

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de nuevos tricarbonilos de Re(I) con ligandos bioactivos: síntesis, actividad antiparasitaria, blancos de acción y metalómica

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155971

30/08/2022

GAMBINO VEDANI, Dinorah Cecilia (Responsable Técnico - Científico)

SOBA DELGADO, Mariano (Investigador)

FACCIO SGIOROVELLO, Ricardo Juan (Investigador)

MACHADO MONTES, Ignacio Andres (Co-Responsable Técnico-Científico)

PEREZ DIAZ, Leticia (Investigador)

SCALESE BARRETO, Gonzalo Daniel (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\

FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

La enfermedad de Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, constituye un problema sanitario acuciante en regiones de alta pobreza de América Latina. Dada la falta de medicamentos adecuados resulta indispensable el desarrollo de fármacos eficientes y no tóxicos. Nuestro grupo de Química Bioinorgánica ha contribuido a demostrar que la estrategia de incluir en una misma molécula un metal y un compuesto o ligando orgánico bioactivo contra el parásito, conduce a compuestos metálicos antiparasitarios con propiedades biológicas mejoradas respecto al ligando orgánico bioactivo y que afectan potencialmente múltiples blancos de acción. Utilizando esta estrategia, en este proyecto se exploró la potencialidad de nuevos tricarbonilos de Re(I) que incluyen en una misma molécula integrantes de dos familias de ligandos que tienen actividad contra parásitos: 1) derivados bidentados de la 1,10-fenantrolina y 2) azoles monodentados. El trabajo incluyó la obtención y caracterización completa de seis nuevos compuestos de renio(I) y la realización de estudios fisicoquímicos y biológicos para evaluar la potencialidad de éstos como agentes antiparasitarios y estudiar posibles blancos de acción en *Trypanosoma cruzi*. Estudios por HPLC demostraron su estabilidad en solución en diferentes medios relevantes para la actividad biológica. Los compuestos presentaron actividad contra el parásito en el rango micromolar, del mismo orden que el fármaco Nifurtimox. La selectividad hacia el parásito, determinada utilizando células mamíferas, resultó moderada. No se encontró relación entre la actividad biológica y la lipofilia. Se exploró la incorporación y distribución subcelular en el parásito del compuesto más promisorio por espectrometría de emisión atómica y microscopía Raman confocal, resultando el compuesto acumulado principalmente en la fracción de proteínas solubles. Esta serie de nuevos compuestos resulta promisoria para el desarrollo de posibles agentes contra *T. cruzi*. Los resultados emergentes del proyecto resultarán un aporte tanto a la Química Inorgánica básica como a la Química Inorgánica Medicinal.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Inorgánica y Nuclear / Química Bioinorgánica

Palabras clave: compuestos organometálicos / tricarbonilos de renio / enfermedad de Chagas y Leishmaniasis /

Introducción

Las enfermedades producidas por parásitos tripanosomátidos, como la Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y las Leishmaniasis, constituyen un problema sanitario acuciante concentrado en áreas de alta pobreza [1-4]. La enfermedad de Chagas es una endemia producida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, transmitida principalmente por la picadura de insectos triatomíneos infectados. Afecta a ocho millones de personas en América Latina produciendo anualmente 12000 muertes. Veinticinco millones de personas viven en riesgo [1-5]. En Uruguay, ha sido de las enfermedades parasitarias de mayor prevalencia, morbilidad y mortalidad. Avances en su prevención y control lograron interrumpir sus vías de transmisión vectorial y transfusional. En la actualidad la transmisión congénita es prácticamente la única que genera nuevos casos [6]. A causa de la inmigración y falta de controles de la transmisión por transfusión sanguínea y donación de órganos, otros países de regiones no endémicas presentan un número creciente de casos [2-4]. Leishmania abarca un género de parásitos protozoarios flagelados caracterizados por ser transmitidos a los humanos y otros mamíferos por la picadura de insectos flebotomos hembra infectados y por invadir y multiplicarse en células del sistema inmune (macrófagos) de sus huéspedes mamíferos. Se reconocen tres grandes manifestaciones clínicas de leishmaniasis que afectan las vísceras (bazo, hígado), la piel y las mucosas. A nivel regional, *L. infantum* y *L. braziliensis* son responsables de la leishmaniasis visceral (de curso fatal si no es tratada) y la cutánea (de alta morbilidad), respectivamente. La pobreza, las malas condiciones de vivienda y la mala alimentación promueven la enfermedad [7,8]. En la región (Brasil, Argentina y Paraguay), esta enfermedad originalmente rural se ha extendido a áreas urbanas y periurbanas. El principal reservorio de la enfermedad es el perro doméstico. En 2015 el Ministerio de Salud Pública tomó acciones preventivas en el departamento fronterizo Salto para evitar el contagio de la leishmaniasis en seres humanos, ante la aparición por primera vez de la enfermedad en perros [9]. A pesar de esto, en 2018 se registró el primer caso de leishmaniasis visceral en humanos en este Departamento [10]. Ambas parasitosis son consideradas "enfermedades olvidadas" por la OMS dada la baja inversión histórica de la industria farmacéutica en el desarrollo de fármacos. Los fármacos en uso clínico presentan importantes efectos secundarios y toxicidad en el huésped humano, necesitan de tratamientos prolongados que en muchos casos implican regímenes terapéuticos complicados y desarrollan o presentan fenómenos de resistencia [3,5,8].

En el marco de la Química Inorgánica Medicinal moderna, la investigación de compuestos metálicos con actividad farmacológica surgió como una alternativa interesante para el desarrollo de potenciales fármacos. Esta rama de la Química Bioinorgánica ha evolucionado desde el descubrimiento casual de la actividad de diferentes complejos metálicos hacia el diseño racional de los mismos, buscando blancos y actividades determinados [11]. En este marco, un número importante de fármacos metálicos se encuentran en uso clínico o en fases clínicas avanzadas [12]. Este desarrollo se centró inicialmente en compuestos de coordinación clásicos pero, actualmente, el diseño de potenciales fármacos organometálicos constituye una alternativa relativamente reciente que ha dado excelentes resultados. La Química Bioorganometálica es un área interdisciplinaria que conecta la Biología, la Bioquímica y la Farmacología con la Química Bioinorgánica y la Química Organometálica sintética. Involucra compuestos que presentan al menos un enlace metal-carbono y tienen relevancia en un contexto biológico [13-19]. Los compuestos organometálicos ofrecen una alternativa prometedora y novedosa para el diseño racional de fármacos con nuevos modos de acción, en muchos aspectos superior a la que ofrecen los compuestos de coordinación clásicos. En particular, ofrecen gran variedad estructural, su labilidad puede ser modulada lográndose compuestos cinéticamente estables y, en general, son compuestos relativamente lipofílicos, lo que favorece su comportamiento in vivo. En particular, se han evaluado las propiedades terapéuticas de diferentes compuestos organometálicos, principalmente como potenciales agentes antitumorales, pertenecientes a las siguientes clases clásicas: metalocenos, metal-arenos, carbonilos metálicos o carbenos metálicos (Figura 1, anexo figuras) [13-19].

En el marco de la Química Inorgánica medicinal, resultan de interés particular para nuestra propuesta los antecedentes relativos a compuestos metálicos con actividad antiparasitaria, tanto referidos a compuestos de coordinación clásicos como organometálicos. A pesar del alto impacto de las enfermedades parasitarias en la salud mundial, los antecedentes son menos abundantes que en el área de antitumorales, y relativamente más recientes [20-30]. En particular, la búsqueda de una adecuada quimioterapia para la enfermedad de Chagas y la malaria por parte de grupos pertenecientes a la Academia derivó en la síntesis de compuestos de coordinación clásicos incluyendo fármacos comerciales con actividad antiparasitaria como ligandos (pentamidina, cloroquina, clotrimazol, benznidazol, entre otros) a fin de mejorar su actividad, disminuir su toxicidad y evadir la resistencia desarrollada por los parásitos. Como resultado, se obtuvieron compuestos metálicos más potentes y menos citotóxicos en células mamíferas que el fármaco sin coordinar y, en muchos casos, activos contra cepas parasitarias resistentes al fármaco orgánico [20-31]. En cuanto al desarrollo de compuestos antiparasitarios organometálicos, la ferroquina, ferroceno análogo estructural del antimalárico cloroquina (Figura 2, anexo figuras) constituye el ejemplo más relevante. Mostró actividad en cepas de *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria) resistentes a la cloroquina y un importante incremento de actividad respecto a la misma, lo que ameritó su ingreso a fase clínica de desarrollo por Sanofi Aventis para terapia de combinación con fármacos en uso clínico [32].

Como se detalla en el siguiente punto, nuestro grupo ha desarrollado un gran número de compuestos de coordinación clásicos y organometálicos con actividad contra *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania infantum*. El trabajo se ha enfocado fundamentalmente al diseño racional de nuevos compuestos antiparasitarios basado en los conocimientos adquiridos en investigaciones sucesivas en cuanto a relaciones estructura química – actividad biológica.

La presente propuesta incluye el desarrollo de nuevos compuestos organometálicos de Re(I) sustentado en conocimientos emergentes de nuestras investigaciones previas. El desarrollo de la propuesta permitirá profundizar conocimientos de Química de Coordinación y Química Organometálica, así como avanzar en la búsqueda de nuevos compuestos metálicos, "hits" o líderes, con alta actividad y selectividad en parásitos tripanosomátidos y un adecuado perfil farmacológico.

Antecedentes del equipo de trabajo

El grupo Química Inorgánica Medicinal: desarrollo de potenciales fármacos inorgánicos, que la proponente dirige, desarrolla, hace años, potenciales metalofármacos contra enfermedades de alta incidencia regional (cáncer, tuberculosis, enfermedades parasitarias). En el marco de proyectos nacionales (CSIC, PDT, FCE), internacionales (TWAS) y de cooperación internacional (FONDECYT, PROSUL/CNPq, CYTED), desarrollamos un importante número de compuestos metálicos con actividad contra *T. cruzi* utilizando como estrategia coordinar iones metálicos (Pt(II), Pd(II), Ru(II), Au(I), V(IV), Cu(II), Ni(II), Mn(II), Fe(III), entre otros) o centros organometálicos (Ru(II)-p-cimeno, Ru(II)-ciclopentadienilo, fac-Re(I)(CO)₃, derivados del ferroceno) de importancia farmacológica a ligandos orgánicos que poseen actividad contra *T. cruzi* (ligandos bioactivos) (CVUy Gambino). La unión al metal modifica solubilidad, lipofilia, estabilidad y propiedades electrónicas y de transporte del ligando orgánico, generándose especies que pueden resultar más activas y/o menos tóxicas. Estos compuestos metálicos pueden actuar afectando dos o más blancos en el parásito: el propio del ligando y otros resultantes de la presencia del metal [20]. Las propiedades biológicas del compuesto metal-ligando bioactivo dependerán de la naturaleza del metal o centro metálico y del ligando bioactivo, de la presencia de coligandos y,

fundamentalmente, de las propiedades fisicoquímico-estructurales del mismo. Nuestro trabajo se enfoca al diseño racional de compuestos metálicos antiparasitarios basado en conocimientos adquiridos en investigaciones sucesivas en cuanto a relaciones estructura química–propiedades fisicoquímicas–actividad biológica. Este formato de trabajo ha conducido a aportes al conocimiento que han sido volcados al ámbito científico (CVUy Gambino). La actividad biológica de los compuestos obtenidos fue relacionada, por un lado, con sus propiedades fisicoquímicas (lipofilia, estabilidad, solubilidad, comportamiento redox) y, por otro, con su potencial mecanismo de acción (metabolismo redox, inhibición de enzimas parasitarias, interacción con ADN, generación de ROS). Los compuestos desarrollados fueron diseñados seleccionando los metales, sus estados de oxidación cuando corresponde, coligandos, contraiones, etc., de forma de modular el perfil farmacológico de los nuevos compuestos. El estudio de gran número de compuestos químicamente relacionados permitió realizar estudios de estructura-actividad para retroalimentar el diseño racional de nuevas especies. Por ejemplo, se estudiaron series de compuestos de vanadio con ligandos tridentados y coligandos derivados de la fenantrolina, identificándose un compuesto "hit" que fue estudiado exhaustivamente del punto de vista de la metalómica, proteómica y transcriptómica en un proyecto multidisciplinario desarrollado en Facultad de Ciencias, UdelAR, con nuestra participación (Fondo María Viña 2015-2018).

Dado que *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* (Tripanosomiasis africana) y *Leishmania major* comparten un alto porcentaje de genes [33] que codifican proteínas similares que podrían representar blancos parasitarios comunes, nuestro grupo extendió el trabajo desarrollando compuestos metálicos que pudieran ser efectivos contra los tres tripanosomátidos. Así se encontraron compuestos activos contra *T. cruzi* y *T. brucei* [34-37] o contra *T. cruzi* y especies de *Leishmania* [38,39]. El grupo ha sido pionero en explorar la potencialidad de la Química Bioorganometálica para el desarrollo de compuestos con actividad contra *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum* [34-36, 39-44]. En esta propuesta se pretende utilizar la estrategia delineada y los conocimientos previamente generados para diseñar nuevos compuestos organometálicos de Re(I) con potencial actividad leishmanicida y contra *Trypanosoma cruzi*.

Metodología/diseño del estudio

Continuando con investigaciones del grupo en la temática, se propone desarrollar nuevos compuestos organometálicos [fac-Re(I)(CO)₃(NN)(azol)] que incluyan en la misma molécula dos ligandos bioactivos, NN y azol, seleccionados y realizar estudios fisicoquímicos y biológicos que permitan evaluar su potencialidad como fármacos leishmanicidas y/o tripanosomicidas. El grupo ha contribuido a demostrar que la hibridación de agrupamientos bioactivos, "metal o centro organometálico + ligando bioactivo", conduce en muchos casos a: actividades incrementadas respecto a los ligandos libres, propiedades biológicas mejoradas, mecanismos de acción con blancos múltiples y nuevos "hits" o líderes para el desarrollo de agentes antiparasitarios metálicos. Muchos de los compuestos organometálicos obtenidos previamente mostraron actividades mayores que los fármacos tripanosomicidas de referencia y excelentes selectividades hacia los parásitos. Además, encontramos que el incremento de actividad de la molécula híbrida podría deberse al efecto de la misma en el blanco del ligando bioactivo y en nuevos blancos emergentes de la presencia del metal coordinado (ADN, enzimas parasitarias, entre otros) [34-36,39-44].

Justificada la estrategia de desarrollo de los nuevos compuestos, corresponde justificar la selección del centro organometálico y de los ligandos bioactivos. En cuanto al renio, hace años exploramos la potencialidad de sus compuestos en Radioquímica (CVUy Gambino). Si bien actualmente se desarrolla intensa investigación en tricarbonilos de renio(I) debido a sus interesantes propiedades fotofísicas, fotoquímicas y catalíticas [45,46], subsiste el interés en compuestos con el centro fac-[Re(I)(CO)₃]⁺ en Medicina Nuclear [47]. Más recientemente, tricarbonilos de Re(I) mostraron igual o mayor citotoxicidad que el cisplatino, resultando de interés para el desarrollo de antitumorales [18,48-50]. Los tricarbonilos de Re(I) presentan ventajas para su uso en Química Medicinal; presentan un centro fac-[Re(I)(CO)₃]⁺ químicamente robusto y fácilmente accesible siguiendo una secuencia simple de etapas sintéticas [18]. En cuanto al uso del centro fac-[Re(I)(CO)₃] para el desarrollo de agentes antiparasitarios, éste ha sido utilizado solamente en derivados ciretrenilo desarrollados por el grupo de Klahn y otros grupos (Figura 3) [29]. Nuestro grupo incursionó en la búsqueda de nuevos potenciales antiparasitarios [Re(V)OC₂(PPh₃)₃L] [51] y, recientemente, desarrolló tricarbonilos de Re(I) con semicarbazonas [52] y tiosemicarbazonas bioactivas [53]. Estos últimos brindaron resultados muy promisorios. Pretendemos profundizar el estudio de la potencialidad de este tipo de tricarbonilos de Re(I) para el desarrollo de agentes antiparasitarios. Los nuevos compuestos organometálicos incluirán en una misma molécula el centro fac-[Re(I)(CO)₃] y dos ligandos bioactivos (Figura 4), uno perteneciente a la familia de azoles monodentados (Figura 5) y el otro a la de derivados de la 1,10-fenantrolina (Figura 6). La 1,10-fenantrolina y sus derivados son ligandos bidentados planos que ejercen efectos citotóxicos en variados sistemas biológicos y han mostrado actividad en parásitos [54-56]. Estudios sugieren que su efecto citotóxico está relacionado con su capacidad de intercalarse entre pares de bases del ADN. La inclusión de estos ligandos puede favorecer la interacción intercalante de los nuevos compuestos con el ADN, resultando esta biomolécula un potencial

blanco de acción. Los azoles seleccionados demostraron una potente actividad antifúngica y antiprotozoario actuando a nivel de la biosíntesis del ergosterol, principal esteroide en tripanosomátidos, esencial para proveer estructura y función a sus membranas y para la multiplicación del parásito. Inhiben la actividad de la enzima lanosterol 14 alfa-demetilasa (CYP51) que convierte lanosterol en zymosterol, precursor del ergosterol. La biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos difiere de la del huésped humano, por lo que esta enzima ha sido muy estudiada como blanco de acción [57]. Recientemente, los azoles ravuconazol y posaconazol llegaron a estudios clínicos [58]. En cuanto a compuestos metálicos, los excelentes resultados obtenidos por Sánchez-Delgado con compuestos de coordinación clásicos y organometálicos de rutenio y otros metales con clotrimazol y ketoconazol desencadenaron el trabajo de varios grupos de investigación en esta temática [20,24,29]. Además, se han obtenido tricarbonilos de Mn(I) con algunos de estos ligandos que presentaron actividad en *T. cruzi* [59]. Nuestro grupo ha desarrollado recientemente un promisorio compuesto bioactivo Ru(II)-ciclopentadienilo con clotrimazol [35].

El trabajo incluirá la síntesis, caracterización exhaustiva en estado sólido y en solución y evaluación biológica de los compuestos y el estudio de propiedades fisicoquímicas de importancia biológica (lipofilia, estabilidad). Se estudiará como posibles blancos de acción aquellos descritos para los ligandos bioactivos seleccionados: inhibición de la actividad de la lanosterol 14 alfa-demetilasa y ADN. Como parte de nuestro interés en conocer en profundidad el comportamiento de los compuestos a nivel biológico se estudiará aspectos de su metalómica determinando incorporación y distribución subcelular en *T. cruzi* del compuesto más promisorio [60,61]. Si bien los estudios de metalómica de compuestos antitumorales son relativamente abundantes, los estudios de compuestos metálicos realizados por nuestro grupo constituyen los primeros reportados de esta naturaleza en *T. cruzi* [62,63]. Resulta necesario poner a punto técnicas adecuadas a la naturaleza del metal central y del compuesto en estudio. En el caso de los tricarbonilos de Re(I) se utilizarán dos técnicas de diferente alcance: espectrometría de absorción atómica electroterma (ET-AAS), técnica ya utilizada por nosotros para determinar incorporación y distribución subcelular en *T. cruzi* [62,63] y microscopía Raman confocal. La microscopía Raman confocal será puesta a punto y utilizada por primera vez para el estudio de compuestos metálicos en *T. cruzi* (Cryssmat-Lab, Cátedra de Física, DETEMA, Facultad de Química, UdelAR, Prof. Ricardo Faccio). Los tricarbonilos de Re(I) presentan propiedades vibracionales adecuadas para su seguimiento por esta técnica. Presentan intensas bandas en el rango 1800–2200 cm^{-1} , rango en el que prácticamente no existe absorción en muestras biológicas [64]. Jaouen desarrolló el primer uso de estas características espectrales en un contexto biológico implementando un método de ensayo de fármacos basado en el uso de carbonilos metálicos coordinados a los mismos [65]. Recientemente, se ha utilizado esta técnica para seguir tricarbonilos de Re(I) en células de cáncer de mama [66]. La alta penetración de la radiación IR hace a esta técnica adecuada para la imagenología de tejidos [67,68]. Se ha reportado el uso de la técnica para estudios en *T. cruzi* pero no incluyendo tricarbonilos de Re [69]. Dada la disponibilidad de equipamiento y de la experiencia del Prof. Faccio, se pretende implementar el uso de esta técnica para los fines descritos.

Resultados, análisis y discusión

El objetivo general del proyecto fue sintetizar y caracterizar nuevos compuestos organometálicos con el centro fac-Re(I) $(\text{CO})_3$ que incluyan dos ligandos bioactivos en la misma molécula a efectos de generar compuestos multifuncionales que pudieran actuar como multi-blanco y realizar estudios fisicoquímicos y biológicos que permitan evaluar su potencialidad como fármacos antiparasitarios.

En ese marco, se completó la síntesis y caracterización en estado sólido y en solución (análisis elemental, FTIR, difracción de rayos X, ^1H -RMN) de un grupo de compuestos de fórmula global $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{NN})](\text{PF}_6)$, donde NN representa a cinco diferentes ligandos derivados de la fenantrolina (incluyendo a la misma) bioactivos contra parásitos tripanosomátidos (Figura 1 anexo Figuras). CTZ representa al azol clotrimazol, un ligando bioactivo que también presenta actividad contra tripanosomátidos actuando a nivel de la biosíntesis del ergosterol, principal esteroide en parásitos tripanosomátidos y esencial para proveer estructura y función a sus membranas y para la multiplicación del parásito. Además, y como estaba previsto, se sintetizó y caracterizó el compuesto $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{KTZ})(\text{NN})](\text{PF}_6)$, análogo del más activo de la serie anterior, incluyendo al ligando bioactivo ketoconazol (KTZ).

Como parte del estudio de propiedades fisicoquímicas de interés biológico de los compuestos, se estudió su estabilidad en disolvente orgánico (DMSO), en mezclas DMSO-medio acuoso similar biológico, BHI (medio de cultivo del parásito) y suero bovino utilizando técnicas de ^1H -RMN y HPLC-DAD (técnica analítica puesta a punto para este fin en el marco de este proyecto). Los compuestos resultaron estables por al menos 4 días, lo que resulta adecuado para el posterior trabajo planteado. También se determinó su lipofilia por un método de TLC en fase reversa ya utilizado por el grupo y se puso a punto una técnica por HPLC en fase reversa para estudiar esta propiedad fisicoquímica. Los compuestos resultaron más lipofílicos que los ligandos libres, lo que resulta interesante para su potencial actividad biológica ya que favorece el pasaje por membranas biológicas (Figura 2, anexo Figuras).

Todos los tricarbonilos de renio desarrollados con CTZ y KTZ fueron evaluados en las formas epimastigota y tripomastigota del ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener). La Tabla 1 muestra la actividad en la forma tripomastigota (Tabla 1, anexo Tablas). Se obtuvieron valores de IC50 en el rango micromolar o submicromolar. Los compuestos resultaron en general más activos que los ligandos libres, más activos en la forma infectiva tripomastigota que en la forma epimastigota (esta última forma está presente únicamente en el insecto vector) y mostraron una actividad del mismo orden que el fármaco tripanocida de referencia Nifurtimox. Además, se evaluó la toxicidad inespecífica de los compuestos en células Vero, utilizadas como células de mamífero modelo. Los compuestos mostraron valores aceptables a buenos de índice de selectividad hacia el parásito. El compuesto de KTZ resultó muy poco soluble y no pudo determinarse un valor de IC50.

En suma, los resultados obtenidos prueban nuestra hipótesis de que los compuestos diseñados pueden ser obtenidos y que éstos presentan actividad contra *Trypanosoma cruzi*.

Respecto a posibles blancos de acción en el parásito, se estudió la interacción con CT-ADN de todos ellos utilizando la técnica de fluorescencia que mide el desplazamiento de bromuro de etidio del aducto ADN-bromuro de etidio. Ésta mostró débil interacción a través de un quenching muy bajo. Por eso, no se realizaron los estudios de electroforesis en gel planificados sino estudios de la interacción por el método convencional espectrofotométrico que permite sugerir el modo de interacción (Figura 3, anexo Figuras). Éste mostró un efecto hipercrómico al aumentar la concentración de CT-DNA, que se explica principalmente por la presencia de cationes cargados que interactúan con el ADN por atracción electrostática de los grupos fosfato del esqueleto del ADN provocando una contracción y un daño general en la estructura secundaria del ADN. El efecto también podría atribuirse al contacto externo (unión electrostática) o al desenrollamiento parcial de la estructura helicoidal del ADN, exponiendo más bases del ADN. Los resultados prácticamente descartan la intercalación. Estudios de Química teórica apoyan estos resultados experimentales y las conclusiones indicadas.

El otro blanco propuesto para los compuestos es la enzima lanosterol alpha 14 demetilasa, parte de la ruta de biosíntesis de esteroides del parásito, que es el blanco de acción del clotrimazol. En el marco del proyecto se puso a punto una técnica por HPLC para analizar acumulación de lanosterol por inhibición de la enzima, técnica más fiable que la técnica por TLC propuesta originalmente (Tabla 2, anexo Tablas). Los resultados muestran que el nuevo compuesto inhibe la enzima produciendo acumulación de lanosterol y depleción de ergosterol.

En cuanto a los estudios de metalómica, se determinó la captación por el parásito del compuesto más promisorio, $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$, y la distribución subcelular en cuatro fracciones del parásito en la forma epimastigota del mismo (Tablas 3 y 4, anexo Tablas). Los resultados muestran una baja captación de renio por el parásito, pero similar a otros potenciales metalofármacos, y una acumulación preferencial en la fracción de proteínas solubles. También, se realizaron estudios de metalómica por Microscopía Raman Confocal aprovechando que los complejos presentan bandas en el espectro vibracional en una región donde los componentes biológicos no lo hacen (aprox. 2000 cm^{-1}). Éstos muestran un cierto porcentaje de complejo asociado al ADN como se esperaba. Sin embargo, en contra de lo esperado no se observó una asociación preferencial con ADN.

Publicaciones:

Application of microwave plasma atomic emission spectrometry in bioanalytical chemistry of bioactive rhenium compounds. M. Soba, G. Scalese, L. Pérez-Díaz, D. Gambino, I. Machado, *Talanta* 244 (2022) 123413.

Manuscritos en preparación:

Multi-functional organometallic compounds for the treatment of Chagas Disease: Re(I) tricarbonyl compounds with two different bioactive ligands.

Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Federico Casuriaga, Ricardo Faccio, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino

Presentaciones en congresos:

-VII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, VII LABIC (6 al 9 de abril de 2021). Poster
Multi-target prospective antiparasitic organometallic compounds: Re(I) tricarbonyl complexes with two different bioactive ligands

Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Federico Casuriaga, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino

- LatinXChem (congreso virtual 20 de septiembre de 2021 a través de la red social Twitter) e-Poster:
Design of novel multi-target Re(I) tricarbonyls with antiparasitic activity.

Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Leticia Pérez-Díaz, Ignacio Machado, Dinorah Gambino

- ENAQUI 7 (3 al 5 de noviembre de 2021) e-poster:

Diseño de compuestos organometálicos multi-blanco con actividad antiparasitaria: tricarbonilos de Re(I) con dos ligandos bioactivos diferentes

Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Federico Casuriaga, Ricardo Faccio, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino

- SILQCOM 08 (10 al 11 de marzo 2022, virtual) poster:

Multifunctional Re(I) tricarbonyls for the treatment of Chagas Disease.

M. Soba, G. Scalese, R. Faccio, L. Pérez, I. Machado, D. Gambino

-Metals in Medicine Gordon Research Conference (26 de junio- 1 de julio) poster:

Multi-functional organometallic compounds for the treatment of Chagas Disease: Re(I) tricarbonyl compounds with two different bioactive ligands

M. Soba, G. Scalese, R. Faccio, N. Veiga, L. Pérez, I. Machado, D. Gambino

Conclusiones y recomendaciones

En conclusión, se han sintetizado seis nuevos compuestos tricarbonilos de Re(I) activos contra *T. cruzi*, lo que permitió expandir el estudio de nuevos compuestos organometálicos de renio con ligandos bioactivos como potenciales antiparasitarios. Los mismos fueron caracterizados exhaustivamente en estado sólido y en solución utilizando diferentes técnicas y se determinaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas de relevancia biológica: lipofilia y estabilidad en solución. Se estudió su actividad biológica en diferentes formas del ciclo biológico del *T. cruzi*, la selectividad hacia el parásito estudiando la toxicidad inespecífica en células mamíferas modelo y su posible mecanismo de acción analizando dos blancos propuestos. Los compuestos mostraron actividad como se esperaba y fueron más activos en la forma infectiva del parásito que en la forma presente en el insecto vector, lo que resulta muy satisfactorio. Se avanzó en estudios de metalómica. La metalómica es un área joven de la Química Inorgánica Medicinal que empezó su desarrollo en la última década por lo que todo resultado resulta novedoso. El compuesto seleccionado mostró una baja captación por el parásito pero similar a la reportada por otros metalofármacos. Se plantea en un futuro cambiar el contraion de forma de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos.

Esta serie de nuevos compuestos resulta promisoria para el desarrollo de posibles agentes contra *T. cruzi*. Los resultados emergentes del proyecto resultarán un aporte tanto a la Química Inorgánica básica como a la Química Inorgánica Medicinal.

El proyecto tuvo un fuerte componente de formación en Química Inorgánica Medicinal y Química Analítica, habiéndose formado un estudiante de grado en las etapas iniciales del proyecto y un estudiante de Maestría en Química. Este último defenderá su tesis en breve. Como resultado, durante la realización del proyecto se desarrollaron nuevos métodos analíticos de utilidad fundamental para la Química Inorgánica Medicinal. Se estableció una técnica para la determinación cuantitativa de renio mediante MP-AES ya que la técnica de absorción atómica electrotérmica propuesta no resultó adecuada. Esta técnica se utilizó para el análisis elemental de renio en los compuestos y para los estudios de metalómica para determinar la captación y distribución subcelular del compuesto más promisorio por parte del parásito. Además, se desarrolló un nuevo método analítico de determinación de lipofilia por HPLC-DAD y un método de seguimiento de la estabilidad en solución de los compuestos en diferentes medios también por HPLC-DAD. Además, se puso a punto un método por HPLC para estudiar la inhibición de la enzima lanosterol alpha 14 demetilasa, parte de la importante ruta de biosíntesis de esteroides del parásito. Todos estos instrumentos resultarán de suma utilidad para el grupo de investigación en su trabajo con estos y otros potenciales metalofármacos.

Referencias bibliográficas

- [1] A. Cavalli, M.L. Bolognesi, *J. Med. Chem.* 2009, 52, 7339.
- [2] P.J. Hotez, et al, *Engl. J. Med.* 2007, 357, 1018.
- [3] I. Ribeiro, et al, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3, e484.
- [4] S. P. S. Rao, et al, *ACS Infect. Dis.* 2019, 5, 152.
- [5] M. De Rycker, et al., *Nature* 2018, 559, 498.
- [6] R. Salvatella, Chagas in Uruguay, 1937-2016. *Arch. Pediatr. Urug.* 2016, 87, 49.
- [7] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (visitada 14/5/2019).
- [8] S. Sundar, J. Chakravarty, *Expert Opin. Pharmacother.* 2013, 14, 53.
- [9] <http://www.universidad.edu.uy/prensa/renderItem/itemId/36928/refererPageId/12> (visitada 23/11/2015)
- [10] <https://www.elpais.com.uy/informacion/salud/primeravez-confirmo-uruguay-caso-leishmaniasis-visceral-humano.html> (visitada 20/5/2019).
- [11] T.W Hambley, *Dalton Trans.* 2007, 4929.
- [12] L. Ronconi, P.J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 2007, 251, 1633.
- [13] A.L. Noffke, P. Sadler, et al, *Chem. Commun.* 2012, 48, 5219.
- [14] R.H. Fish, G. Jaouen, *Organometallics* 2003, 22, 2166.
- [15] C.G. Hartinger, P.J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 39.
- [16] P.J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* 2006, 1929.
- [17] S.H. van Rijt, P.J. Sadler, *Drug Discov. Today* 2009, 14, 1089.
- [18] G. Gasser, et al., *J. Med. Chem.* 2011, 54, 3.
- [19] S. Thota, D.A. Rodrigues, D.C. Crans, E.J. Barreiro et al., *J. Med. Chem.* 2018, 61, 5805.
- [20] R.A. Sánchez-Delgado, et al, *Metal ions in Biological Systems*, 41, Marcel Dekker, New York, 2004, 379.
- [21] S. Singh, et al, *Chem. Rev.* 2009, 109, 1900.
- [22] M. Navarro, G. Gabbiani, L. Messori, D. Gambino, *Drug Discov. Today* 2010, 15, 1070.
- [23] D. Gambino, *Coord. Chem. Rev.* 2011, 25, 2193.
- [24] D. Gambino, L. Otero, *Inorg. Chim. Acta* 2012, 393, 103.
- [25] J. Costa Pessoa, S. Etcheverry, D. Gambino, *Coord. Chem. Rev.* 2015, 301-302, 24-48.
- [26] A. Tahghighi, *J. Organomet. Chem.* 2014, 770, 51 – 60.
- [27] R. W. Brown, C.J.T. Hyland, *Med. Chem. Commun.* 2015, 6, 1230 -1243.
- [28] M. B. Camarada, et al. *Med. Chem. Commun.* 2016, 7, 1307 – 1315.
- [29] D. Gambino, L. Otero, *Inorg. Chim. Acta* 2018, 472, 58-75.
- [30] G. Gasser, et al., *Chem. Rev.* 2019, 119, 730−796.
- [31] J.J. Nogueira, et al, *J. Med. Chem.* 2008, 51, 4104.
- [32] C. Biot, *Curr. Med. Chem. - Anti-Infective Agents* 2004, 3, 135.
- [33] N.M. El-Sayed, et al., *Science* 2005, 309, 404.
- [34] B. Demoro, L. Otero, D. Gambino, et al., *Dalton Trans.* 2012, 41, 1534.
- [35] E. Rodríguez, C. Sarniguet, T.S. Moraes, M. Vieites, A.I. Tomaz, A. Medeiros, M.A. Comini, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, F. Marques, M.H. García, L. Otero, D. Gambino, *J. Coord. Chem.* 2015, 68, 2923.
- [36] E. Rodríguez, L. Otero, D. Gambino et al., *Dalton Trans.* 2019, 48, 7644.
- [37] B. Demoro, L. Otero, D. Gambino, et al., *Biol. Trace Elements Res.* 2013, 153, 371.
- [38] J. Benítez, D. Gambino, et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 62, 20.
- [39] M. Vieites, D. Gambino, et al. *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 1300.
- [40] B. Demoro, L. Otero, D. Gambino, A.I. Tomaz, et al., *Dalton Trans.* 2013, 42, 7131.
- [41] E. Rodríguez, M.F. Mosquillo, L. Pérez-Díaz, G. A. Echeverría, O.E. Piro, A. Merlino, E.L. Coitiño, C. Maríngolo Ribeiro, C.Q.F. Leite, F.R. Pavan, L. Otero, D. Gambino, *Dalton Trans.* 2015, 44, 14453.
- [42] M. Fernández, E. Rodríguez Arce, C. Sarniguet, T.S. Morais, A.I. Tomaz, C. Olea-Azar, R. Figueroa, J. Diego Maya, A. Medeiros, M. Comini, M.H. Garcia, L. Otero, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* 2015, 156, 306.
- [43] E. Rodríguez, I. Machado, B. Rodríguez, M. Lapiere, M.C. Zúñiga, J.D. Maya, C. Olea-Azar, L. Otero, D. Gambino, *J. Inorg.*

Biochem. 2017, 170, 125.

- [44] F. Rivas, A. Medeiros, E. Rodríguez Arce, M. Comini, C. M. Ribeiro, F. R. Pavan, D. Gambino, J. Inorg. Biochem. 2018, 187, 73.
- [45] Y. Kuninobu, K. Takai, Chem. Rev. 2018, 111, 1938.
- [46] A. Yip, K. Lo, Coord. Chem. Rev. 2018, 361, 138.
- [47] R. Alberto, et al., Coord. Chem. Rev. 1999, 190–192, 901.
- [48] C.C. Konkankit, et al., Dalton Trans., 2018, 47, 9934.
- [49] A. Leonidova, G. Gasser, ACS Chemical Biology, 2014, 9, 2180.
- [50] E. B. Bauer, A.A. Haase, R. M. Reich, D. C. Crans, F.E. Kühn, Coord. Chem. Rev. 2019, 393, 79.
- [51] L. Otero, D. Gambino, H. Cerecetto, et al., Eur. J. Med. Chem. 2006, 41, 1231.
- [52] I. Machado, S. Fernández, L. Becco, B. Garat, J. S. Gancheff, A. Rey, D. Gambino, J. Coord. Chem. 2014, 67, 1835.
- [53] E. Rodríguez, I. Machado, B. Rodríguez, M. Lapier, M. C. Zúñiga, J. D. Maya, C. Olea Azar, L. Otero, D. Gambino, J. Inorg. Biochem. 2017, 170,125.
- [54] C. Deegan, et al., Chem. Biol. Interact. 2006, 164, 115.
- [55] H.M. Butler, et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1969, 47, 541.
- [56] M. Fernández, J. Varela, I. Correia, E. Birriel, J. Castiglioni, V. Moreno, J.C. Pessoa, H. Cerecetto, M. González, D. Gambino, Dalton Trans. 2013, 42, 11900.
- [57] G. I. Lepesheva, et al., Parasitology 2018, 145, 1820.
- [58] C. Morillo et al, J. Am. Coll. Cardiol. 2017, 69, 939.
- [59] P. V. Simpson, et al., Organometallics 2015, 34, 3809.
- [60] J. Szpunar, Anal. Bioanal. Chem. 2004, 378, 54.
- [61] M. Groessl, C.G. Hartinger, Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 1791.
- [62] M. F. Mosquillo, L. Bilbao, F. Hernández, I. Machado, D. Gambino, B. Garat, L. Pérez-Díaz, Biometals 2018, 31, 961.
- [63] G. Scalese, I. Machado, C. Fontana, G. Risi, G. Salinas, L. Perez-Díaz, D. Gambino, J. Biol. Inorg. Chem. 2018, 23, 1265.
- [64] S. Hostachy, et al., Coord. Chem. Rev. 2017, 351, 172.
- [65] M. Salmain, A. Vessières, Bioorganometallics, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 263–302.
- [66] S. Clède, C. Policar et al., Analyst 2013, 138, 5627.
- [67] L. Quaroni, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 318.
- [68] E. Fernández, et al, Colloids Surf. B Biointerfaces 2015, 131, 102.
- [69] D.A.M. Toledo, et al., PLoS ONE 2016, 11, e0160433.
- [70] S.P. Schmidt, et al., Inorg. Synth. John Wiley & Sons, Inc., 1990, 28, 160.
- [71] R. Alberto, et al., J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1994, 2815.
- [72] I. Maisuls, G. T. Ruiz, et al., Dalton Trans. 2015, 44, 17064.
- [73] S. Fernández, et al., Bioorg. Med. Chem. 2012, 20, 4040.
- [74] M. Cipriani, D. Gambino, L. Otero, et al., Eur. J. Inorg. Chem. 2014, 27, 4677.
- [75] M.A. Fontes, J. Chem. Ed. 2001, 78, 533.
- [76] M. Vieites, B. Garat, D. Gambino, et al. J. Inorg. Biochem. 2011, 105, 1704.
- [77] A. Gerpe, et al., Bioorg. Med. Chem. 2009, 17, 7500.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)