

Informe final publicable de proyecto

Incorporación de un centro organometálico de Mn(I) al diseño racional de agentes antiparasitarios metálicos: estudio comparativo con compuestos análogos de Re(I)

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_166665

Fecha de cierre de proyecto: 01/08/2024

GAMBINO VEDANI, Dinorah Cecilia (Responsable Técnico - Científico)

DEL MÁRMOL SOTO, Carolina (Investigador)

FACCIO SGIOROVELLO, Ricardo Juan (Investigador)

GRIMALDI GARUTI, Aldana Ayelen (Investigador)

MACHADO MONTES, Ignacio Andres (Investigador)

MOREIRA FERNÁNDEZ, Rodrigo Alejandro (Investigador)

PEREZ DIAZ, Leticia (Investigador)

SCALESE BARRETO, Gonzalo Daniel (Investigador)

SOBA DELGADO, Mariano (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, enfermedades producidas por parásitos tripanosomátidos genómicamente relacionados, constituyen problemas sanitarios acuciantes en Latinoamérica. La falta de quimioterapia adecuada hace indispensable la búsqueda de nuevas estrategias de desarrollo de fármacos eficientes y no tóxicos. Nuestro grupo ha contribuido a demostrar que la estrategia de hibridación de un metal o centro organometálico y un ligando orgánico bioactivo conduce, en muchos casos, a compuestos metálicos antiparasitarios con propiedades biológicas mejoradas respecto al ligando orgánico y que pueden afectar múltiples blancos parasitarios.

En este proyecto se expandió el trabajo previo con tricarbonilos bioactivos de Re(I) explorando la potencialidad de tricarbonilos de Mn(I) análogos y realizando un estudio comparativo. El trabajo incluyó la síntesis y caracterización químico-estructural de siete nuevos compuestos multifuncionales que incluyen en una misma molécula dos ligandos orgánicos bioactivos pertenecientes uno a la familia de derivados bidentados de la 1,10-fenantrolina y otro a la familia de azoles monodentados y la realización de estudios fisicoquímicos y biológicos para evaluar su potencialidad como tripanosomicidas y/o leishmanicidas e identificar sus posibles blancos de acción.

Los compuestos presentaron actividad contra los parásitos en el rango micromolar, mayor que el fármaco Nifurtimox y el azol libre. La selectividad hacia el parásito, determinada utilizando células mamíferas, resultó moderada. No se encontró relación entre la actividad biológica y la lipofilia. Se identificó una enzima de la ruta de biosíntesis del ergosterol en el parásito como blanco de acción. Se exploró la incorporación y distribución intraparasitaria del compuesto más promisorio, resultando este acumulado principalmente en la fracción de proteínas solubles y mínimamente en la fracción de ADN. Se estudió la proteómica en *T. cruzi* para el compuesto más promisorio. Los resultados emergentes del proyecto resultan 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 manganeso(I) / enfermedad de Chagas y Leishmaniasis /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las enfermedades producidas por parásitos tripanosomátidos, como la Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y las Leishmaniasis, constituyen un problema sanitario acuciante en Latinoamérica [1-4]. La enfermedad de Chagas es una endemia producida por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, transmitida principalmente por la picadura de insectos triatomíneos. Afecta a 6-7 millones de personas en Latinoamérica produciendo anualmente unas 12000 muertes [1-5]. En Uruguay, fue de las enfermedades parasitarias de mayor prevalencia, morbilidad y mortalidad. Avances en su prevención y control interrumpieron su transmisión vectorial y transfusional. Actualmente, solo la transmisión congénita genera nuevos casos [6]. Debido a la migración de portadores de la enfermedad, regiones no endémicas presentan un número creciente de casos [5,7].

Por otro lado, la leishmaniasis es causada por protozoarios del género *Leishmania*, transmitidos a mamíferos por la picadura de insectos flebótomos hembra, que invaden y se multiplican en células del sistema inmune (macrófagos) del huésped. Presenta tres formas clínicas básicas. A nivel regional, *Leishmania infantum* es responsable de la leishmaniasis visceral (de curso fatal si no es tratada) [8-10]. En Uruguay, ante la aparición de casos de leishmaniasis visceral en perros, el MSP tomó acciones preventivas para evitar el contagio en humanos [11]. De todos modos, se registró el primer caso en humanos en Salto en 2018 y otro en 2020 en la

ciudad argentina limítrofe Concordia [12].

Ambas parasitosis son consideradas "enfermedades desatendidas" por la OMS dada la baja inversión histórica de la industria farmacéutica. Los fármacos en uso clínico presentan importantes efectos secundarios y toxicidad en el huésped, necesitan tratamientos prolongados que implican regímenes terapéuticos complicados y desarrollan resistencia [1,5,9,10].

La Química Inorgánica Medicinal resulta una opción atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos, especialmente antiparasitarios [13,14]. En particular, los compuestos organometálicos, caracterizados por presentar al menos un enlace metal-carbono, brindan una alternativa prometedora para el diseño racional de fármacos [15–19]. Ofrecen 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, principalmente antitumorales, de organometálicos de las siguientes clases: metalocenos, metal-arenos, carbonilos metálicos o carbenos metálicos (Figura 1, anexo figuras) [20].

A pesar del impacto de las enfermedades parasitarias en la salud mundial, los antecedentes de compuestos metálicos con actividad antiparasitaria, tanto de coordinación clásicos como organometálicos, son menos abundantes y más recientes que en el área de antitumorales [13,21–30]. En particular, la búsqueda de una adecuada quimioterapia para la enfermedad de Chagas y la malaria por 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). Se obtuvieron compuestos más potentes y menos citotóxicos que el fármaco sin coordinar y, en muchos casos, activos contra cepas resistentes al fármaco orgánico [21–33]. En cuanto al desarrollo de compuestos antiparasitarios organometálicos, la ferroquina, ferroceno análogo estructural del antimalárico cloroquina, constituye el ejemplo más relevante. Ingresó a fase clínica de desarrollo por Sanofi-Aventis para terapia de combinación de la malaria [34].

Como se detalla a continuación, nuestro grupo desarrolló un gran número de compuestos de coordinación clásicos y organometálicos con actividad contra *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania infantum* (CVUyGambino). Nuestro trabajo se enfoca al diseño racional de nuevos compuestos antiparasitarios basado en conocimientos adquiridos en investigaciones sucesivas en cuanto a relaciones estructura química–actividad biológica. 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 y propiedades biológicas mejoradas respecto a los ligandos libres, blancos múltiples de acción y nuevos "hits" para el desarrollo de agentes antiparasitarios metálicos. Muchos de los compuestos organometálicos obtenidos mostraron actividades mayores que los fármacos de referencia y excelentes selectividades hacia los parásitos. El incremento de actividad de la molécula híbrida podría deberse al efecto de esta en el blanco propio del ligando bioactivo y en nuevos blancos emergentes de la presencia del metal coordinado (ADN, enzimas parasitarias, entre otros posibles) [35–44].

Antecedentes del equipo de trabajo

El grupo Química Inorgánica Medicinal: desarrollo de potenciales fármacos inorgánicos, que la proponente dirige, hace años desarrolla 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, ECOS), desarrollamos un importante número de compuestos metálicos con actividad contra *Trypanosoma cruzi* utilizando como estrategia la coordinación de diferentes iones metálicos (Pt(II), Pd(II), Ru(II), Ru(III), Au(I), V(IV), V(V), Cu(II), Ni(II), Mn(II), Fe(III), Ga(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) (ver CVUy Gambino). Se ha demostrado que la unión

al ion o centro metálico modifica la solubilidad, la lipofilia, la estabilidad y las propiedades electrónicas y de transporte del ligando orgánico, generándose especies metálicas que pueden resultar más activas y/o menos tóxicas que éste. 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 en la nueva especie generada [21]. 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 que completan la esfera de coordinación y, fundamentalmente, de las propiedades fisicoquímico-estructurales globales del mismo. En base a esto, 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 (ver 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 EROS, efecto sobre vías metabólicas del parásito y proteínas involucradas en éstas). Los compuestos desarrollados fueron diseñados seleccionando los metales, sus estados de oxidación cuando corresponde, los coligandos, los contraiones, etc., de forma de modular el perfil farmacológico de los nuevos compuestos.

El grupo ha sido pionero en el planteo de propuestas innovadoras y en la aplicación de técnicas innovadoras para el desarrollo y estudio de compuestos metálicos activos contra parásitos:

- Dado que *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* (tripanosomátido causante de la Tripanosomiasis africana) y *Leishmania major* comparten un alto porcentaje de genes [45] que codifican proteínas similares que podrían representar blancos parasitarios comunes, nuestro grupo extendió el alcance del trabajo desarrollando compuestos metálicos que pudieran ser de amplio espectro, efectivos contra los tres tripanosomátidos. Así se encontraron compuestos activos contra *T. cruzi* y *T. brucei* [35-38] o contra *T. cruzi* y especies de *Leishmania* [46,47].

- Por otro lado, el estudio de un gran número de compuestos químicamente relacionados ha permitido al grupo realizar estudios de estructura-actividad para retroalimentar el diseño racional de nuevas especies. El desarrollo de largas series de compuestos estructuralmente relacionados de vanadio y de platino y paladio permitió realizar estudios cuantitativos de relaciones entre aspectos estructurales y propiedades fisicoquímicas de los compuestos y actividad biológica, QSAR. Estos estudios QSAR son realmente pocos comunes en Química Inorgánica Medicinal [44,48].

- El grupo realizó investigación innovadora en Química Inorgánica Medicinal de agentes antiparasitarios aplicando estudios de ómica (metabolómica, metalómica, proteómica y transcriptómica) a compuestos metálicos, por primera vez en *T. cruzi*. 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 (FMV-2015-2018) [48-51]. Con dos de los compuestos de vanadio mencionados en el párrafo anterior, se realizó el primer estudio de metabolómica de compuestos metálicos en *T. cruzi* que apuntó a la mitocondria como blanco de acción de los compuestos [52].

- 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*, comenzando con compuestos Ru-p-cimeno hace 10 años [35-39,43].

La presente propuesta incluyó el desarrollo de nuevos compuestos organometálicos de Mn(I) sustentado en conocimientos emergentes de nuestras investigaciones previas. El desarrollo de la propuesta permitió 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.

Metodología/Diseño del estudio

Continuando con las investigaciones del grupo en la temática, y aplicando la estrategia delineada, se propuso en este proyecto explorar la potencialidad de tricarbonilos de Mn(I) desarrollando nuevos compuestos organometálicos multifuncionales [fac-Mn(I)(CO)₃(NN)(azol)] y realizar estudios fisicoquímicos y biológicos que permitan evaluar su potencialidad como fármacos leishmanicidas y/o tripanosomicidas. Estos compuestos incluyeron en una misma molécula el centro fac-Mn(I)(CO)₃ y dos ligandos bioactivos, uno perteneciente a la familia de azoles monodentados (clotrimazol, ketoconazol y miconazol, Figura 2 anexo figuras) y otro a la de derivados de la 1,10-fenantrolina (1,10-fenantrolina, 5-amino-1,10-fenantrolina, 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina y 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, Figura 3).

Corresponde justificar la selección del centro organometálico y de los ligandos bioactivos. En el marco de un proyecto FCE anterior desarrollamos cinco nuevos compuestos [fac-Re(I)(CO)₃(NN)(clotrimazol)] que mostraron actividad en *T. cruzi* en el rango micromolar, mayor que la de los ligandos libres (Figura 4). Lamentablemente, éstos presentaron un índice de selectividad hacia el parásito bajo.

El manganeso pertenece al mismo grupo de la tabla periódica que el Re pero es un elemento esencial para los organismos vivos, presente en el sitio activo de varias enzimas [53,54]. Era esperable que sus compuestos presenten menor toxicidad que los análogos de renio. Además, su costo es menor y más adecuado para este tipo de fármacos dirigidos principalmente a poblaciones de bajos recursos.

Si bien los compuestos de manganeso han sido poco estudiados en Química Inorgánica Medicinal, el compuesto SC-52608 ingresó en estudios clínicos como SOD mimético y el agente de contraste mangafodipir es utilizado en imagenología por resonancia magnética nuclear. También, se han estudiado in vitro compuestos de manganeso(II) como antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatorios y antitumorales [55,56]. Compuestos con el centro fac-Mn(I)(CO)₃ fueron estudiados, principalmente, como CORMs, compuestos liberadores de CO, molécula de potencial valor terapéutico [57,58]. Unos pocos trabajos exploran la actividad de tricarbonilos de Mn(I) contra microorganismos y virus [59-64], dos su actividad antitripanosomal [63,64]. Uno de ellos investigó muy preliminarmente la actividad en *T. brucei* y *L. major* de un compuesto de Mn(I) con bipiridina análogo a lo propuestos, [64] resultando un antecedente para este proyecto.

Los compuestos propuestos son análogos de los de Re(I) ya preparados (Figura 4). Respecto a los ligandos seleccionados, la 1,10-fenantrolina y sus derivados son ligandos bidentados planos que ejercen efectos citotóxicos en variados sistemas biológicos y han mostrado actividad contra parásitos [52,65-68]. Estudios sugieren que su efecto 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 compuestos con el ADN, resultando esta biomolécula un potencial blanco de acción. Los azoles seleccionados demostraron actividad antifúngica y antiprotozoario actuando a nivel de la biosíntesis del ergosterol, principal esteroide en tripanosomátidos, esencial para proveer estructura y función a membranas y para la multiplicación del parásito. Inhiben la actividad de la enzima esteroide 14 α -demetilasa (CYP51) que convierte lanosterol en zymosterol, precursor del ergosterol. La biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos difiere de la del huésped mamífero, por lo que esta enzima es muy estudiada como blanco de acción [69,70]. Recientemente, los azoles tripanosomicidas ravuconazol y posaconazol llegaron a estudios clínicos [71]. 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 en esta temática [21,25,30]. Nuestro grupo ha desarrollado un compuesto bioactivo Ru-ciclopentadienilo con clotrimazol [36].

El proyecto incluyó la síntesis, caracterización exhaustiva en estado sólido y solución y evaluación biológica de los compuestos y el estudio de propiedades fisicoquímicas de importancia biológica como potenciales

fármacos (lipofilia, estabilidad en solución en medios de complejidad creciente). Se estudió como posibles blancos de acción aquellos descritos para los ligandos seleccionados: lanosterol 14 β -demetilasa y ADN y se analizó la existencia de otros blancos por estudios de proteómica [49,50]. Como parte de nuestro interés en conocer en profundidad el comportamiento de los compuestos a nivel biológico, se estudiaron aspectos de la metalómica del compuesto más promisorio (más activo y más selectivo): incorporación y distribución subcelular en *T. cruzi* [72,73]. Si bien existen estudios de metalómica de compuestos antitumorales, los estudios de compuestos metálicos realizados por nuestro grupo constituyen los primeros y únicos reportados en *T. cruzi* [49,50,74]. Para estos estudios se utilizó espectrometría de absorción atómica electrotermica, técnica ya utilizada por nosotros para determinar incorporación y distribución subcelular en *T. cruzi* de otros metales [49,74]. Finalmente se realizó un estudio comparativo de todos aspectos para el compuesto más promisorio de la serie de manganeso con el de la serie de renio desarrollada previamente.

El desarrollo del proyecto permitió estudiar la potencialidad del centro organometálico fac-Mn(CO)₃ para el desarrollo de agentes contra parásitos tripanosomátidos en pos de agentes más activos y menos tóxicos en células mamíferas modelo. El desarrollo de la propuesta permitió profundizar conocimientos de Química Organometálica, así como avanzar en la búsqueda de nuevos compuestos organometálicos, "hits" o líderes, con alta actividad y selectividad en parásitos tripanosomátidos y un adecuado perfil farmacológico.

Resultados, análisis y discusión

El objetivo general del proyecto fue sintetizar y caracterizar nuevos compuestos organometálicos con el centro fac-Mn(I)(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, ¹H-RMN) de un grupo de compuestos de fórmula global [Mn(CO)₃(CTZ)(NN)](PF₆), donde NN representa a los cinco diferentes ligandos derivados de la fenantrolina (incluyendo a la misma) bioactivos contra parásitos tripanosomátidos ya nombrados (Figura 5, anexo Figuras) y CTZ representa al clotrimazol, azol bioactivo que presentan actividad contra tripanosomátidos actuando a nivel de la biosíntesis del ergosterol, principal esterol en parásitos tripanosomátidos y esencial para proveer estructura y función a sus membranas y para la multiplicación del parásito. Además, se sintetizaron y caracterizaron los compuestos [Mn(CO)₃(KTZ)(tmp)](PF₆) y [Mn(CO)₃(MCZ)(tmp)](PF₆), análogos del más activo de la serie anterior [Mn(CO)₃(CTZ)(tmp)](PF₆), donde KTZ = ketoconazol, MCZ = miconazol y tmp = 3,4,7,8-tetrametilfenantrolina.

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 en suero fetal bovino utilizando RP- HPLC-DAD (HPLC de fase reversa con detección por arreglo de diodos). Los compuestos resultaron estables por al menos 1 día en DMSO, pero muestran signos de cierta inestabilidad en los medios más complejos. También se determinó su lipofilia por un método de HPLC en fase reversa. 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 (Tabla 2, anexo tablas). Los compuestos resultaron más lipofílicos que sus análogos de Re. Para buscar una explicación a este hecho se realizaron estudios computacionales no previstos que indicaron que los compuestos de Mn presentan un momento dipolar total menor que sus análogos de Re, lo que explica la diferente distribución electrónica y, por lo tanto, la diferente lipofilia.

Todos los tricarbonilos de Mn desarrollados fueron evaluados en las formas epimastigota y tripomastigota del ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi* (Tabla 2, anexo tablas). Se obtuvieron valores de IC₅₀ en el rango micromolar o incluso submicromolar. Los compuestos resultaron en general más activos que los azoles 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 mayor que el fármaco tripanocida de

referencia Nifurtimox. En su conjunto mostraron actividad del mismo orden que sus análogos de Re. Además, se evaluó la toxicidad inespecífica de los compuestos en células Vero, utilizadas como células de mamífero modelo (Tabla 2). Inesperadamente, los compuestos mostraron valores menores de índice de selectividad hacia el parásito que sus análogos de Re. Los compuestos mostraron también valores de IC50 en *Leishmania infantum* en el rango micromolar bajo. En suma, los resultados obtenidos prueban nuestra hipótesis de que los compuestos diseñados pueden ser obtenidos y que éstos presentan actividad contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum*.

Respecto a posibles blancos de acción en el parásito, se estudió la interacción con CT-ADN de todos ellos utilizando una técnica de fluorescencia que mide el desplazamiento de bromuro de etidio del aducto ADN-bromuro de etidio por efecto de la interacción con los compuestos. El estudio mostró una débil interacción a través de un quenching de fluorescencia bajo (Tabla 3). Por eso, no se realizaron los estudios de electroforesis en gel planificados ya que, además, como se explica más adelante el estudio de metalómica mostró que la asociación de los compuestos al ADN parasitaria es ínfima.

El otro blanco propuesto para los compuestos es la enzima lanosterol 14 alpha demetilasa, parte de la ruta de biosíntesis de ergosterol en el parásito, que es el blanco de acción del clotrimazol y otros azoles. Los resultados obtenidos por HPLC luego de incubar el parásito en su forma epimastigota con el compuesto más promisorio, $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$, y aislar los esteroides presentes y cuantificar lanosterol y ergosterol, muestran que el nuevo compuesto inhibe la enzima produciendo acumulación de lanosterol y depleción de ergosterol respecto al parásito sin tratar. Este efecto es muy similar al cuantificado para el análogo de Re y mayor que el obtenido para el CTZ libre.

En cuanto a los estudios de metalómica, se determinó, en la forma epimastigota del parásito, el ingreso del compuesto más promisorio, $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$, y la distribución subcelular del mismo en cuatro fracciones: proteínas solubles, fracción insoluble que incluye proteínas insolubles, ADN y ARN (Tablas 4 y 5, anexo tablas). Los resultados muestran una baja captación de manganeso por el parásito, pero similar a otros potenciales metalofármacos, y una acumulación preferencial en la fracción de proteínas solubles. Sin embargo, en contra de lo esperado no se observó una asociación preferencial con ADN. Esto nuevamente descarta al ADN como blanco principal de los compuestos. El estudio de proteómica se realizó por una estrategia shotgun que permitió comparar el pool de proteínas de parásitos tratados y sin tratar con $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$. El diagrama volcano muestra que muy pocas proteínas son afectadas por el compuesto de Mn. El compuesto análogo de renio mostró sin embargo un efecto mucho mayor, lo que condujo a un significativamente mayor número de proteínas subexpresadas respecto al parásito sin tratar. Al analizar las proteínas afectadas no se logró identificar proteínas de la ruta de biosíntesis del ergosterol. Este resultado podría indicar que, si bien el compuesto no afecta la expresión de la enzima lanosterol 14 alpha demetilasa, el estudio experimental ya comentado confirma que la actividad de esta enzima es inhibida por el compuesto. También, se realizó un estudio no proyectado. Los tricarbonilos suelen ser estudiados como moléculas liberadoras de CO, pudiendo este tener efectos en diferentes células. Durante la pasantía en el laboratorio de la Prof. Rosely Peralta en la Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, parte de su plan de posgrado, la becaria realizó estudios de liberación fotoinducida de CO por los compuestos de Mn emergentes de su trabajo tesis. Estos liberaron CO en las condiciones de trabajo utilizadas. Los compuestos análogos de renio no mostraron liberación.

Manuscrito en preparación:

Multifunctional compounds including an organometallic Mn(I) centre as antiparasitic agents: a comparative study with the Re(I) analogues

Carolina Del Mármola, Gonzalo Scalesea, Rodrigo Moreiraa, Nicolás Veigaa, Ignacio Machadob, Analía Limac, Leticia Pérez-Díazd, Dinorah Gambinoa

aÁrea Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay; bÁrea Química Analítica,

DEC, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay; cUnidad de Proteómica y Bioquímica Analíticas, Institut Pasteur Montevideo, dLaboratorio de Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Conclusiones y recomendaciones

En conclusión, se han sintetizado siete nuevos compuestos tricarbonilos de Mn(I) que resultaron activos contra *T. cruzi* y *L. infantum*, utilizando cinco diferentes derivados bidentados polipiridínicos y tres diferentes azoles monodentados. Este estudio permitió expandir los conocimientos relativos a nuevos compuestos organometálicos de manganeso con ligandos bioactivos como potenciales antiparasitarios, tema prácticamente inexplorado hasta el momento. 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 en medios relevantes de complejidad creciente. Se estudió su actividad biológica en diferentes formas del ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*, la selectividad hacia el parásito estudiando la toxicidad inespecífica en células mamíferas modelo y su posible mecanismo de acción analizando dos blancos propuestos propios de los ligandos utilizados. 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. También resultaron activos en *Leishmania infantum*, parásito responsable de la leishmaniasis visceral. Se avanzó en estudios de metalómica en *T. cruzi*. La metalómica es un área joven de la Química Inorgánica Medicinal que empezó su desarrollo en las últimas décadas por lo que todo resultado obtenido resulta novedoso y relevante. El compuesto seleccionado mostró una baja captación por el parásito, pero similar a la reportada por otros potenciales metalofármacos en células de diferentes tipos. También, se realizó un estudio de proteómica buscando identificar proteínas del parásito afectadas por el compuesto más promisorio (más activo y selectivo). Este tipo de estudios ha sido realizado en *T. cruzi* para compuestos metálicos solo por nuestro grupo.

En cuanto a la comparación de los compuestos de Mn con los compuestos análogos de Re(I) con clotrimazol, desarrollados en un proyecto anterior, ambas series mostraron actividad similar en tripomastigotas de *T. cruzi* pero inesperadamente los compuestos de Mn resultaron menos selectivos que los de Re. El compuesto más promisorio de cada serie (menor IC₅₀ y mayor índice de selectividad) fue el de tetrametilfenantrolina y clotrimazol como ligandos. Los compuestos de Mn resultaron menos estables en solución que los de Re y más lipofílicos que estos. Los estudios de metalómica de los compuestos más promisorios de ambas series mostraron mayor ingreso al parásito para el de Mn pero una distribución intraparasitaria muy similar para ambos. El ADN no parece ser un blanco relevante para ninguna de las series. Ambos compuestos promisorios de Re y Mn inhiben la actividad de la enzima lanosterol 14 alpha demetilasa de forma dosis dependiente y con similar intensidad. El estudio de proteómica de los compuestos más promisorios de ambas series mostró un mucho mayor efecto sobre el pool de proteínas del parásito para el compuesto de Re.

Esta serie de nuevos compuestos de Mn(I) aporta resultados relevantes para el desarrollo de posibles agentes contra *T. cruzi*. Los resultados emergentes del proyecto resultan un aporte tanto a la Química Inorgánica básica como a la Química Inorgánica Medicinal, especialmente del manganeso.

El proyecto tuvo un fuerte componente de formación en Química Inorgánica Medicinal, habiéndose formado una estudiante de Posgrado en Química, que realizó su defensa intermedia y actualmente continúa sus estudios como estudiante de Doctorado en Química. Ésta no solo se formó en herramientas básicas de la Química Inorgánica Medicinal sino también en técnicas de Química Bioanalítica como las involucradas en los estudios de determinación de estabilidad en solución y lipofilia, metalómica y proteómica y de determinación de la inhibición de la enzima lanosterol 14- alpha demetilasa y de la interacción con ADN. Además, la estudiante adquirió habilidades en la determinación de la actividad biológica de los compuestos. La experiencia y conocimientos adquiridos por la estudiante resultarán de suma utilidad para el grupo de

investigación en su trabajo con estos y otros potenciales metalofármacos y para su futuro desempeño como investigadora independiente.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Resumen de conferencia publicado	Rational design of new multifunctional compounds including an organometallic Mn(I) centre: a comparative study with the Re(I) analogues	Dinorah Gambino, Carolina Del Mármol, Gonzalo Scalese, Mariano Soba, Ignacio Machado, Leticia Pérez-Díaz		https://hdl.handle.net/20.500.12008/45232	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Multifunctional Mn(I) and Re(I) tricarbonyls as prospective antiparasitic compounds: a comparative study	D. Gambino, C. Del Mármol, R. Moreira, G. Scalese, N. Veiga, I. Machado, L. Pérez-Díaz, A. Lima		https://hdl.handle.net/20.500.12008/45260	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Explorando la potencialidad de compuestos organometálicos multifuncionales de Mn(I) como agentes contra Trypanosoma cruzi	Carolina Del Mármol, Gonzalo Scalese, Rodrigo Moreira, Analía Lima,		https://hdl.handle.net/20.500.12008/45202	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
		Leticia Pérez Díaz, Ignacio Machado, Dinorah Gambino			
Resumen de conferencia publicado	Comparing multifunctional Mn(I) and Re(I) tricarbonyls as potential agents against Chagas disease	Dinorah Gambino , Carolina Del Mármol , Gonzalo Scalese , Mariano Soba , Rodrigo Moreira , Ignacio Machado , Leticia Pérez Díaz , Analia Lima		https://hdl.handle.net/20.500.12008/45237	Finalizado

Referencias bibliográficas

- [1] M. De Rycker, et al, Nature 2018, 559, 498.
- [2] B.J. Balarumali, K. Chanda, Front. Chem. 2021, 9, 622286.
- [3] S. Silva, et al, Int. J. Antimicrob. Agents, 2020, 55, 105906.
- [4] S.P.S. Rao, et al, ACS Infect. Dis. 2019, 5, 152.
- [5] I. Ribeiro, et al, PLoS Negl. Trop. Dis. 2009, 3, e484.
- [6] C.B. Scarim, et al., Eur. J. Med. Chem. 2018, 155, 824.
- [7] R. Salvatella, Arch. Pediatr. Urug. 2016, 87, 49.
- [8] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (visitada 2021).
- [9] A.S. Nagle, et al., Chem. Rev. 2014, 114, 11305.
- [10] S.K. Kwofie, et al, Curr. Top. Med. Chem. 2020, 20, 349.

- [11] <http://www.universidad.edu.uy/prensa/renderItem/itemId/36928/refererPageId/12> (visitada 2015)
- [12] <https://www.elpais.com.uy/informacion/salud/primera-vez-confirmando-uruguay-caso-leishmaniasis-visceral-humano.html>;
<https://www.eltelegrafo.com/2020/01/concordia-confirmando-un-caso-de-leishmaniasis-humana/> (visitadas 2020).
- [13] Y.C. Ong, et al, *Chem. Rev.* 2019, 119, 730.
- [14] S.P. Fricker, 2007, 2003, 4903–4917.
- [15] C.G. Hartinger, P.J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 39.
- [16] A.L. Noffke, et al, *Chem. Commun.* 2012, 48, 5219.
- [17] C.S. Allardyce, et al, *Appl. Organomet. Chem.* 2005, 19, 1.
- [18] P.J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* 2006, 2003, 1929.
- [19] P. Chellan, P.J. Sadler, *Chem. Eur. J.* 2020, doi.org/10.1002/chem.201904699.
- [20] G. Gasser, et al., *J. Med. Chem.* 2011, 54, 3.
- [21] R.A. Sánchez-Delgado, et al, *Metal ions in Biological Systems*, 41, Marcel Dekker, New York, 2004, 379.
- [22] S. Singh, et al, *Chem. Rev.* 2009, 109, 1900.
- [23] M. Navarro, G. Gabbiani, L. Messori, D. Gambino, *Drug Discov. Today* 2010, 15, 1070.
- [24] D. Gambino, *Coord. Chem. Rev.* 2011, 25, 2193.
- [25] D. Gambino, L. Otero, *Inorg. Chim. Acta* 2012, 393, 103.
- [26] J. Costa-Pessoa, S. Etcheverry, D. Gambino, *Coord. Chem. Rev.* 2015, 301-302, 24.
- [27] A. Tahghighi, *J. Organomet. Chem.* 2014, 770, 51.
- [28] R.W. Brown, C.J.T. Hyland, *Med. Chem. Commun.* 2015, 6, 1230.
- [29] M.B. Camarada, et al. *Med. Chem. Commun.* 2016, 7, 1307.
- [30] D. Gambino, L. Otero, *Inorg. Chim. Acta* 2018, 472, 58.
- [31] E. Paunescu, et al, *Eur. J. Med. Chem.* 2021, doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113610.
- [32] M. Ravera, et al, *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 155, 459.
- [33] J.J. Nogueira, et al, *J. Med. Chem.* 2008, 51, 4104.
- [34] C. Biot, *Curr. Med. Chem. - Anti-Infective Agents* 2004, 3, 135.
- [35] B. Demoro, L. Otero, D. Gambino, et al., *Dalton Trans.* 2012, 41, 1534.
- [36] E. Rodríguez, L. Otero, D. Gambino, et al., *J. Coord. Chem.* 2015, 68, 2923.
- [37] E. Rodríguez, L. Otero, D. Gambino et al., *Dalton Trans.* 2019, 48, 7644.
- [38] B. Demoro, L. Otero, D. Gambino, et al., *Biol. Trace Elements Res.* 2013, 153, 371.
- [39] B. Demoro, L. Otero, D. Gambino, A.I. Tomaz, et al., *Dalton Trans.* 2013, 42, 7131.
- [40] E. Rodríguez, M.F. Mosquillo, L. Pérez-Díaz, L. Otero, D. Gambino, et al., *Dalton Trans.* 2015, 44, 14453.
- [41] M. Fernández, L. Otero, D. Gambino, et al., *J. Inorg. Biochem.* 2015, 156, 306.
- [42] E. Rodríguez, I. Machado, L. Otero, D. Gambino, et al., *J. Inorg. Biochem.* 2017, 170, 125.
- [43] F. Rivas, D. Gambino, et al. *J. Inorg. Biochem.* 2018, 187, 73.
- [44] F. Rivas, D. Gambino, et al. *Dalton Trans.* 2021, 50, 1651.
- [45] N.M. El-Sayed, et al., *Science* 2005, 309, 404.
- [46] J. Benítez, D. Gambino, et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 62, 20.
- [47] M. Vieites, D. Gambino, et al. *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 1300.
- [48] M. F. Mosquillo, P. Smircich, A. Lima, S. A. Gehrke, G. Scalese, I. Machado, D. Gambino, B. Garat, L. Pérez-Díaz. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2020,
<https://doi.org/10.1155/2020/1634270>.
- [49] M. F. Mosquillo, I. Machado, D. Gambino, B. Garat, L. Pérez-Díaz, et al. *Biometals* 2018, 31, 961.
- [50] M.F. Mosquillo et al, *Metallomics* 2020, 12, 813.
- [51] M. F. Mosquillo, D. Gambino, B. Garat, L. Pérez-Díaz, et al., *Chem. Biol. Drug Design* 2018, 92, 1657.

- [52] M. Fernández, D. Gambino, et al., Dalton Trans. 2013, 42, 11900.
- [53] L.S. Waters, Curr. Opin. Chem. Biol. 2020, 55, 96.
- [54] V.L. Pecoraro, Coord. Chem. Rev. 2008, 252, 416.
- [55] Z. Guo, P.J. Sadler, Angew. Chem. Int.Ed. 1999, 38, 1512.
- [56] A. Tarushi, et al, J. Inorg. Biochem. 2019, 190, 1-14.
- [57] V.C. Weiss, et al, Inorg. Chem. 2020, 59, 13078.
- [58] A.L. Amoirim, et al, New J. Chem. 2020, 44, 10892.
- [59] I. de Aguiar, et al, Inorg. Chem. Commun. 2017, 84, 49.
- [60] F.Z. Ishmail, et al, J. Inorg. Biochem. 2021, 215, 111328.
- [61] J. W. Betts, et al, Metallomics 2021, DOI:10.1039/D0MT00142B.
- [62] P. Guntzel, et al, Metallomics, 2019, 11, 2033.
- [63] A. Jablonski, et al, Molecules 2017, 22, 2220.
- [64] P.V. Simpson, et al, Organometallics 2015, 34, 3809.
- [65] C. Deegan, et al., Chem. Biol. Interact. 2006, 164, 115.
- [66] H.M. Butler, et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1969, 47, 541.
- [67] M. Cipriani et al, J. Biol. Inorg. Chem. 2020, 25, 509.
- [68] A. Bencini, Coord. Chem. Rev. 2010, 254, 2096.
- [69] G. I. Lipesheva, et al., Parasitology 2018, 145, 1820.
- [70] P.D. Crowley, J. Appl. Microbiol. 2014, 117, 611.
- [71] C. Morillo et al, J. Am. Coll. Cardiol. 2017, 69, 939.
- [72] J. Szpunar, Anal. Bioanal. Chem. 2004, 378, 54.
- [73] M. Groessel, C.G. Hartinger, Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 1791.
- [74] G. Scalese, I. Machado, L. Perez-Díaz, D. Gambino, et al., J. Biol. Inorg. Chem. 2018, 23, 1265.

Licenciamiento

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