar trabajando con los compuestos de Pt modificando la esfera de coordinación del mismo por introducción de co-ligandos que pudieran modificar favorablemente las propiedades biológicas de estos compuestos.

Para verificar si la hipótesis inicial de que la estrategia de coordinar ligandos bioactivos contra *T. cruzi* con Pt(II) podía resultar una estrategia adecuada para generar compuestos con actividad incrementada y mecanismo de acción dual se trató de obtener una visión del mecanismo de acción de estos complejos metálicos. Para ello, se estudió su capacidad de producir radicales libres intraparasitarios al igual que los ligandos y de interaccionar con el ADN como segundo blanco de acción.

Todos los compuestos fueron capaces de producir radicales libres en el parásito intacto. Los estudios de EPR mostraron que los complejos de Pt(II) tiosemicarbazona se biorreducen en el parásito generando radicales a través del grupo nitro, lo que indica que estos complejos podrían mantener el mecanismo de acción del farmacóforo 5 nitrofurano.

Además, como parte de los objetivos fundamentales de este Trabajo de Tesis, se realizó un estudio exhaustivo para los complejos análogos de Pd(II) y Pt(II) de su interacción con el ADN, utilizando diferentes técnicas propias de la biología molecular. De los estudios realizados se desprende que los complejos de Pt(II) y Pd(II) de fórmula $[MCl_2(HL)]$ introducen, en general, estructuras anómalas en el ADN lo que lleva a la pérdida de superhelicidad. Este efecto pudo ser comprobado inequívocamente a través del enfoque electroforético complementado con los resultados de los estudios de AFM y DC y las mediciones de viscosidad. También, se pudo descartar la interacción de los mismos a través del surco menor del ADN por estudios de competencia con distamicina. Por otro lado, no fueron detectados eventos de escisión de simple o doble hebra del ADN. En general, todas las técnicas mostraron que la naturaleza de la interacción con el ADN de las series de complejos análogos de Pd(II) y Pt(II) parece ser de similar naturaleza. Los complejos de Pd(II) producen una interacción significativamente más intensa que la observada para los correspondientes de Pt(II). Es probable que una interacción inicial de tipo covalente con el ADN podría mediar en la interacción y que la mayor inercia de los complejos de Pt(II) respecto a la de los análogos de Pd(II) explicaría estas diferencias de comportamiento. En particular, los experimentos de DC apoyan esta hipótesis.

Por el contrario, para los complejos de fórmula $[M(L)_2]$ no se observa un patrón común de interacción. En forma general, podría decirse que la mayoría no muestra interacción en los experimentos por electroforesis en gel y dicroísmo circular. No encontramos explicación plausible para el comportamiento de algunos complejos $[M(L)_2]$ que escapan a esta regla general.

En definitiva, los resultados mostraron que algunos de los compuestos podrían actuar como inhibidores duales en el parásito, a través de la producción de radicales libres tóxicos y a través de la interacción con el ADN.

Como resultado de gran significación tanto para la formación personal como para el grupo que esta tesista integra, ésta ha adquirido experiencia e independencia en el desarrollo e interpretación de los estudios de interacción con ADN, principalmente aquellos realizados por electroforesis en gel. De esta forma este grupo de Química Inorgánica Medicinal expande sus posibilidades de realizar profundos estudios de mecanismo de acción de nuevos complejos metálicos bioactivos. La cotutoría de la Dra. Garat ha resultado fundamental para este logro.

4.4- BIBLIOGRAFÍA

1. Beraldo, H.; Gambino, D. Wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2004, 4, 159-165.
2. Giles, F.J.; Fracasso, P.M.; Kantarjian, H. M. Phase I and pharmacodynamic study of Triapine, a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in patients with advanced leukemia. *Leuk. Res.* 2003, 27, 1077–1083.
3. Yee, K.W.L.; Cortes, J.; Ferrajoli, A.; Garcia-Manero, G.; Verstovsek, S.; Wierda, W.; Thomas, D.; Faderl, S.; King, I.; O'Brien, S. M.; Jeha, S.; Andreeff, M.; Cahill, A.; Sznol, M.; Giles, F.J. Triapine and cytarabine is an active combination in patients with acute leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 2006, 30, 813–822.
4. Cory, J. G.; Cory, A. H.; Rappa, G., Inhibitors of ribonucleotide reductase. Comparative effects of amino- and hydroxy-substituted pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 335–344.
5. Beraldo, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova* 2004, 27, 461-471.
6. Campbell, M. J. M. Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones. *Coord. Chem. Rev.* 1975, 15, 279-.
7. Padhye, S.; Kauffman, G. B. Transition metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. *Coord. Chem. Rev.* 1985, 63, 127-.

8. West, D. X.; Liberta, A.; Padhye, S. B.; Chikate, R. C.; Sonawane, P. B.; Kumbhar, A. S.; Yerande, R. G. Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. *Coord. Chem. Rev.* 1993, 123, 49-.
9. Casas, S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coord. Chem. Rev.* 2000, 209, 197-.
10. Gómez Quiroga, A.; Navarro Ranninger, C. Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 119–133.
11. Rosenberg, B. Biological effects of platinum compounds. New agents for the control of tumors. *Platinum Met. Rev.* 1971, 15, 42-51.
12. Guo, Z.; Sadler, P. J. Medicinal inorganic chemistry. *Adv. Inorg. Chem.* 2000, 49, 183-306.
13. Hambley, T. W. The influence of structure on activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* 1997, 166, 181-223.
14. Rebolledo, A. P.; Vieites, M.; Gambino, D.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Zani, C. L.; Fagundes, E. S.; Teixeira, L. R.S.; Batista, A. A.; Beraldo, H. Palladium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: spectral characterization, structural studies and cytotoxic activity. *J. Inorg. Biochem.* 2005, 99, 698-706.
15. Gómez, N.; Santos, D.; Vázquez, R.; Suescun, L.; Mombrú, A.; Vermeulen, M.; Finkielsztejn, L.; Shayo, C.; Moglioni, A.; Gambino, D.; Davio, C. Synthesis, structural characterization, and pro-apoptotic activity of 1-Indanone thiosemicarbazone platinum(II) and palladium(II) complexes: potential antileukemic agents. *ChemMedChem*, 2011, 6, 1485-1494.

16. Singh, S.; Bharti, N.; Mohapatra, P. P. Chemistry and biology of synthetic and naturally occurring antiamoebic agents. *Chem. Rev.* 2009, 109, 1900–1947.
17. Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Fernández, M.; González, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Faundez, M. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4885–4893.
18. Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Mendizábal, F.; Otero, L.; Gambino, D.; González, M.; Cerecetto, H. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochim. Acta Part A* 2005, 61, 2933-2938.
19. Otero, L.; Maya, J. D.; Morello, A.; Rigol, C.; Barriga, G.; Rodríguez, J.; Folch, C.; Norambuena, E.; González, M.; Olea Azar, C.; Cerecetto, H.; Gambino, D. Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Med. Chem.* 2008, 4, 11-17.
20. Cazzulo, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Topics Med. Chem.* 2002, 2, 1261-1271.
21. Greenbaum, D. C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Chibale, K. Synthesis and structure activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *P.falciparum*, *T. brucei* and *T. cruzi*. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3212-3219.
22. Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R. L.; Piro, O. E.; Castellano, E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox

metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322-3331.

23. Gambino, D.; Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, M.; González, M.; Baran, E. J.; Cerecetto, H. Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: Experimental and theoretical study. *Spectrochim. Acta Part A* 2007, 68, 341–348.

24. Lin Vien, D.; Colthup, N. B.; Fataley, W. G.; Grasselli, J. G. *The handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules.* Academic Press, Inc., San Diego, USA, 1991.

25. Arán, V. J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Montero, D.; Nogal, J. J.; Gómez-Barrio, A.; Azqueta, A.; López de Ceraín, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 3197–3207.

26. Tyler, K. M.; Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 472-480.

27. Repetto, Y.; Opazo, E.; Maya, J. D.; Agosin, M.; Morello, A. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: Effect of drugs. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1996, 115, 281-285.

28. Muelas, S.; Di Maio, R.; Cerecetto, H.; Seoane, G.; Ochoa, C.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A. New thiadiazine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Folia parasitologica* 2001, 48, 105-108.

29. Veerapen, N.; Taylor, S. A.; Walsby, C. J.; Mario Pinto, B. A mild pummerer-like reaction of carbohydrate-based selenoethers and thioethers involving linear ozonide acetates as putative intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 227-239.

30. Maya, J. D.; Bollo, S.; Nuñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; Repetto, Y.; Morello, A.; Périé, J.; Chauvière, G. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 999-1006.
31. Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. Artificial metallonucleases. *Chem. Comm.* 2005, 2540-2548.
32. Brabec, V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2002, 71, 1-68.
33. Wolfe, A.; Shimer Jr. G. H.; Meehan, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry* 1987, 26, 6392-6396.
34. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E. J. et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. *J. Inorg. Biochem.* 2003, 97, 364–369.
35. Chen, L.; Liu, J.; Chen, J.; Shi, S.; Tan, C.; Zheng, K.; Ji, L. Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex [Ru(MeIm)₄(dpq)]²⁺. *J. Mol. Struct.* 2008, 881, 156-166.
36. Liu, J. G.; Zhang, Q. L.; Ji, L. N.; Cao, Y. Y.; Shi, X. F. Synthesis, characterization and interaction of mixed polypyridyl ruthenium(II) complexes with calf thymus DNA. *Trans. Met. Chem.* 2001, 26, 733–738.
37. Farrell, N. in: B. R. James and R. Ugo (Ed.), *Catalysis by metal complexes*, vol. 11, Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. Reidel-Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; Boston, 1989.

38. Storl, K.; Burckhardt, G.; Lown, J.W.; Zimmer, C. Studies on the ability of minor groove binders to induce supercoiling in DNA. *FEBS Lett.* 1993, 334, 49-54.
39. Abu-Daya, A.; Brown, P. M.; Fox, K. R. DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands. *Nucl. Acids Res.* 1995, 23, 3385-3392.
40. Akdi, K.; Vilaplana, R. A.; Kamah, S.; González-Vílchez, F. Effects of Tris and Hepes buffers on the interaction of palladium–diaminopropane complexes with DNA. *J. Inorg. Biochem.* 2005, 99, 1360-1368.
41. Butenko, N.; Tomaz, A. I.; Nouri, O.; Escribano, E.; Moreno, V.; Gama, S.; Ribeiro, V.; Telo, J. P.; Costa Pesssoa, J.; Cavaco, I. DNA cleavage activity of VIVO(acac)₂ and derivatives. *J. Inorg. Biochem.* 2006, 103, 622-632.
42. Murray, V.; Whittaker, J.; Temple, M. D.; McFadyen, W. D. The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997, 1354, 261-271.
43. Satyanarayana, S.; Dabrowiak J. C.; Chaires, J. B. Neither delta- nor lambda-tris(phenanthroline) ruthenium(II) binds to DNA by classical intercalation. *Biochemistry* 1992, 31, 9319-9324.
44. Lerman, L. S. J. Structural considerations in the interactions of deoxyribonucleic acid and acridines. *Mol. Biol.* 1961, 3, 18-30.
45. Dougherty, G.; Pilbrow, J. R. Physico-chemical probes of intercalation. *Int. J. Biochem.* 1984, 16, 1179-1192.
46. Wilson, W. D.; Jones, R. L. (1982) in *Intercalation Chemistry*, pp. 445-501, Academic Press, New York.

47. Cohen, G.; Eisenberg, H. Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes. *Biopolymers* 1969, 8, 45-55.
48. Kapicak, L., Gabbay, E. J. Topography of nucleic acid helices in solutions. XXXIII. Effect of aromatic cations on the tertiary structures of deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 403-408.
49. Xiong, Y.; Zou, X. H.; Wu, J. Z.; Chen, X. M.; Ji, L. N.; Li, R. H.; Zhou J. Y.; Yu, R. B. Interaction of polypyridyl ruthenium(II) complexes containing non-planar ligands with DNA. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1999, 1, 19–24.
50. Ivanov, V. I.; Minchenkova, L. E.; Schyolkina, A. K.; Poletayer, A. I. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. *Biopolymers* 1973, 12, 89-110.
51. Garbett, N. C.; Ragazzon, P. A.; Chaires, J. B. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nature Protocols* 2007, 2 3166-3172.
52. Johnson, W. C. in: K. Nakanishi, N. Berova, R.W. Woody (Eds.), *Circular Dichroism: Principles and Applications*, VCH, New York, 1994, pp. 523–540.
53. Zhang, S.; Zhu, Y.; Tu, C.; Wei, H.; Yang, Z.; Lin, L.; Ding, J.; Zhang, J.; Guo, Z. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and L-threonine with DNA nuclease activity. *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 2099-2106.
54. Rajendiran, V.; Karthik, R.; Palaniandavar, M.; Stoeckli-Evans, H.; Periasamy, V.S.; Akbarsha, M.A.; Srinag, B.S.; Krishnamurthy, H. Mixed-ligand copper(II)-phenolate complexes: Effect of coligand on enhanced DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity. *Inorg. Chem.* 2007, 46, 8208-8221.

55. Habib, A.; Tabata, M. Oxidative DNA damage induced by HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) buffer in the presence of Au(III). *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 1696-1702.
56. Pessoa, J. C.; Correia, I.; Gonçalves, G.; Tomaz, I. Circular dichroism in coordination compounds. *J. Argent. Chem. Soc.* 2009, 97, 151-165.
57. Lincoln, P.; Tuite, E.; Norden, B. Short-circuiting the molecular wire: cooperative binding of Δ -[Ru(phen)₂dppz]²⁺ and Δ -[Rh(phi)₂bipy]³⁺ to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 1454-1455.
58. Norden, B.; Tjerneld, F. Structure of methylene blue–DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biopolymers* 1982, 21, 1713-1734.
59. Chen, Z.; Wang, X.; Li, Y.; Guo, Z. Comparison of DNA binding and cleavage abilities between mono- and trinuclear copper(II) complexes of benzimidazole derivatives. *Inorg. Chem. Comm.* 2008, 11, 1392-1396.
60. Bustamante, C.; Rivetti, C.; Keller, D.J. Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7, 709-16.
61. Hansma, H. G.; Pietrasanta, L. Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998, 2, 579-584.
62. Fisher, T. E.; Marszalek, P. E.; Fernandez, J. M. Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7, 719-724.
63. Golan, R.; Pietrasanta, L. I.; Hsieh, W.; Hansma, H. G. DNA toroids: stages in condensation. *Biochemistry* 1999, 38, 14069-76.
64. Pietrasanta, L. I.; Thrower, L.; Hsieh, W.; Rao, S.; Stemmann, O.; Lechner, J.; Carbon, J.; Hansma, H. Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric

DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, 96, 3757-62.

65. Anselmetti, D.; Fritz, J.; Smith, B.; Fernández-Busqueta, X. Single molecule DNA biophysics with atomic force microscopy. *Single Mol.* 2000, 1, 53-58.

66. Pietrasanta, L. I.; Smith, B. L.; MacLeod, M. C. A novel approach for analyzing the structure of DNA modified by benzopyrene diol epoxide at single-molecule resolution. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 351-355.

67. Onoa, G. B.; Cervantes, G.; Moreno, V.; Prieto, M. J. Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucl. Acids Res.* 1998, 26, 1473-1480.

CAPÍTULO 5

COMPLEJOS METÁLICOS DE N-ÓXIDO DE 2-MERCAPTOPIRIDINA

CONTENIDO

5.1- INTRODUCCIÓN

4.1.1- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL LIGANDO N-ÓXIDO DE 2-MERCAPTOPIRIDINA

4.1.2- N-ÓXIDO DE 2-MERCAPTOPIRIDINA COMO LIGANDO

5.2- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1- SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

5.2.2- CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

5.2.2.1- Análisis elemental de los elementos livianos

5.2.2.2- Estudios de espectrometría de masas ESI-MS

5.2.2.3- Estudios de espectroscopía IR y Raman

5.2.2.4- Estudios de resonancia magnética nuclear

5.2.2.5- Estudios de estabilidad en DMSO por RMN

5.2.2.6- Estudios por difracción de rayos X

5.2.2.7- Comportamiento electroquímico

5.2.2.8- Producción electroquímica de radicales libres estudiada por EPR

5.2.3- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.2.3.1- Actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro* de los complejos de Pd y Pt

5.2.3.2- Actividad biológica *in vitro* de los complejos de Au y V en parásitos kinetoplástidos

5.2.3.2.1- Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c)

5.2.3.2.2- Epimastigotas de *T. cruzi* (clon CL-B5 transfectadas)

5.2.3.2.3- Promastigotas de *Leishmania*

5.2.4- ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

5.2.4.1- Citotoxicidad en macrófagos de los complejos de Pd y Pt

5.2.4.2- Citotoxicidad en macrófagos y fibroblastos de los complejos de Au y V

5.2.5- ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN

5.2.5.1- ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN

5.2.5.2- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN *T. cruzi*

5.2.5.3- ESTUDIOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

5.2.5.3.1- Ensayos de inhibición de la tripanotona reductasa (TR) de *T. cruzi*

5.2.5.3.2- Ensayos de inhibición de la NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi*

5.2.6-.ESTUDIOS PRELIMINARES *IN VIVO*

5.3- CONCLUSIONES

5.4- BIBLIOGRAFÍA

5.1- INTRODUCCIÓN

Como ya se ha descrito previamente, la hipótesis general de este Trabajo de Tesis implica la síntesis y caracterización de compuestos de Pt(II) y Pd(II) con ligandos que muestran actividad contra *Trypanosoma cruzi* y su estudio comparativo tanto estructural como biológico y de mecanismo de acción. En particular, este capítulo trata de los estudios químicos, biológicos y de mecanismo de acción realizados a compuestos de Pd(II) y Pt(II) con el ligando bioactivo *N*-óxido de 2-mercapto piridina (Hmpo) (Figura 1) y su comparativa con el nuevo complejo de este ligando de Au(I) desarrollado en el marco de este Trabajo de Tesis, y con el compuesto ya conocido de V(IV).

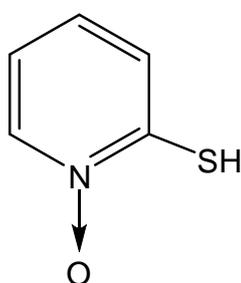


Figura 1. Estructura del ligando bioactivo *N*-óxido de 2-mercapto piridina (Hmpo)

5.1.1- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL LIGANDO *N*-ÓXIDO DE 2-MERCAPTOPIRIDINA

La presencia de la enzima NADH-fumarato reductasa en varios miembros del género *Trypanosoma* proporciona un potencial blanco de acción para los agentes antitripanosomales, ya que no está presente en las células mamíferas [1-6]. Esta enzima integrante de la cadena respiratoria del parásito produce succinato por reducción de fumarato (Figura 2). El succinato posee al menos dos funciones en el parásito: (i) es uno de los principales sustratos respiratorios y por lo tanto es necesario para la producción de energía [3,4]; (ii) el succinato puede ser utilizado para la eliminación del exceso de equivalentes de reducción, ya que la enzima láctico-deshidrogenasa está ausente en los tripanosomátidos [7]. Esto último explica por qué los tripanosomas acumulan succinato en condiciones anaeróbicas [8].

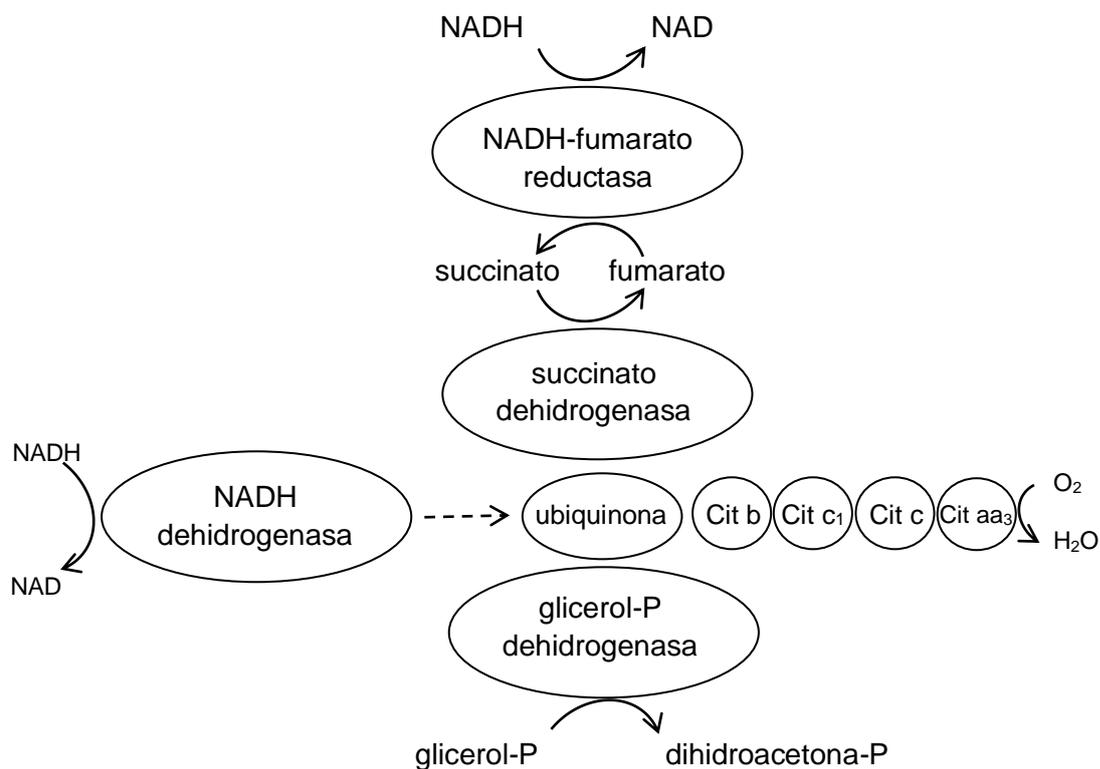


Figura 2. Cadena respiratoria propuesta para los tripanosomas.

La ausencia de la enzima fumarato reductasa en células de mamífero proporciona entonces una diana para potenciales agentes contra la enfermedad de Chagas. De hecho, se ha demostrado que varios nitroimidazoles y benzimidazoles, algunos de los cuales se utilizan actualmente en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, como el benznidazol, o de la helmintiasis son poderosos inhibidores de esta enzima [9]. Otros antihelmínticos no imidazólicos como el fármaco L-092, 201 (Figura 3), desarrollado por Merck, Sharp & Dohme contra la enzima fumarato reductasa encontrada en *Haemonchus contortus*, también inhibe la enzima de *Trypanosoma brucei* y el crecimiento de cultivos de tripomastigotas procíclicos de este parásito [6].

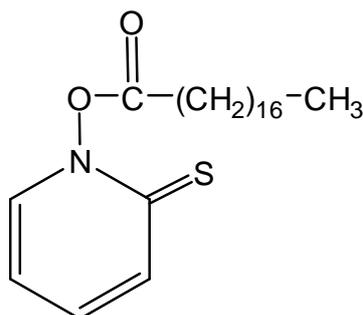


Figura 3. Estructura del fármaco L-092, 201.

El *N*-óxido de 2-mercapto piridina (Hmpo), uno de los precursores de la síntesis del fármaco L-092, 201 [10], también resulta un inhibidor de la enzima fumarato reductasa aislada de epimastigotas de *T. cruzi*, mostrando un valor de concentración inhibitoria 50 %, CI_{50} , de 35 μ M. Este compuesto inhibe el crecimiento de cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* en concentraciones aproximadamente dos órdenes de magnitud más bajas que las que bloquean a la fumarato reductasa *in vitro* (CI_{50} 0,08 μ M). Cultivando epimastigotas de *T. cruzi* durante 5 días en presencia y en ausencia de succinato (5mM) se comprobó que la inhibición del crecimiento del parásito se debe, al menos en parte, a la inhibición de la fumarato reductasa. El succinato disminuyó significativamente el efecto inhibitor del crecimiento celular del Hmpo. Por otro lado, el crecimiento celular en ausencia de Hmpo fue el mismo en presencia o en ausencia de succinato, lo que indica que el succinato no afecta la viabilidad de la célula en condiciones normales de cultivo. Se determinó que el Hmpo disminuye la acumulación de succinato en epimastigotas de *T. cruzi* en una forma dosis-dependiente [10]. También fue evaluado el efecto del Hmpo sobre la viabilidad celular en otras etapas del ciclo de vida del *T. cruzi*. Como resultado, se comprobó que este compuesto resulta también un potente inhibidor de la proliferación de amastigotas de *T. cruzi* en mioblastos de mamíferos, a dosis que no afectan la viabilidad de los mioblastos. Además, si se preincuba tripomastigotas con Hmpo (CI_{50} = 20 μ M), se inhibe la infección de los mioblastos por éstos [10].

Las concentraciones de Hmpo requeridas para inhibir el crecimiento de cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* y para inhibir la capacidad de los tripomastigotas para infectar a los mioblastos de mamíferos, resultaron inferiores a las

necesarias para bloquear la actividad *in vitro* de la fumarato reductasa, lo que sugiere que el fármaco puede tener más de un blanco con diferentes afinidades. Una explicación alternativa dada por el grupo que desarrolló estos experimentos [10], involucraría que los cultivos de células podrían acumular Hmpo durante prolongados períodos de tiempo, alcanzando así concentraciones suficientemente altas como para afectar la actividad de la NADH-fumarato reductasa.

En resumen, todos estos resultados indican que el Hmpo es un potente inhibidor del desarrollo de *T. cruzi*. Aunque no está claro si su acción se debe a su efecto inhibitorio sobre la NADH-fumarato reductasa, las bajas dosis requeridas para bloquear el crecimiento de cultivos de *T. cruzi* y la aparente falta de toxicidad para los cultivos celulares de mamíferos (por lo menos durante la exposición a corto plazo) sugiere que este compuesto o sus derivados pueden ser efectivos agentes antitripanosomales.

5.1.2- N-ÓXIDO DE 2-MERCAPTOPIRIDINA COMO LIGANDO

La síntesis del compuesto a ser utilizado como ligando fue reportada por primera vez en 1954. A partir de su obtención se realizó un esfuerzo sustancial dedicado al estudio de la estructura y propiedades de este compuesto. Este compuesto existe en dos formas tautoméricas (I y II) (Figura 4).

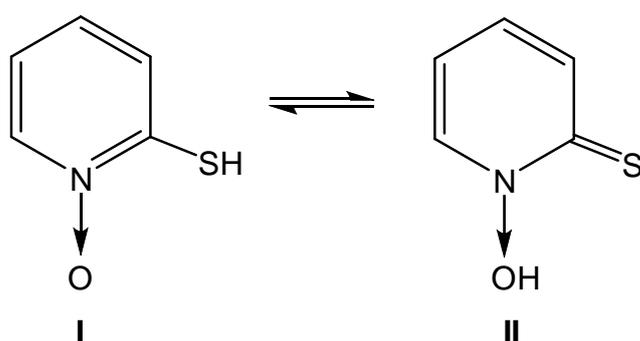


Figura 4. Formas tautoméricas del compuesto N-óxido de 2-mercaptopiridina

Jones y Katritsky establecieron que la forma tiona (II) es la predominante [11], lo que está de acuerdo con el patrón general de tautomería de las mercapto-

piridinas [12]. Desde el punto de vista de la química de coordinación, este compuesto presenta átomos donores adecuados que le permiten coordinarse a iones metálicos, el oxígeno del grupo *N*-óxido y el azufre tiocarbonílico. Como se describe a continuación, este compuesto ha demostrado su capacidad para actuar como ligando bidentado de diferentes iones metálicos de la primera serie de transición y, también, de paladio(II) y platino(II). También, se han descrito complejos de metales representativos y lantanoides, como el Zn, el Sn y el Sm en los cuales este ligando coordina de forma bidentada. Pero por otro lado, recientemente se ha descrito un complejo de Ru(II) en el cual el mpo coordina de forma monodentada por el azufre.

A efectos de profundizar en las características del Hmpo como ligando se describirán algunos aspectos relativos a los compuestos de coordinación de este ligando que se describen en la bibliografía, como ser: método de síntesis, modo de coordinación y estructura y actividad biológica. Para ese fin, se decidió agrupar los mismos según el grupo de elementos de la tabla periódica al cual el metal central pertenece. En un grupo separado se describen los complejos de vanadio, paladio y platino por su interés central para este Trabajo de Tesis.

En cuanto a complejos del Hmpo con metales representativos, el complejo de zinc, denominado comúnmente piritona de zinc, $[Zn(mpo)_2]$, (Figura 5), la sal sódica del mpo y otras sales de este compuesto resultan eficaces agentes antibacterianos y antifúngicos. El complejo $[Zn(mpo)_2]$ y la sal sódica del mpo se utilizan como agentes antiseborreicos en champús y como conservantes industriales en cosméticos. Se realizó un estudio comparativo del destino metabólico de estos compuestos administrados en forma intravenosa y dérmica por análisis de muestras de orina utilizando los compuestos marcados con C-14 y se encontró que sus metabolitos se excretan predominantemente a través de esta ruta [13]. El principal metabolito urinario resultó ser el S-glucurónido de *N*-óxido de 2-mercaptopiridina y uno de los metabolitos de menor importancia fue el S-glucurónido de 2-mercaptopiridina. El patrón metabólico después de la aplicación dérmica fue muy diferente, los principales metabolitos fueron el 2,2'-piridildisulfuro y el sulfonato de 2-(piridil-*N*-óxido).

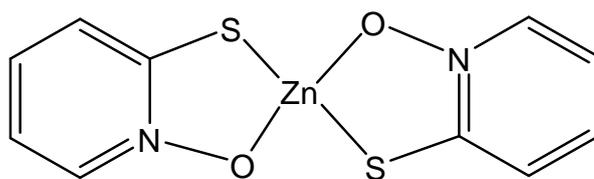


Figura 5. Fórmula estructural del complejo piritiona de zinc, $[Zn(mpo)_2]$.

También, se han descrito complejos de estaño. En particular, se sintetizó el complejo $[Sn(mpo)(Ph-H)_3]$, donde Ph-H es el fenilo deprotonado, y se determinó su estructura cristalina por estudios de difracción de rayos X a partir de monocristales obtenidos de cloroformo [14]. El compuesto posee una estructura de bipirámide trigonal con el ligando mpo unido de forma bidentada a través de ambos átomos donores (Figura 6).

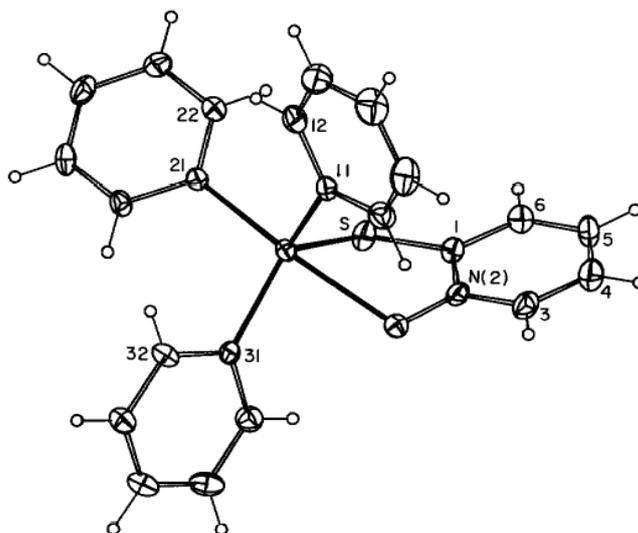


Figura 6. Estructura cristalina del complejo $[Sn(mpo)(Ph-H)_3]$

También, se obtuvo el complejo de Sn(II), $[Sn(mpo)_2]$ (Figura 7) [15]. Este compuesto se diseñó para realizar el marcado de células, en particular plaquetas, con el radionucleido Tc-99m. La alta liposolubilidad del compuesto resultó en una captación intracelular incrementada de Sn(II) respecto a otros compuestos cargados de este ion. Esto condujo a una efectiva reducción

intracelular del pertecnato y, en consecuencia, a un marcado eficiente de estas células con Tc-99m con fines radiofarmacéuticos.

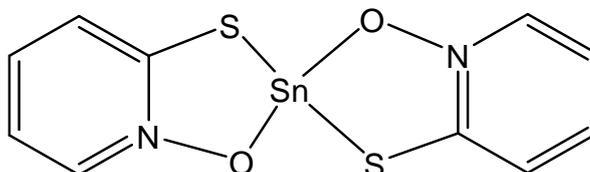


Figura 7. Estructura propuesta para el complejo bis(*N*-óxido de 2-mercaptopiridina) estaño(II)

En cuanto a complejos de iones lantanoideos, únicamente se ha preparado el complejo de samario, $[\text{Sm}(\text{mpo})_3(\text{dmsO})_2]$. Éste fue obtenido por reacción de acetato de samario, $\text{Sm}(\text{OAc})_3$, con la sal sódica del mpo en DMSO [16]. Su estructura, resuelta por difracción de rayos X, muestra al Sm coordinado a tres ligandos mpo bidentados y dos moléculas de DMSO (Figura 8). El átomo de Sm forma un dodecaedro distorsionado con distancias de enlace Sm-S y Sm-O de 2.878(2)-2.916(2) y 2.359(5)-2.440(4) Å, respectivamente.

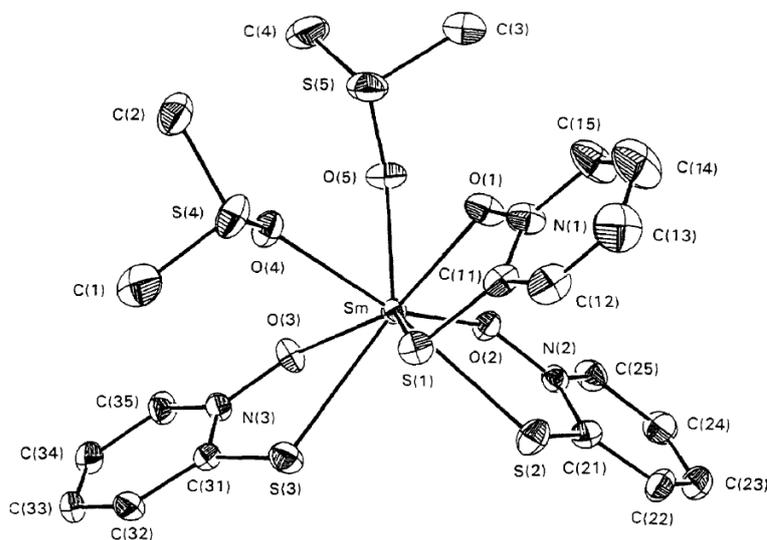


Figura 8. Diagrama que muestra la estructura molecular de $[\text{Sm}(\text{mpo})_3(\text{DMSO})_2]$ (elipsoides con un 30 % de probabilidad).

En cuanto a complejos con metales de la primera serie de transición d, se ha estudiado la química de coordinación del Hmpo con una variedad de iones metálicos. Como resultado se han obtenido los siguientes complejos: $\text{CrL}_3 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnL}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, FeL_3 , $\text{CoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NiL_2 , CuL_2 , ZnL_2 , CdL_2 , donde $\text{L} = \text{mpo}$ [17]. Los complejos fueron preparados mezclando una solución acuosa de la sal sódica del mpo con una solución acuosa de la sal del metal deseado. Los derivados metálicos precipitaron inmediatamente, se filtraron, se lavaron sucesivamente con agua, metanol y éter, y se secaron a vacío sobre P_4O_{10} . En varios casos, los compuestos se recrystalizaron de dimetilformamida. Los complejos de Mn, Ni, Fe y Co se prepararon también por reacción del cloruro del metal apropiado con ya sea la sal sódica del mpo o 2,2'-ditio-bis(*N*-óxido de piridina) en presencia de metóxido de sodio [18,19,20]. Los complejos se caracterizaron por determinación del peso molecular, la ausencia de conductividad en disolventes no acuosos, medidas de susceptibilidad magnética y espectroscopías infrarroja, visible y ultravioleta. En todos los casos el ligando coordina de forma bidentada. La estructura del complejo $[\text{Ni}(\text{mpo})_2]$, se determinó mediante difracción de rayos X en monocristal. El átomo de níquel está en un entorno cuadrado plano con dos ligandos mpo en configuración *cis* (Figura 9). Los complejos de Mn, Ni, Fe y Co fueron investigados también por espectroscopía ^1H RMN y por voltametría cíclica.

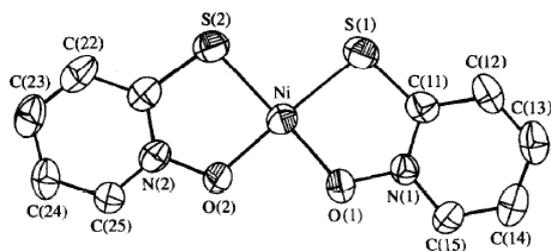


Figura 9. Diagrama ORTEP de la estructura de $[\text{Ni}(\text{mpo})_2]$.

También se han preparado algunos complejos de Co heterolépticos o de ligandos mixtos. Los compuestos $[\text{Co}(\text{mpo})_2\text{L}]$, donde $\text{L} = \text{PBU}^n_3$ o py , han sido sintetizados y estudiados espectroscópicamente. Sus estructuras fueron determinadas por estudios de difracción de rayos X en monocristal (Figuras 10 y 11). El $\text{Co}(\text{II})$ se encuentra en un entorno de pirámide de base cuadrada con

los dos ligandos Hmpo deprotonados en el plano basal en posición *trans* y el ligando L en posición axial [20].

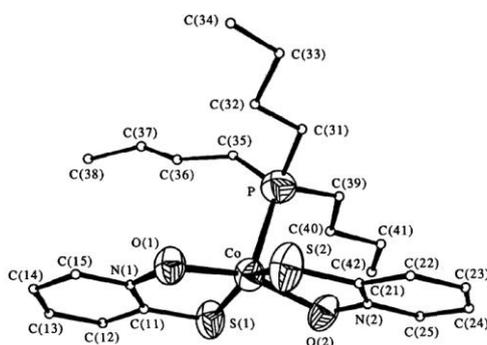


Figura 10. Representación ORTEP del complejo $[\text{Co}(\text{mpo})_2\text{PBU}_3]$ con los átomos de carbono representados por esferas simples para mayor claridad.

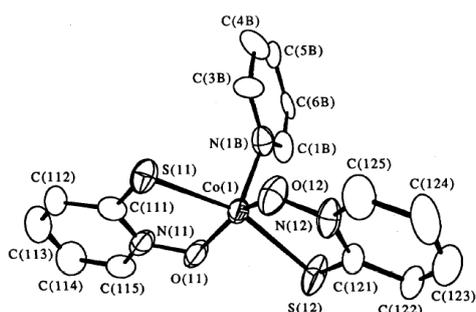


Figura 11. Representación ORTEP del complejo $[\text{Co}(\text{mpo})_2\text{py}]$.

También, se informa en la bibliografía el complejo tetranuclear de cobalto de valencia mixta $[\text{Na}_3\text{Co}_4(\text{mpo})_8(\mu_3\text{O})_2(\text{DMF})_4]\text{Br}\cdot 2\text{DMF}$. Éste fue preparado por reacción de $[\text{CoBr}(\text{PPh}_3)_3]$, donde PPh_3 es trifenilfosfina, con la sal sódica del ligando y fue estructuralmente caracterizado por difracción de rayos X en monocristal (Figuras 12 y 13). El complejo contiene cuatro átomos de Co dispuestos según una geometría cuadrada. Cada átomo de Co está coordinado a dos ligandos mpo que actúan de forma bidentada [21]. Para este complejo se estudiaron también sus propiedades magnéticas [22]. Los resultados muestran que el complejo exhibe un acoplamiento anti-ferromagnético entre los sitios $\text{Co}(\text{II})$ y $\text{Co}(\text{III})$.

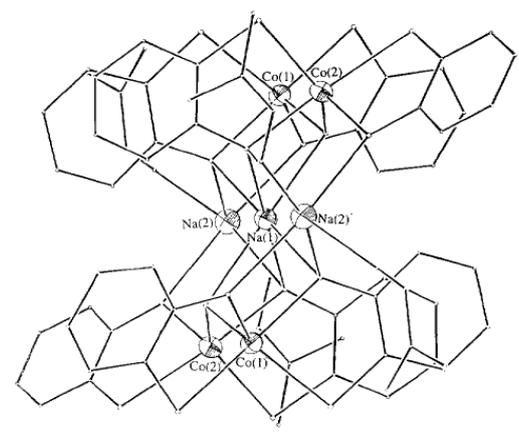
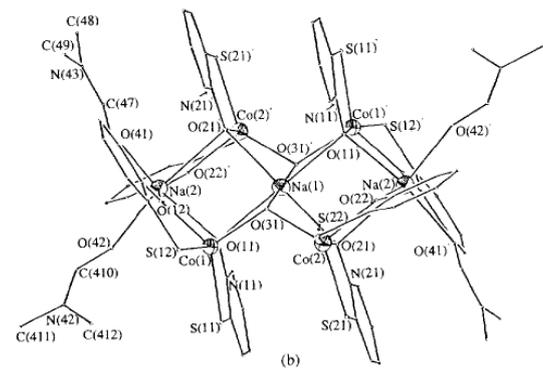
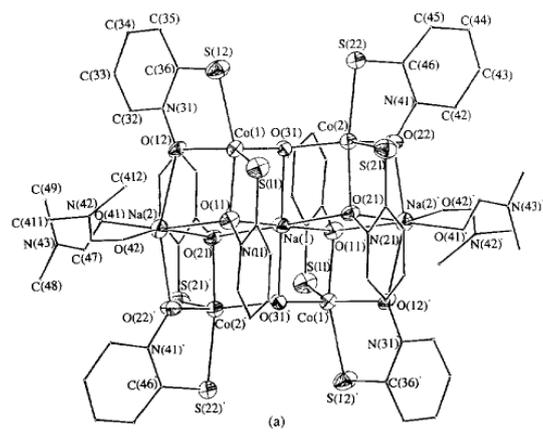


Figura 12. Diferentes vistas del complejo $[Na_3Co_4(mpo)_8(\mu_3O)_2(DMF)_4]^+$

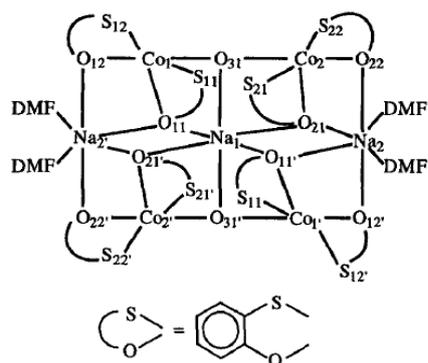


Figura 13. Diagrama que muestra la estructura del catión
 $[\text{Na}_3\text{Co}_4(\text{mpo})_8(\mu_3\text{O})_2(\text{DMF})_4]^+$

En cuanto a complejos de las segunda y tercera series de transición d, además de los complejos de Pt y Pd que serán comentados en el próximo párrafo, únicamente se ha encontrado en la bibliografía los complejos $\text{ZrL}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, HgL_2 [17] y el complejo de rutenio(II) $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{S-mpo})](\text{PF}_6)$, donde bpy = 2,2'-bipiridina y tpy = 2,2':6',2'-terpiridina, que representa el único ejemplo de la bibliografía en el cual el mpo actúa como ligando monodentado coordinando por el azufre (Figura 14) [23]. El compuesto fue sintetizado a partir de un precursor que solo permite la unión de un ligando monodentado $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{Cl})]\text{Cl}$, para así estudiar la posibilidad de la isomería de unión para este ligando ambidentado. El precursor se trata primero con AgCF_3COO en agua y luego se hace reaccionar con la sal sódica de mpo.

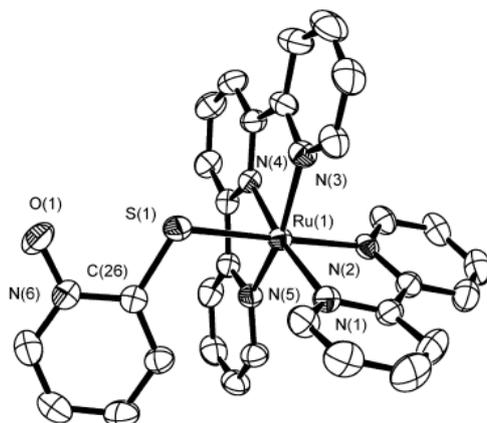


Figura 14. Representación ORTEP del catión complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{S-mpo})]^+$.

Resultan de particular interés para este Trabajo de Tesis los compuestos de paladio(II), platino(II) y oxovanadio(IV), ya que para los dos primeros en la misma se ha profundizado en su comportamiento espectroscópico (FTIR, Raman y RMN) y electroquímico y para los tres complejos se ha evaluado su actividad contra *T. cruzi* y estudiado en profundidad su mecanismo de acción.

Dado que los compuestos de vanadio mostraron actividad insulino-mimética, se han hecho grandes esfuerzos para preparar complejos de vanadio(IV) y vanadio(V) de baja toxicidad, fácil absorción y alta actividad biológica [24,25,26]. Como parte de esos esfuerzos el complejo bis(*N*-óxido de 2-mercaptopiridina) oxovanadio(IV), $[\text{VO}(\text{mpo})_2]$, ha demostrado ser potente en la disminución del nivel de glucosa en sangre con una eficiencia relativamente alta en ratas a las que se les indujo diabetes con estreptozotocina [27,28,29]. Este complejo de color púrpura se obtuvo a partir de la sal sódica de mpo y $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, bajo atmósfera de nitrógeno como se ha indicado en la sección Materiales y Métodos. También se obtuvo un aducto con piridina de este compuesto partiendo del complejo anterior y piridina. Estos complejos fueron caracterizados por espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía electrónica visible y medidas magnéticas [30]. La frecuencia de estiramiento del enlace VO en este compuesto es considerablemente más baja que la observada en otros complejos de oxovanadio(IV). Esta baja frecuencia encontrada en estado sólido

podría ser debida a interacciones entre el V(IV) de una molécula y el azufre de un mpo coordinado a otro V(IV) en una molécula adyacente en el estado sólido o a la formación de puentes azufre generando especies oligoméricas (Figura 15 I y II).

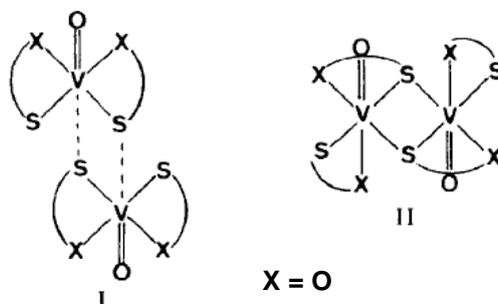


Figura15. Diagrama que muestra la coordinación de los ligandos mpo actuando como puente.

Este aspecto fue dilucidado al resolverse la estructura cristalina del compuesto que muestra que este compuesto es monomérico (ver más adelante) presentando interacciones entre moléculas vecinas en el sólido.

También se obtuvo el mismo compuesto por reacción de una solución del precursor $[\text{VOCl}_2(\text{thf})_2]$ en thf, donde thf es tetrahidrofurano, con la sal de sodio del *N*-óxido de 2-mercaptopiridina en relación molar 1:2 y agitando durante 24 horas [31]. Finalmente se elucidó la estructura cristalina del mismo. Este complejo cristaliza en el grupo espacial ortorrómbico *Pbca* (Figura16), con las siguientes dimensiones de celda unidad: $a = 11,148 (2)$, $b = 14,103 (2)$, $c = 15,258 (3) \text{ \AA}$, $Z = 8$. La molécula posee geometría de pirámide de base cuadrada con una longitud del enlace $\text{V}=\text{O}$ de $1,597 \text{ \AA}$ y distancias de enlace VS y VO de $2,375$ y $1,964 \text{ \AA}$, respectivamente. El átomo de vanadio está desplazado del plano generado por los cuatro átomos donores de los dos ligandos en $0,644(1) \text{ \AA}$.

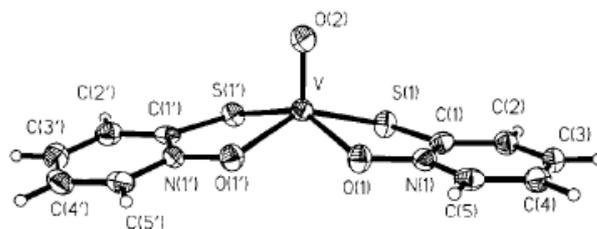


Figura 16. Imagen ORTEP del complejo $[VO(mpo)_2]$.

Dada la importancia biológica del compuesto por su potencial actividad insulino-mimética se estudió también su especiación por técnicas potenciométricas [32].

En cuanto al complejo de Pd(II), $[Pd(mpo)_2]$, éste fue sintetizado por reacción de una mezcla de cloruro de paladio y *N*-óxido de 2-mercaptopiridina en MeOH/MeCN, con agitación durante dos horas a temperatura ambiente. El precipitado se recristaliza en DMF obteniéndose cristales de color marrón [33]. El compuesto fue caracterizado por difracción de rayos X en monocristal, espectroscopías IR, Raman, 1H y ^{13}C RMN, y técnicas de ESI-MS. En el compuesto el átomo de paladio se encuentra en un entorno cuadrado plano (Figura 17). La distancia promedio Pd-O es de 2.043 Å. Este complejo también fue sintetizado partiendo de 2,2'-ditiobis(*N*-óxido de piridina) (dtpo) y metóxido de sodio (NaOMe) con el mismo precursor de Pd. También la reacción del complejo de níquel con mpo, $[Ni(mpo)_2]$, con $[Pd(COD)Cl_2]$ (COD=1,5-ciclooctanedieno) llevó a la formación de $[Pd(mpo)_2]$.

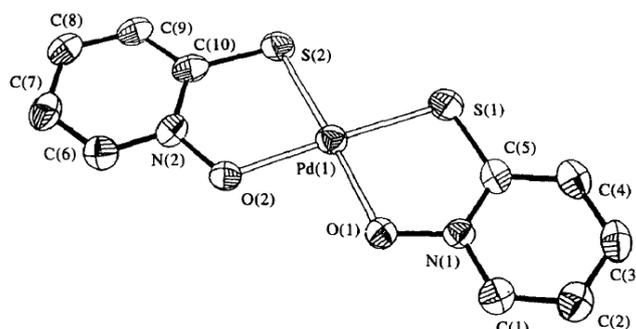


Figura 17. Estructura cristalina del compuesto $[Pd(mpo)_2]$

El complejo análogo de Pt(II), $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$, se obtuvo agregando a una solución acuosa de la sal sódica del ligando una solución de K_2PtCl_4 en metanol y refluendo durante 6 horas. Durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis se resolvió la estructura cristalina de este compuesto pero casi contemporáneamente la misma fue resuelta y publicada por otros autores (Figura 18) [34]. Esta estructura se analizará en detalle al discutir los resultados obtenidos en la siguiente sección de este capítulo.

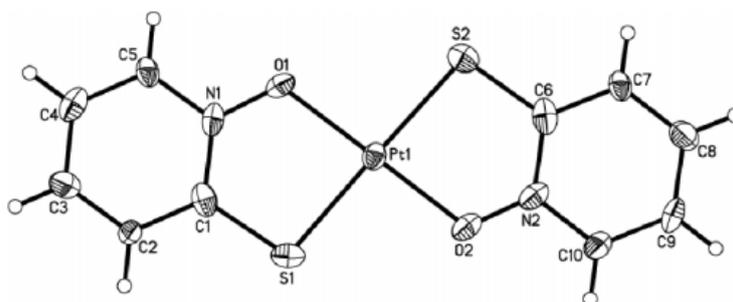


Figura 18. Diagrama que muestra la estructura molecular del complejo $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$

5.2- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se indicó al delinear la propuesta de este Trabajo de Tesis, un aspecto de la misma involucra el desarrollo y/o estudio detallado de compuestos metálicos con el ligando bioactivo *N*-óxido de 2-mercapto piridina. Si bien el énfasis inicial se puso en complejos análogos de Pd y Pt con este ligando, también se incluyó el trabajo con Au, metal que forma parte junto con Ru, Os, Rh, Pd y Pt de un grupo de metales con una gran importancia biológica y potencialidad terapéutica. Este aspecto fue fundamentado en el capítulo introductorio de este Trabajo de Tesis. También, se trabajó con el compuesto de V con este ligando dado que una estrategia actual en el desarrollo de fármacos involucra la evaluación de fármacos ya utilizados con otra finalidad terapéutica o incluso la evaluación de compuestos bioactivos desarrollados con otros fines, en este caso tratamiento de la diabetes, como potenciales fármacos

para el tratamiento de otras enfermedades. Esta estrategia permitiría descubrir nuevos agentes terapéuticos con menores costos de desarrollo [35].

5.2.1- SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

Los complejos de Pd(II), Pt(II) y Au(I) con *N*-óxido de 2-mercaptopiridina fueron sintetizados como se indicó en el capítulo 3. Para la síntesis de los complejos de Pd y Pt se realizaron modificaciones a las técnicas sintéticas originales. Se obtuvieron rendimientos aceptables para las síntesis indicadas: 22,8 mg, 21%, para [Pd(mpo)₂]; 11,2 mg, 32% para [Pt(mpo)₂] y 27,1 mg, 23% para [Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂]. Para el complejo de Au: PF= 224-226°C; $\lambda_{\max}(\text{DMSO})/\text{nm}$ 264 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 8,4x10⁴); $\Lambda_{\text{M}}(\text{DMSO})$ 0,58 ohm⁻¹cm²mol⁻¹. El valor de conductividad molar obtenido para soluciones del complejo de Au en DMSO demuestra la naturaleza no cargada del mismo. Las soluciones de los complejos de Pt y Pd tampoco conducen la electricidad. Es de resaltar que se obtiene un complejo nuevo, no reportado previamente, de Au(I). El complejo de vanadio [VO(mpo)₂] fue sintetizado con alto rendimiento según la técnica descrita previamente (80 %).

5.2.2- CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

5.2.2.1- Análisis elemental de los elementos livianos

Los resultados del análisis elemental de C, H y N se muestran en la Tabla 1. Las fórmulas propuestas para los complejos de Pd, Pt y Au son C₁₀H₈N₂O₂S₂Pd, C₁₀H₈N₂O₂S₂Pt y C₄₆H₃₈N₂O₂P₂S₂Au₂, respectivamente.

Tabla 1. Resultados del análisis elemental de C, H y N para los complejos de Pd, Pt, Au y V con mpo (%).

	[Pd(mpo) ₂]		[Pt(mpo) ₂]		[Au ₂ (mpo) ₂ (PPh ₃) ₂]		[VO(mpo) ₂]	
	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.
C	33,5	33,4	26,9	26,9	47,2	47,0	37,7	37,6
H	2,2	1,9	1,80	1,72	3,30	3,10	2,51	2,48
N	7,8	7,9	6,26	6,10	2,40	2,50	8,80	8,54

Calc.: calculado; Exp.: experimental

Los resultados experimentales están de acuerdo con las fórmulas propuestas. El análisis elemental para el complejo de Au está de acuerdo con la relación molar 1:1:1 (Au-mpo-PPh₃).

5.2.2.2- Estudios de espectrometría de masas ESI-MS

Los resultados de los estudios de espectrometría de masas (ESI-MS) para el complejo de Au se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Relación *m/z* de los principales picos del ESI-MS para el complejo de Au.

especie	<i>m/z</i>
(M-mpo) ⁺	1044
(M-2mpo-H-Au-PPh ₃) ⁺	459

El espectro de masas ESI-MS mostró un pico de intensidad moderada correspondiente a la especie (M-mpo)⁺ en *m/z* 1044, demostrando con este resultado la existencia del dímero. En consecuencia la fórmula dimérica propuesta [Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂] estaría de acuerdo con estos resultados.

5.2.2.3- Estudios de espectroscopía IR y Raman

Para todos los complejos se registraron los espectros IR en el rango 4000-400 y 500-200 cm⁻¹ en pastillas de KBr y CsI, respectivamente, o en el rango 4000-

200 cm^{-1} en Csl. En las figuras 19-22 se muestran los espectros IR de la sal sódica del ligando mpo y los complejos de Pd, Pt y Au.

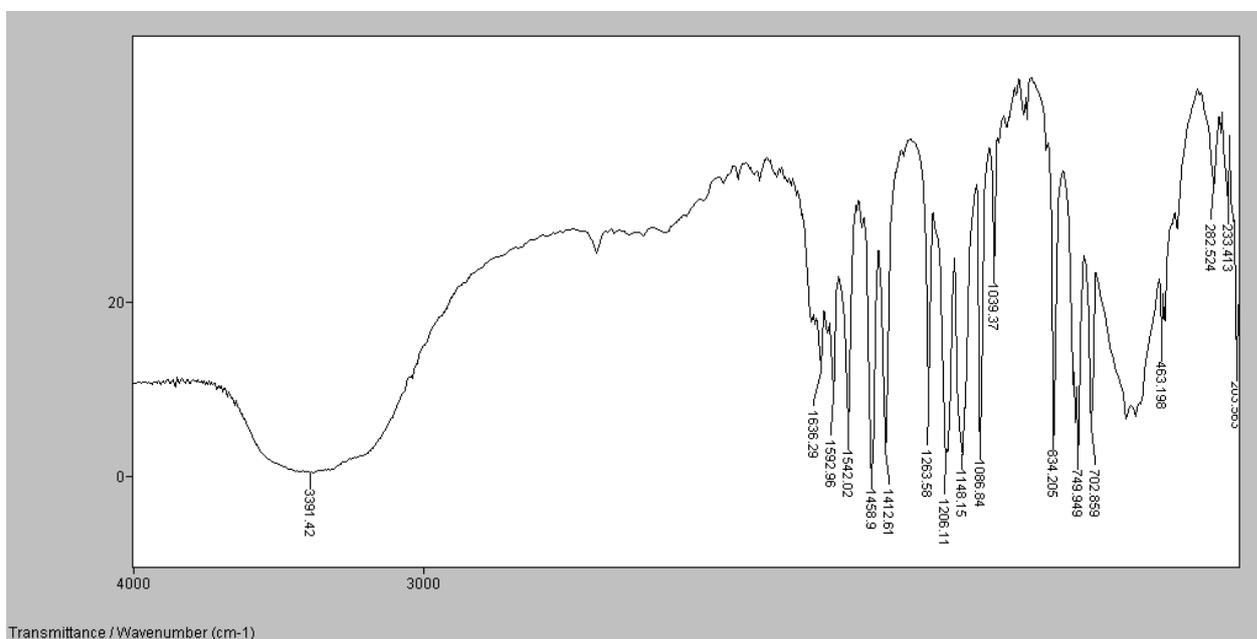


Figura 19. Espectro IR del ligando (Na mpo) en el rango 4000-200 cm^{-1} .

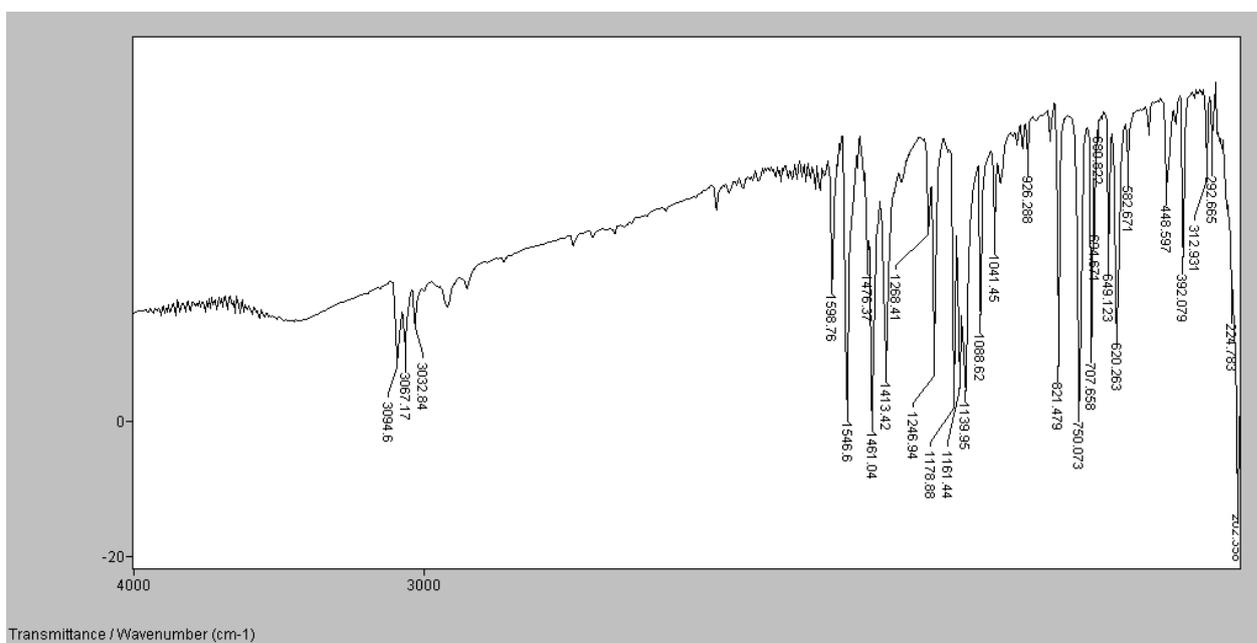


Figura 20. Espectro IR de $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$ en el rango 4000-200 cm^{-1} .

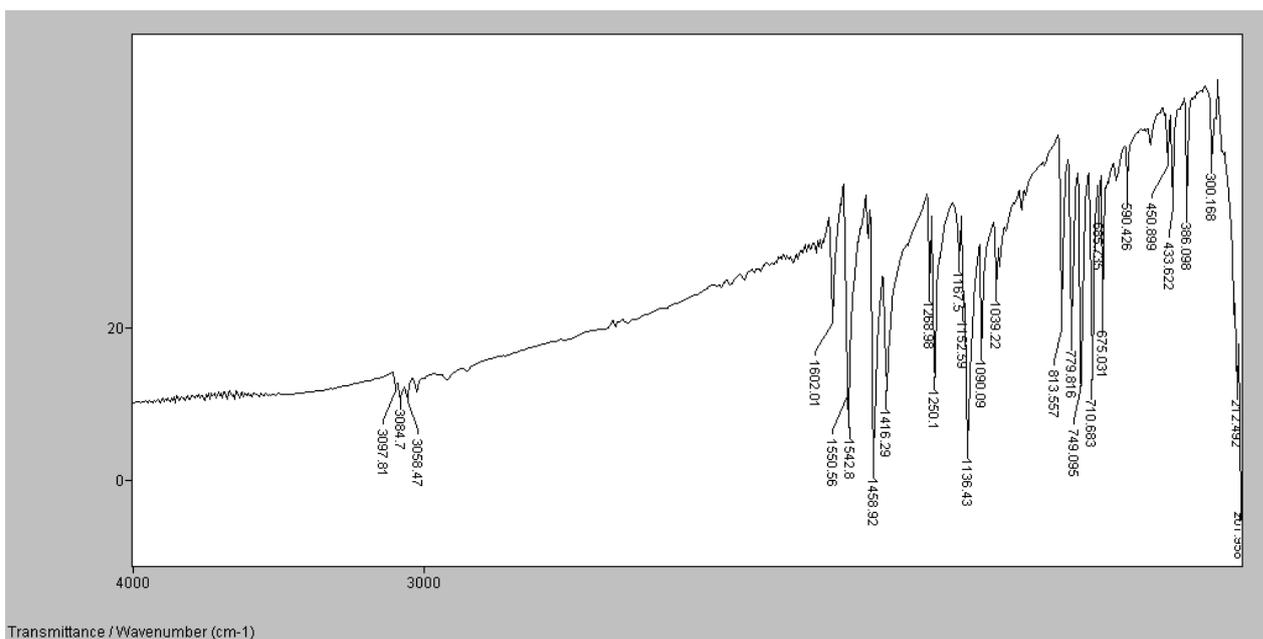


Figura 21. Espectro IR de $[Pt(mpo)_2]$ en el rango 4000-200 cm^{-1} .

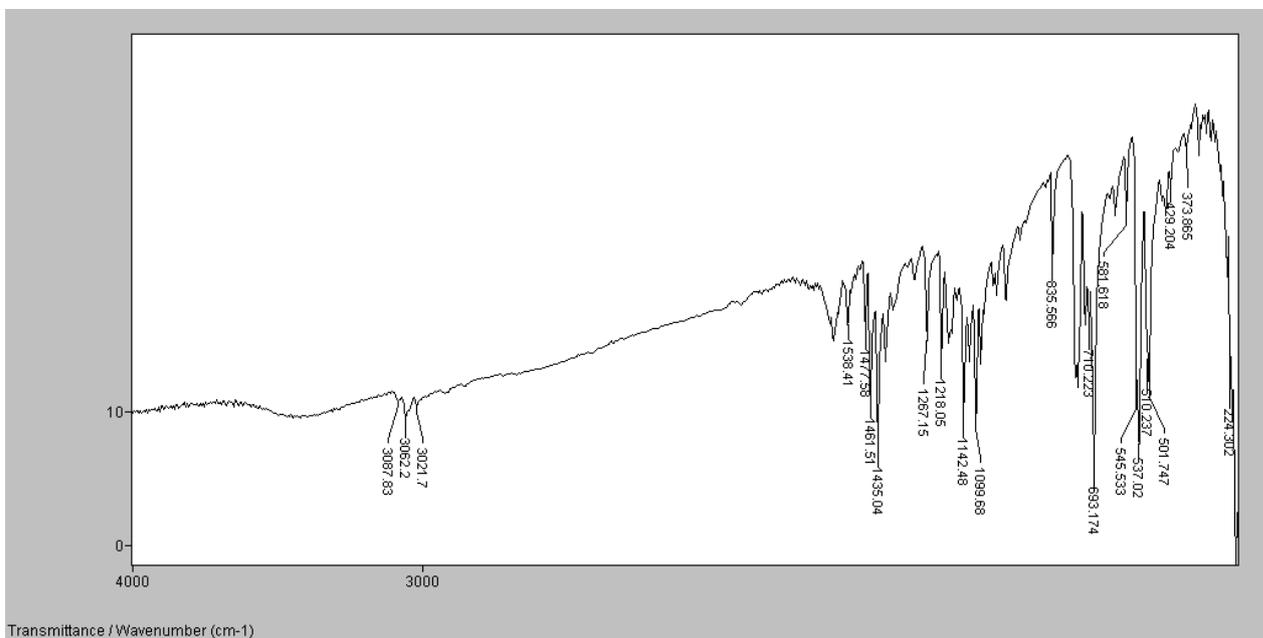


Figura 22. Espectro IR de $[Au_{12}(mpo)_2(PPh_3)_2]$ en el rango 4000-200 cm^{-1} .

Para los complejos de Pd y Pt y la sal sódica del ligando mpo también se registraron los espectros Raman (Figuras 23-25).

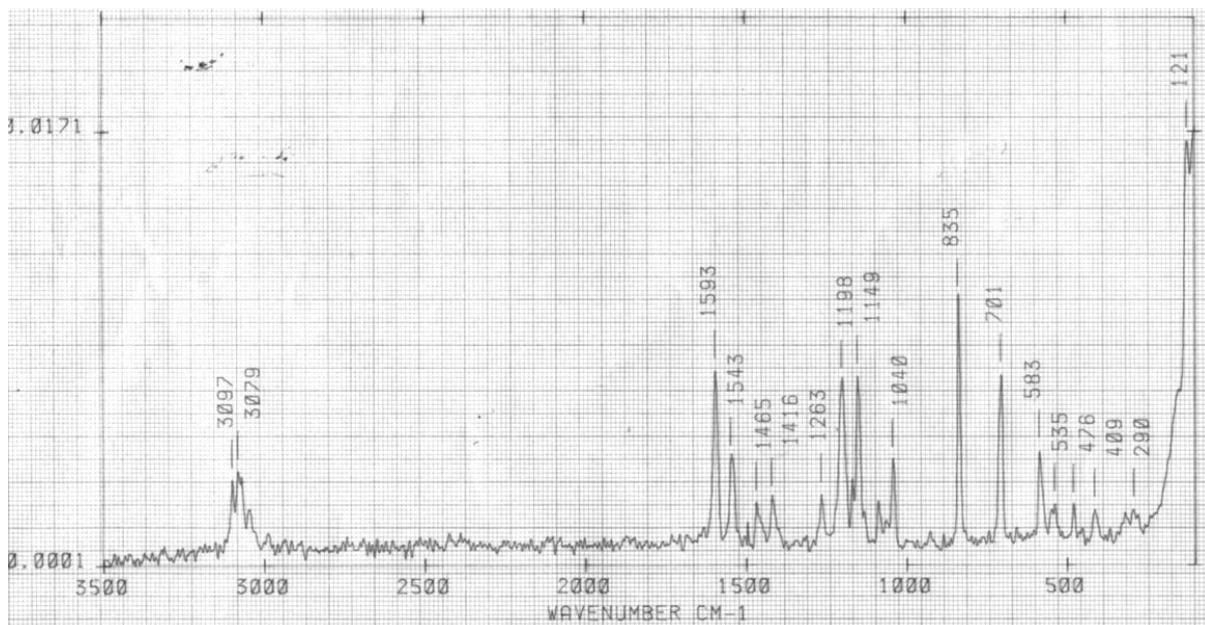


Figura 23. Espectro Raman de la sal sódica de mpo en el rango 3500-100 cm^{-1} .

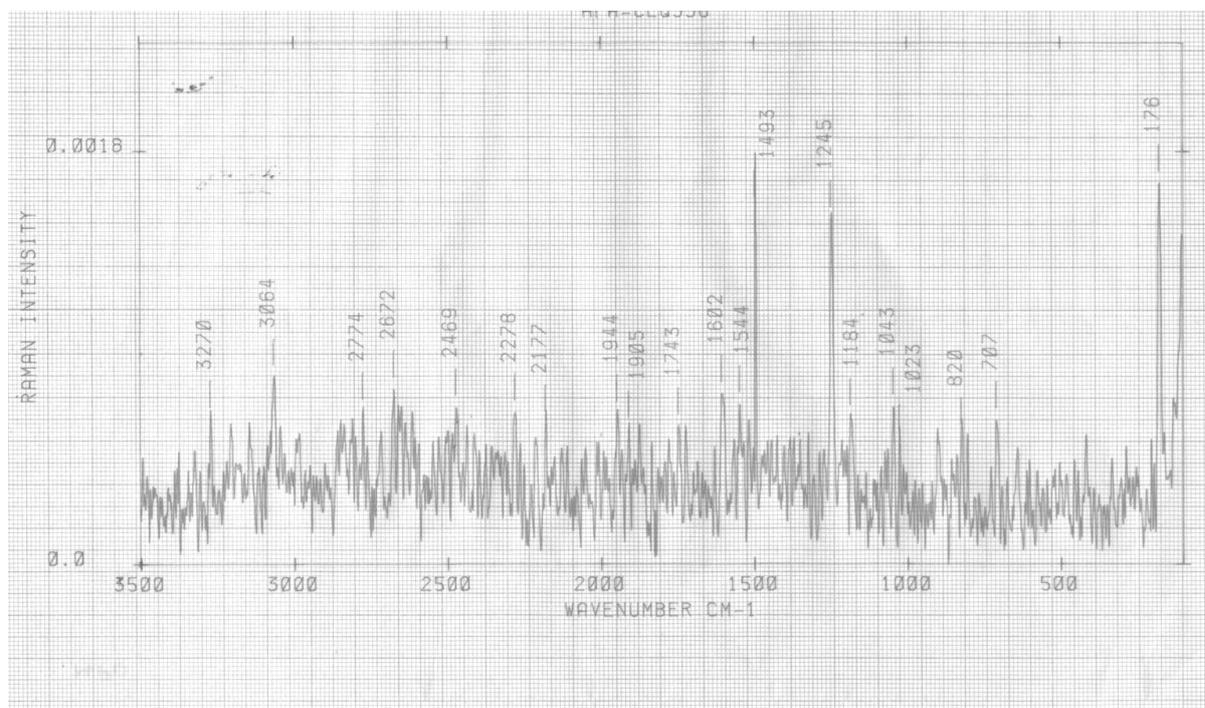


Figura 24. Espectro Raman de $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$ en el rango 3500-100 cm^{-1} .

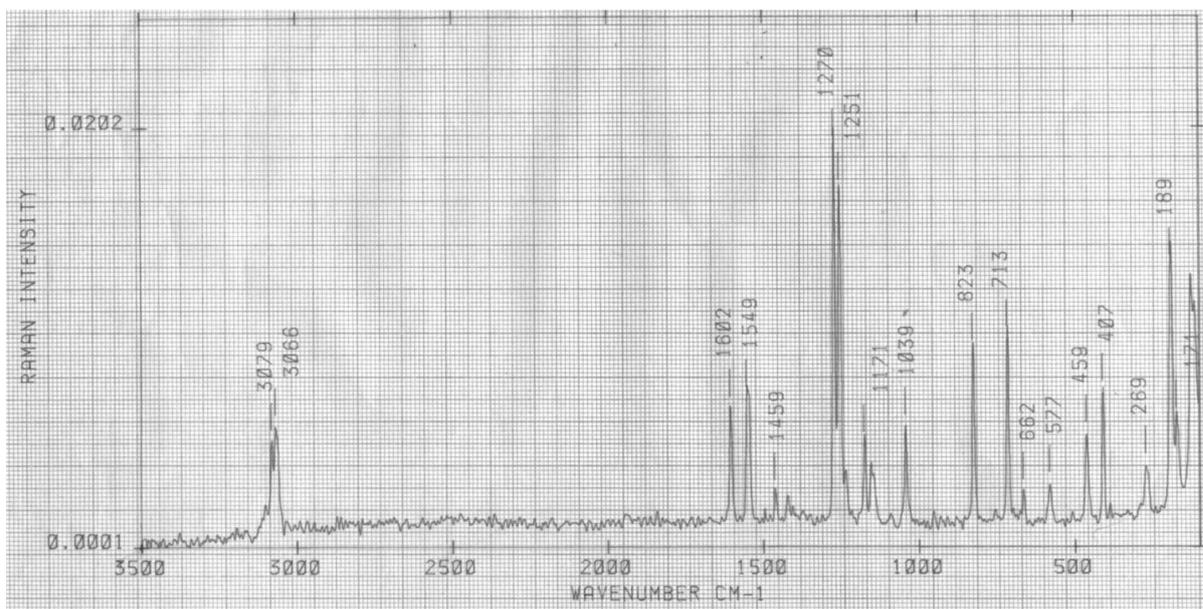


Figura 25. Espectro Raman de $[Pt(mpo)_2]$ en el rango 3500-100 cm^{-1} .

Analizando los espectros se realizó la asignación tentativa de las bandas características de ligando y de los tres complejos [31, 36, 37] (Tabla 3).

Tabla 3. Asignación de las bandas de los espectros IR y Raman para los complejos de Pd, Pt y Au de mpo.

Asignación	Na mpo		$[Pd(mpo)_2]$		$[Pt(mpo)_2]$		$[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$
	IR	R	IR	R	IR	R	IR
$\nu(CH)$	3068 m 3043 m	3097 m 3079 m	3095 m 3067 m 3033 m	3064 d	3098 m 3085 m 3059 m	3079 m 3066 m	3088 3062 3022
$\nu(C=C)$	1541 i	1543 i	1547 mi	1544 m	1551 mi	1549 i	1538
$\nu(N-O)$	1206 i	1198 i	1247 i	1245 i	1250 i	1251 i	1218
$\nu(P-fenil)$	-	-	-	-	-	-	1099
$\delta(N-O)$	834 i	835 i	821 i	820 m	814 m	823 i	835
$\nu(C-S)$	702 i	701 i	708 i /695h	707 m	711i /686 h	713 i	710/693
$\nu(Au-P)$	-	-	-	-	-	-	511 502
$\nu(M-O)$	-	-	442 d	-	434 d	-	429
$\nu(M-S)$	-	-	392 d 313 d	-	386 d 300 d	-	374

v: estiramiento; δ : deformación; i: intensa, m: media; d: débil; mi: muy intensa; h: hombro

Para los complejos de Pd, Pt y Au las bandas correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{N-O})$ y $\nu(\text{C-S})$ fueron asignadas teniendo en cuenta asignaciones para esas mismas bandas de compuestos relacionados conteniendo *N*-óxido o tiocarbonilo [36-41]. Las bandas $\nu(\text{N-O})$, $\nu(\text{C-S})$ y $\delta(\text{N-O})$ se corren luego de la coordinación al metal, lo que está de acuerdo con la coordinación del ligando de forma bidentada a través del O del grupo *N*-óxido y del S [33,34,42]. Además, esta coordinación se confirma en las estructuras cristalinas de los complejos de Pd y Pt. Para el complejo de Au se observa también la banda $\nu(\text{P-fenil})$, característica del ligando trifenílfosfina [43]. Esta vibración no se ve muy afectada como resultado de la coordinación [44]. También fueron asignadas las bandas en la región de bajos número de onda (450-200 cm^{-1}) correspondientes a los modos de estiramiento metal-ligando, $\nu(\text{M-O})$ y $\nu(\text{M-S})$, de los complejos de Pd y Pt y $\nu(\text{Au-O})$, $\nu(\text{Au-S})$ y $\nu(\text{Au-P})$ del complejo de Au [45,46].

5.2.2.4- Estudios de resonancia magnética nuclear

Para el ligando libre y los complejos de Pd y Pt se registraron los espectros ^1H RMN y ^{13}C RMN (Figuras 26-30).

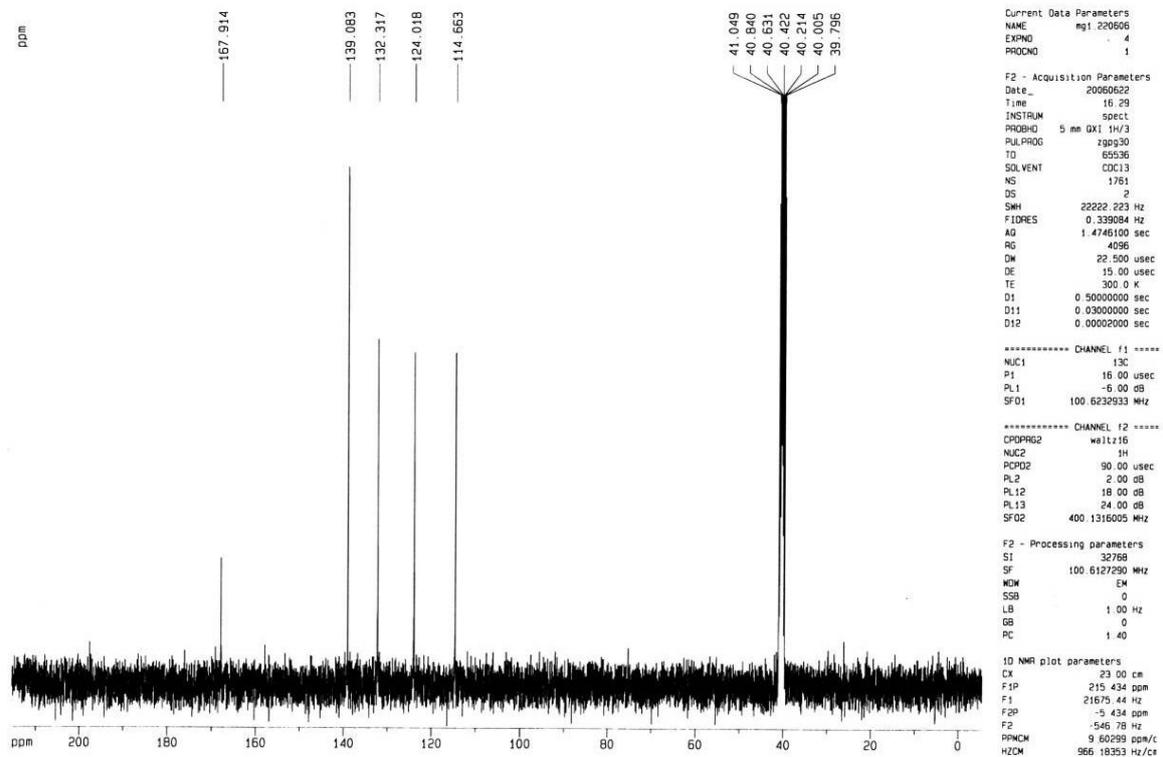
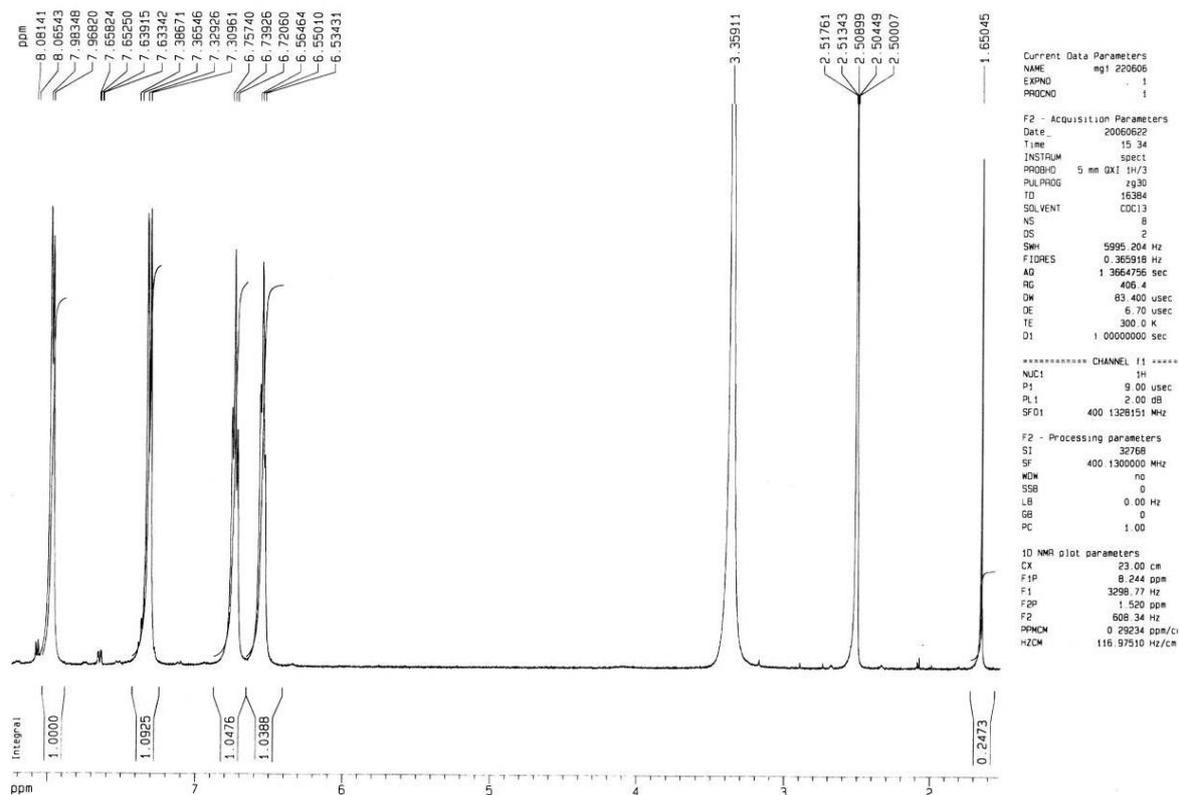


Figura 26. Espectros RMN de Na mpo: arriba: ^1H RMN y abajo: ^{13}C RMN.

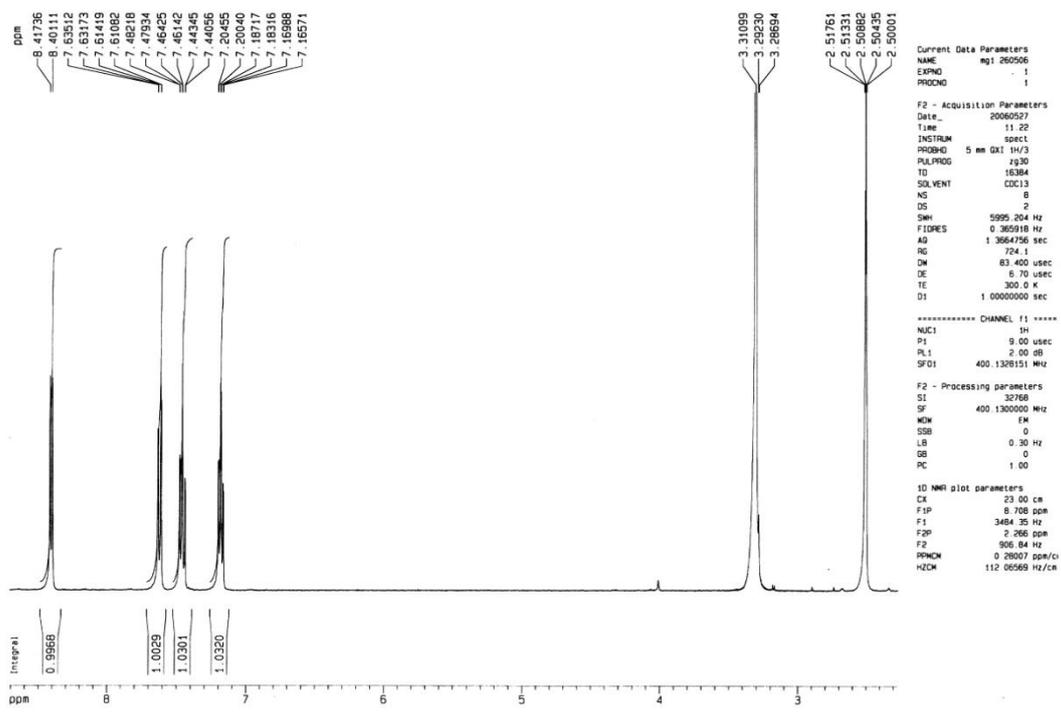


Figura 27. Espectro ¹H RMN de [Pd(mpo)₂].

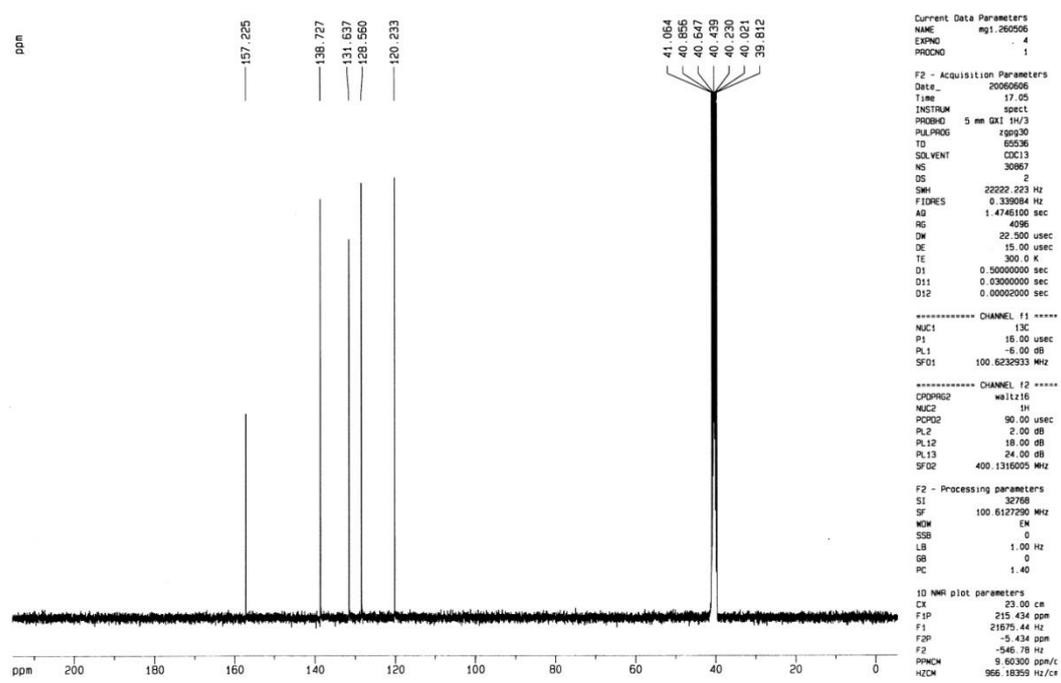


Figura 28. Espectro ¹³C RMN de [Pd(mpo)₂].

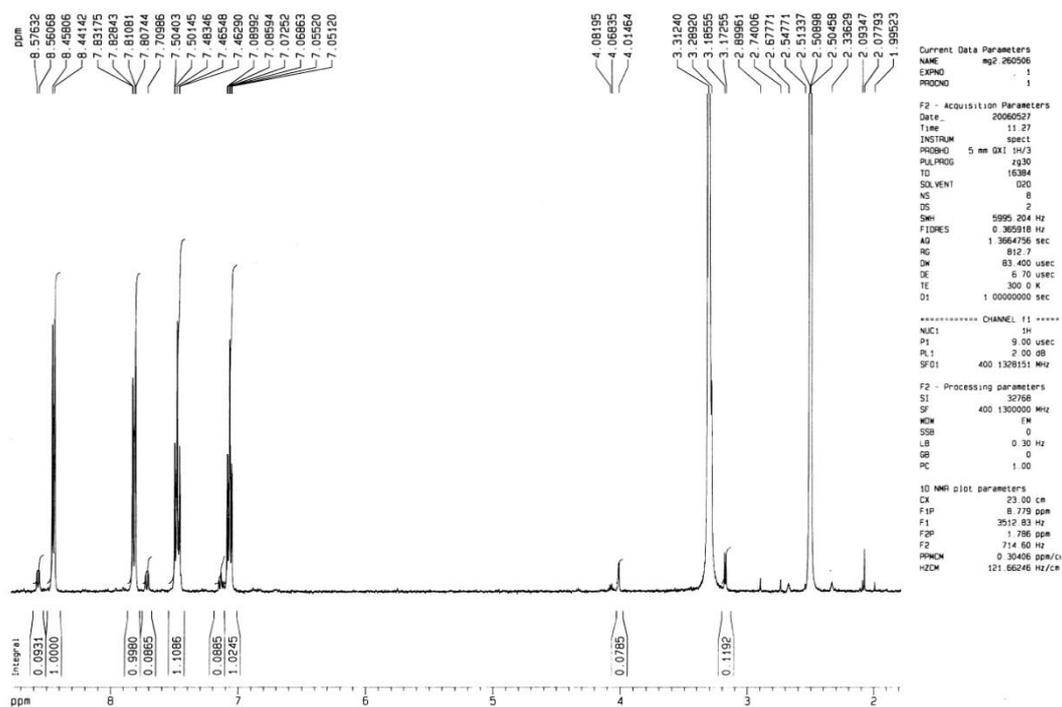


Figura 29. Espectro ^1H RMN de $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$.

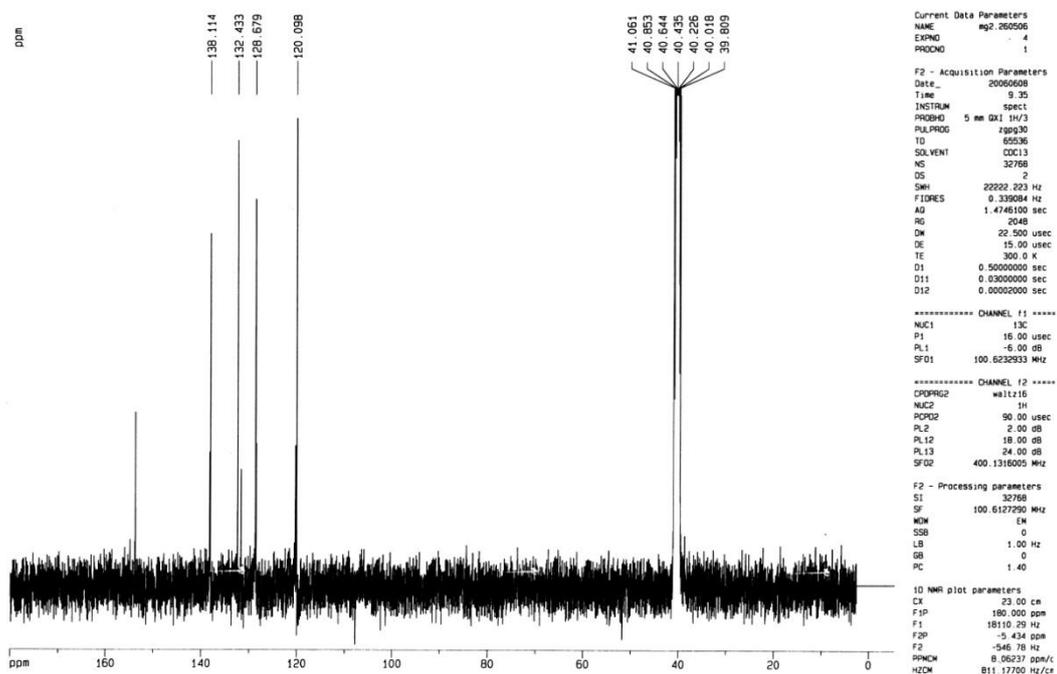


Figura 30. Espectro ^{13}C RMN de $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$.

La Tabla 4 muestra los desplazamientos químicos (δ) en ppm de las señales de los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN del ligando y de los complejos de Pd y Pt, y también la diferencia de desplazamientos químicos entre ellos ($\Delta\delta$). En la tabla se muestra el esquema de numeración.

Tabla 4. Valores de desplazamientos químicos en ppm para los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN del ligando mpo y de los complejos de Pd y Pt.

Protón	δ_{H} (multiplicidad)		$\Delta\delta^a$	Carbono	δ_{C}		$\Delta\delta^a$
	Ligando	Complejo			Ligando	Complejo	
-	-	-	-	1	167,91	157,23	- 10,68
2	7,32 (d)	7,62 (d)	0,30	2	132,32	128,56	- 3,76
3	6,74 (t)	7,46 (t)	0,72	3	124,02	131,64	7,62
4	6,55 (t)	7,18 (t)	0,63	4	114,66	120,23	5,57
5	7,97 (d)	8,41 (d)	0,44	5	139,04	138,73	-0,31

Protón	δ_{H}	$\Delta\delta^a$	Carbono	δ_{C}	$\Delta\delta^a$
	(multiplicidad)			Complejo	
-	-	-	1	154,00	-13,91
2	7,82 (d)	0,50	2	128,68	-3,64
3	7,48 (t)	0,74	3	132,43	8,41
4	7,07 (t)	0,52	4	120,10	5,44
5	8,45 (d)	0,48	5	138,11	-0,93

^a $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{Ligando}})$. multiplicidad: d: doblete, t: triplete.

Las integraciones y multiplicidades de las señales están de acuerdo con la fórmula y estructura propuesta. Los experimentos bidimensionales HMQC y HMBC (Figuras 31-35) permitieron realizar la asignación de todas las señales del ligando libre y de los complejos metálicos.

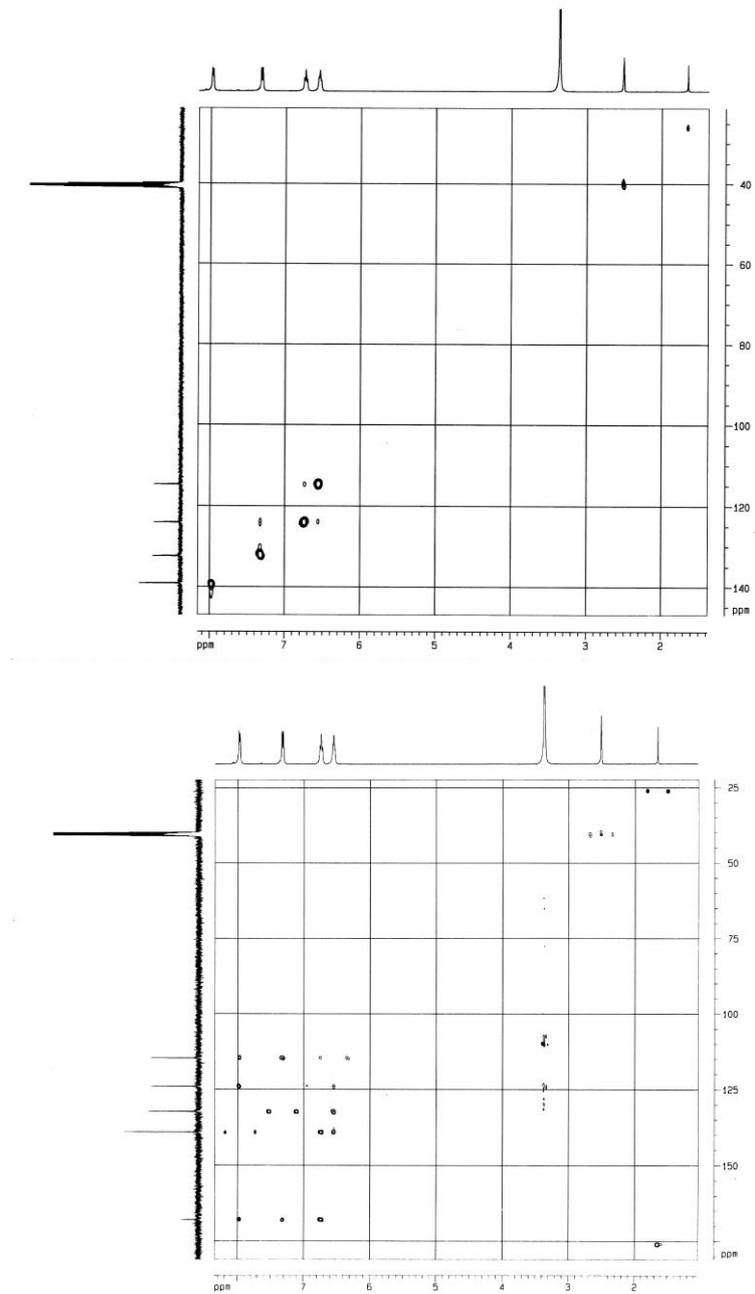


Figura 31. Espectro HMQC (arriba) y HMBC (abajo) de Na mpo.

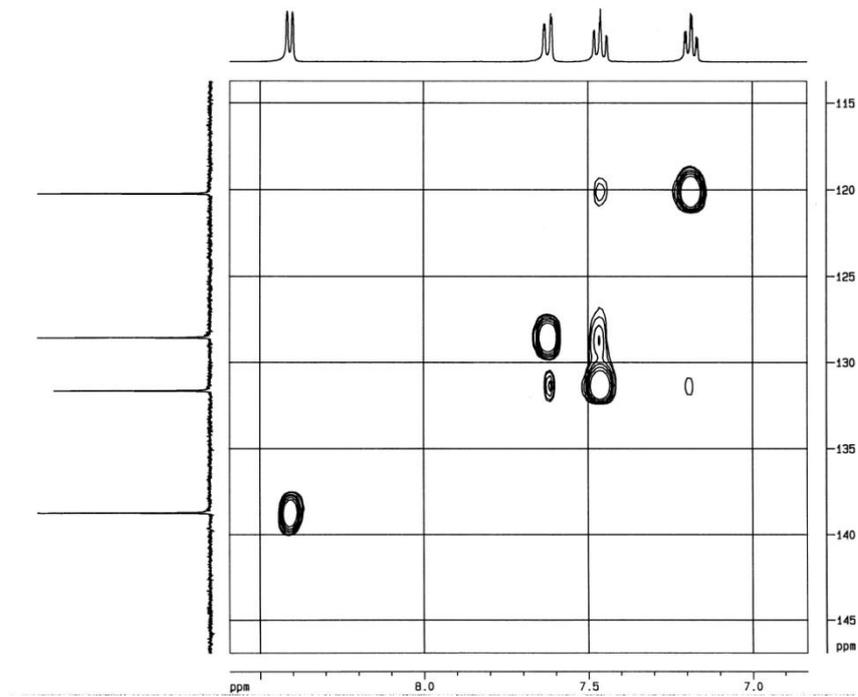


Figura 32. Espectro HMQC de $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$.

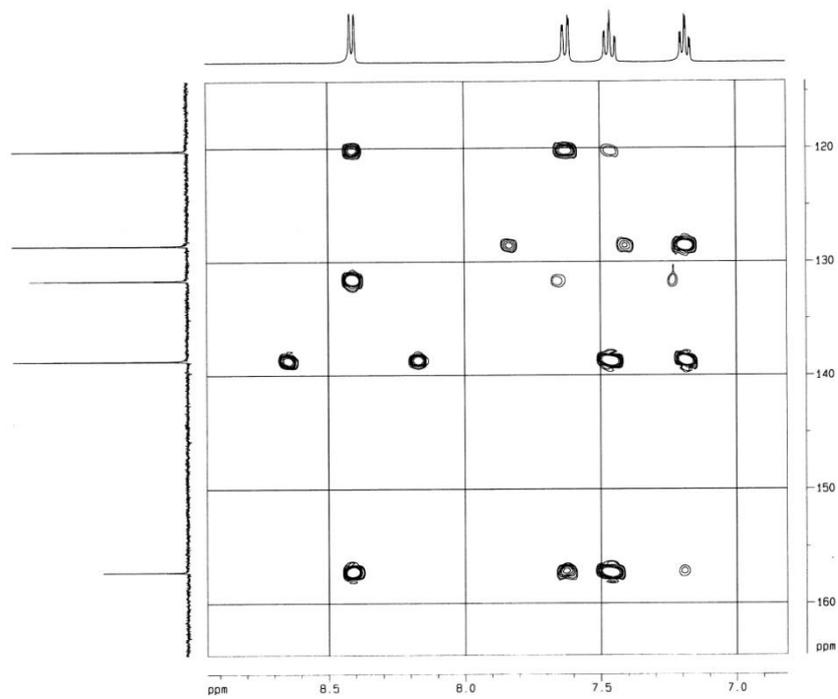


Figura 33. Espectro HMBC de $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$.

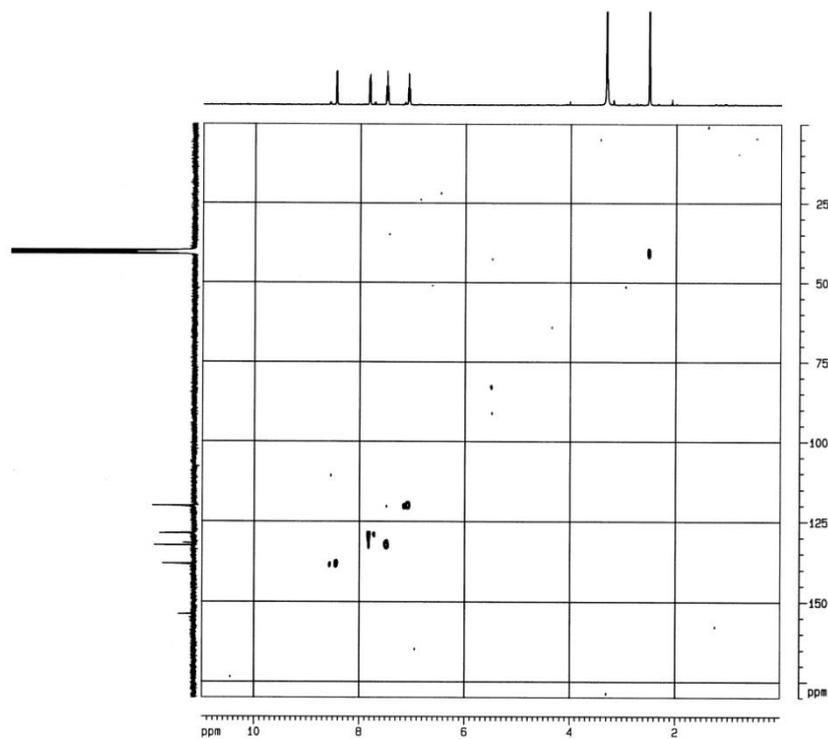


Figura 34. Espectro HMQC de $[Pt(mpo)_2]$.

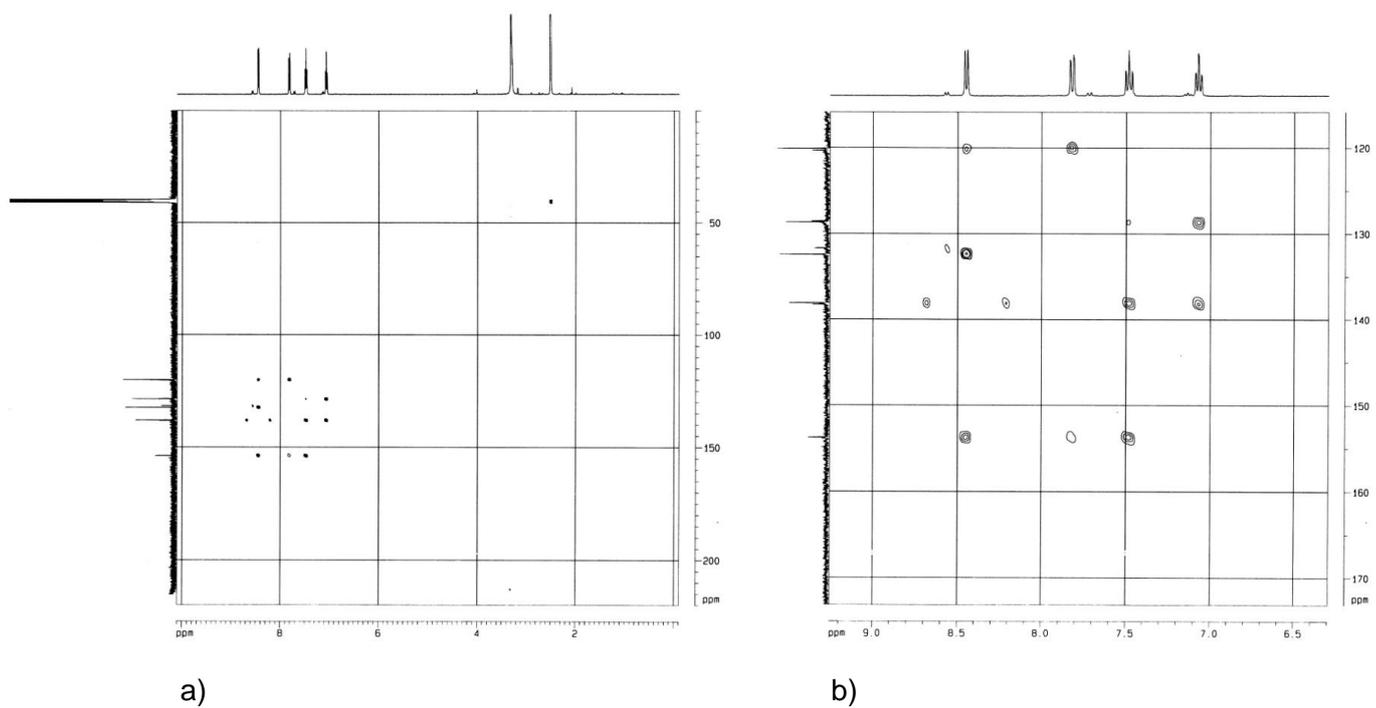
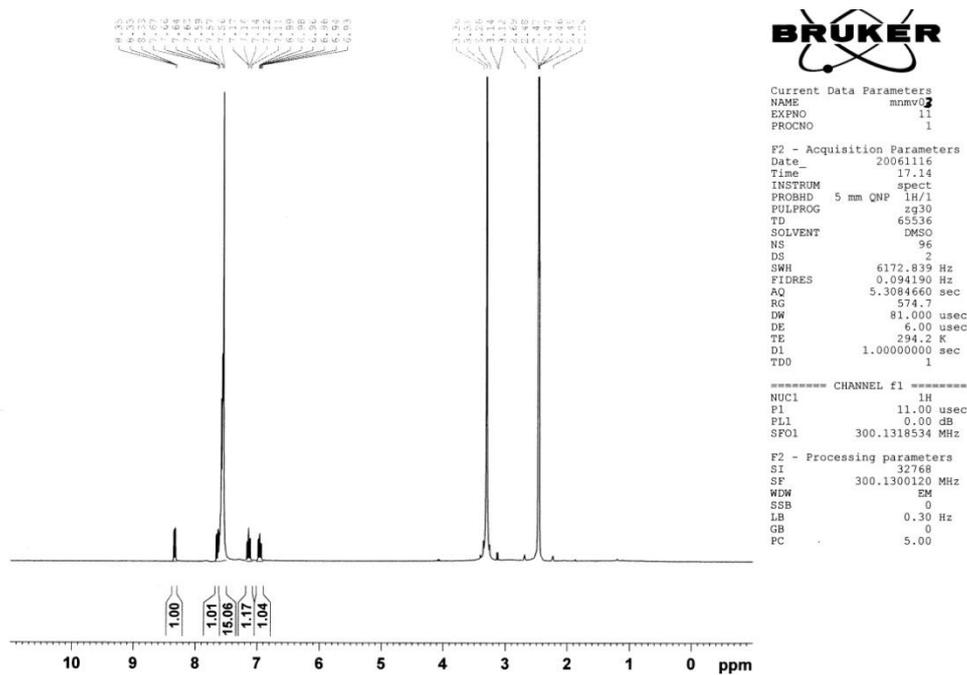


Figura 35. a) Espectro HMBC de $[Pt(mpo)_2]$; b) ampliación del sector de interés.

Se observó un efecto de desapantallamiento para todos los protones como resultado de un retiro electrónico causado por la coordinación del ligando a los cationes Pd(II) y Pt(II). Sin embargo, para los protones 2 y 5 (protones que están cerca de los átomos de la coordinación) solo se observó un ligero efecto de desapantallamiento. Este resultado estaría de acuerdo con un efecto protector debido a la presencia de la entidad vecina O-Metal-S. Para los espectros de ^{13}C RMN, como resultado de la coordinación hay un cambio del desplazamiento químico del carbono 1, de 168 a 157 y 154 ppm para los complejos de Pd y Pt, respectivamente [33]. Los experimentos HMQC y HMBC permitieron realizar la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos 2 y 4 en el ligando y en los complejos.

Para el complejo de Au se registró únicamente el espectro ^1H RMN (Figura 36).



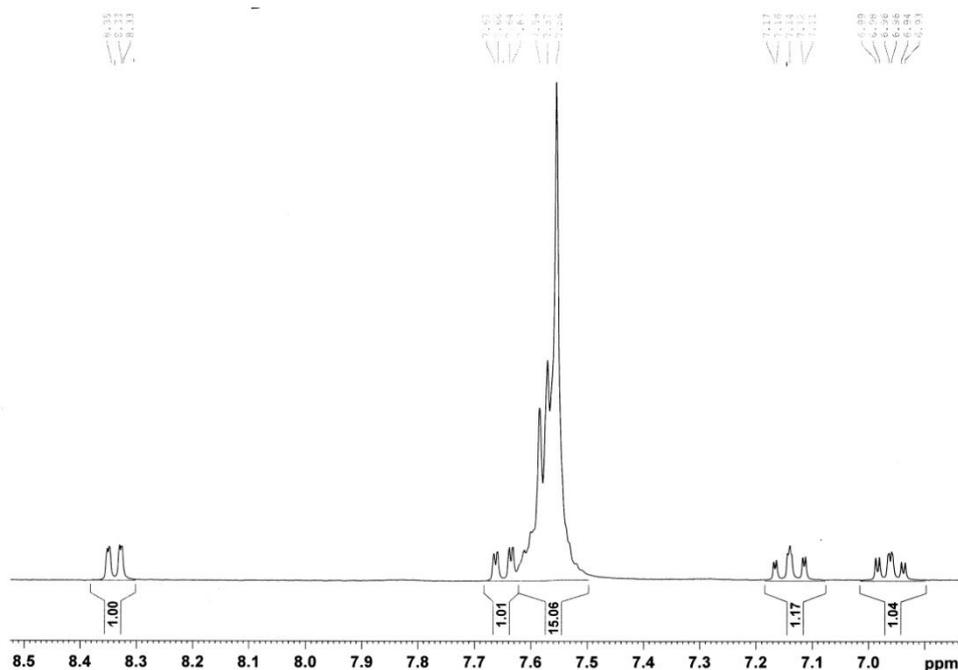


Figura 36. Espectro ^1H RMN de $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ en el rango de 0-10ppm (arriba) y en el rango de 6,9-8,5 ppm (abajo).

En la Tabla 5 se muestran los desplazamientos químicos en el experimento de ^1H RMN del ligando y del complejo y también la diferencia de desplazamientos químicos entre ellos ($\Delta\delta$).

Tabla 5. Desplazamientos químicos en ppm para el espectro ^1H RMN del ligando mpo y del complejo $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$.

Protón	δ_{H} (multiplicidad)		$\Delta\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
	Na mpo	$[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$	
2	7,32 (d)	7,65 (d)	0,33
3	6,74 (t)	7,14 (t)	0,40
4	6,55 (t)	6,96 (t)	0,41
5	7,97 (d)	8,34 (d)	0,37
PPh_3^{b}	-	7,56 (bt, Horto) 7,57 (bt, Hmeta) 7,59 (bt, Hpara)	0,26 0,27 0,29

^a $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{Ligando}})$; $\delta_{\text{H}(\text{PPh}_3)} = 7,30$ (Horto, Hmeta, Hpara) ppm; Integración: $\text{H}_2:\text{H}_3:\text{H}_4:\text{H}_5:\text{H}_{\text{PPh}_3}=1:1:1:1:15$; multiplicidad: d: doblete, t: triplete, bt: triplete ancho

Las integraciones y multiplicidad de las señales están de acuerdo con la fórmula y estructura propuesta. El efecto de desapantallamiento debido al átomo metálico se puede comprobar en todos los protones, ya que provoca un corrimiento de las señales a δ más altos. El mismo efecto se observa en las señales del ligando trifenilfosfina (trifenilfosfina libre δ_H 7,30 ppm) [47]. Sin embargo, para los protones 2 y 5 (protones que están cerca de los átomos de la coordinación) solo se observó un ligero efecto de desapantallamiento, debido al efecto protector por la presencia de la entidad vecina O-Metal-S [42].

Para el complejo de Au se registró también el espectro RMN de ^{31}P (Figura 37).

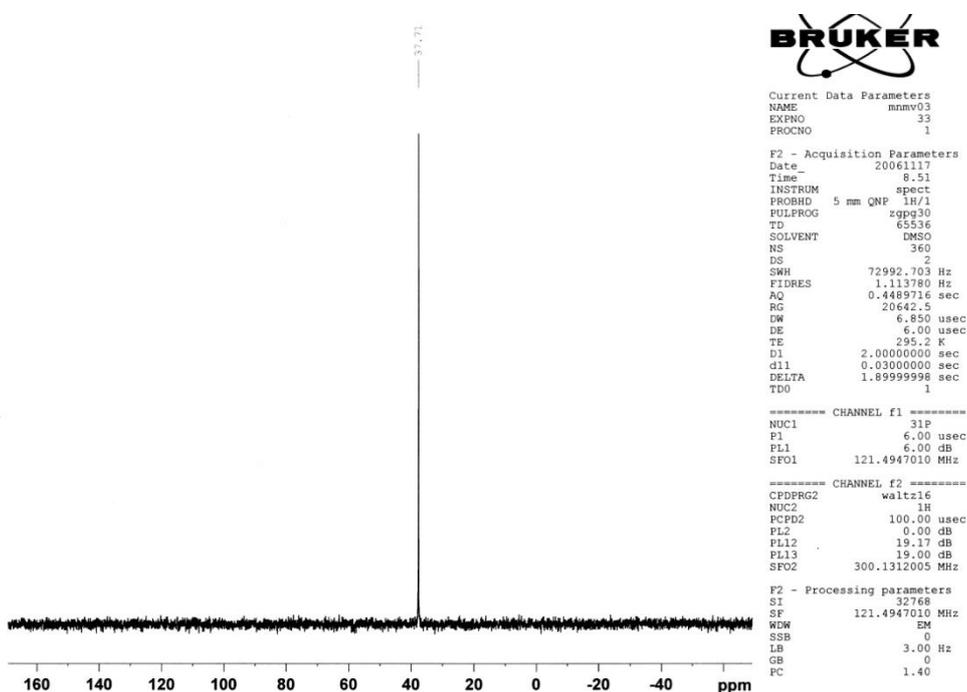


Figura 37. Espectro ^{31}P RMN de $[\text{Au}_{12}(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$.

El experimento de RMN de ^{31}P mostró una señal a 37,71 ppm. El corrimiento de la señal a 33,90 ppm, que muestra el precursor $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, a 37,71 ppm en el complejo muestra el efecto de la coordinación en el valor del desplazamiento químico para el ^{31}P . La presencia de una única señal en los experimentos de ^{31}P RMN y las integraciones en los experimentos de ^1H RMN de los protones de la trifenilfosfina estarían de acuerdo con una relación trifenilfosfina-ligando 1:1, y con la existencia de trifenilfosfinas no distinguibles

para el complejo. Este hecho está de acuerdo con la fórmula y estructura propuestas (Figura 38).

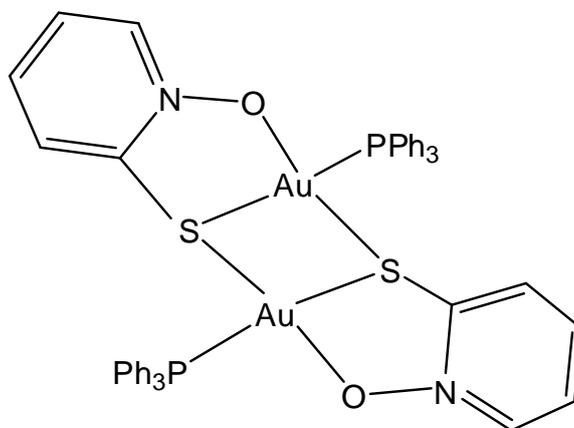


Figura 38. Estructura tentativa propuesta para $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$.

Los experimentos preliminares realizados en el sólido, no muestran fotoluminiscencia en la región UV/vis, lo que permitió postular una estructura dimérica sin un enlace Au-Au [48,49]. De acuerdo a la caracterización fisicoquímica realizada, la estructura tentativa de la Figura 38 sería la propuesta para este complejo de Au.

5.2.2.5- Estudios de estabilidad en DMSO por RMN

Se determinó la estabilidad en DMSO a 298 K durante 24 horas de los complejos de Pd y Pt por seguimiento utilizando ^1H RMN. También se estudió la estabilidad del complejo de Au a 298 K en DMSO durante 5 días por igual técnica. No se detectaron señales ni de DMSO coordinado ni de ligando libre. Tampoco se detectaron diferencias entre los espectros recolectados inmediatamente después de la disolución y después de mantener la solución durante el tiempo indicado. Este resultado es relevante ya que para la evaluación biológica de estos compuestos se disuelve inicialmente los sólidos en DMSO preparando soluciones concentradas que luego se incorporan a los medios biológicos necesarios.

5.2.2.6- Estudios por difracción de rayos X

Se obtuvieron monocristales del complejo $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$, adecuados para la recolección de datos por difracción de rayos X. Éstos se obtuvieron por evaporación lenta de la solución de síntesis metanol/acetonitrilo. La resolución se realizó previamente a la publicación realizada por otros autores [34].

La Tabla 6 resume los datos del cristal, los procedimientos de recolección de datos y los resultados del refinamiento. En la Tabla 7 se muestran algunas distancias y ángulos de enlace seleccionados. Los datos cristalográficos completos (lista completa de distancias y ángulos de enlace, coordenadas atómicas, parámetros de desplazamiento isotrópico, coordenadas de los átomos de hidrógeno, entre otros) se presentan en el Apéndice 1. En la Figura 39 se muestra la representación ORTEP del complejo con la numeración asignada a los átomos y los elipsoides vibratoriales al 50 % de probabilidad.

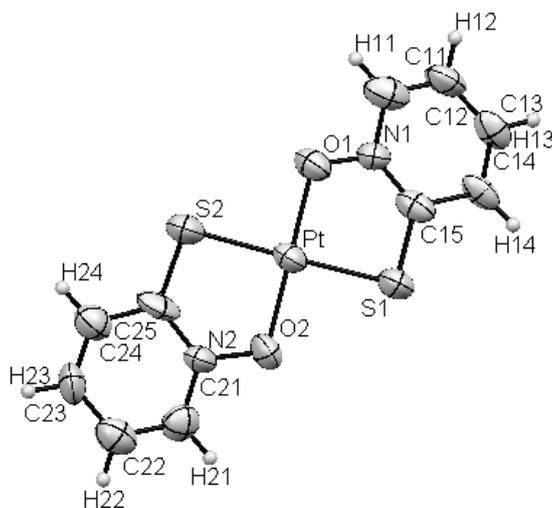


Figura 39. Representación ORTEP del complejo $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$.

Tabla 6. Datos del cristal, de la recolección de datos y del refinamiento para el complejo [Pt(mpo)₂].

Fórmula empírica	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ PtS ₂
Peso fórmula	423,37
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	1,54184 Å
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P21/c
Dimensiones de la celda unidad	a = 7,520(4) Å b = 7,944(5) Å c = 19,452 (18) α(°) = 90 β(°) = 94,89(6) Å γ(°) = 90
Volumen	1157,8(14) Å ³
Z, Densidad calculada	4; 2,429 Mg/m ³
Coeficiente de Absorción	25,917 μ (mm ⁻¹)
F(000)	784
Rango de θ para recolección de datos	4,56 a 67,96°
Rangos de índices de Miller	0 ≤ h ≤ 9, -1 ≤ k ≤ 9, -23 ≤ l ≤ 23
Reflecciones recolectadas/independientes	2621 / 2105 [R(int) = 0,1191]
Completitud a θ = 67,96	100,0 %
Método de refinamiento	matriz de mínimos cuadrados en F ²
Datos/restricciones/parámetros	2105/0/154
Bondad del ajuste en F ²	1,454
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1=0,1070, wR2=0,2811
Índices R (todos los datos)	R1=0,1175, wR2=0,3166
Mayores y menores densidades electrónicas residuales	3,409 y -6,416 eÅ ⁻³

Tabla 7. Distancias interatómicas(Å) y ángulos (°) alrededor del átomo metálico central en el complejo [Pt(mpo)₂].

Distancias de enlace		Ángulos de enlace	
Pt-O(1)	1,997(11)	O(1)-Pt-O(2)	179,4(5)
Pt-O(2)	2,031(12)	O(1)-Pt-S(2)	92,9(4)
Pt-S(2)	2,260(5)	O(2)-Pt-S(2)	86,6(3)
Pt-S(1)	2,280(5)	O(1)-Pt-S(1)	85,8(4)
		O(2)-Pt-S(1)	94,8(3)
		S(2)-Pt-S(1)	178,55(15)

El estudio de difracción de rayos X muestra que el complejo [Pt(mpo)₂] consiste en un monómero molecular discreto. El Pt(II) se encuentra coordinado en configuración *trans* a dos moléculas de mpo prácticamente coplanares (la distancia del átomo de Pt al plano determinado por los átomos donores del ligando es de 0,002 Å). Es de resaltar que en este complejo los átomos de azufre de los ligandos mpo se unen al Pt(II) en posición *trans*, lo que constituye una diferencia estructural respecto a sus análogos [M(mpo)₂], donde M = Ni(II), Pd(II) y VO(II). Las estructuras cristalinas de todos ellos muestran a los azufres de los ligandos mpo coordinados en forma *cis* al ión metálico central (Figuras 9, 16 y 17). En [Pt(mpo)₂] ambas moléculas de ligando coordinan al átomo central en forma bidentada a través del azufre [d(Pt-S) = 2,280(5) y 2,260(5) Å] y del oxígeno [d(Pt-O) = 1,997(11) y 2,031(12) Å]. Los ángulos *trans* ligando-Pt-ligando son cercanos a 180° [S-Pd-S=178,55(15)° y O-Pd-O=179,4(5)°] y los ángulos *cis* ligando-Pt-ligando se acercan al valor esperado de 90° (S-Pd-O entre 85,8 y 94,8°).

Los complejos, de estructura prácticamente plana, se ubican en la red cristalina en forma paralela generando una estructura en capas. La molécula se empaqueta en capas bidimensionales a través de interacciones intermoleculares débiles C-H...O/S (Figuras 40-42).

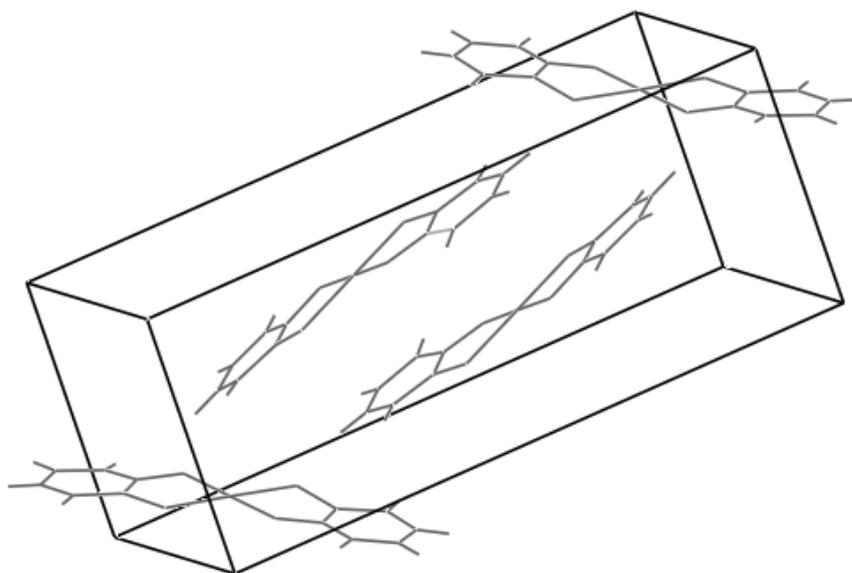


Figura 40. Empaquetamiento en capas bidimensionales en el cristal de $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$.

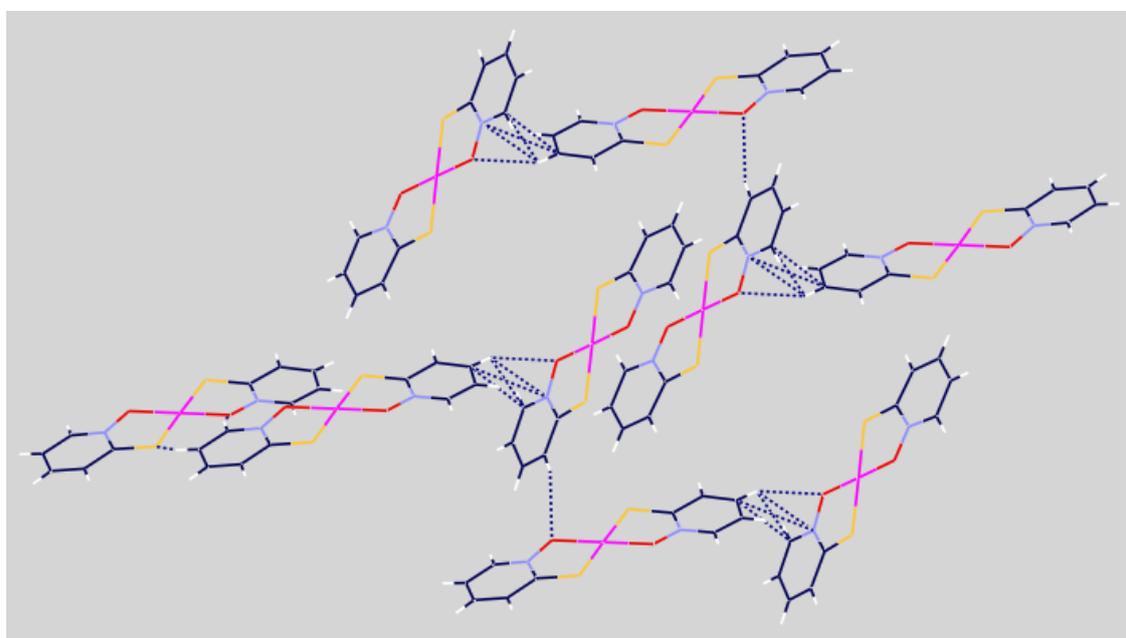


Figura 41. Figura mostrando en línea punteada (---) algunas de las interacciones intermoleculares débiles $\text{C-H}\cdots\text{O/S}$ presentes en el cristal de $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$.

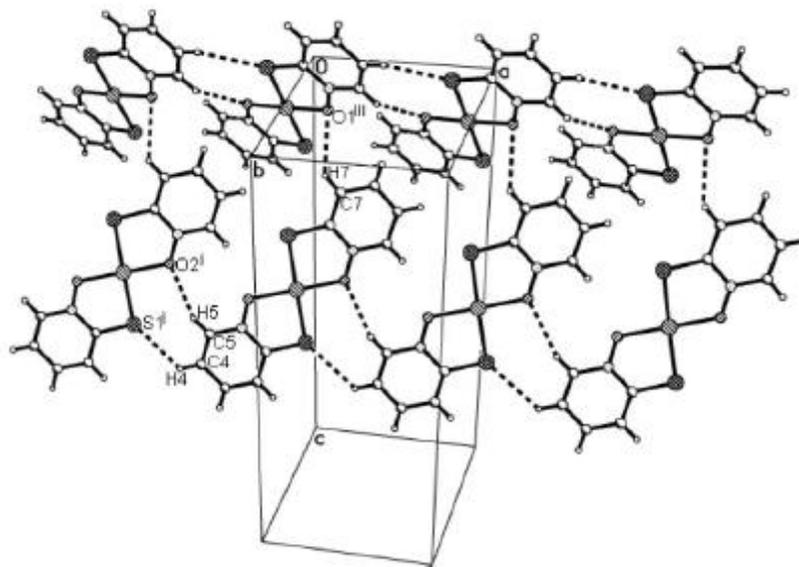


Figura 42. Interacciones débiles intermoleculares en el cristal de [Pt(mpo)₂], indicadas en línea punteada (---) según [34].

5.2.2.7- Comportamiento electroquímico

Se estudió el comportamiento electroquímico de soluciones en DMF de los complejos de Pd y Pt por voltametría cíclica usando un electrodo de carbón vítreo. En la Figura 43 se comparan los voltamogramas cíclicos obtenidos a una velocidad de barrido de 0,05 V s⁻¹.

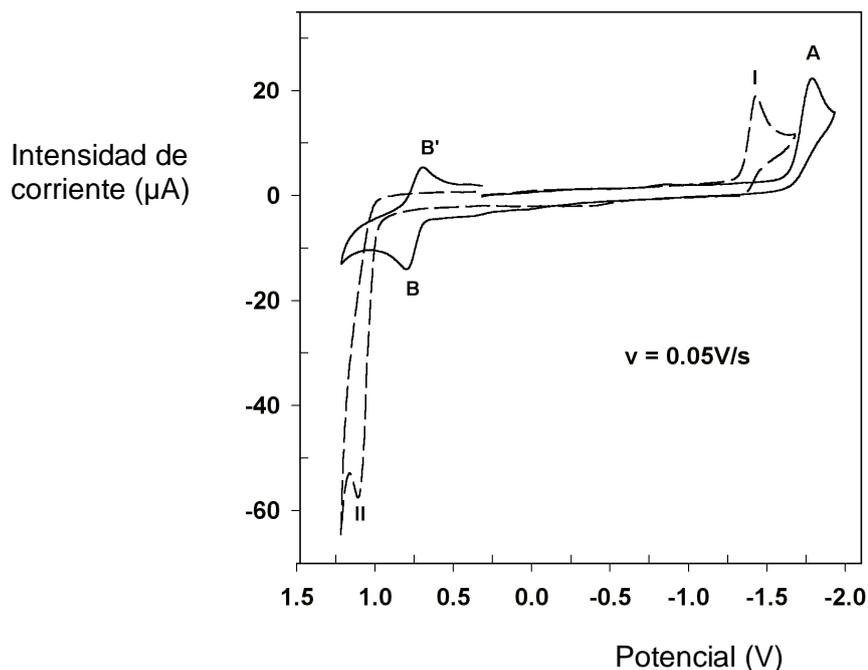
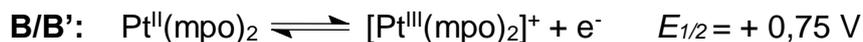
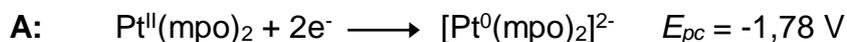


Figura 43. Comparación de los voltamogramas de los complejos $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$ (—) y $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$ (----) en soluciones de DMF, a $v = 0,05 \text{ V/s}$.

En la dirección catódica, se observó un proceso de reducción (indicado por “A” en la figura 43) en $-1,78 \text{ V}$ para $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$ y en $-1,43 \text{ V}$ (indicado por “I” en la figura 43) para $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$. En el reverso de la dirección catódica, el complejo $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$ mostró una cupla redox (indicada por “B” y “B’ ” en la figura 43; $0,79/0,70 \text{ V}$) y el complejo $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$ mostró un pico de oxidación (indicado por “II” en la figura 43) en $1,10 \text{ V}$. Estos últimos procesos se dieron también cuando se aplicó un barrido de potencial hacia valores positivos, lo que indica que son independientes del camino de reducción.

Para el complejo de $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$ de acuerdo con los datos experimentales, el centro metálico del compuesto podría ser reducido y oxidado en el potencial mencionado para el par redox B/B’. No se detectaron evidencias de reacciones químicas ni antes ni después del proceso electroquímico en el electrodo [50, 51]. Además, la corriente del pico de la reducción A fue aproximadamente dos veces mayor que la corriente del pico de la oxidación B ($i_p(\text{A})/i_p(\text{B})=1,75$), lo que sugiere que el proceso irreversible catódico involucra doble número de

electrones que el proceso reversible B anódico. A partir del estudio electroquímico detallado realizado por la Prof. Parajón-Costa es posible formular ambos procesos redox de la siguiente manera:



Para el complejo $[\text{Pd}(\text{mpo})_2]$, la figura 44 muestra los voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido entre -1,00V y 1,75V. Para este complejo en el reverso de la dirección catódica apareció un único pico de oxidación (I) a $v \geq 0,05 \text{ V/s}$, que se hizo más pronunciado y se corrió a valores más negativos a v cada vez mayores. A diferencia de lo observado para el compuesto de Pt, para este compuesto se observa un aumento del pico I' al aumentar la velocidad de barrido. Las características de este pico fueron analizadas utilizando criterios y parámetros electroquímicos. Los resultados de ese análisis son indicativos de la existencia de una reacción química acoplada posterior al proceso de transferencia electrónica (mecanismo que se codifica como EC) [50-52], que es observable porque la vida media de la reacción química es comparable a la escala de tiempo del experimento. A partir de las mediciones no pudo determinarse de forma inequívoca el número de electrones que participan en este proceso. Sin embargo, a partir del parámetro de ancho de pico ($58 \pm 6 \text{ mV}$) y del corrimiento del pico (I) hacia potenciales negativos en unos 30 mV para un aumento de diez veces en v se puede deducir que esta reducción involucra un solo electrón (el valor teórico para un mecanismo EC es: $30/n \text{ mV}$) [50-52]. Asumimos que este proceso corresponde a una reducción de Pd(I), seguido por una reacción química a productos no identificados. Por otra parte, para este complejo no se observó oxidación del centro metálico. El pico de oxidación irreversible (II) a 1,10V (Figura 43) debe corresponder a un proceso centrado en el ligando, ya que se dio a un potencial similar al de otros compuestos metálicos con este ligando [18]. Además, este pico mostró un comportamiento similar al observado para el ligando libre en condiciones experimentales similares.

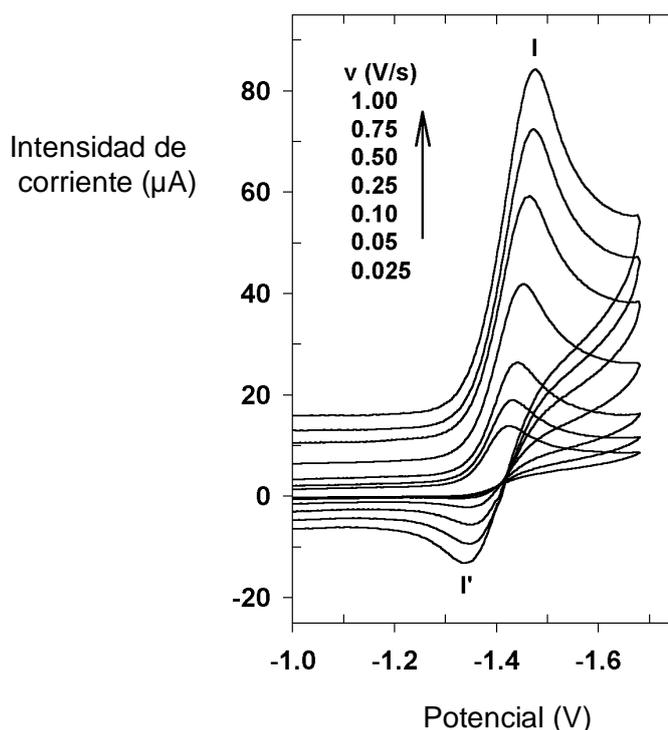


Figura 44. Voltamogramas cíclicos para el complejo de $[Pd(mpo)_2]$ a diferentes velocidades de barrido entre -1,00V y 1,75V.

La interpretación detallada de estos procesos electroquímicos para su publicación fue realizada por la Dra. Beatriz Parajón Costa (UNLP, Argentina), especialista en la temática electroquímica.

5.2.2.8- Producción electroquímica de radicales libres estudiada por EPR

La reducción electroquímica del mpo y sus complejos se realizó *in situ* en soluciones de DMSO, aplicando un potencial igual al correspondiente del pico obtenido de los experimentos de voltametría usando un electrodo de gota de mercurio. Todos los compuestos investigados formaron intermediarios estables paramagnéticos en el primer paso de reducción que fueron caracterizados por EPR. La interpretación del EPR a través de un proceso de simulación confirmó las estabildades de estas especies radicalarias debido a la deslocalización de los electrones no apareados. La simulación de los espectros de mpo se realizó mediante constantes de acoplamiento hiperfinos obtenidos a partir de cálculos

teóricos de funcionales de densidad (DFT) realizados hasta que los espectros obtenidos tuvieron la mayor similitud con los experimentales. La Figura 45a muestra el espectro EPR del radical mpo. Este patrón hiperfino se simuló en términos de un triplete del nitrógeno del mpo y dos dobletes asignados a los átomos de hidrógeno que pertenecen al anillo aromático. Los complejos de paladio y platino mostraron el mismo patrón hiperfino, sin embargo, las constantes de acoplamiento fueron más pequeñas que las del radical mpo (Figura 45b, Tabla 9).

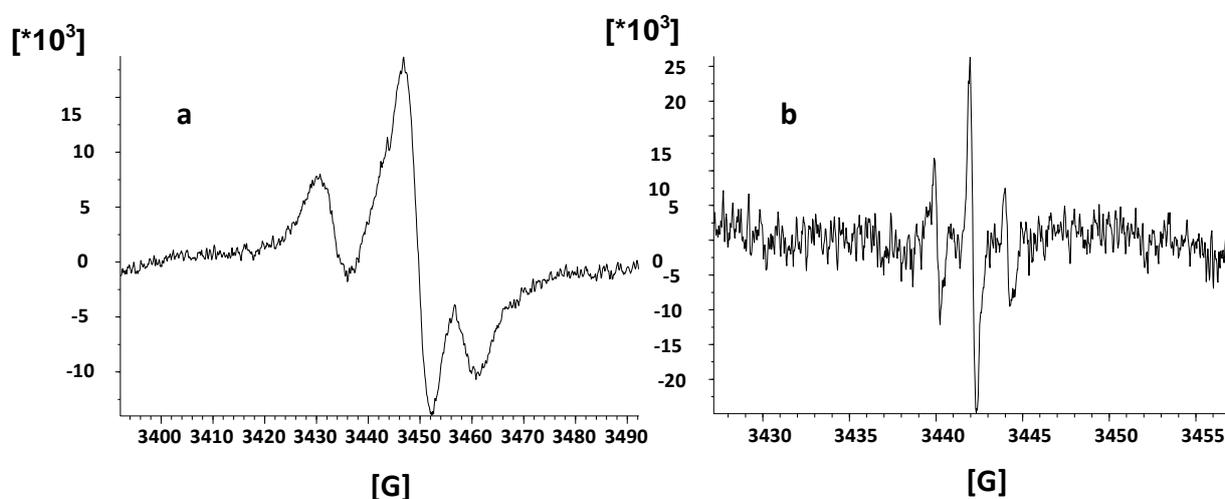


Figura 45. a) espectro experimental de EPR del anión radical de mpo en DMSO. b) espectro experimental de EPR del anión radical de $[\text{Pt}(\text{mpo})_2]$ en DMSO. Condiciones espectrométricas: frecuencias de microondas, 9,72 GHz; potencia de microondas, 20mW; modulación de amplitud, 0,98 G; ganancia 59 db.

Tabla 9. Constantes de acoplamiento hiperfino de mpo, [Pt(mpo)₂] y [Pd(mpo)₂] y valores g.

	N	H	H	G
mpo (experimental)	1,5 G	15,0 G	15,0 G	2,015
mpo (teórico)	1,3 G	12,0 G	10,8 G	-
[Pt(mpo) ₂]	0,2 G	2,5 G	2,5 G	2,055
[Pd(mpo) ₂]	0,2 G	2,4 G	2,4 G	2,050

El análisis de los resultados fue realizado por el Dr. Claudio Olea Azar, especialista en la temática.

Lo importante a destacar de estos resultados en relación a los intereses de este Trabajo de Tesis es que estos experimentos demuestran que es posible generar radicales libres por vía electroquímica para los tres compuestos testeados. A pesar de la coordinación a metales es posible generar electroquímicamente radicales libres a partir de los compuestos de mpo obtenidos.

5.2.3- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.2.3.1- Actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro* de los complejos de Pd y Pt

Se evaluó la actividad anti *T. cruzi* de los complejos de Pd y Pt y del ligando bajo forma de sal sódica sobre la forma epimastigota del parásito (cepa Tulahuen 2). En la Tabla 10 se muestran los valores de concentración inhibitoria 50 % (CI₅₀) obtenidos de las correspondientes curvas dosis-respuesta.

Los tres compuestos mostraron una actividad anti *T. cruzi* muy alta (en el rango nanomolar). Los complejos de Pd y Pt fueron 115 y 39 veces más activos que el fármaco tripanosomicida Nifurtimox. Además, como resultado de la coordinación, el complejo de Pd incrementó tres veces la actividad respecto al ligando libre.

Tabla 10. Actividad biológica *in vitro* de los complejos de Pd y Pt y del ligando libre.

Compuesto	CI ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM)
Na mpo	0,190 ± 0,015
[Pd(mpo) ₂]	0,067 ± 0,015
[Pt(mpo) ₂]	0,200 ± 0,018
Nifurtimox	7,700 ± 0,500

5.2.3.2- Actividad biológica *in vitro* de los complejos de Au y V en parásitos kinetoplásticos

5.2.3.2.1- Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c)

Para el complejo de Au se determinó la actividad anti *T. cruzi in vitro* evaluando la inhibición del crecimiento de epimastigotas (cepa Dm28c) para diferentes concentraciones del complejo después de 5 días de incubación.

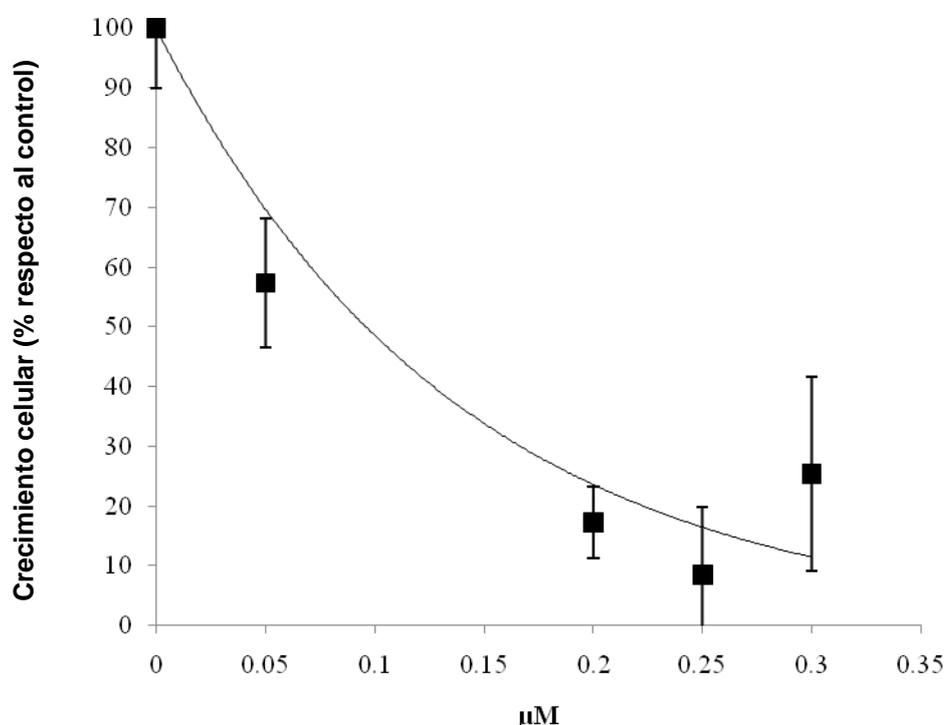


Figura 46. Curva dosis-respuesta de crecimiento de *T. cruzi* para el complejo [Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂].

En la Figura 46 se muestran los porcentajes de crecimiento con respecto al control. El CI_{50} obtenido de la curva dosis-respuesta fue de 0,09 μM . El complejo de Au(I) resultó significativamente más activo que el ligando libre ($CI_{50} = 0,190 \mu\text{M}$) y que el fármaco de referencia Nifurtimox ($CI_{50} = 6 \mu\text{M}$) [10,53].

5.2.3.2.2- Epimastigotas de *T. cruzi* (clon CL-B5 transfectadas)

Tabla 11. Actividad *in vitro* de Na mpo, $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ y $[\text{VO}(\text{mpo})_2]$ contra epimastigotas de *T. cruzi* (clon CL-B5 cepa transfectada).

Compuesto	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μM)
Na mpo	3,35
$[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$	0,14
$[\text{VO}(\text{mpo})_2]$	1,27
Benznidazol	30,89

Los compuestos mostraron una alta actividad en esta cepa de epimastigotas de *T. cruzi* [54]. La unión del ligando bioactivo a V(IV)O y Au(I) provocó un aumento de la actividad en un factor de 2,6 para el primer complejo y en un factor de 24 para el último, demostrando que la complejación es una buena estrategia para mejorar la actividad anti-tripanosoma de ligandos orgánicos bioactivos. Además, todos los compuestos mostraron en esta cepa del parásito, una actividad significativamente mayor que el Benznidazol.

5.2.3.2.3- Promastigotas de *Leishmania*

Una vez que se detectó actividad anti-*T. cruzi* interesante en el nuevo compuesto de Au con mpo se decidió evaluar el mismo en cepas de *Leishmania*. El grupo que integro inició con estas evaluaciones una apertura de sus intereses en Química Inorgánica Medicinal basada en una serie de consideraciones. Por un lado, la Leishmaniasis constituye un conjunto de enfermedades parasitarias que afectan principalmente a regiones tropicales y

subtropicales de África, Asia y América y a la región mediterránea de Europa. Afecta a 12 millones de personas en 88 países, 72 de los cuales son países en desarrollo. Es producida por al menos 17 especies de parásitos del género *Leishmania*. Éstos al igual que el *T. cruzi* son protozoarios tripanosomátidos pertenecientes al género Trypanosomatidae y orden Kinetoplastida [55,56]. Por otro lado, el desarrollo de fármacos de amplio espectro contra múltiples parásitos constituye una estrategia innovadora, poco explorada y menos costosa para el descubrimiento de agentes antiparasitarios [57,58]. Esta estrategia involucra el reconocimiento de blancos comunes presentes en diferentes parásitos y de estructuras químicas capaces de interactuar con esos blancos. La decodificación del genoma de *T. cruzi* y *L. major* ha demostrado una interesante similitud genómica que abre la posibilidad de la existencia de muchos blancos enzimáticos comunes en ambos parásitos [59]. Es de interés actual del grupo que integro identificar compuestos metálicos capaces de inhibir tanto el crecimiento de *T. cruzi* como de diferentes especies de *Leishmania*. En particular, en este Trabajo de Tesis se evaluó el compuesto $[Au^I_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ en promastigotas de dos especies de *Leishmania* (*L. (Leishmania) mexicana* y *L. (Viannia) braziliensis*).

El complejo de Au(I) indujo un potente efecto antiproliferativo dosis-dependiente en ambas especies de *Leishmania*. Después de 30 minutos, una dosis de 1 μ M del complejo de Au(I) indujo un potente efecto leishmanicida (DL_{50}) contra promastigotas de *L. (L.) mexicana*, mientras que para la misma

concentración del complejo se observó solo un efecto leishmanistático (CI_{75}) contra promastigotas de *L. (V.) braziliensis* después de 48 horas (Figuras 47 y 48).

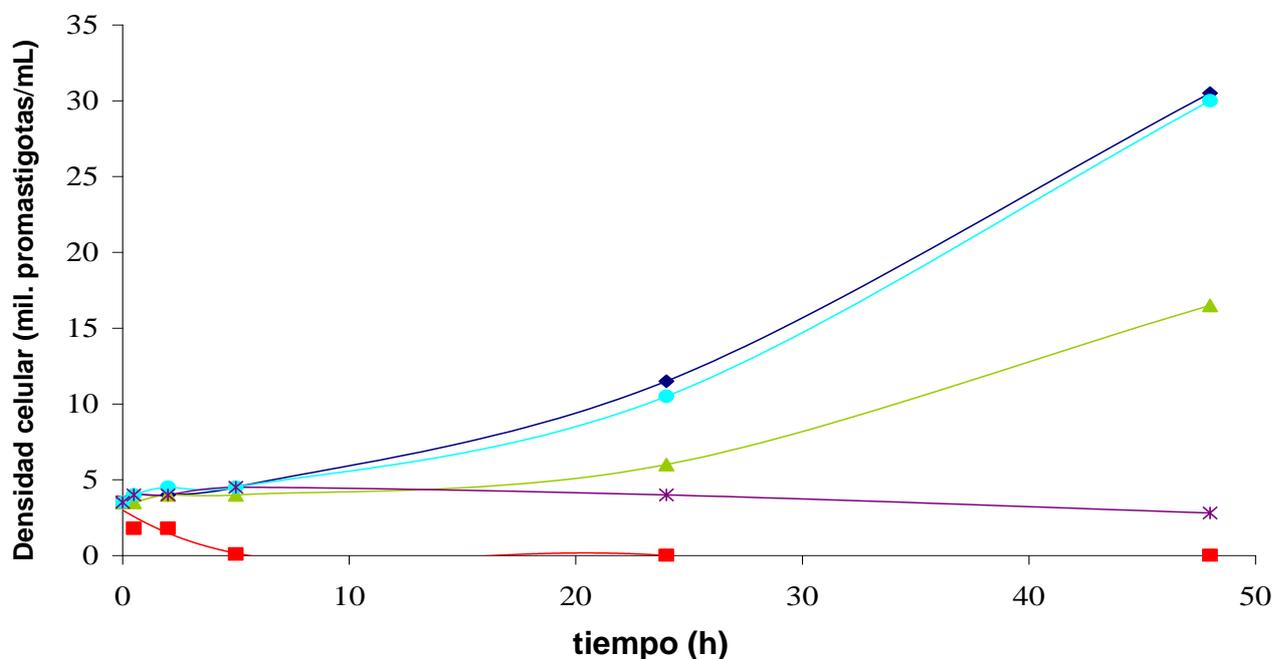


Figura 47. Promastigotas de *Leishmania (L.) mexicana* tratados con el complejo $[Au^I_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ (código Au-mpo) y con Na mpo durante 48 horas: (◆) control, (●) 0,05 μ M Au-mpo, (▲) 0,1 μ M Au-mpo, (■) 1 μ M Au-mpo, (*) 5 μ M Na mpo.

A concentración subletal los parásitos muestran pérdida de motilidad e hinchazón que en el caso de *L. (L.) mexicana* preceden a la lisis celular observada a una dosis superior a 1 μ M.

Para el ligando bioactivo se observan los mismos cambios morfológicos pero a una concentración 5 veces mayor (5 μM). Entonces, como resultado de la coordinación del Au al ligando, se mejora significativamente la actividad antiproliferativa contra promastigotas de *Leishmania*.

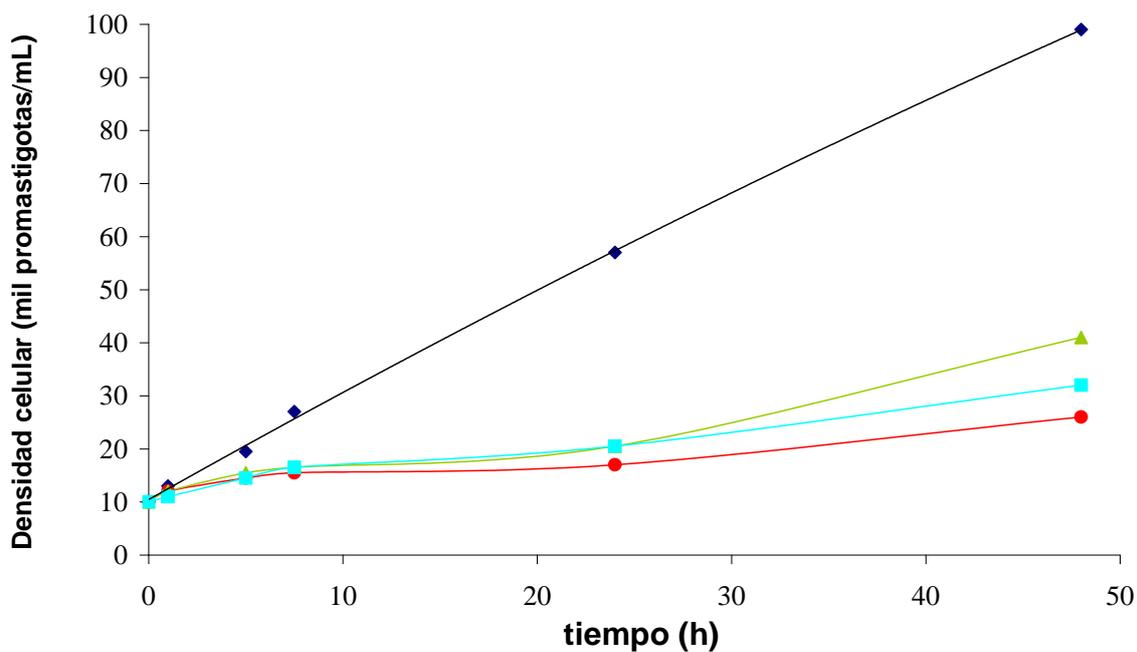


Figura 48. Promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* tratados con $[\text{Au}^{\text{I}}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ (código Au-mpo) y Na mpo durante 48 horas. (◆) control, (●) 1 μM Au-mpo, (▲) 0,5 μM Au-mpo, (■) 5 μM Na mpo.

El complejo de dioxovanadio(IV) mostró también un interesante efecto antiproliferativo dosis-dependiente en ambas especies de *Leishmania* (Figuras 49 y 50). Sin embargo, resulta menos activo que el complejo de Au(I).

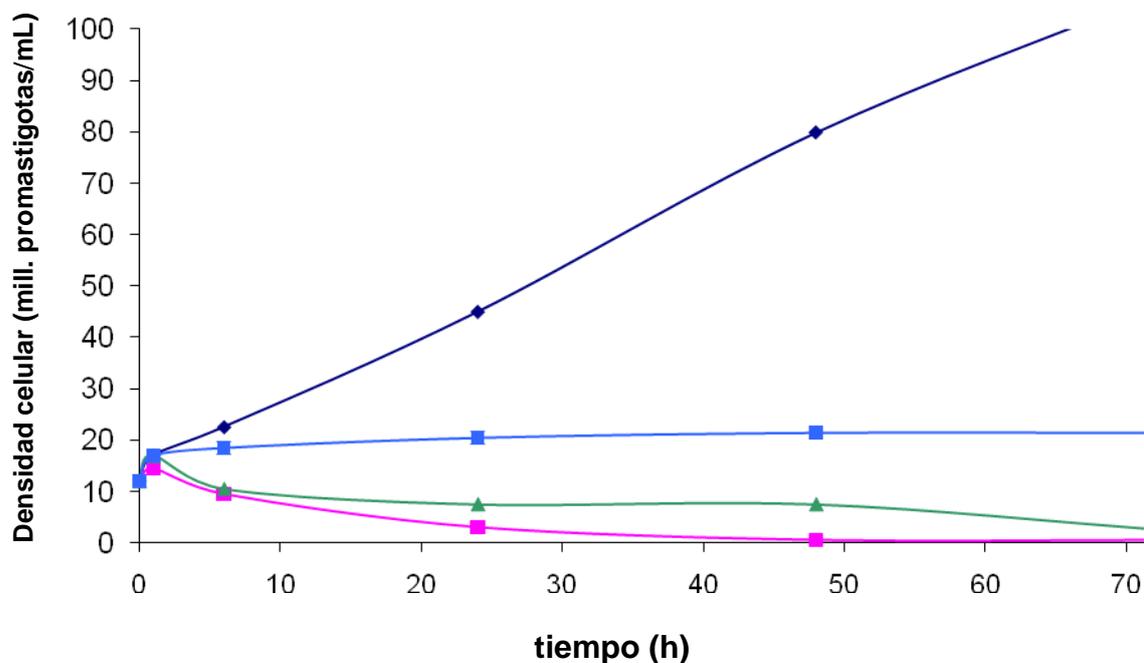


Figura 49. Efecto de [VO(mpo)₂] sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* (72 horas). (◆) control, (■) 0,5 μM [V(mpo)₂], (▲) 5 μM [V(mpo)₂], (■) 10 μM [V(mpo)₂].

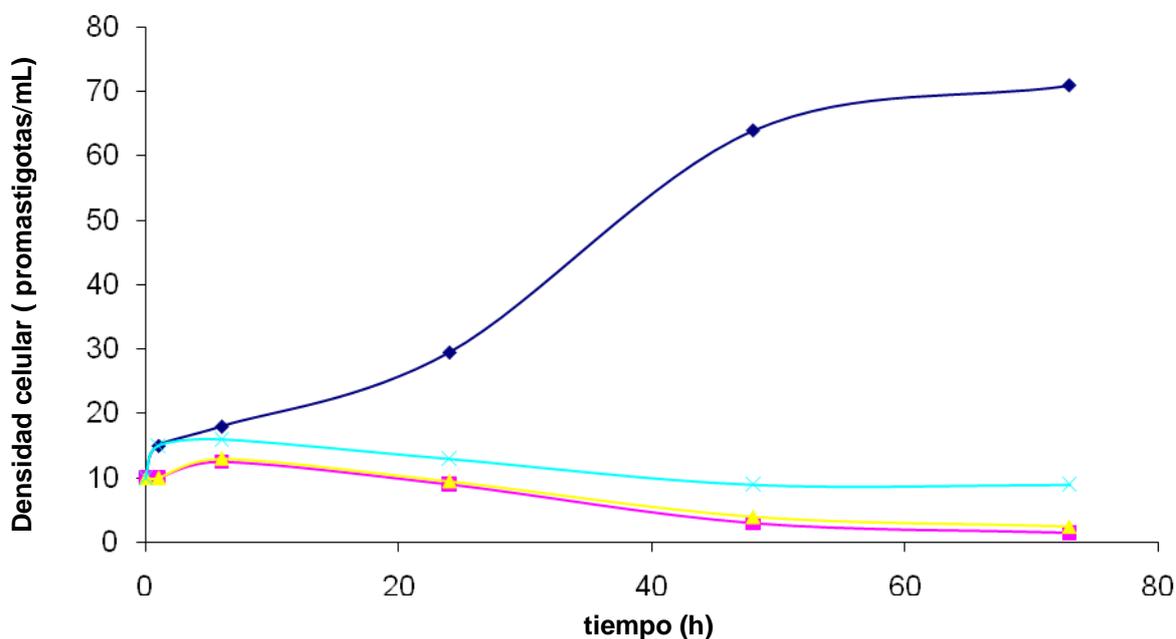


Figura 50. Efecto de $[VO(mpo)_2]$ sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* (72 horas). (♦) control, (x) $0,5 \mu M [V(mpo)_2]$, (▲) $5 \mu M [V(mpo)_2]$, (■) $10 \mu M [V(mpo)_2]$.

5.2.4- ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Un aspecto importante a considerar en la búsqueda de compuestos activos con actividad antiprotozoarios es su toxicidad en las células del huésped mamífero. Los macrófagos se encuentran entre las primeras células con las que *T. cruzi* tiene contacto en el proceso de entrada en un mamífero huésped. Además de células del sistema inmune, *T. cruzi* puede invadir otros tipos celulares como los fibroblastos. Por lo tanto, la toxicidad de los compuestos en estudio se evaluó en estas dos líneas de células de mamífero.

5.2.4.1- Citotoxicidad en macrófagos de los complejos de Pd y Pt

Se realizó el estudio de citotoxicidad inespecífica en células mamíferas (macrófagos J774) con el fin de comprobar la especificidad de la actividad

antiprotozoario. En la Tabla 12 se muestran los resultados para los complejos de Pd, Pt y el ligando libre, como porcentaje de citotoxicidad, es decir el porcentaje de células que murió después de la incubación con los compuestos.

Tabla 12. Actividad inespecífica contra macrófagos expresada como porcentaje de citotoxicidad (% C). Entre paréntesis se expresan las desviaciones estándar.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{g/mL}$)					
	1,0	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025
Na mpo	84,8 (0,6)	74,6 (0,6)	67,5 (0,8)	41,0 (0,6)	35,8 (1,5)	5,4 (1,8)
[Pd(mpo) ₂]	97,5 (0,1)	94,6 (0,1)	80,9 (0,4)	39,7 (0,9)	35,4 (0,8)	0 (2,5)
[Pt(mpo) ₂]	6,6 (1,3)	0 (3,5)	0 (1,6)	0 (1,5)	0 (3,2)	0 (0,8)

A partir de estos resultados se calcularon los valores de CI_{50} en macrófagos para los tres compuestos (Tabla 13).

Los complejos no mostraron una apreciable citotoxicidad inespecífica en macrófagos a las dosis que son relevantes para la actividad anti-*T. cruzi*. El complejo de Pd y el ligando libre mostraron similar citotoxicidad en macrófagos, mientras que el complejo de Pt mostró una muy baja citotoxicidad en estas células en las condiciones ensayadas. La comparación de la actividad anti-*T. cruzi* y la citotoxicidad contra macrófagos (Tabla 13) revela que el complejo de Pt presenta una alta selectividad (es tóxico hacia los parásitos y menos tóxico para las células de mamífero que el complejo de Pd y el ligando libre).

Tabla 13. Comparación de las CI_{50} en los parásitos y en los macrófagos. Índice de selectividad: CI_{50} macrófagos/ CI_{50} *T. cruzi*.

Compuesto	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μM)	CI_{50} macrófagos (μM)	Índice de selectividad
Na mpo	0,190 \pm 0,015	0,85	4,5
[Pd(mpo) ₂]	0,067 \pm 0,015	0,33	4,9
[Pt(mpo) ₂]	0,200 \pm 0,018	>> 2,0	>> 10
Nifurtimox	7,700 \pm 0,500	-	-

5.2.4.2- Citotoxicidad en macrófagos y fibroblastos para los complejos de Au y V

Para el complejo de Au se observa una baja citotoxicidad inespecífica sobre macrófagos a las dosis que son relevantes para la actividad anti-*Leishmania* y para la actividad anti-*T. cruzi* (Figura 51).

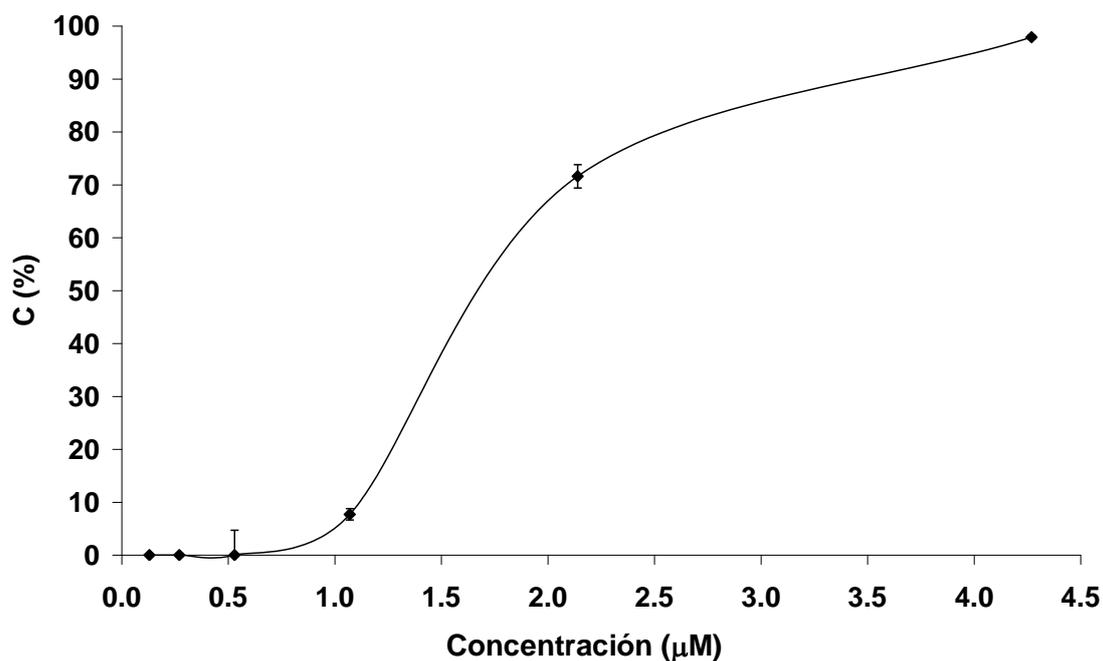


Figura 51. Citotoxicidad inespecífica en macrófagos expresada como porcentaje de citotoxicidad (% C). Las concentraciones son expresadas en μM $[\text{Au}^{\text{I}}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$.

La comparación de la eficacia anti-*Leishmania* y anti-*T. cruzi* y la citotoxicidad en macrófagos sugiere que la coordinación del Au proporciona una buena selectividad. Aunque el complejo de Au ha sido probado contra una cepa de *T. cruzi* distinta a la que se utilizó para los complejos de Pd y Pt, una comparación preliminar sugiere que los complejos de Au y Pt muestran una selectividad mayor que el complejo de Pd [42]

En cuanto a la evaluación de citotoxicidad en fibroblastos, se determinó el índice de selectividad (IS) dividiendo el valor de CI_{50} en las células huésped

fibroblastos entre el valor de CI_{50} en el parásito. De acuerdo a la literatura, sólo los compuestos que logran valores de IS mayores de 50 deben ser considerados para nuevos controles [60]. En base a este criterio, el compuesto $[VO(mpo)_2]$ es un compuesto con muy buena selectividad $IS=61,14$ (Tabla 14). Del mismo modo, el compuesto Na mpo con un $IS=43,01$ mostró buena actividad en epimastigotas ($CI_{50} \leq 3,35 \mu M$) y baja citotoxicidad en macrófagos ($CI_{50} \geq 256 \mu M$) y fibroblastos ($CI_{50} \geq 144,1 \mu M$). Por el contrario, el compuesto $[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ mostró citotoxicidad importante en fibroblastos (Tabla 14).

Tabla 14. Actividad *in vitro* de Na mpo, $[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ y $[VO(mpo)_2]$ contra epimastigotas de *T. cruzi* (clon CL-B5 transfectadas) y líneas de células de mamíferos.

Compuesto	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μM)	CI_{50} macrófagos J774 (μM)	CI_{50}	IS ^a
			fibroblastos NCTC 929 (μM)	
Na mpo	3,35	>256	144,1	43,01
$[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$	0,14	8,75	1,15	8,21
$[VO(mpo)_2]$	1,27	67,80	77,65	61,14
Benznidazol	30,89	>384,24	>384,24	12,44

^a $IS = NCTC929 CI_{50} / T. cruzi CI_{50}$

La Tabla 15 recoge los resultados obtenidos para los complejos de oro, platino, paladio y vanadio en diferentes cepas de *T. cruzi* [42,61]. Independientemente de la cepa de *T. cruzi* todos los complejos mostraron una alta actividad en epimastigotas, siendo significativamente más activos que el Nifurtimox y Benznidazol. Sin embargo, resulta notable que el complejo de oro mostró citotoxicidad significativa en fibroblastos (IS 8,21) en relación a los otros complejos de mpo, lo que descalifica en principio a este compuesto para los ensayos *in vivo*. Por lo tanto, a la luz de estos resultados, el complejo de vanadio fue seleccionado para realizar estudios *in vivo*, y siendo el compuesto $[Pd(mpo)_2]$, el más activo, también se incluyó a este en la evaluación *in vivo* que se encuentra en curso.

Tabla 15. Recopilación de los resultados de evaluación *in vitro* para los complejos de vanadio, oro, platino y paladio con mpo.

Compuesto	CI ₅₀ ^a <i>T. cruzi</i> (μM)	CI ₅₀ ^a macrófagos (μM)
[Pd(mpo) ₂]	0,067 ^b	0,33
[Pt(mpo) ₂]	0,200 ^b	>> 2,0
[Au ₂ (mpo) ₂ (PPh ₃) ₂]	0,09 ^c	8,75
	0,14 ^d	
[VO(mpo) ₂]	1,27 ^d	67,80
Nifurtimox	7,700 ^b	-
	6,00 ^c	
Benznidazol	30,89 ^d	>384,24

^a CI₅₀: concentración inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito,

^b cepa Tulahuen 2, ^c cepa Dm28c, ^d cepa CL-B5

5.2.5- ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN

A efectos de investigar el mecanismo de acción de estos compuestos se evaluaron algunos blancos potenciales para cuyo estudio se adquirió experiencia durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis o para cuyo estudio se dispone de facilidades a través de cooperaciones con otros centros. En concreto se estudiaron los siguientes blancos potenciales de acción: ADN (blanco potencial por la presencia de metales d de la segunda y tercera serie en los compuestos en estudio), generación de radicales libres en el parásito (el EPR electroquímico demostró la posibilidad de generarlos) e inhibición de la fumarato reductasa (blanco del ligando libre) y de la tripanotona reductasa (enzima relacionada con el metabolismo redox del parásito).

5.2.5.1- ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN

Se llevaron a cabo experimentos con ADN plasmídico utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa con el fin de estudiar si la interacción con el ADN podría ser parte del mecanismo de acción de los complejos. Ningún efecto resultó evidente después de la incubación del ADN plasmídico con los

complejos de Au, Pd y Pt en relaciones molares de metal a pares de bases, r_i , de 0,5 a 4,0 (complejos de Pd y Pt, Figura 52) y de 0,5, 3,0 y 6,0 (para el complejo de Au). Para el complejo de Au no se evidenciaron estos efectos incluso luego de 72 horas de incubación (Figura 53) [62].

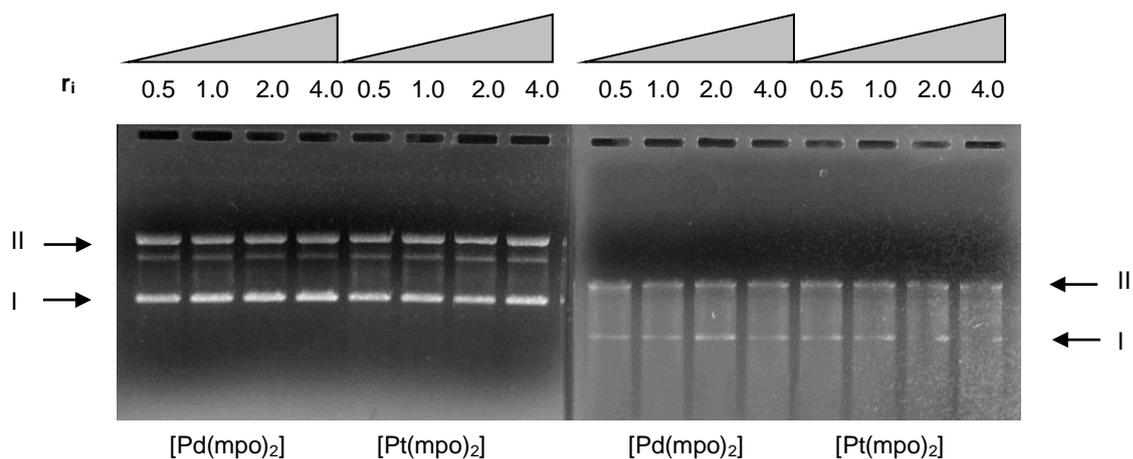


Figura 52. Resultados de la interacción de los complejos $[Pd(mpo)_2]$ y $[Pt(mpo)_2]$ con ADN plasmídico. Las interacciones fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa. Todas las reacciones fueron incubadas en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μ L, por 24 horas a 37 °C con ADN pBSK II. En la parte inferior de cada sección del gel se indica el complejo utilizado. La concentración relativa (r_i) se indica en la parte superior. Panel derecho: electroforesis en agarosa realizada en presencia de BrEt (0,5 μ g/mL). Panel izquierdo: electroforesis en agarosa realizada en ausencia de BrEt. El gel se tiñó luego de la corrida. Las flechas indican: (I) ADN plasmídico superenrollado y (II) ADN plasmídico circular.

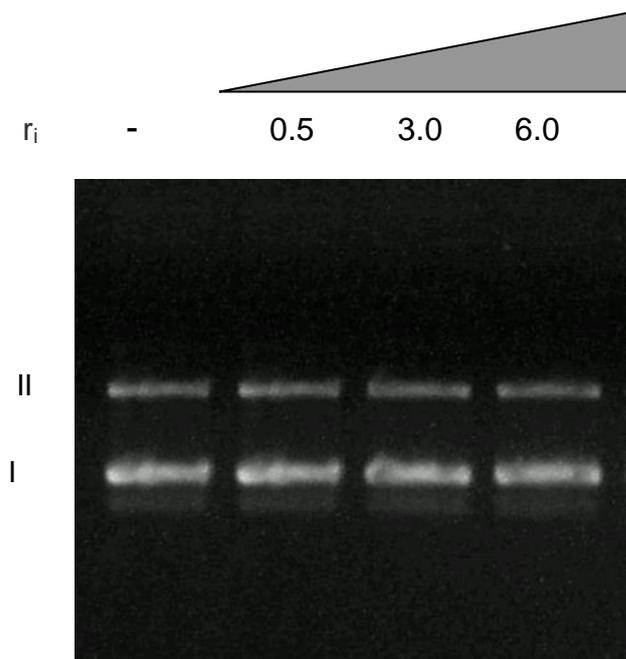


Figura 53. Resultados de la interacción de $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ con ADN plasmídico. Las interacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa en ausencia de BrEt. Todas las reacciones se incubaron en Tris-HCl 10 mM pH 7,4 en un volumen final de 20 μL , por 24 h a 37 °C con pBSK II usando las concentraciones relativas (r_i) indicadas. El gel fue teñido luego de la corrida. Se muestran las formas superenrollada del ADN plasmídico (forma I) y la forma circular del mismo (forma II).

Los resultados están de acuerdo con los obtenidos para los complejos por el método de estudio de interacción primaria con ADN de timo de ternero ya descrito (método que combina determinación del metal unido por espectrometría de absorción atómica y determinación del ADN por espectroscopía UV). De hecho, no se detectó interacción significativa de los complejos de Pd y Pt con el ADN después de 96 horas de incubación. Para el complejo de Au solo se encontró una muy baja cantidad de metal unido al ADN (cerca de 5 nmol de Au/mg de ADN) resultado que indica que prácticamente no hay interacción. Los resultados de estos dos enfoques sugieren que el ADN no constituye un blanco importante para estos complejos.

5.2.5.2- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN *T. CRUZI*

Con el fin de detectar radicales libres intracelulares que se pudieran generar a partir de los complejos en el parásito, se incubaron epimastigotas (cepa Dm28c) con los complejos de Pd, Pt y el ligando libre en presencia de DMPO (*N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina) como agente de captura de radicales libres de corta vida. Los resultados se muestran en la Figura 54. Como control positivo, se usó el fenil derivado de la 5-nitro-2-furaldehído tiosemicarbazona que se conoce produce reciclaje redox en *T. cruzi* [63]. No se observó señal de EPR ni para los complejos ni para el ligando libre. En las mismas condiciones experimentales se detectó para la tiosemicarbazona control las señales correspondientes al aducto DMPO- OH• (Figura 54). Por lo tanto, se puede descartar un mecanismo de acción biorreductivo con la participación de estos compuestos de Pd y Pt en reciclaje redox.

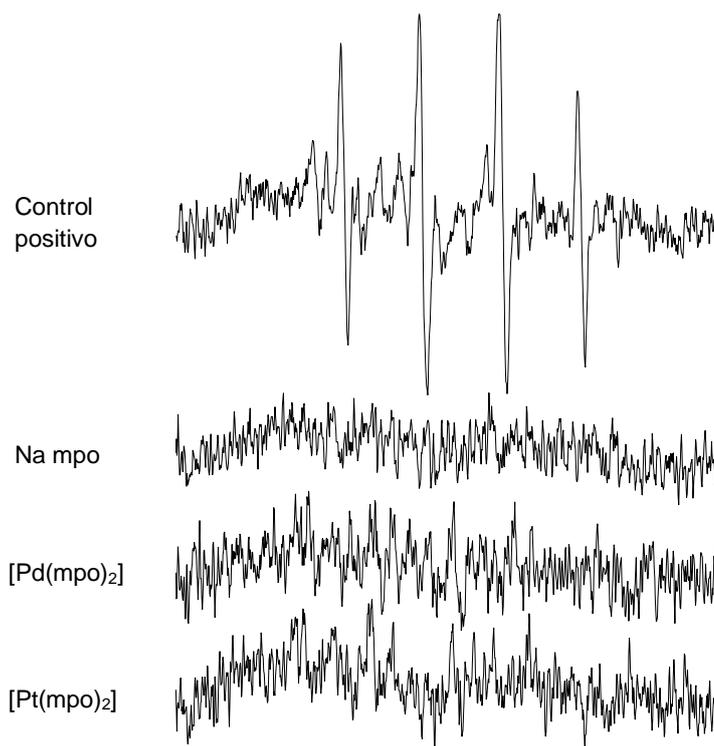


Figura 54. Espectro EPR obtenido en las condiciones experimentales descritas y en presencia de DMPO como atrapador de radicales libres de vida media corta.

5.2.5.3- ESTUDIOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

5.2.5.3.1- Ensayos de inhibición de la tripanotiona reductasa (TR) de *T. cruzi*

La investigación básica de pasos metabólicos cruciales para la viabilidad e infectividad del parásito, propios del mismo y ausentes en el hospedero mamífero, ha resultado fundamental en la búsqueda de dianas válidas para el desarrollo racional de fármacos contra las tripanosomiasis. En particular, entre las dianas estudiadas resulta de nuestro interés para este Trabajo de Tesis una enzima involucrada en el metabolismo redox basado en tioles, la tripanotiona reductasa (TR). El sistema que utiliza el hospedero mamífero para mantener su homeostasis redox intracelular se diferencia completamente del que utiliza el parásito. El hospedero utiliza los sistemas glutatión / glutatión reductasa y tioredoxina / tioredoxina reductasa. En cambio los tripanosomátidos no disponen de estas enzimas. Su metabolismo redox depende de un único ditiol propio del parásito, la tripanotiona (N1,N8-bis (glutathionil) espermidina), y de la enzima tripanotiona reductasa (Figura 55) [64-67]. Dado que los parásitos se enfrentan a potentes oxidantes durante la invasión del hospedero, como peróxido de hidrógeno y peroxinitrito, el uso de inhibidores capaces de paralizar los sistemas antioxidantes parasitarios resulta una estrategia interesante para atacar al parásito. En particular, la tripanotiona reductasa no ocurre en el hospedero y es esencial para los tripanosomátidos en cuestión. Entre los compuestos que han mostrado actividad inhibitoria de esta enzima se encuentran algunos compuestos de coordinación de platino y paladio. Se postula que la inhiben por unión a través del centro metálico al sitio activo de la enzima a nivel del residuo de cisteína 52 (Figura 56) [39,68-70]. Algunos de ellos resultaron inhibidores irreversibles de la TR de *T. cruzi* pero no de la glutatión reductasa humana.

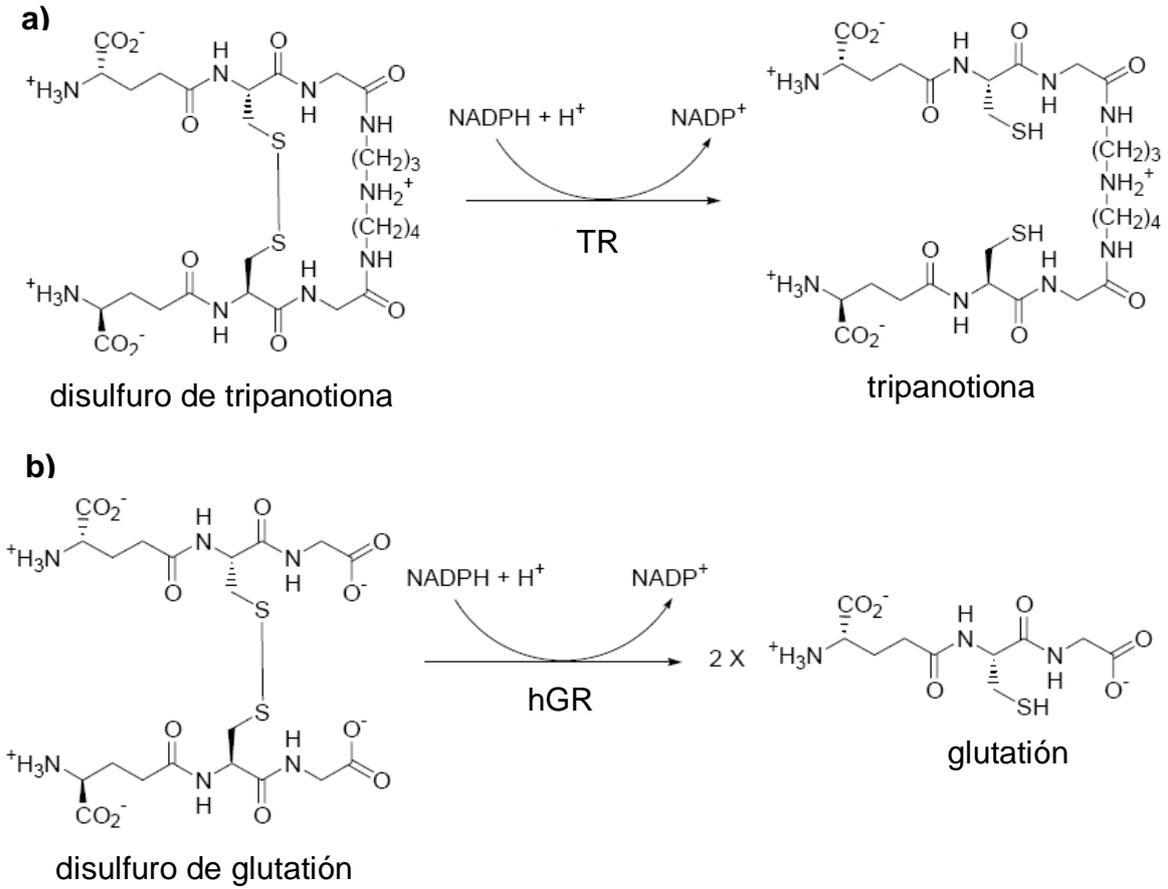


Figura 55. Enzimas y especies involucradas en el metabolismo redox: a) del parásito (trypanotiona /trypanotiona reductasa TR); b) del humano (glutatión / glutatión reductasa humana hGR)

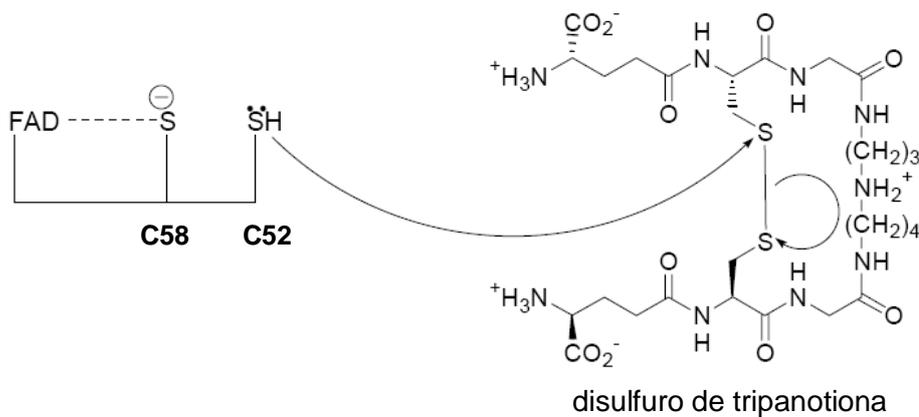


Figura 56. Mecanismo de acción de la enzima TR a través de la cisteína 52.

En nuestro caso, el ligando libre no produjo ninguna inhibición de la TR a una concentración 100 μM . Los complejos de Pd y Pt con mpo resultaron poco solubles en agua impidiendo la realización de estudios cinéticos adecuados. En general, la concentración de inhibidor (complejos de Pd y Pt) se vio limitada por la cantidad de DMSO, que no debe exceder de 50 $\mu\text{L/mL}$ porque de lo contrario la enzima es desnaturalizada por el disolvente. En la concentración más alta alcanzada para el complejo de Pd (20 μM) éste no inhibe la TR. El complejo de Pt a concentraciones de 4 y 8 μM no tuvo ningún efecto, pero a 20 μM se encontró una inhibición del 10% de TR. No se pudieron probar concentraciones más altas de los complejos por causa de sus bajas solubilidades [71].

5.2.5.3.2- Ensayos de inhibición de la NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi*

Se analizó el efecto de los complejos de Pd, Pt y Au en la actividad de la enzima fumarato reductasa NADH dependiente de *T. cruzi*. En la Figura 57 se muestran los resultados de la prueba de inhibición a una dosis única (225 μM). El ligando libre y los complejos metálicos inhiben a la enzima en las condiciones ensayadas. En estas condiciones, el complejo de Au mostró un marcado incremento en el efecto inhibitorio en relación al ligando libre y a los complejos de Pd y Pt. El efecto inhibitorio observado sobre esta enzima se correlaciona con el efecto inhibitorio del crecimiento observado en los parásitos, lo que parece indicar que la enzima podría ser el blanco principal de estos compuestos.

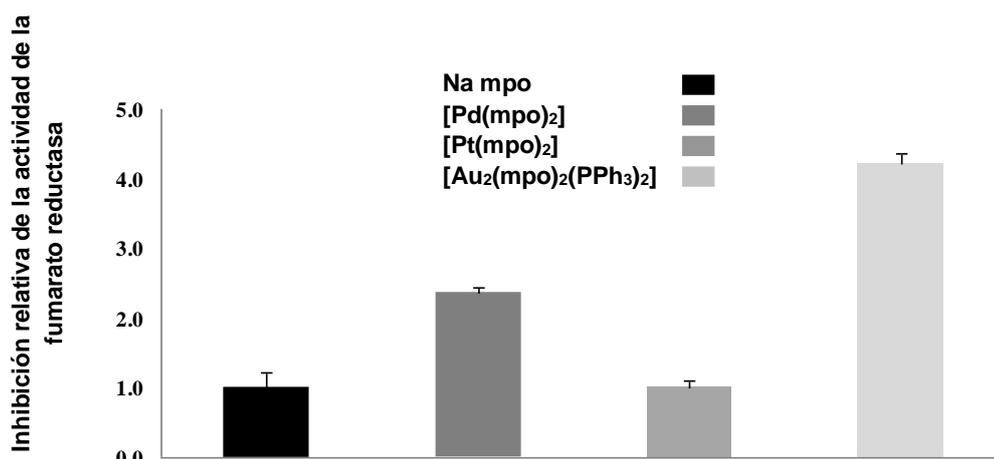


Figura 57. Efecto inhibitorio de la enzima NADH-fumarato reductasa por el ligando y los complejos de Pd, Pt y Au. Se toma el porcentaje de inhibición por la sal Na mpo como referencia (1,0) a igual dosis. Se incubó el extracto proteico de epimastigotas de *T. cruzi* por 5 min a 30 °C en ausencia (control) o presencia de una concentración 225 µM de Na mpo (■), [Pd(mpo)₂] (■), [Pt(mpo)₂] (■) y [Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂] (■) antes de medir espectrofotométricamente la actividad NADH-fumarato reductasa según se detalla en Materiales y Métodos. Se muestra la desviación estandar para cada compuesto.

Para caracterizar mejor la inhibición de la enzima, se estudió para los complejos que resultaron mejores inhibidores (complejos de Au y Pd), la dependencia del efecto inhibitorio con la concentración (Figuras 58 y 59). Los resultados muestran que el complejo de Au y también el de Pd inhiben la enzima de forma dosis-dependiente. Sin embargo, el complejo de Au inhibió el crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) a concentraciones más bajas que las que inhiben la NADH-fumarato reductasa *in vitro*. Un comportamiento similar se ha descrito anteriormente para Na mpo en la cepa Y de *T. cruzi* [10].

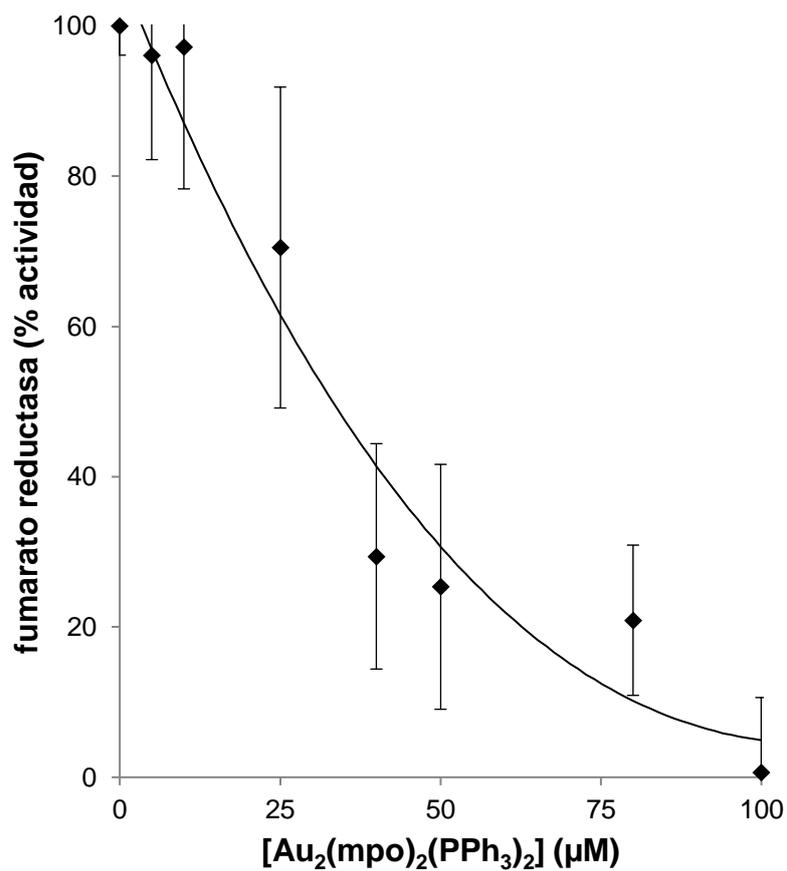


Figura 58. Efecto inhibitorio de $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ sobre la NADH- fumarato reductasa de *T. cruzi* Dm28c. Los resultados son promedios \pm ds de dos experimentos independientes realizados con preparaciones enzimáticas diferentes.

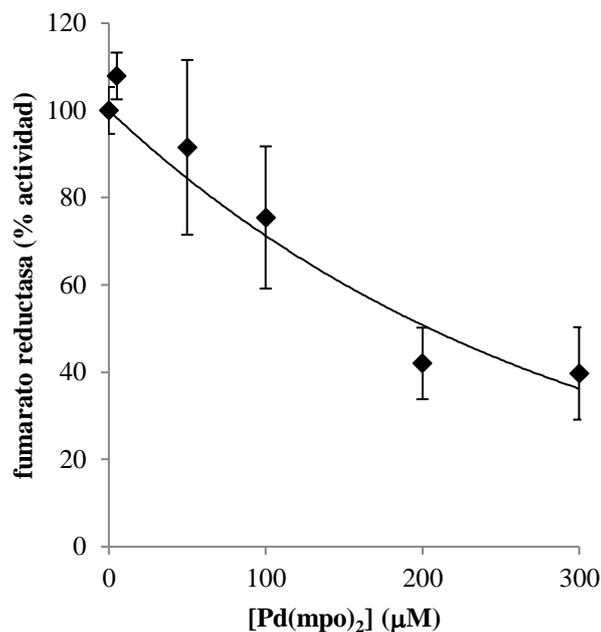


Figura 59. Efecto inhibitorio de $[Pd(mpo)_2]$ sobre la NADH-fumarato reductasa de epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c. Los extractos proteicos fueron incubados con varias concentraciones de $[Pd(mpo)_2]$ por 5 min a 30 °C antes de medir espectrofotométricamente la actividad NADH-fumarato reductasa según se detalla en Materiales y Métodos. Cada punto es el promedio \pm ds de dos experimentos independientes realizados con preparaciones enzimáticas diferentes.

Con el fin de demostrar que la inhibición del crecimiento producida por los complejos es causada, al menos en parte, por su efecto inhibitorio sobre la actividad de la fumarato reductasa, se realizó una suplementación del medio de cultivo con succinato, el producto de la actividad de la enzima [10]. Se cultivaron epimastigotas de *T. cruzi* durante 5 días en presencia o ausencia de succinato 5 mM. En presencia de succinato se observó una clara disminución de la inhibición del crecimiento producida por ambos complejos metálicos (Figura 60). Aunque no es posible descartar la posibilidad de que estos complejos podrían estar afectando a otros procesos contribuyendo a la inhibición del crecimiento de *T. cruzi*, el efecto inhibitorio de la NADH fumarato reductasa parece tener un papel primordial en su mecanismo de acción.

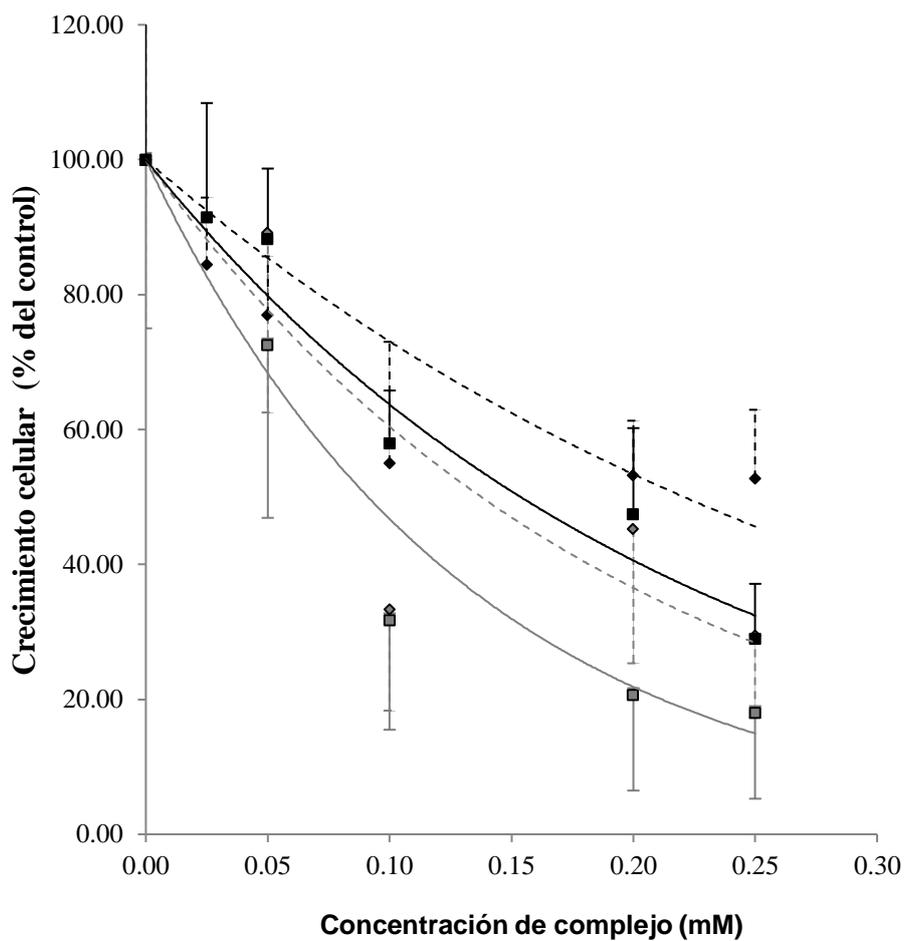


Figura 60. Efecto protector del succinato en la sobrevivencia de cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c incubados con diferentes concentraciones de $[Pd(mpo)_2]$ y $[Pt(mpo)_2]$. Se muestra el porcentaje de crecimiento respecto al control en presencia de $[Pd(mpo)_2]$ (■) y $[Pt(mpo)_2]$ (◆) suplementado con succinato 5 mM. Las curvas se muestran con línea negra llena para $[Pd(mpo)_2]$ y en línea negra punteada para $[Pt(mpo)_2]$. Las líneas en gris, llenas o punteadas, representan células expuestas a $[Pd(mpo)_2]$ y $[Pt(mpo)_2]$, respectivamente, en ausencia de succinato. Los resultados son promedios \pm ds de tres experimentos independientes.

Con fines comparativos, también se estudió el efecto inhibitorio del $[V(mpo)_2]$ a una dosis fija únicamente (100 μ M). El resultado se muestra en la Tabla 15. Si bien este resultado no se correlaciona con la relación de actividades de los complejos de Pd y V que se comparan, se debe tomar en cuenta que se trata

de una medición preliminar a dosis fija. Para disponer de conclusiones más claras se debería completar un estudio similar al realizado con los complejos de Pd, Pt y Au. De todas formas este experimento resulta útil ya que permite sugerir que también el complejo de V inhibe esta enzima.

Tabla 15. Comparativa de la actividad inhibitoria de la NADH-fumarato reductasa para [V(mpo)₂] y [Pd(mpo)₂] a dosis 100 μM.

compuesto	% de actividad NADH–fumarato reductasa a dosis 100 μM respecto al control	Inhibición relativa de la actividad NADH–fumarato reductasa a dosis 100 μM^a
[Pd(mpo) ₂]	70	1,0
[VO(mpo) ₂]	30	2,3

^a tomando el porcentaje de inhibición de [Pd(mpo)₂] como referencia a igual dosis.

5.2.6.- ESTUDIOS PRELIMINARES *IN VIVO*

Como ya se discutió, a la luz de los resultados de la evaluación *in vitro*, el complejo de vanadio fue seleccionado para realizar estudios *in vivo* por su buena selectividad de acción. Siendo el compuesto [Pd(mpo)₂], el más activo, también se incluyó en la evaluación *in vivo* que se encuentra en curso.

A continuación se indican algunos resultados preliminares de esta evaluación. La Tabla 16 muestra los resultados de la evaluación en ratones experimentalmente infectados con *T. cruzi* (fase aguda) tratados con [Pd(mpo)₂], [VO(mpo)₂] o Na mpo. Desde el día 41 post-infección (21 días post-tratamiento) hasta el final del ensayo *in vivo*, el compuesto [Pd(mpo)₂] administrado en forma oral a una dosis de 5 mg/Kg/día tuvo una actividad mayor que el Benznidazol administrado también oralmente pero a una dosis de 50 mg/Kg/día.

Los compuestos, además de presentar la significativa actividad *in vitro* ya comentada previamente en este capítulo, muestran una interesante actividad

antitripanosoma en los ensayos *in vivo* cuando son administrados por vía oral a una dosis de 5mg/Kg/día. En particular, parecen mostrar un efecto mayor que el Benznidazol cuando es administrado en los mismos ensayos a una dosis 10 veces mayor. Al final del estudio (día 59) la disminución del porcentaje de parásitos en los grupos tratados respecto a los grupos control indica que el compuesto [Pd(mpo)₂] muestra una disminución de 89 % en la parasitemia, seguido por el compuesto Na mpo (63%) y luego el [VO(mpo)₂] (30%) (Tabla 17). En particular, el compuesto [Pd(mpo)₂] demostró una actividad interesante revelada por la disminución porcentual de parásitos desde el día 41 (17 días luego de la finalización del tratamiento) hasta el final del estudio. Por lo tanto, este compuesto puede ser considerado en forma preliminar como un compuesto que amerita seguir siendo estudiado por otros tests complementarios para confirmar su eficacia antiparasitaria. Estos estudios preliminares continúan en curso y son realizados por personal especializado en el Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Tabla 16. Evaluación parasitológica: efecto del tratamiento de ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi* (fase aguda) con [Pd(mpo)₂], [VO(mpo)₂] y Na(mpo).^a

Días post-infección	Parasitemia media ± ds (parásitos/mL)				
	Control	Benznidazol (50 mg) oral	[Pd(mpo) ₂] (5mg) oral	[VO(mpo) ₂] (5 mg) oral	Na mpo (5 mg) oral
13	13318 ± 7789	499 ± 545	3657 ± 5805	5109 ± 4094	9847±7791
20	10019 ± 9909	527 ± 728	13386 ± 6117	8363 ± 4500	21908 ± 13010
29	344173 ± 810799	267 ± 391	171179±402249	11891 ± 5681	819031 ±1455060
34	1297170 ± 2400155	5150 ± 10410	309138±354182	13297 ± 11422	433051 ± 1196225
41	523142 ± 975915	128254 ± 328808	3587 ± 3432	1309868 ± 2270368	359542 ± 917920
49	3724 ± 55078	11536 ± 9073	131 ± 254	402114 ± 769888	8755 ± 13077
59	17600 ± 29294	15886 ± 10472	2023 ± 5113	12315 ± 22021	6353 ± 10161

^a Tratamiento por 2 semanas, Benznidazol como fármaco de referencia, 8 ratones por grupo. ds desviación estandard.

Tabla 17. Efecto del tratamiento de ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi* (fase aguda) con [Pd(mpo)₂], [VO(mpo)₂] y Na mpo. Disminución del número de parásitos en relación al control al finalizar el protocolo.

Días post-infección	Disminución porcentual de parásitos ^a				
	Control	Benznidazol (50 mg) oral	[Pd(mpo) ₂] (5mg) oral	[VO(mpo) ₂] (5 mg) oral	Na mpo (5mg) oral
59	0	9.7↓	88.5↓	30.0↓	63.3↓

^a La disminución porcentual de la parasitemia fue determinada por comparación de la media de parásitos para cada grupo tratado con la media de parásitos para el grupo infectado control.

5.3- CONCLUSIONES

Se sintetizaron tres complejos con el ligando bioactivo Hmpo con Pd(II), Pt(II) o Au(I) como ión metálico central. A pesar de que la síntesis y caracterización parcial de los complejos [Pt(mpo)₂] y [Pd(mpo)₂] ya había sido reportada, éstos fueron sintetizados por modificaciones de estas técnicas y fueron caracterizados exhaustivamente. Para estos compuestos se llevó a cabo una caracterización analítica, fisicoquímica y estructural exhaustiva, así como también el estudio de su actividad antitripanosoma y de su probable mecanismo de acción. En particular, se estudiaron aspectos espectroscópicos y electroquímicos no informados en la literatura y se resolvió la estructura de [Pt(mpo)₂] por difracción por rayos X en monocristal. Lamentablemente, casi simultáneamente fue reportada su estructura por otros autores. Además, se evaluó su actividad anti-*T. cruzi* y se estudió en profundidad su probable mecanismo de acción. También se sintetizó y caracterizó mediante diferentes técnicas un nuevo complejo de Au(I)-mpo de fórmula [Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂]. Éste fue evaluado tanto en *T. cruzi* como en promastigotas de dos cepas de Leishmania y se estudió su probable mecanismo de acción. Con fines comparativos también se sintetizó el compuesto de V(IV) con mpo, [VO(mpo)₂].

Para todos los compuestos se evaluó su citotoxicidad en células mamíferas y se determinó el índice de selectividad hacia el parásito.

Todos los complejos mostraron actividad contra *T. cruzi in vitro* siendo significativamente más activos que el Nifurtimox y Benznidazol. En particular, la coordinación de mpo con Pd(II) condujo a triplicar, aproximadamente, la actividad con respecto a la actividad del ligando libre. Se puede concluir que la unión del ligando bioactivo mpo a los diferentes centros metálicos provocó un aumento de la actividad con respecto al ligando libre, demostrando nuevamente que la complejación puede resultar una estrategia interesante para mejorar la actividad antitripanosoma de ligandos orgánicos bioactivos. Además, la comparación de los resultados de actividad de los complejos similares de fórmula $[M(mpo)_2]$, donde M: Pd(II), Pt(II) o VO(II), muestra la clara incidencia de la naturaleza del centro metálico sobre la actividad biológica.

Por otro lado, el compuesto de Au(I), de estructura bien diferente a los anteriores, $[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$, demostró tener también un potente efecto antiproliferativo *in vitro* contra dos cepas de epimastigotas de *T. cruzi*. Este último complejo también mostró actividad antiproliferativa interesante sobre promastigotas de *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis*. *T. cruzi* y *Leishmania spp.* constituyen tripanosomátidos relacionados y son agentes etiológicos de enfermedades de importancia regional. Como se justificó previamente, el desarrollo de agentes metálicos con efectos antiproliferativos sobre ambos parásitos resultaría una herramienta terapéutica muy interesante. Entonces, que este compuesto muestre actividad sobre cultivos de *T. cruzi* y diferentes cepas de *Leishmania* constituye un resultado especialmente interesante.

Un aspecto adicional a considerar en la búsqueda de compuestos activos con actividad antiprotozoarios es su toxicidad en las células del huésped mamífero. Por lo tanto, se evaluó la toxicidad de estos compuestos en dos líneas celulares: macrófagos J774 y fibroblastos NCTC 929. Sobre la base de la relación entre el valor de CI_{50} de las células huésped fibroblastos dividido por el valor de CI_{50} en el parásito se determinó el índice de selectividad (IS). En base a criterios que establecen que sólo los compuestos que logran valores de IS

mayores de 50 deben ser considerados para nuevos controles y, en particular, para su estudio en modelos murinos, el compuesto [VO(mpo)₂], que presentó un IS = 61,14, fue seleccionado para su evaluación en ratones infectados junto al compuesto [Pd(mpo)₂], que siendo el más activo, también se incluyó en la evaluación *in vivo*. Este trabajo está siendo realizado en un centro especializado en Paraguay. Los resultados preliminares parecen alentadores.

También en el caso de estos compuestos se investigó para tratar de determinar su mecanismo de acción. Para este fin se probó su actividad inhibitoria de la enzima parasitaria NADH-fumarato reductasa, enzima ausente en el hospedero mamífero y principal blanco conocido del ligando libre. Adicionalmente, se estudió su efecto sobre otros tres blancos posibles, el metabolismo reductivo (producción de radicales libres intraparasitarios), la enzima parasitaria tripanotiona reductasa y el ADN. Todos los estudios realizados sugieren fuertemente que la acción tripanosomicida de estos complejos podría ser debida a la inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa específica del parásito. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de otros blancos adicionales que podrían contribuir a explicar el aumento de la actividad observada como resultado de la coordinación a iones metálicos.

Es de resaltar que como resultado de este Trabajo de Tesis se implementaron técnicas experimentales para evaluar la actividad inhibitoria de estos compuestos metálicos desarrollados sobre un blanco enzimático muy poco estudiado como lo es la NADH fumarato reductasa de *T. cruzi*. Esto resultará de utilidad futura para el grupo que integro ya que se dispondrá de una metodología adecuada y de la experiencia necesaria para evaluar el efecto inhibitorio de esta enzima de otros compuestos metálicos a desarrollar como potenciales antichagásicos.

5.3- BIBLIOGRAFÍA

1. Klein, R.A.; Linstead, D.J.; Wheeler, M.V. Carbon dioxide fixation in Trypanosomatids. *Parasitology* 1975, 71, 93-107.
2. Boveris, A.; Hertig, C.M.; Turrens, J.F. Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986, 19, 163-169.
3. Turrens, J.F. The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. *Biochem. J.* 1989, 259, 363-368.
4. Denicola-Seoane, A.; Rubbo, H.; Prodanov, E.; Turrens, J.F. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 54, 43-50.
5. Turrens, J.F. A possible role of the NADH-fumarate reductase in superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987, 25, 55-60.
6. Mracek, J.; Snyder, S.J.; Chavez, U.B.; Turrens, J.F. A soluble fumarate reductase in *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. *J. Protozool.* 1991, 38, 554-558.
7. Fairlamb, A.H.; Opperdoes, F.R. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes, with special reference to the glycosome. In: *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells* (Morgan, M.J., Ed.), 1986, pp. 183-224. Plenum, NewYork.
8. Ryley, J.F. Studies on the metabolism of the protozoa. 9. Comparative metabolism of blood-stream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem. J.* 1962, 85, 211-223.

9. Turrens, J.F.; Watts, B.P.; Jr., Zhong, L.; Docampo, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T-brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and antihelminthic imidazole derivatives. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996, 82, 125-129.
10. Turrens, J.F.; Newton, C.L.; Zhong, L.; Hernandez, F.R.; Whitfield, J.; Docampo, R. Mercaptopyridine-*N*-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiology Letters* 1999, 175, 217-221.
11. Jones, R. A.; Katritsky, A. R. *N*-oxides and related compounds. Part XVII. The tautomerism of mercapto- and acylamino-pyridine 1-oxides. *J. Chem. Soc.* 1960, 2937-2941.
12. Spinner, E. The infrared spectra of some *N*-heteroaromatic mercaptocompounds and of their *N*-methyl and *S*-methyl derivatives. *J. Chem. Soc.*, 1960, 1237-1241.
13. Wedig, J. H.; Mitoma, C.; Howdy R. A.; Thomas, D. W. Identification of metabolites from salts of pyridine-2-thiol- 1 -oxide following Intravenous and dermal administration to swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1978, 43, 373-379.
14. James, B. D.; Magee, R. J.; Patalinghug, W. C.; Skelton, B. W.; White, A. H. Five-coordinate triphenyltin(IV) -sulfur compounds. Crystal structures of the aminoethanethiol and 2-mercaptopyridine-*N*-oxide derivatives. *J. Organomet. Chem.* 1994, 467, 51-55.
15. Dewanjee, M. K.; Robinson, R. P.; Hellman, R. L.; Ganz, W. I.; Serafini, A. N.; Sfakianakis, G. N. Technetium-99m-labeled platelets: comparison of labeling with a new lipid-soluble Sn(II)-mercaptopyridine-*N*-oxide and ^{99m}Tc-HMPAO. *Nucl. Med. Biol.* 1991, 18, 461-468.
16. Xiong, R.; Zuo, J.; You, X. Synthesis and X ray structure of the first lanthanide 2-mercaptopyridine *N*-oxide complex, tris-(1-hydroxy-2(1H)-

pyridinethionato-O,S) bis[sulfinylbis (methane)] Samarium(III). *Polyhedron* 1996, 15, 3321-3324.

17. Robinson, M. A. Complexes of 1-hydroxy 2-pyridinethione. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1964, 26, 1277-1281.

18. Chen, X.; Hu, Y.; Wu, D.; Weng, L.; Kang, B. Syntheses and electrochemistry of some transition metal complexes with 2-mercaptopyridine *N*-oxide and crystal structure of bis(2-mercaptopyridine *N*-oxide)nickel(II). *Polyhedron* 1991, 10, 2651-2657.

19. Hu, Y. H.; Weng, L. H.; Huang, L. R.; Chen, X. T.; Wu, D. X.; Kang, B. S. Structure of tris(2-mercaptopyridine 1-oxido)cobalt(III) acetonitrile solvate. *Acta Cryst., Sect. C* 1991, 47, 2655-2657.

20. Kang, B.; Xu, Y.; Peng, J.; Wu, D.; Chen, X.; Hu, Y.; Hong, M.; Lu, J. Cobalt complexes with pnictogen (phosphine or pyridine) and thiolato ligands. Syntheses. X-ray crystal structures and spectroscopic characterization. *Polyhedron* 1993, 12, 871-878.

21. Jiang, F.; Hong, M.; Xie, X.; Cao, R.; Kang, B.; Wu, D.; Liu, H. A tetranuclear cobalt complex with mercaptopyridine *N*-oxide as ligand. Synthesis and crystal structure of $[\text{Na}_3\text{Co}_4(\mu_3\text{O})_2(\text{mpo})_8(\text{DMF})_4]\text{Br}\cdot 2\text{DMF}$ (mpo=2-mercaptopyridine-*N*-oxide). *Inorg. Chim. Acta* 1995, 231, 153-157.

22. Xie, X.; Jiang, F.; Cao, R.; Kang, B.; Hong, M.; Liu, H. Anti-ferromagnetic exchange interaction in the tetracobalt complex of 2-mercaptopyridine-*N* oxide (mpo), $[\text{Na}_3\text{Co}_4(\text{mpo})_8(\mu_3\text{O})_2(\text{DMF})_4]\text{Br}\cdot\text{DMF}$. *Polyhedron* 1995, 14, 2205-2208.

23. Hamaguchi, T.; Inoue, Y.; Ujimoto, K.; Ando I. Synthesis, crystal structure and electrochemistry of a ruthenium complex coordinated with an ambidentate 2-mercaptopyridinato *N*-oxide ligand. *Polyhedron* 2008, 27, 2031–2034.

24. Crans, D.C. in Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications, A. Tracey & D.C. Crans (Editores), American Chemical Society, Washington, D.C. 1998.
25. Thompson, K. H.; Lichter, J.; LeBel, C.; Scaife, M.C.; McNeill, J.H.; Orvig, C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 554–558.
26. Sakurai, H.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H. Current state for the development of metallopharmaceutics and anti-diabetic metal complexes. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 2383–2392.
27. Sakurai, H.; Sano, H.; Takino, T.; Yasui, H. A new type of orally active insulin-mimetic vanadyl complex: bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) with VO(S₂O₂) coordination mode. *Chem. Lett.* 1999, 913-914.
28. Sakurai, H.; Sano, H.; Takino, T.; Yasui, H. An orally active antidiabetic vanadyl complex, bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV), with VO(S₂O₂) coordination mode; in vitro and in vivo evaluations in rats. *J. Inorg. Biochem.* 2000, 80, 99-105.
29. Takeshita, S.; Kawamura, I.; Yasuno, T.; Kimura, C.; Yamamoto, T.; Seki, J.; Tamura, A.; Sakurai, H.; Goto, T. Amelioration of insulin resistance in diabetic ob/ob mice by a new type of orally active insulin-mimetic vanadyl complex: bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) with VO(S(2)O(2)) coordination mode. *J. Inorg. Biochem.* 85 (2001) 179-186.
30. Hodge, A.; Nordquest, K.; Blinn, E. L. Oxovanadium(V) complexes containing bidentate nitrogen-sulfur and oxygen-sulfur ligands. *Inorg. Chim. Acta* 1972, 6, 491-498.
31. Tsagkalidis, W.; Rodewald, D.; Rehder, D.; Vergopoulos, V. Bis (2-mercaptopyridine-*N* oxide) oxovanadium(IV): synthesis, structure and its conversion to the dichloro complex. *Inorg. Chim. Acta*, 1994, 219, 213-215.

32. Kiss, E.; Kawabe, K.; Tamura, A.; Jakuscha, T.; Sakurai, H.; Kiss, T. Chemical speciation of insulinomimetic VO(IV) complexes of pyridine-*N*-oxide derivatives: binary and ternary systems. *J. Inorg. Biochem.* 2003, 95, 69–76
33. Shi, J.; Wen, T.; Zheng, Y.; Zhong, S.; Wu, D.; Liu, Q.; Kang, B.; Wu, B.; Mak, T. C. W. Palladium complexes with simultaneous O:S coordination, syntheses, structures and characterization of complexes with 2-mercaptophenol or 2-mercaptopyridine *N*-oxide. *Polyhedron* 1997, 16, 369-375.
34. Zhou, J.; Li, Y.; Liu, Z.; Chen, X. Bis[2-mercaptopyridine *N*-oxide(1-)- K^2N,O]-platinum(II), *Acta Cryst.* 2005, E61, m195-m197.
35. Urbina, J. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert Opin Ther Patents* 2003, 13, 661-669.
36. Parajón-Costa, B.S.; González-Baró, A.C.; Baran, E.J. Electrochemical and spectroscopic behaviour of bis(2-mercaptopyridine-*N*-oxide)oxovanadium(IV). *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2002, 628, 1419–1424.
37. Lin-Vien, D.; Colthup, N.B.; Fateley, W.G.; Grasselli, J.G. The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules. Academic Press, Boston, 1999.
38. Urquiola, C.; Vieites, M.; Aguirre, G.; Marín, A.; Solano, B.; Arrambide, G.; Lavaggi, M.L.; Torre, M.H.; González, M.; Monge, A.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N^1,N^4 -dioxide derivatives by complexation with vanadium. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 5503–5509.
39. Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J.D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel antitrypanosomal agents

based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322–3331.

40. Vieites, M.; Gambino, D.; González, M.; Cerecetto, H.; Tarulli, S.H.; Quinzani, O.V.; Baran, E.J. Pd(thiosaccharinato)₂.H₂O, the first thiosaccharinato complex of a platinum-group metal. *J. Coord. Chem.* 2006, 59, 101–106.

41. Gambino, D.; Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, M.; González, M.; Baran, E.J.; Cerecetto, H. Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: experimental and theoretical study. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spect* 2007, 68, 341–348.

42. Vieites, M.; Smircich, P.; Parajón-Costa, B.; Rodríguez, J.; Galaz, V.; Olea-Azar, C.; Otero, L.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Gómez-Barrio, A.; Garat, B.; Gambino, D. Potent in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008, 13, 723–735.

43. Clark, R.H.; Flint, C.D.; Hempleman, A.J. F.t.i.r. and Raman spectra of triphenylphosphine, triphenylarsine, triphenylstibine, and dibenzylsulphide. *Spectrochim. Acta A* 1987, 43, 805–816.

44. Pearson, C.; Beauchamp, A.L. ¹H NMR study of monomeric chlororhenium(III) complexes with triarylphosphines and nitriles. *Inorg. Chim. Acta* 237 (1995) 13–18.

45. Canales, F.; Gimeno, C.; Laguna, A.; Villacampa, M.D. Auophilicity at sulfur centers. Synthesis of the polyauroated species [S(AuPR₃)_n]⁽ⁿ⁻²⁾⁺ (n = 2–6). *Inorg. Chim. Acta* 1996, 244, 1996, 95–103.

46. Canales, O.F.; Gimeno, M.C.; Jones, P.G.; Laguna, A. Synthesis of [Au₂(SC₆F₅)₂(μ-dppf)] and [Au₂(μ-SC₆F₅)(μ-dppf)] (dppf = 1,1'-

bis(diphenylphosphino)ferrocene). Reactivity toward various metallic fragments. *Organometallics* 1999, 18, 3142–3148.

47. Conner, K.A.; Walton, R.A. *Comprehensive Coordination Chemistry* 4, Middle Transition Elements, Pergamon Press, 1987, p. 125.

48. Schmidbaur, H. The aurophilicity phenomenon: A decade of experimental findings, theoretical concepts and emerging applications. *Gold Bulletin* 2000, 33, 1-8.

49. Schmidbaur, H.; Schier, A. A briefing on auraphilicity. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 1931–1951.

50. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd edition JohnWiley & Sons, New York, 2001.

51. Nicholson, R. S.; Shain, I. Theory of stationary electrode polarography: single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.* 1964, 36, 706-723.

52. Brown, E. R.; Large, R. F. *Electrochemical Methods in Physical Methods of Chemistry* 1971, (A.Weisberger, B.W.Rositer, Eds.), part IIA, Ch.6, Interscience, New York.

53. Benítez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Arrambide, G.; Navarro, M.; Costa Pessoa, J.; Garat, B.; Gambino, D. Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 609-616.

54. Buckner, F.S.; Verlinde, C.L.; La Flamme, A.C.; Van Voorhis, W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using

parasites expressing betagalactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40, 2592–2597.

55. Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003,19, 502-508.

56. Sánchez-Delgado, R. A.; Anzellotti, A.; Suárez, L. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: malaria, trypanosomiasis, and leishmaniasis in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), *Metal ions in Biological Systems*, vol. 41, Marcel Dekker, New York, 2004, pp. 379-419.

57. Chibale, K. Towards broadspectrum antiparasitic agents. *ARKIVOC IX* 2002, 93-98.

58. Ribeiro, I.; Sevcsik, A.M.; Alves, F.; Diap, G.; Don, R.; Harhay, M.O.; Chang, S.; Pecoul, B. New, improved treatments for Chagas Disease: From the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e484. Doi:10.1371/journal.pntd.0000484.

59. El-Sayed, N. M.; *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005, 309, 404-409.

60. Nwaka, S.; Hudson, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006, 5, 941-955.

61. Vieites, M.; Smircich, P.; Guggeri, L.; Marchán, E.; Gómez-Barrio, A.; Navarro, M.; Garat, B.; Gambino, D. 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. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 1300-1306.

62. Otero, L.; Smircich, P.; Vieites, M.; Ciganda, M.; Cardoso Severino, P.; Terenzi, H.; Cerecetto, H.; Gambino, D.; Garat, B. DNA conformational changes

and cleavage by ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes. *J. Inorg. Biochem.* 2007, 101, 74–79.

63. Otero, L.; Maya, J.D.; Morello, A.; Rigol, C.; Barriga, G.; Rodriguez, J.; Folch, C.; Norambuena, E.; González, M.; Olea Azar, C.; Cerecetto, H.; Gambino, D. Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Med. Chem.* 2008, 4, 119–126.

64. Krauth-Siegel, R. L.; Inhoff O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitol. Res.* 2003, 90, S77–S85.

65. Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H.; Schirmer, R. H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing Plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 690–715.

66. Irigoín, F.; Cibils, L.; Comini, M. A.; Wilkinson, S. R.; Flohé, L.; Radi, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Rad. Biol. & Med.* 2008, 45, 733–742.

67. Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1780, 1236–1248.

68. Bonse, S.; Richards, J. M.; Ross, S. A.; Lowe, G.; Krauth-Siegel, R. L. (2,2':6',2''-terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4812-4821.

69. Inhoff, O.; Richards, J. M.; Briet, J.W.; Lowe, G.; Krauth-Siegel, R. L. Coupling of a competitive and an irreversible ligand generates mixed type inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4524–4530.

70. Magalhães Moreira, D. R.; Lima Leite, A. C.; Ribeiro dos Santos, R.; Soares, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr. Drug Targets* 2009, 10, 212-231.

71. Krauth-Siegel RL. Personal communication

CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONTENIDO

6.1- CONCLUSIONES GENERALES

6.2- PERSPECTIVAS

6.2.1- Complejos de Pd y Pt con tiosemicarbazonas bioactivas frente a *T. cruzi*

6.2.2- Complejos metálicos de *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo)

6.2.3- Complejos de los metales estudiados con otros ligandos orgánicos bioactivos

6.2.4- Consideraciones finales

6.1- CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados generados en este Trabajo de Tesis pueden ser analizados desde dos puntos de vista: uno puramente Químico Inorgánico, relacionado con la síntesis y la caracterización de nuevos compuestos de coordinación, y otro Químico Médico, relacionado con la potencialidad de dichos compuestos como agentes terapéuticos para combatir la enfermedad de Chagas.

Desde el punto de vista Químico Inorgánico, se sintetizaron y caracterizaron complejos de Pt(II) con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofuraldehído y de 3-(5-nitrofuril)acroleína y complejos de Pd(II), Pt(II) y Au(I) con *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo). Con fines comparativos también se sintetizó el complejo [VO(mpo)₂].

En particular, se obtuvieron dieciséis complejos de platino(II), de fórmulas [PtCl₂(HL)] y [Pt(L)₂], con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído y de la 3-(5-nitrofuril)acroleína. Además, se sintetizaron complejos de Pd(II), Pt(II) y Au(I) con Hmpo, de fórmulas [Pd(mpo)₂], [Pt(mpo)₂] y [Au₂(mpo)₂(PPh₃)₂], respectivamente. A pesar de que la síntesis y caracterización parcial de los complejos de Pd(II) y Pt(II) ya había sido reportada, se modificó las técnicas originales y se realizó una caracterización fisicoquímica y estructural exhaustiva de los mismos. En particular, el complejo de Pt(II) fue sintetizado y caracterizado exhaustivamente al inicio de este Trabajo de Tesis, incluyendo el estudio de su estructura por difracción de rayos X en monocristal. Lamentablemente, al poco tiempo fue reportada su estructura por otros autores.

Para ambas familias de compuestos se realizó un estudio comparativo de los resultados fisicoquímico-estructurales obtenidos. Además, en el caso de los compuestos de Pt(II) con tiosemicarbazonas los resultados obtenidos se compararon exhaustivamente con los obtenidos previamente por el grupo que integro para sus análogos de Pd(II).

Desde el punto de vista de la Química Inorgánica Medicinal, se demostró que el efecto de la complejación con distintos metales sobre la actividad anti *T. cruzi*

de los ligandos bioactivos seleccionados resultó fuertemente dependiente del metal y de la naturaleza del complejo obtenido.

Los compuestos de Pt(II) con tiosemicarbazonas mostraron una buena actividad antitripanosoma sobre la forma epimastigota del parásito y muchos de ellos resultaron más activos que sus correspondientes ligandos. Como era de esperar en función de nuestra experiencia previa, la actividad varió al cambiar el ligando tiosemicarbazona. Además, la mayoría de estos compuestos resultó más activa que el Nifurtimox contra la forma infectiva tripomastigota del parásito. No fue posible encontrar una justificación a la tendencia observada de actividades para las dos series de compuestos. Los compuestos de Pt presentaron citotoxicidad inespecífica elevada, pero mostraron un índice de selectividad hacia el parásito ligeramente mayor que el de los ligandos libres y sus complejos de Pd. Se comprobó que al igual que fuera propuesto para los complejos análogos de Pd, los complejos de Pt obtenidos podrían actuar por un mecanismo de acción dual: interacción con ADN y generación de estrés oxidativo en el parásito.

Todos los compuestos metálicos con el ligando bioactivo Hmpo estudiados mostraron un aumento significativo de la actividad anti *T.cruzi* con respecto al ligando libre. En particular, los compuestos $[Pd(mpo)_2]$ y $[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ mostraron un incremento muy importante, lo que demuestra que nuestra estrategia es valedera. El complejo de Au con mpo también mostró actividad antiproliferativa interesante sobre promastigotas de *Leishmania*. Este resultado muestra la posibilidad de desarrollar compuestos metálicos con actividad contra diferentes tripanosomátidos. Como ya se discutió esto representa una estrategia muy interesante para el desarrollo de agentes contra parásitos que afectan a poblaciones pobres de nuestra región. Los compuestos mostraron citotoxicidad en macrófagos adecuada pero algunos de ellos mostraron índices de selectividad respecto a fibroblastos relativamente bajos. Esto determinó que solo los compuestos $[VO(mpo)_2]$ y $[Pd(mpo)_2]$ pasaran en esta instancia a la fase de estudios *in vivo*. Los estudios realizados para tratar de determinar el mecanismo de acción de estos complejos, sugieren fuertemente que la acción tripanosomicida podría ser debida principalmente a la inhibición de la enzima

NADH-fumarato reductasa específica del parásito. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de otros blancos adicionales que podrían contribuir para explicar el aumento de la actividad observada.

En suma y como conclusión general, los resultados de este Trabajo de Tesis muestran que la coordinación de compuestos orgánicos antitripanosomales con metales de interés farmacológico puede resultar una adecuada estrategia para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas contra enfermedades tropicales producidas por tripanosomátidos, en particular la Tripanosomiasis Americana.

Parte del trabajo informado en esta tesis se plasmó en las publicaciones siguientes (Apéndice 2):

1. Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. M. Vieites, L. Otero, D. Santos, D. Gajardo, J. Toloza, R. Figueroa, E. Norambuena, C. Olea-Azar, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Morello, J. D. Maya, B. Garat, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Special Issue dedicated to 13th ICBIC 2007, 102 (2008) 1033-1043.
2. Potent in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol *N*-oxide metal complexes bearing inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. M. Vieites, P. Smircich, B. Parajón-Costa, J. Rodríguez, V. Galaz, C. Olea-Azar, L. Otero, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Gómez-Barrio, B. Garat, D. Gambino, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(5) (2008) 723-735.
3. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. D. Maya, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103 (2009) 411-418.

4. 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. M. Vieites, P. Smircich, L. Guggeri, E. Marchán, A. Gómez-Barrio, M. Navarro, B. Garat, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103 (2009) 1300-1306.
5. DNA as molecular target of analogous palladium and platinum anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: a comparative study. M. Vieites, P. Smircich, M. Pagano, L. Otero, F. Luane Fischer, H. Terenzi, M. J. Prieto, V. Moreno, B. Garat, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry, celebrating Bio-Inorganic Chemistry in Latin America*, 105 (2011) 1704-1711.
6. Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: experimental and theoretical study. D. Gambino, L. Otero, M. Vieites, M. Boiani, M. González, E. J. Baran, H. Cerecetto. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 68 (2007) 341-348. Esta última publicación no formó parte central de este Trabajo de Tesis.

También se presentó una solicitud de patente que involucra el compuesto de Au con mpo: UR N° 31119/2008 Complejos de oro con 2-mercaptopiridina-*N*-óxido: su utilización como agentes antiparasitarios. Inventores: Dinorah Gambino, Marisol Vieites, Maribel Navarro.

6.2- PERSPECTIVAS

6.2.1- Complejos de Pd y Pt con tiosemicarbazonas bioactivas frente a *T. cruzi*

A partir de los resultados obtenidos surgen nuevas alternativas en cuanto a estrategias sintéticas que permitan obtener complejos que tengan la posibilidad de actuar por un mecanismo de acción dual, pero que no presenten los

inconvenientes relacionados con la biodisponibilidad y toxicidad que mostraron los complejos desarrollados. En este sentido, se plantean las siguientes actividades futuras:

- extender los estudios de este Trabajo de Tesis a otros metales de interés terapéutico para obtener complejos con diferentes propiedades fisicoquímicas y estructurales, lo que puede conducir a compuestos que conserven la actividad anti *T. cruzi* encontrada pero que presenten menor toxicidad y, en forma general, presenten mejores características fisicoquímicas de importancia biológica y farmacológicas.

- obtener compuestos de Pt(II) con los ligandos bioactivos elegidos, pero incluyendo en la esfera de coordinación un coligando. Se seleccionarán coligandos que contribuyan a incrementar la solubilidad y modular la lipofilia, a efectos de mejorar la biodisponibilidad (por ejemplo, algún aminoácido), y coligandos que permitan afianzar la unión del complejo al ADN (por ejemplo, algún ligando plano que se una a la doble hebra de ADN por intercalación, como la 1,10-fenantrolina).

- obtener complejos de Pt(IV) con estos ligandos bioactivos y otros coligandos en la esfera de coordinación de este ion central que forma complejos de número de coordinación 6 (octaédricos) y cuyos compuestos están siendo muy estudiados en la actualidad con fines de terapia antitumoral.

La obtención de una amplia serie de compuestos de platino estructuralmente relacionados, permitirá profundizar en estudios de relación estructura, propiedades fisicoquímicas – actividad biológica, aspecto en desarrollo incipiente en el área Inorgánica de la Química Medicinal. Además, los resultados emergentes de este estudio constituirán el punto de partida para un futuro desarrollo de otros compuestos de Pt(II) con este tipo de ligandos y coligandos adecuados y, probablemente, también de Pt(IV). Este último aspecto resulta especialmente interesante si se toma en consideración que hasta el momento no se han reportado compuestos de Pt(IV) con

tiosemicarbazonas como ligandos, y sólo se ha encontrado descrito en la bibliografía un compuesto de Pt(IV) con una semicarbazona.

6.2.2- Complejos metálicos de N-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo)

Los resultados de este Trabajo de Tesis sirven de antecedente para el desarrollo de estrategias sintéticas que permitan obtener complejos que tengan la posibilidad de actuar por el mismo mecanismo de acción, pero que muestren actividades incrementadas y no presenten inconvenientes relacionados con la toxicidad. En este sentido, ya se han iniciado trabajos de desarrollo de nuevos complejos de Au(III) con este ligando del tipo $[Au^{III}mpoX_2]$, donde X = Cl o Br. Además, se pretende generar complejos de otros metales con este ligando.

También se explorará la estrategia de desarrollo de complejos de ligandos mixtos para obtener compuestos metálicos con mpo y otros coligandos en la esfera de coordinación, a efectos de mejorar los aspectos biológicos de los compuestos manteniendo el blanco de acción.

Además, se pretende profundizar en los estudios relativos a la enzima NADH fumarato reductasa intentando obtenerla de forma pura por expresión de la misma en bacterias y aislamiento. Para estos estudios deberá contarse con el apoyo científico de especialistas del área.

También, ya se están explorando otras actividades del compuesto $[Au_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ en conjunto con el Prof. G. Salinas, quien lo está evaluando como inhibidor de selenoenzimas en *Echinococcus granulosus*.

6.2.3. Complejos de los metales estudiados con otros ligandos orgánicos bioactivos

Obviamente, tanto las estrategias sintéticas como de estudio de mecanismo de acción desarrolladas en este Trabajo de Tesis podrán ser aplicadas al desarrollo de nuevos compuestos metálicos con otros ligandos orgánicos que presenten actividad anti-*T. cruzi*. En particular, la experiencia adquirida en la

realización e interpretación de estudios de interacción con ADN podrán ser volcadas al trabajo global del grupo que integro.

6.2.4. Consideraciones finales

Por último, cabe destacar que aún cuando estas perspectivas de trabajo futuro han sido planificadas desde un punto de vista de Químico Médico, los resultados que surjan de estos trabajos generarán aportes importantes a la Química de Coordinación de los metales estudiados.

Desde el punto de vista de la Química Inorgánica Medicinal se pretende avanzar hacia el desarrollo de compuestos metálicos con actividad contra *T. cruzi* y/o *Leishmania spp* que ameriten la realización de estudios *in vivo*. Todo el conocimiento generado incentivará a la comunidad científica del área a desarrollar nuevos complejos según la estrategia planteada por el grupo que integro y, en particular, en este Trabajo de Tesis. Se espera que el esfuerzo realizado conduzca en un futuro a algún compuesto metálico con potencialidad para ser estudiado a fines de ser introducido en fases más avanzadas o incluso en el mercado farmacéutico.

APÉNDICE 1

ALGUNAS INFORMACIONES ADICIONALES

CIF de [Pt(mpo)₂]

```
data_s97
_audit_creation_method      SHELXL-97
_chemical_name_systematic
;
?
;
_chemical_name_common      ?
_chemical_melting_point    ?
_chemical_formula_moiety    ?
_chemical_formula_sum      'C8 H8 N2 O2 Pt S2'
_chemical_formula_weight    423.37

loop_
_atom_type_symbol
_atom_type_description
_atom_type_scatter_dispersion_real
_atom_type_scatter_dispersion_imag
_atom_type_scatter_source
'Pt' 'Pt' -4.5932 6.9264
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'
'S' 'S' 0.3331 0.5567
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'
'O' 'O' 0.0492 0.0322
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'
'N' 'N' 0.0311 0.0180
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'
'C' 'C' 0.0181 0.0091
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'
'H' 'H' 0.0000 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'
_symmetry_cell_setting      monoclinic
_symmetry_space_group_name_H-M P21/c
loop_
_symmetry_equiv_pos_as_xyz
'x, y, z'
```

'-x, y+1/2, -z+1/2'
'-x, -y, -z'
'x, -y-1/2, z-1/2'

_cell_length_a 7.520(4)
_cell_length_b 7.944(5)
_cell_length_c 19.452(18)
_cell_angle_alpha 90.00
_cell_angle_beta 94.89(6)
_cell_angle_gamma 90.00
_cell_volume 1157.8(14)
_cell_formula_units_Z 4
_cell_measurement_temperature 293(2)
_cell_measurement_reflns_used ?
_cell_measurement_theta_min ?
_cell_measurement_theta_max ?

_exptl_crystal_description ?
_exptl_crystal_colour ?
_exptl_crystal_size_max ?
_exptl_crystal_size_mid ?
_exptl_crystal_size_min ?
_exptl_crystal_density_meas ?
_exptl_crystal_density_diffn 2.429
_exptl_crystal_density_method 'not measured'
_exptl_crystal_F_000 784
_exptl_absorpt_coefficient_mu 25.917
_exptl_absorpt_correction_type ?
_exptl_absorpt_correction_T_min ?
_exptl_absorpt_correction_T_max ?
_exptl_absorpt_process_details ?

_exptl_special_details
;
?
;

_diffn_ambient_temperature 293(2)
_diffn_radiation_wavelength 1.54184
_diffn_radiation_type CuK α

```

_diffrn_radiation_source      'fine-focus sealed tube'
_diffrn_radiation_monochromator graphite
_diffrn_measurement_device_type ?
_diffrn_measurement_method   ?
_diffrn_detector_area_resol_mean ?
_diffrn_standards_number     ?
_diffrn_standards_interval_count ?
_diffrn_standards_interval_time ?
_diffrn_standards_decay_%    ?
_diffrn_reflns_number        2621
_diffrn_reflns_av_R_equivalents 0.1191
_diffrn_reflns_av_sigmal/netl 0.0492
_diffrn_reflns_limit_h_min    0
_diffrn_reflns_limit_h_max    9
_diffrn_reflns_limit_k_min    -1
_diffrn_reflns_limit_k_max    9
_diffrn_reflns_limit_l_min    -23
_diffrn_reflns_limit_l_max    23
_diffrn_reflns_theta_min     4.56
_diffrn_reflns_theta_max     67.96
_reflns_number_total         2105
_reflns_number_gt            1775
_reflns_threshold_expression  >2sigma(I)

_computing_data_collection    ?
_computing_cell_refinement    ?
_computing_data_reduction     ?
_computing_structure_solution  'SHELXS-97 (Sheldrick, 1997)'
_computing_structure_refinement 'SHELXL-97 (Sheldrick, 1997)'
_computing_molecular_graphics ?
_computing_publication_material ?

```

```
_refine_special_details
```

```
;
```

Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > 2\sigma(F^2)$ is used only for calculating R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R-

factors based on ALL data will be even larger.

;

```
_refine_ls_structure_factor_coef Fsqd
_refine_ls_matrix_type full
_refine_ls_weighting_scheme calc
_refine_ls_weighting_details
'calc w=1/[(s^2*(Fo^2)+(0.2000P)^2+0.0000P] where P=(Fo^2+2Fc^2)/3'
_atom_sites_solution_primary direct
_atom_sites_solution_secondary difmap
_atom_sites_solution_hydrogens geom
_refine_ls_hydrogen_treatment mixed
_refine_ls_extinction_method none
_refine_ls_extinction_coef ?
_refine_ls_number_reflns 2105
_refine_ls_number_parameters 154
_refine_ls_number_restraints 0
_refine_ls_R_factor_all 0.1175
_refine_ls_R_factor_gt 0.1070
_refine_ls_wR_factor_ref 0.3166
_refine_ls_wR_factor_gt 0.2811
_refine_ls_goodness_of_fit_ref 1.454
_refine_ls_restrained_S_all 1.454
_refine_ls_shift/su_max 0.001
_refine_ls_shift/su_mean 0.000
```

loop_

```
_atom_site_label
_atom_site_type_symbol
_atom_site_fract_x
_atom_site_fract_y
_atom_site_fract_z
_atom_site_U_iso_or_equiv
_atom_site_adp_type
_atom_site_occupancy
_atom_site_symmetry_multiplicity
_atom_site_calc_flag
_atom_site_refinement_flags
_atom_site_disorder_assembly
_atom_site_disorder_group
```

Pt Pt 0.39401(8) 0.84941(10) 0.09173(3) 0.0506(5) Uani 1 1 d . . .
S1 S 0.4646(5) 0.9359(7) 0.2025(2) 0.0612(11) Uani 1 1 d . . .
S2 S 0.3176(5) 0.7675(7) -0.0181(2) 0.0642(12) Uani 1 1 d . . .
O1 O 0.1445(15) 0.9166(16) 0.1069(6) 0.055(3) Uani 1 1 d . . .
O2 O 0.6467(16) 0.7791(17) 0.0756(6) 0.058(3) Uani 1 1 d . . .
N1 N 0.1215(16) 0.9960(17) 0.1683(6) 0.047(3) Uani 1 1 d . . .
N2 N 0.6667(16) 0.7345(19) 0.0088(7) 0.053(3) Uani 1 1 d . . .
C11 C -0.048(3) 1.045(2) 0.1762(12) 0.066(5) Uani 1 1 d . . .
H11 H -0.1391 1.0281 0.1414 0.079 Uiso 1 1 calc R . .
C12 C -0.081(3) 1.118(3) 0.2355(12) 0.064(5) Uani 1 1 d . . .
H12 H -0.1959 1.1540 0.2415 0.077 Uiso 1 1 calc R . .
C13 C 0.051(3) 1.1410(18) 0.2881(11) 0.054(5) Uani 1 1 d . . .
H13 H 0.0245 1.1954 0.3284 0.065 Uiso 1 1 calc R . .
C14 C 0.218(2) 1.0848(18) 0.2812(9) 0.051(4) Uani 1 1 d . . .
H14 H 0.3059 1.0930 0.3175 0.062 Uiso 1 1 calc R . .
C15 C 0.256(2) 1.011(2) 0.2157(9) 0.052(4) Uani 1 1 d . . .
C21 C 0.838(3) 0.707(2) -0.0057(10) 0.059(4) Uani 1 1 d . . .
H21 H 0.9319 0.7298 0.0275 0.070 Uiso 1 1 calc R . .
C22 C 0.874(3) 0.645(2) -0.0709(12) 0.066(5) Uani 1 1 d . . .
H22 H 0.9901 0.6174 -0.0802 0.079 Uiso 1 1 calc R . .
C23 C 0.733(3) 0.627(3) -0.1205(10) 0.071(6) Uani 1 1 d . . .
H23 H 0.7533 0.5898 -0.1646 0.086 Uiso 1 1 calc R . .
C24 C 0.568(3) 0.662(2) -0.1047(13) 0.063(5) Uani 1 1 d . . .
H24 H 0.4758 0.6486 -0.1391 0.075 Uiso 1 1 calc R . .
C25 C 0.523(2) 0.718(2) -0.0390(10) 0.061(4) Uani 1 1 d . . .

loop_

_atom_site_aniso_label

_atom_site_aniso_U_11

_atom_site_aniso_U_22

_atom_site_aniso_U_33

_atom_site_aniso_U_23

_atom_site_aniso_U_13

_atom_site_aniso_U_12

Pt 0.0377(7) 0.0642(8) 0.0518(7) 0.0037(2) 0.0148(4) -0.0005(2)

S1 0.040(2) 0.088(3) 0.057(2) -0.005(2) 0.0127(16) 0.003(2)

S2 0.038(2) 0.093(3) 0.063(2) 0.003(2) 0.0120(17) 0.002(2)

O1 0.046(6) 0.061(7) 0.061(6) -0.006(6) 0.019(5) -0.001(5)

O2 0.054(7) 0.077(8) 0.046(6) -0.009(6) 0.019(5) 0.002(6)

N1 0.032(6) 0.058(6) 0.050(7) 0.000(6) 0.006(5) -0.001(5)

N2 0.031(6) 0.079(9) 0.050(7) 0.009(7) 0.010(5) 0.002(6)
C11 0.050(10) 0.059(10) 0.092(13) 0.021(9) 0.020(9) 0.005(8)
C12 0.043(10) 0.077(11) 0.076(13) -0.001(10) 0.025(9) 0.012(9)
C13 0.065(12) 0.041(8) 0.061(11) 0.007(7) 0.025(9) 0.020(7)
C14 0.055(9) 0.037(7) 0.066(10) 0.000(7) 0.031(8) 0.013(7)
C15 0.046(8) 0.043(7) 0.069(10) -0.009(7) 0.022(7) -0.003(6)
C21 0.058(11) 0.057(9) 0.059(10) 0.005(8) -0.002(8) 0.012(9)
C22 0.059(12) 0.065(12) 0.076(13) 0.000(8) 0.018(10) 0.008(8)
C23 0.077(15) 0.106(16) 0.032(8) 0.003(9) 0.014(9) 0.010(12)
C24 0.056(10) 0.070(13) 0.063(10) 0.013(8) 0.016(9) 0.006(8)
C25 0.040(8) 0.065(10) 0.083(12) 0.020(9) 0.031(8) -0.003(8)

_geom_special_details

;

All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

;

loop_

_geom_bond_atom_site_label_1

_geom_bond_atom_site_label_2

_geom_bond_distance

_geom_bond_site_symmetry_2

_geom_bond_publ_flag

Pt O1 1.997(11) . ?

Pt O2 2.031(12) . ?

Pt S2 2.260(5) . ?

Pt S1 2.280(5) . ?

S1 C15 1.721(16) . ?

S2 C25 1.681(17) . ?

O1 N1 1.375(17) . ?

O2 N2 1.368(16) . ?

N1 C15 1.31(2) . ?

N1 C11 1.36(2) . ?

N2 C21 1.36(2) . ?

N2 C25 1.37(2) . ?

C11 C12 1.33(3) . ?
C12 C13 1.37(3) . ?
C13 C14 1.35(3) . ?
C14 C15 1.45(2) . ?
C21 C22 1.41(3) . ?
C22 C23 1.38(3) . ?
C23 C24 1.33(3) . ?
C24 C25 1.42(3) . ?

loop_

_geom_angle_atom_site_label_1

_geom_angle_atom_site_label_2

_geom_angle_atom_site_label_3

_geom_angle

_geom_angle_site_symmetry_1

_geom_angle_site_symmetry_3

_geom_angle_publ_flag

O1 Pt O2 179.4(5) . . ?

O1 Pt S2 92.9(4) . . ?

O2 Pt S2 86.6(3) . . ?

O1 Pt S1 85.8(4) . . ?

O2 Pt S1 94.8(3) . . ?

S2 Pt S1 178.55(15) . . ?

C15 S1 Pt 96.0(6) . . ?

C25 S2 Pt 97.6(8) . . ?

N1 O1 Pt 116.1(9) . . ?

N2 O2 Pt 113.5(9) . . ?

C15 N1 C11 124.6(16) . . ?

C15 N1 O1 120.4(12) . . ?

C11 N1 O1 114.8(15) . . ?

C21 N2 O2 114.8(14) . . ?

C21 N2 C25 123.4(15) . . ?

O2 N2 C25 121.8(12) . . ?

C12 C11 N1 118(2) . . ?

C11 C12 C13 122.1(17) . . ?

C14 C13 C12 119.9(18) . . ?

C13 C14 C15 118.4(19) . . ?

N1 C15 C14 117.1(15) . . ?

N1 C15 S1 121.3(12) . . ?

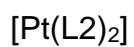
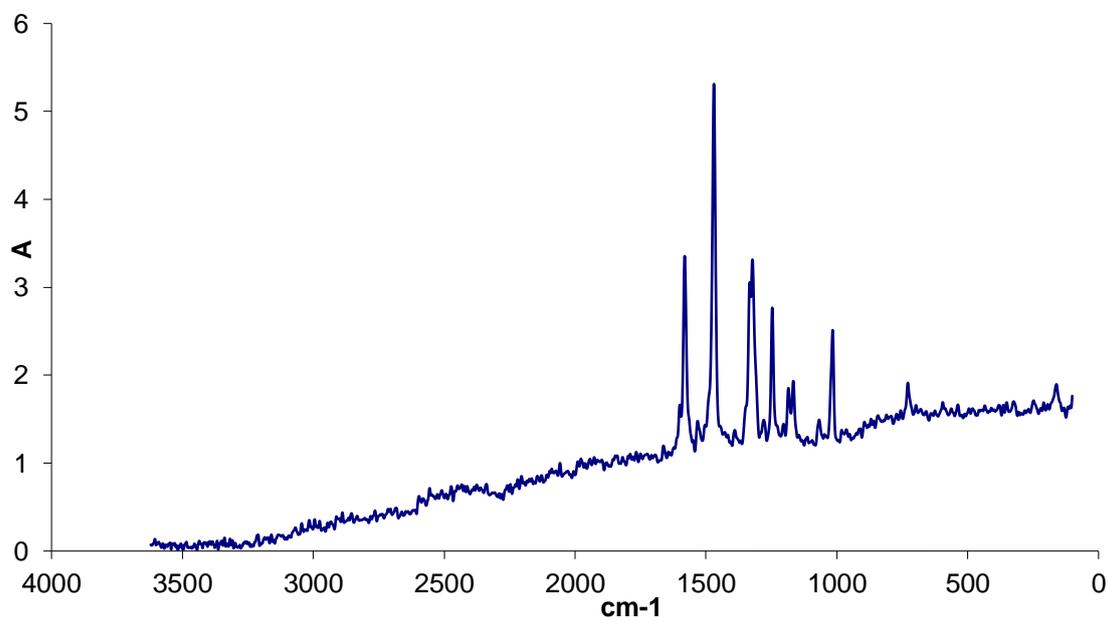
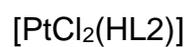
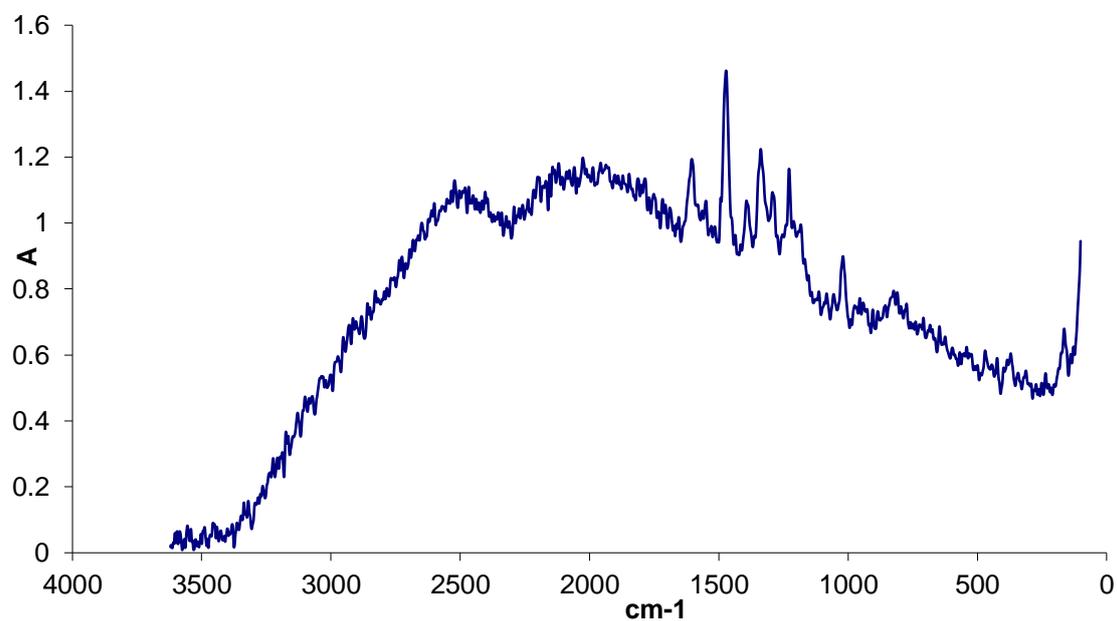
C14 C15 S1 121.5(14) . . ?

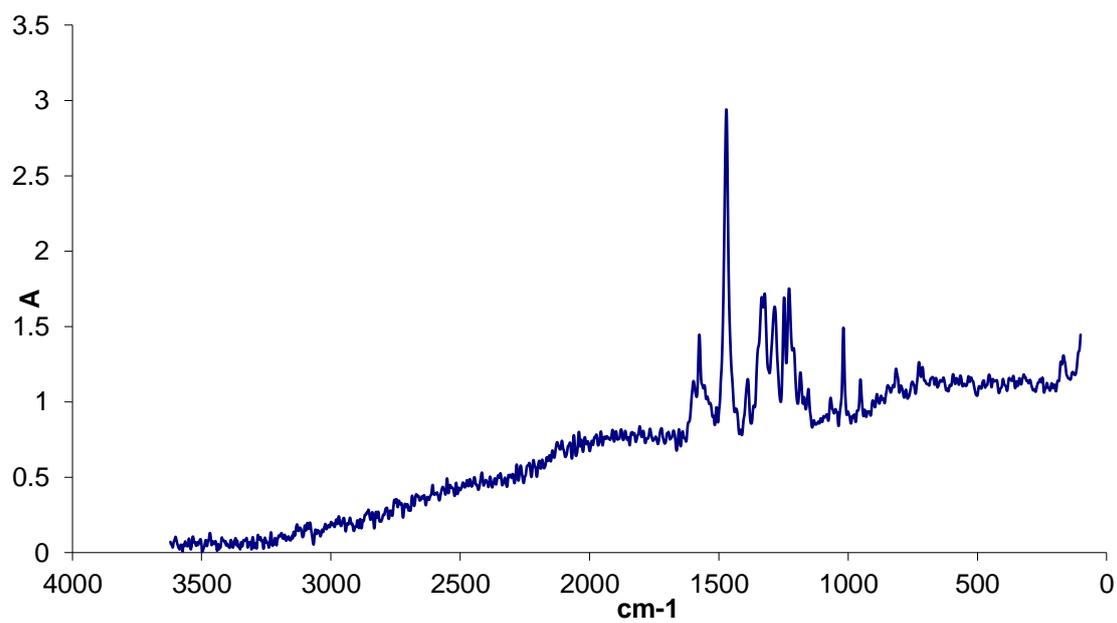
N2 C21 C22 120.0(18) . . ?
C23 C22 C21 118(2) . . ?
C24 C23 C22 119(2) . . ?
C23 C24 C25 125(3) . . ?
N2 C25 C24 114.1(17) . . ?
N2 C25 S2 120.0(14) . . ?
C24 C25 S2 125.9(18) . . ?

_diffn_measured_fraction_theta_max 1.000
_diffn_reflns_theta_full 67.96
_diffn_measured_fraction_theta_full 1.000
_refine_diff_density_max 3.409
_refine_diff_density_min -6.416
_refine_diff_density_rms 0.538

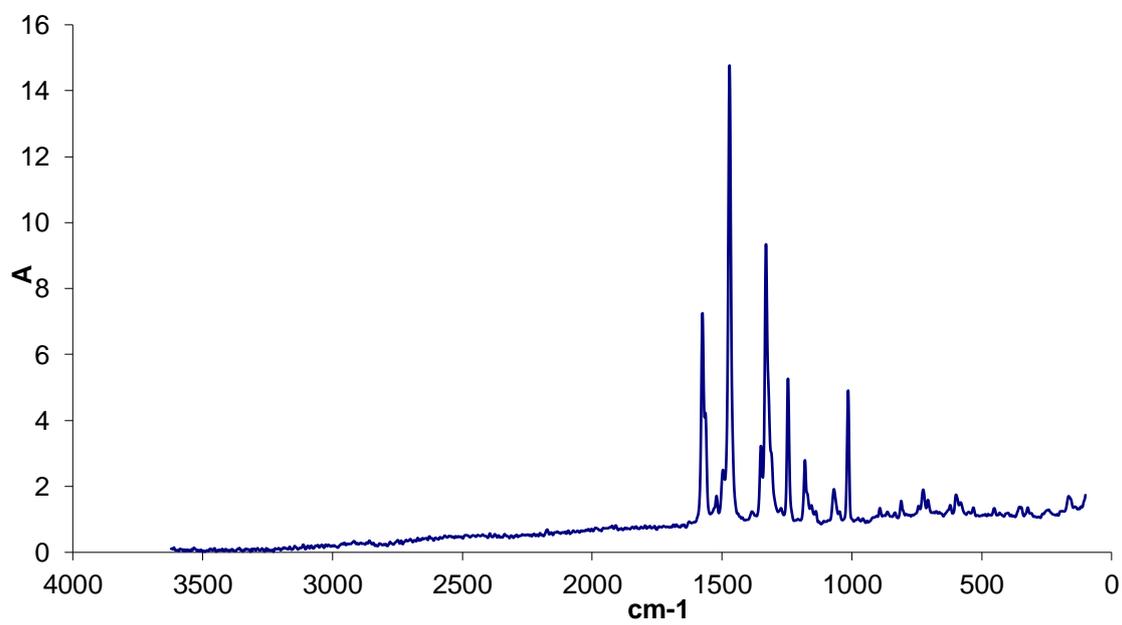
#===END

ESPECTROS RAMAN DE LOS COMPLEJOS DE Pt CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DEL 5-NITRO FURANO

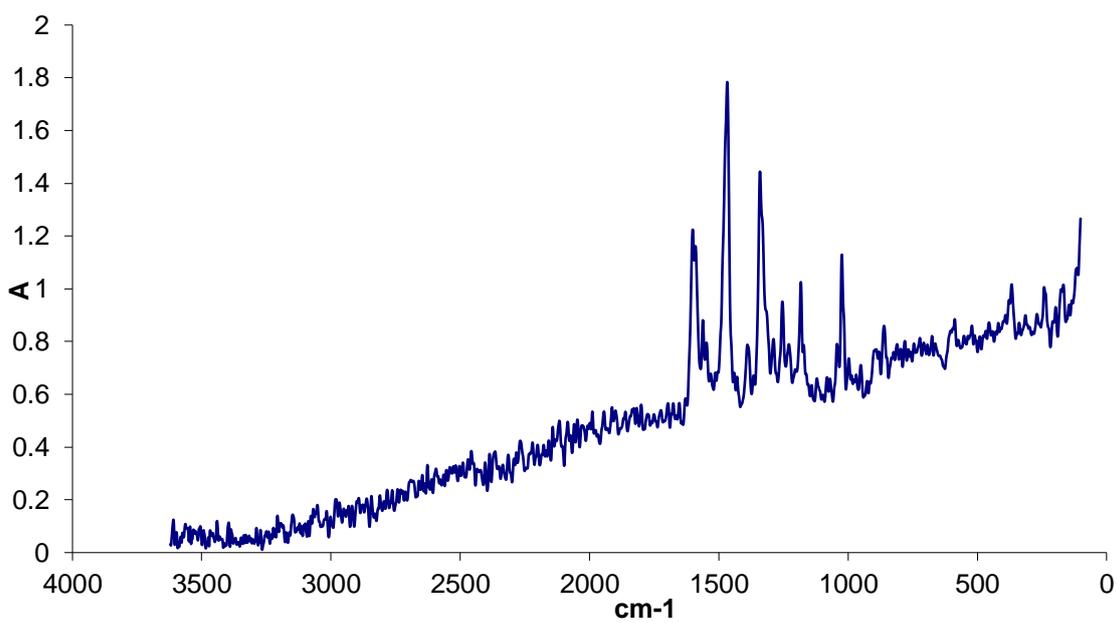




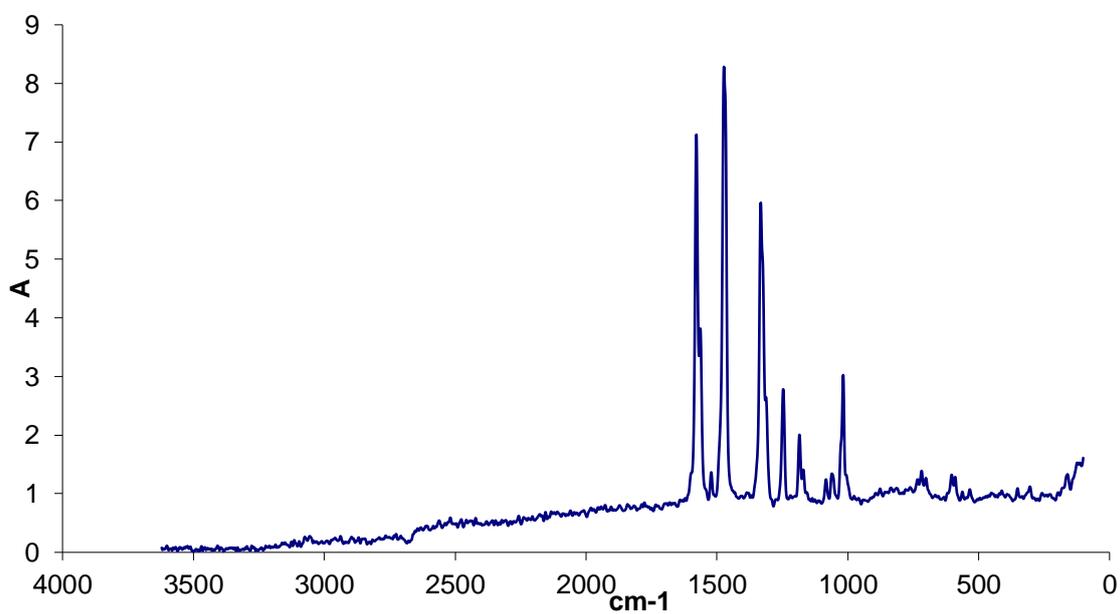
$[\text{PtCl}_2(\text{HL3})]$



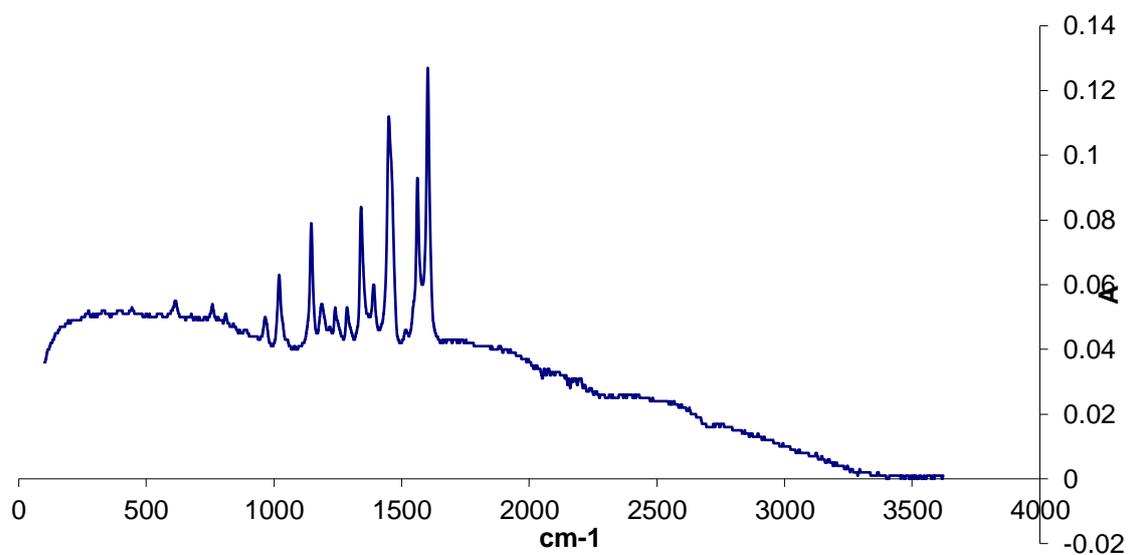
$[\text{Pt}(\text{L3})_2]$



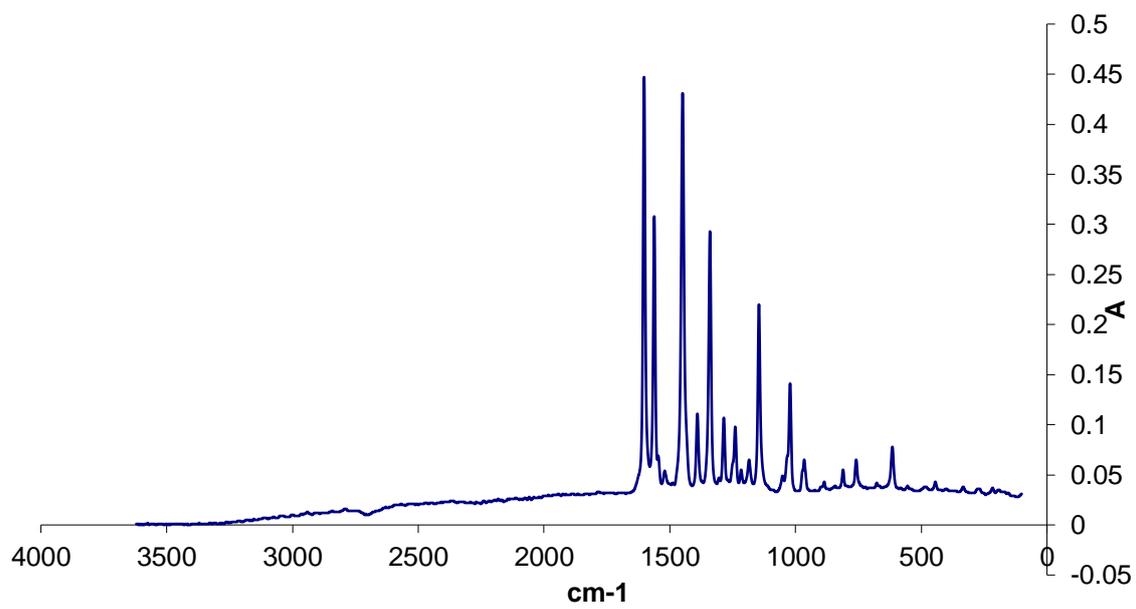
$[\text{PtCl}_2(\text{HL}_4)]$



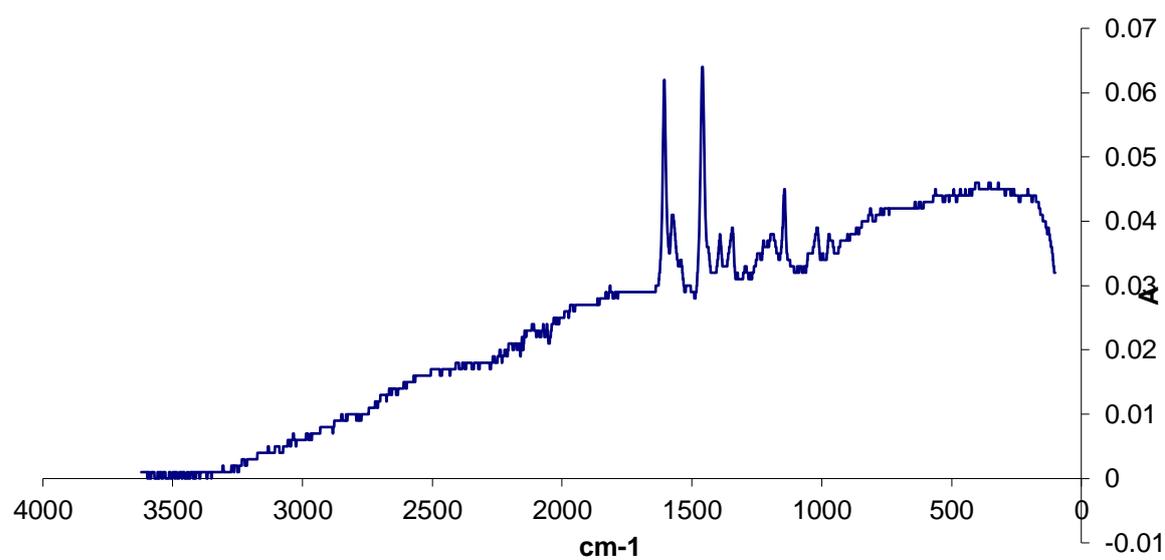
$[\text{Pt}(\text{L}_4)_2]$



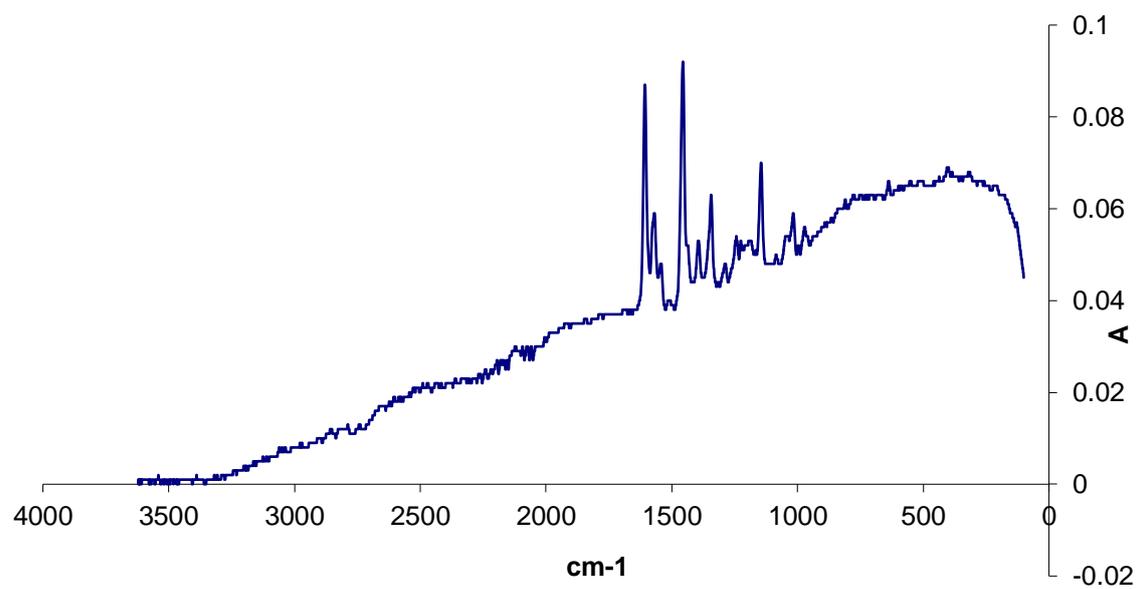
$[\text{PtCl}_2(\text{HL7})]$



$[\text{Pt}(\text{L7})_2]$

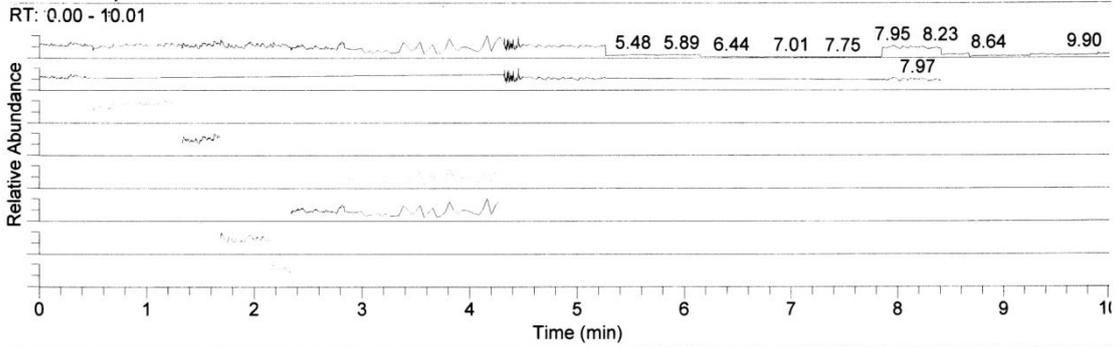


[PtCl₂(HL8)]

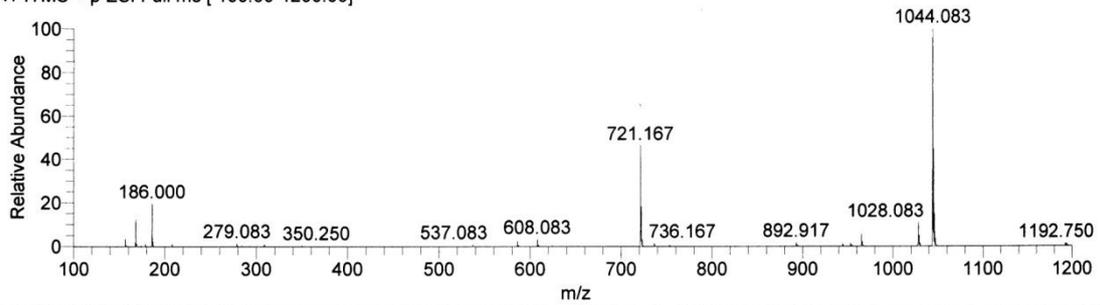


[Pt(L8)₂]

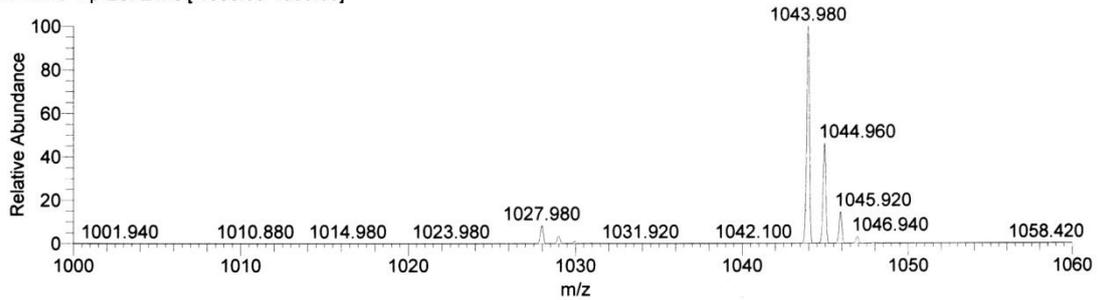
ESPECTRO DE MASAS (ESI-MS) DEL COMPLEJO $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$



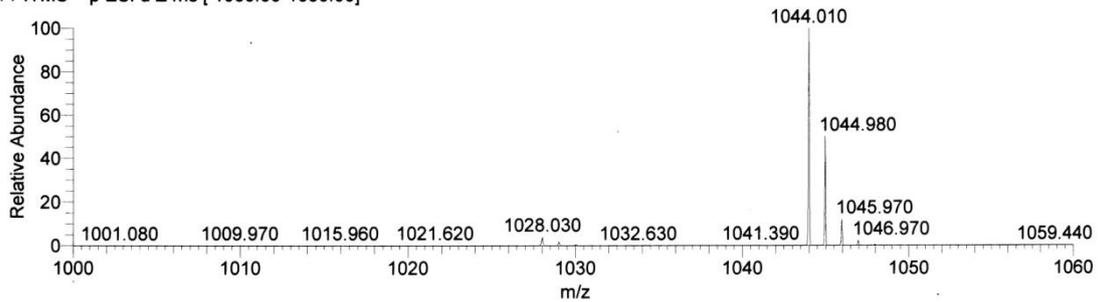
marisol vieites_1 #49-230 RT: 0.14-0.49 AV: 118 NL: 1.70E4
T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-1200.00]



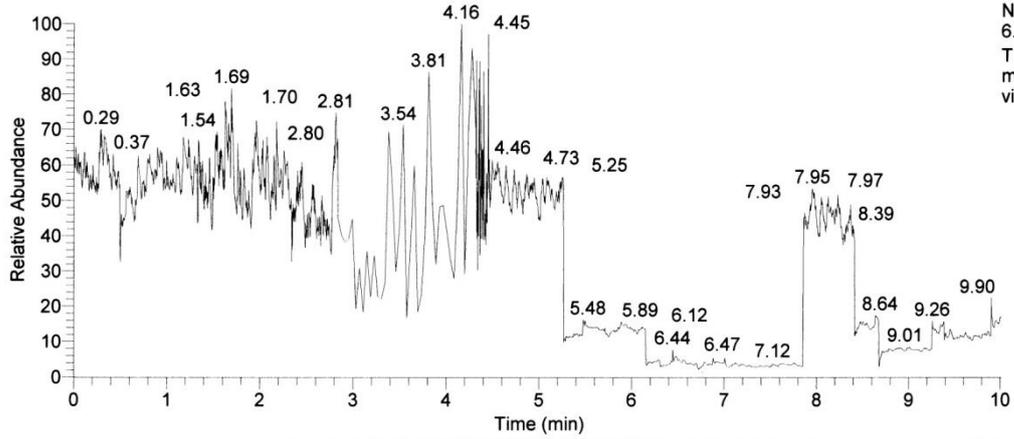
marisol vieites_1 #836-1030 RT: 2.39-2.80 AV: 195 NL: 1.63E4
F: ITMS + p ESI Z ms [1000.00-1060.00]



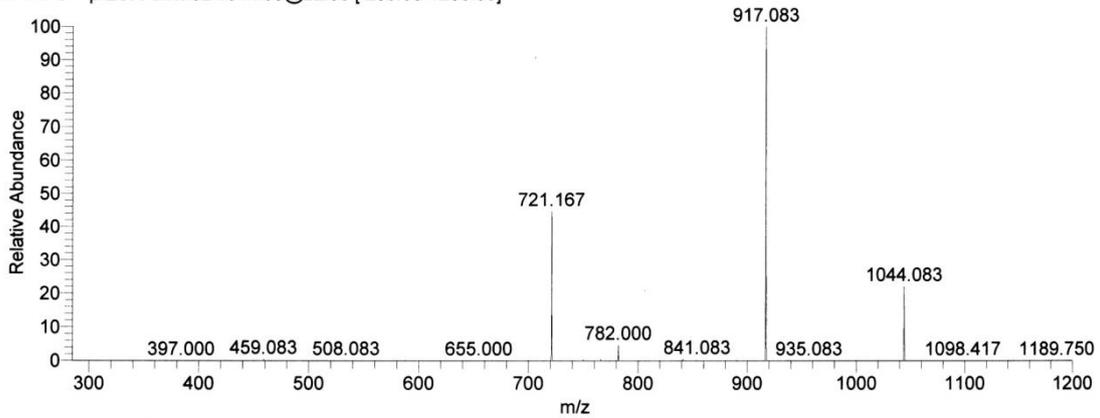
marisol vieites_1 #1061-1073 RT: 3.46-3.93 AV: 13 NL: 2.21E4
F: ITMS + p ESI u Z ms [1000.00-1060.00]



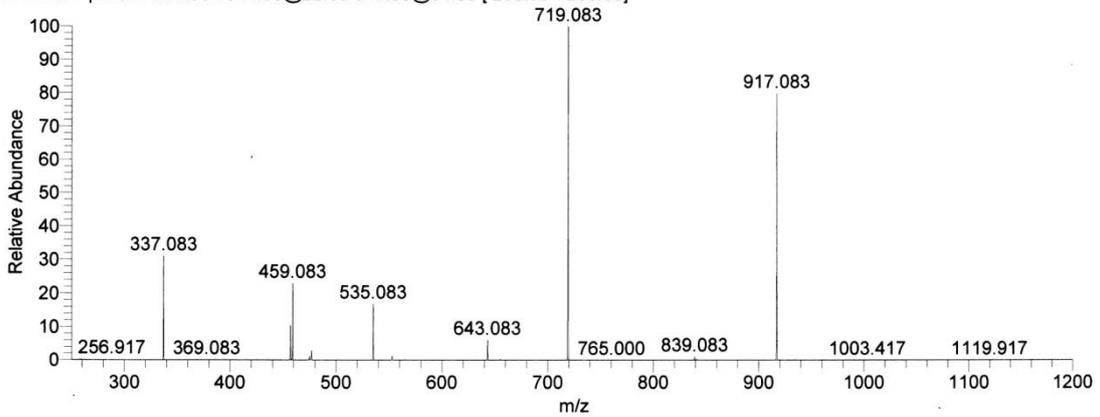
RT: 0.00 - 10.01



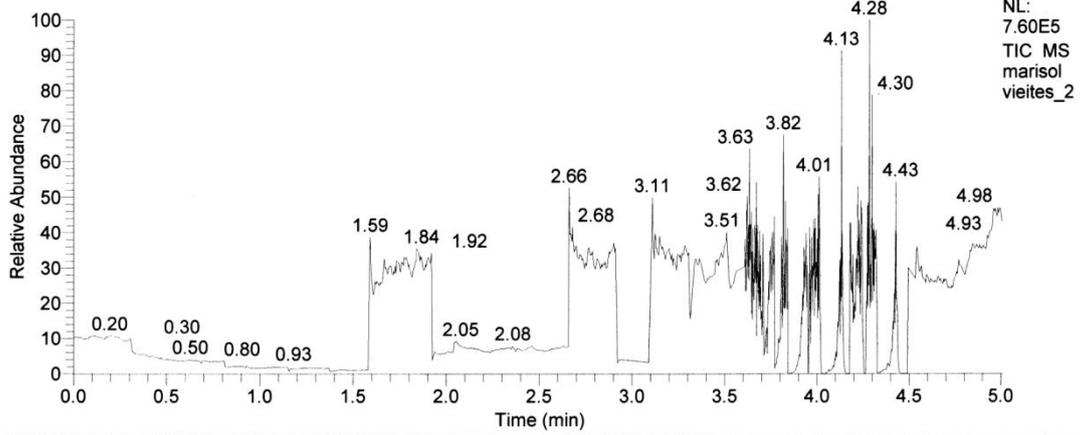
marisol vieites_1 #1436-1520 RT: 5.50-5.99 AV: 85 NL: 8.61E3
T: ITMS + p ESI Full ms2 1044.00@22.00 [285.00-1200.00]



marisol vieites_1 #1755-1776 RT: 7.54-7.69 AV: 22 NL: 1.44E3
T: ITMS + p ESI Full ms3 1044.00@22.00 917.00@31.00 [250.00-1200.00]

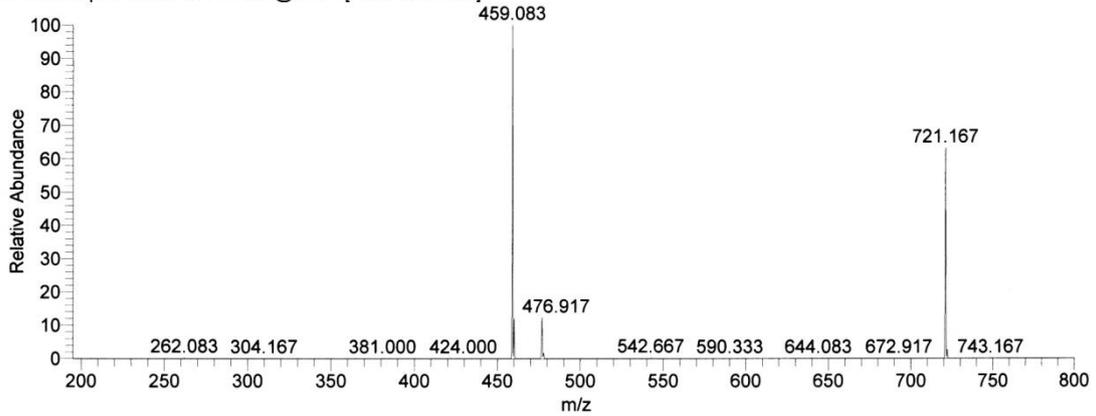


RT: 0.00 - 5.01



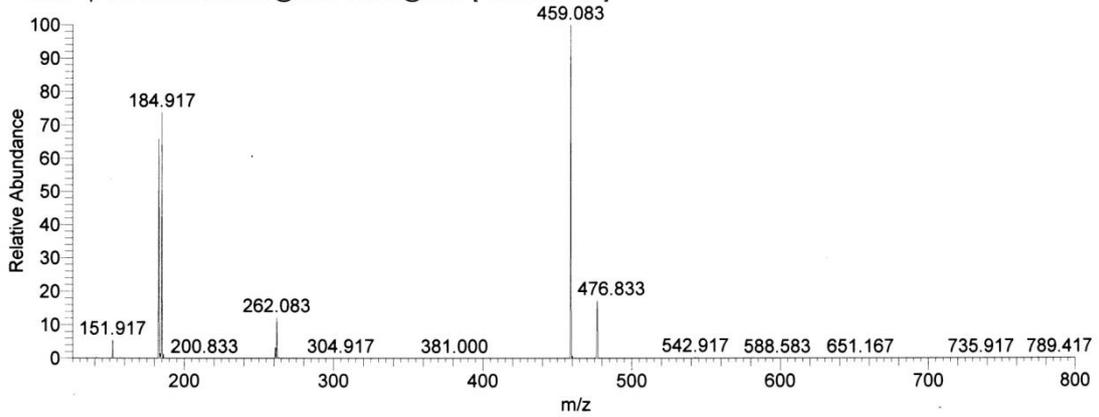
marisol vieites_2 #14-47 RT: 0.07-0.24 AV: 34 NL: 7.56E3

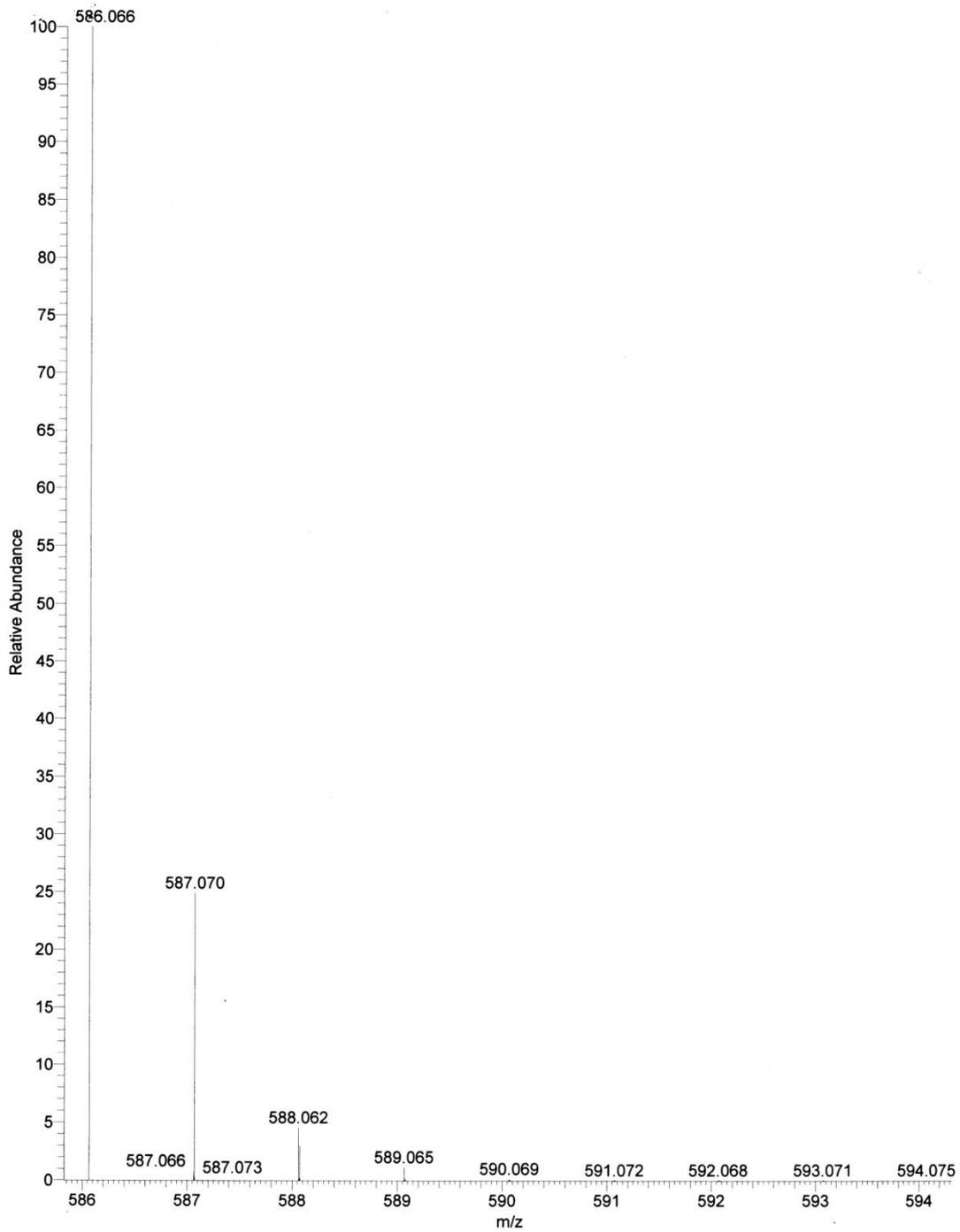
T: ITMS + p ESI Full ms2 721.00@28.00 [195.00-800.00]



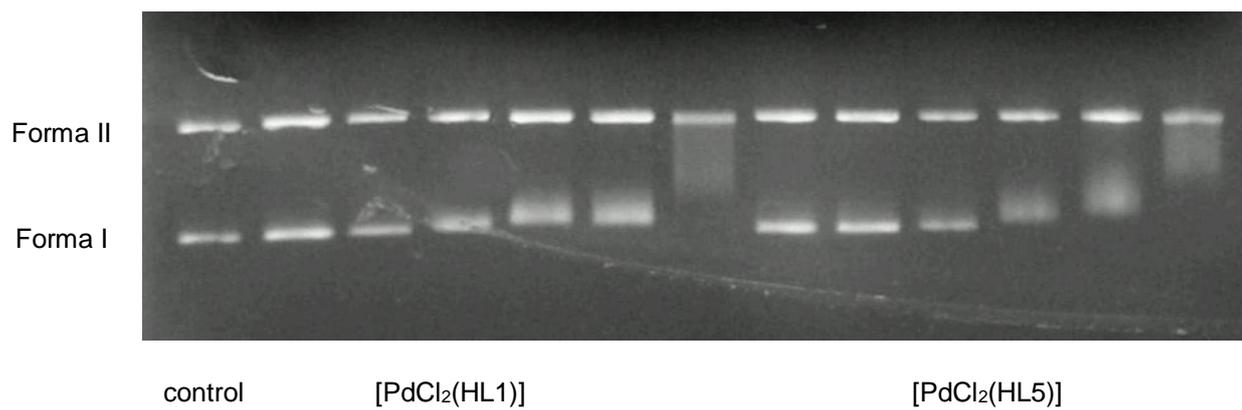
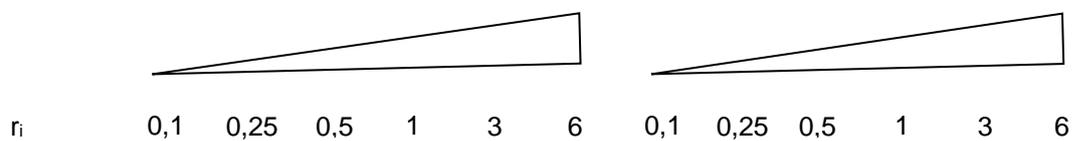
marisol vieites_2 #148-180 RT: 0.86-1.05 AV: 33 NL: 9.92E2

T: ITMS + p ESI Full ms3 721.00@28.00 459.00@38.00 [125.00-800.00]

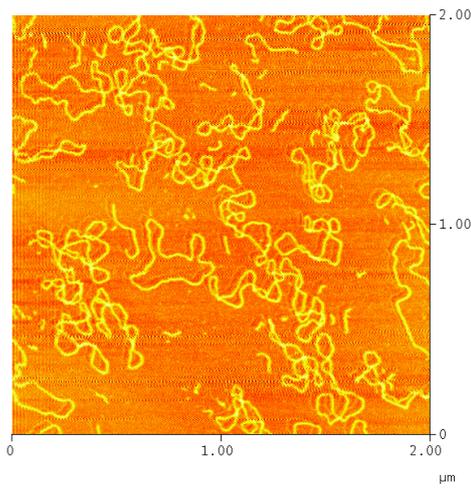




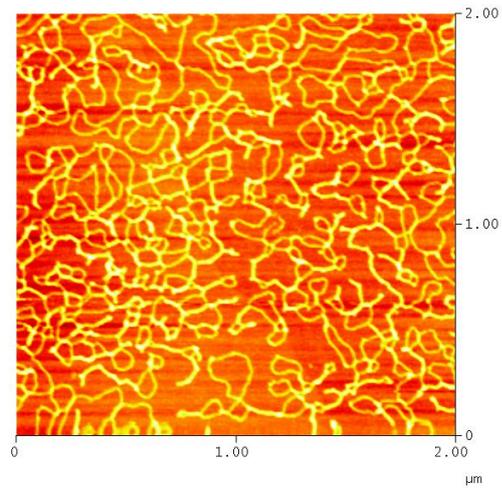
MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA EN GEL DE AGAROSA PARA LOS COMPLEJOS DE $[PdCl_2(HL1)]$ Y $[PdCl_2(HL5)]$



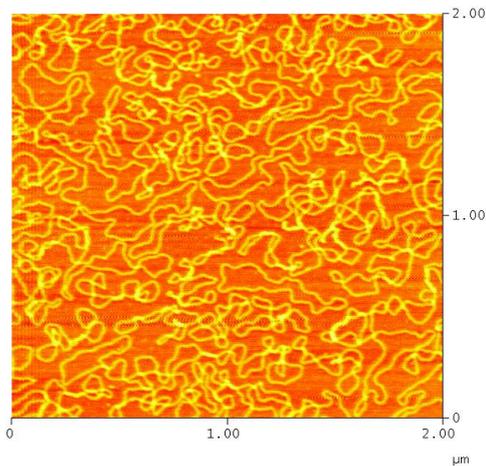
IMÁGENES DE AFM PARA ALGUNOS COMPLEJOS $[MCl_2(HL)]$



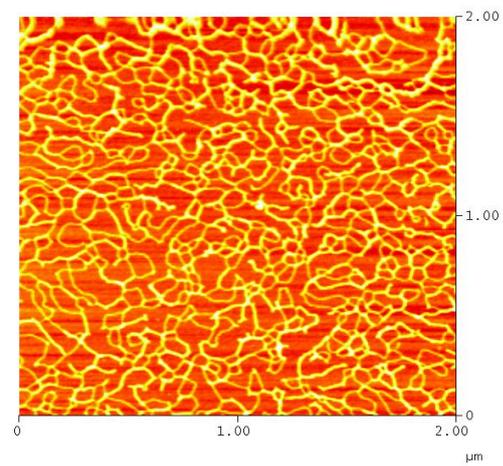
pBR322, 3 horas



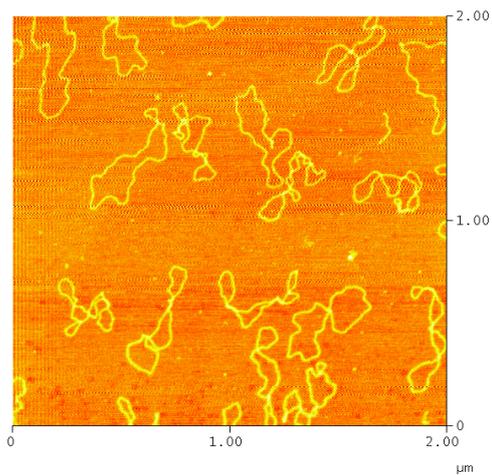
pBR322, 22 horas



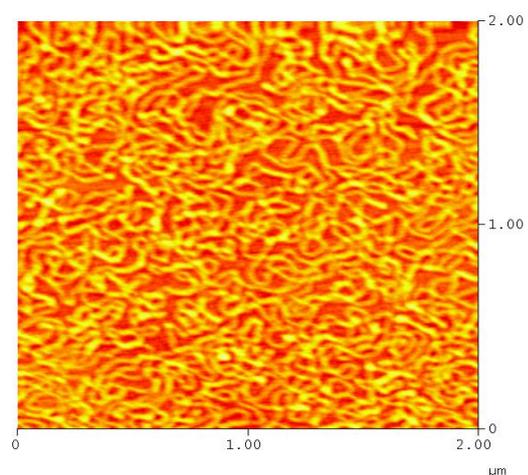
$[PdCl_2(HL5)]$, 3 horas



$[PdCl_2(HL5)]$, 22 horas

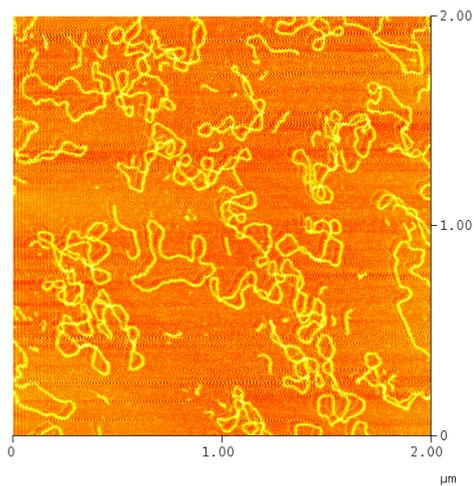


$[PtCl_2(HL5)]$, 3 horas

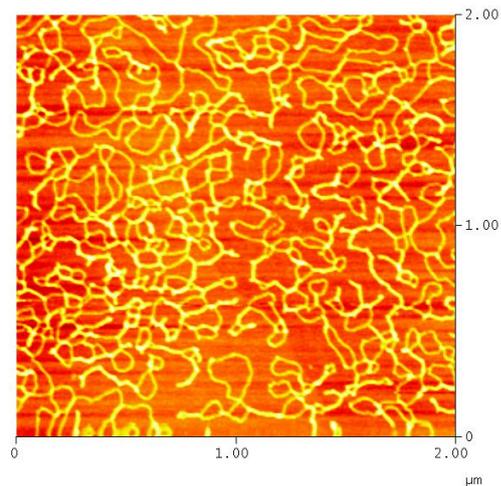


$[PtCl_2(HL5)]$, 22 horas

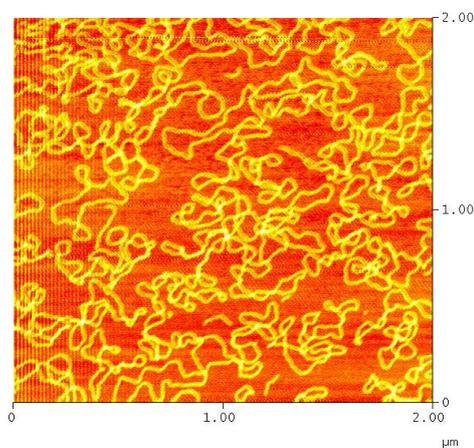
Imágenes de AFM para los complejos $[PdCl_2(HL5)]$ y $[PtCl_2(HL5)]$.



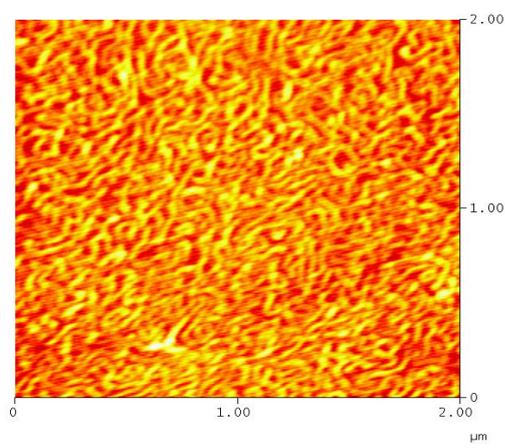
pBR322, 3 horas



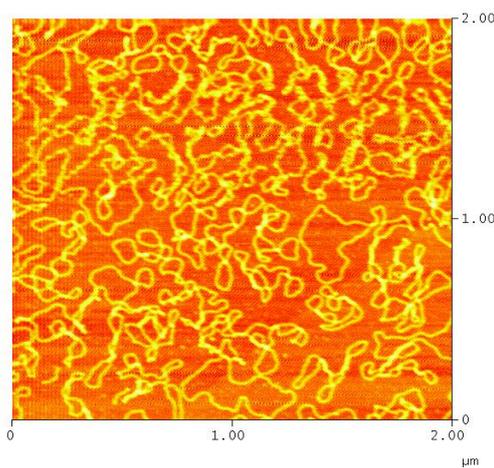
pBR322, 22 horas



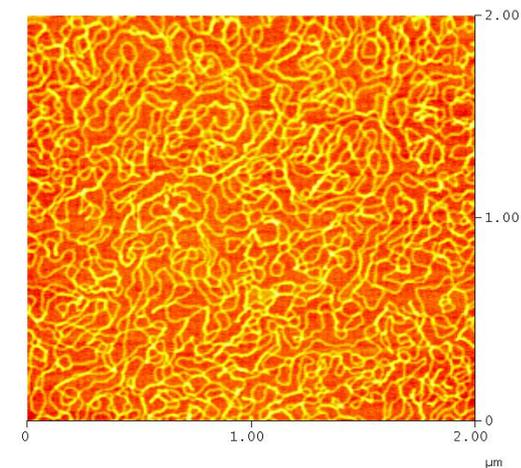
[PdCl₂(HL6)], 3 horas



[PdCl₂(HL6)], 22 horas

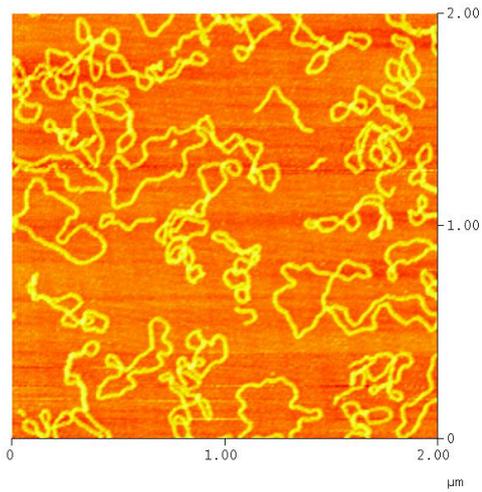


[PdCl₂(HL4)], 3 horas

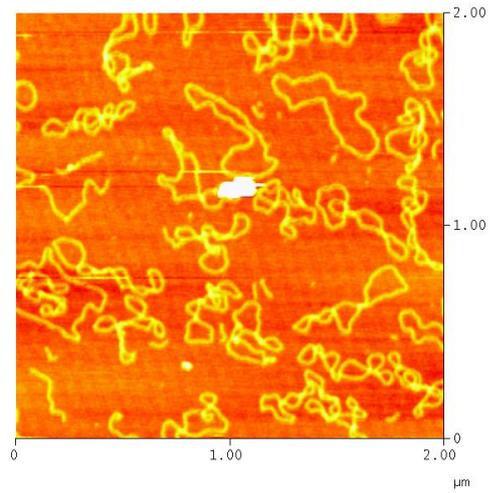


[PdCl₂(HL4)], 22 horas

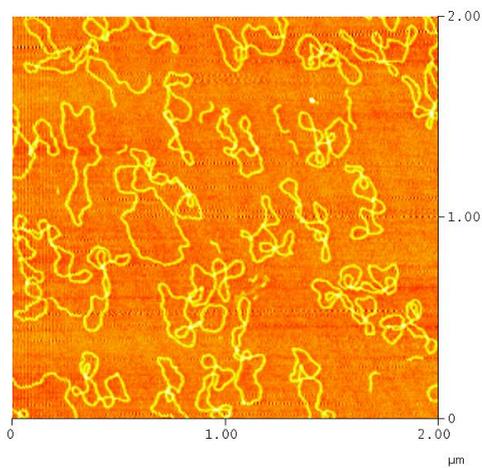
Imágenes de AFM para los complejos [PdCl₂(HL4)] y [PdCl₂(HL6)].



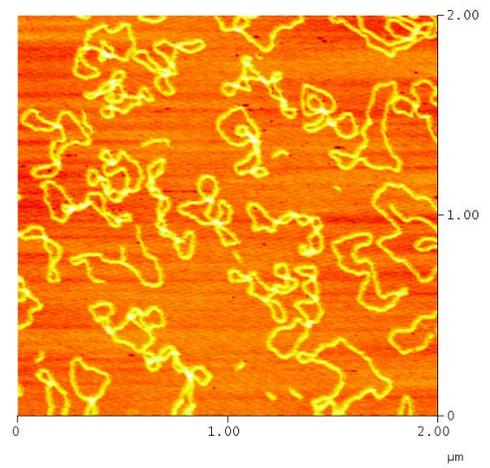
pBR322, 3 horas



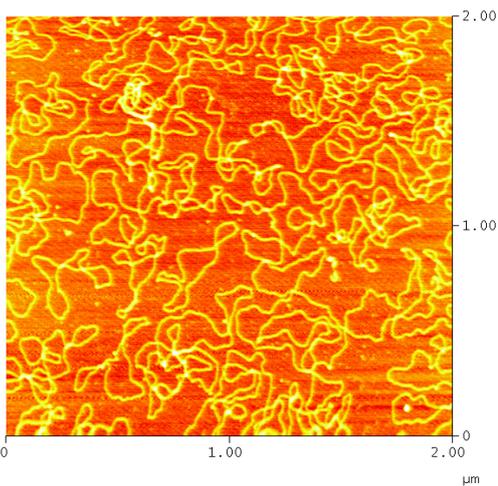
pBR322, 22 horas



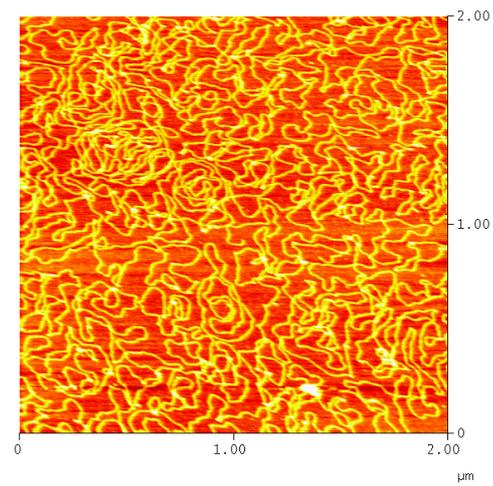
[PtCl₂(HL3)], 3 horas



[PtCl₂(HL3)], 22 horas



[PdCl₂(HL7)], 3 horas



[PdCl₂(HL7)], 24 horas

Imágenes de AFM para los complejos [PtCl₂(HL3)] y [PdCl₂(HL7)].