



Complejos metálicos como potenciales antimaláricos con blanco de acción: hemozoína

William Castro*¹, Maribel Navarro²

¹Lab. Química Bioinorgánica, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas 1020-A. Venezuela

²School of Chemical and Mathematical Sciences, Murdoch University, Western Australia 6150, Australia.

(*) wcastro10@gmail.com

Recibido: 20/06/2012

Revisado: 13/08/2012

Aceptado: 24/08/2012

Resumen:

La malaria es un grave problema de salud a nivel mundial, por lo cual la síntesis de drogas más efectivas para combatir la enfermedad es un objetivo prioritario. Una de las estrategias más prometedoras es la modificación de compuestos con actividad biológica conocida por medio del acomplejamiento a metales, buscando evitar la resistencia presentada por los parásitos e incrementar la actividad biológica. En este trabajo se presentan los estudios más novedosos en la síntesis de complejos metal-cloroquina, en vías del desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos más eficaces contra la malaria y menos tóxicos al huésped, teniendo como blanco de acción la hemozoína.

Palabras clave: Complejos metálicos; Ferriprotoporfirina; Hemozoína; Malaria; Plasmodium

Abstract

Malaria is a serious problem of health worldwide, synthesis of drugs more effective to combat this disease is a high-priority task for the control of the disease; one of the most promising strategies is the modification of compounds with known or potential activity through the incorporation of a transition metal into its molecular structure, in order to avoid the resistance of parasites and increase biological activity. In this paper we present the latest studies on the synthesis of metal-chloroquine, in the process of developing new chemotherapeutic agents more effective against malaria and less toxic to the host, still the hemozoin the principal target of action.

Keywords: Ferriprotoporphyrin; Hemozoin; Malaria; Metal complexes; Plasmodium

Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad protozoaria producida por cualquiera de las cinco especies de parásitos del genero *Plasmodium*. Las especies capaces de infectar al ser humano son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, y se transmite al humano a través de la picadura de mosquitos infectados del genero *Anopheles*¹. La misma se encuentra dentro de las enfermedades prioritarias de la Organización Mundial de la Salud (OMS) según reportes, en 2010 se estimaron en 3.300 millones las personas que se encontraban en riesgo de contraer la enfermedad y se registraron 655.000 (537.000-907.000) muertes, el 91% de ellas (596.000, rango de 468.000-837.000) en la región africana y aproximadamente el 86% de las muertes causadas por paludismo en todo el mundo fueron niños menores de 5 años². Debido a esta grave situación diversos investigadores a

nivel mundial han sumado esfuerzos en la búsqueda de nuevos fármacos que puedan combatir de una manera más efectiva la enfermedad con respecto a los compuestos que se usan actualmente (figura 1), además de evitar la resistencia presentada por parte de los parásitos hacia los fármacos y disminuir los efectos secundarios, una de las vías más prometedoras para obtener nuevas drogas antimaláricas, es la síntesis de compuestos capaces de atacar específicos blancos de acción.

Uno de los principales objetivos de compuestos antimaláricos es evitar la formación del cristal de hemozoína³, debido a ello en este trabajo se muestra una revisión de los aspectos más relevantes de este blanco que permitirán su fácil entendimiento además se describirán las técnicas y métodos de evaluación de la interacción de diversos complejos metálicos con análogos sintéticos de la hemozoína.

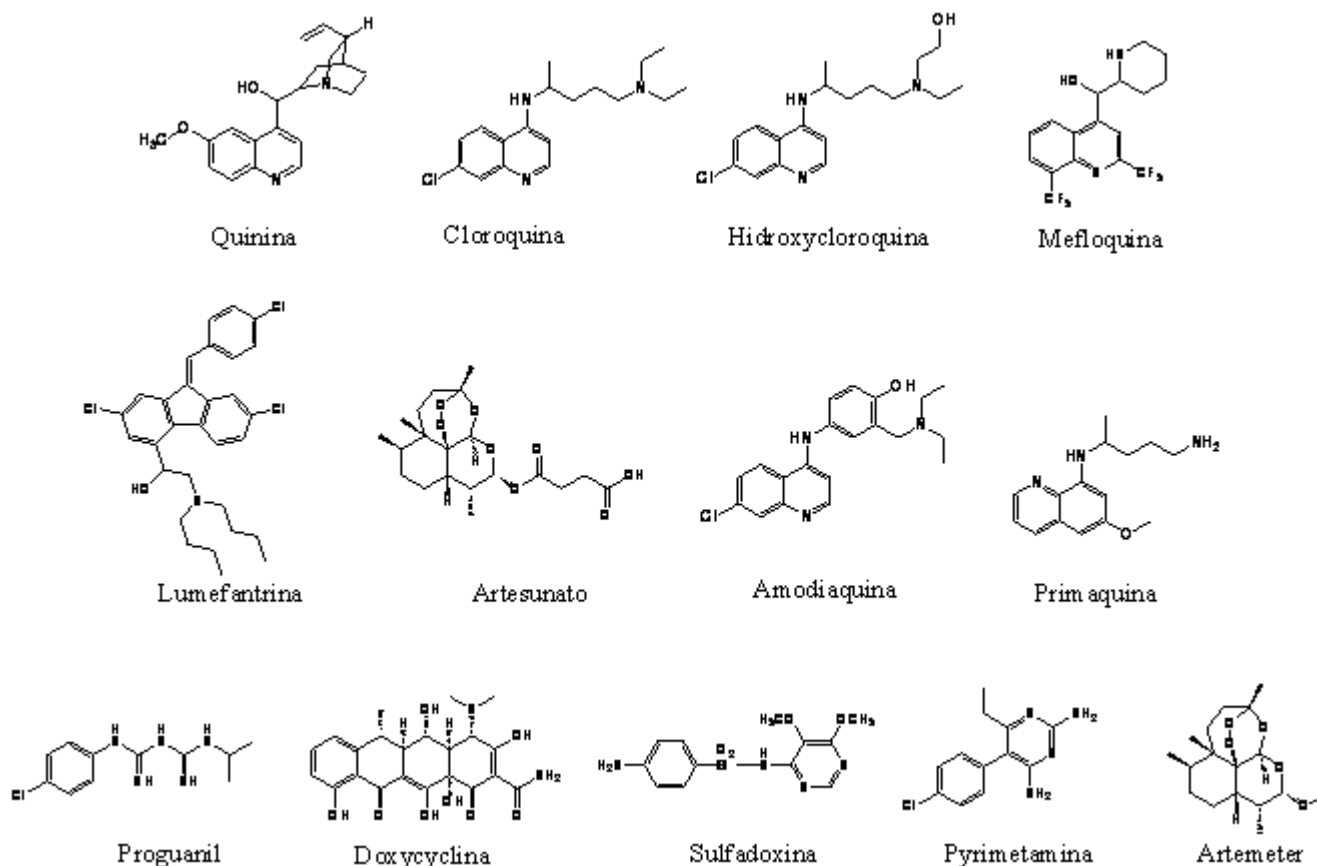


Fig. 1: Compuestos orgánicos usados actualmente como antimaláricos.

Hemozoína

Los parásitos una vez dentro del cuerpo humano, digieren y degradan grandes cantidades de hemoglobina para satisfacer sus requerimientos biológicos. Diversos estudios indican que cerca del 60-80% de los glóbulos rojos presentes son degradados dentro de un compartimiento llamado vacuola digestiva, la cual posee un pH entre 5,2-5,6^{4,5}. Una vez finalizado este proceso el grupo hemo es liberado y el centro de hierro es oxidado, probablemente a través de auto-oxidación espontánea por O₂, para producir hematina (acuoferritoproporfirina IX o H₂OFe(III)PPIX). Existe evidencia sustentable en la literatura que muestran que una vez que el hemo se encuentra en estado libre, es capaz de inducir especies reactivas de oxígeno^{6,7}, peroxidación lipídica^{8,9}, oxidación del ADN¹⁰ y proteínas¹¹ además de interferir con la estabilidad de los fosfolípidos con un mecanismo pro-oxidante^{12,13}, resultando en la lisis celular. Por esta razón los parásitos de *Plasmodium* han generado un mecanismo para evitar los efectos nocivos que genera el hemo libre¹⁴, convirtiendo la hematina en una sustancia altamente microcristalina, insoluble y que no es tóxica para el parásito, denominada hemozoína (pigmento malárico)¹⁵, este proceso se ha llamado mecanismo de desintoxicación.

La formación de hemozoína en el parásito de malaria, no está totalmente claro, sin embargo varias hipótesis se han

sugerido, entre las que podemos mencionar, proceso enzimático¹⁶, formación espontánea¹⁷, formación autocatalítica¹⁸, catálisis por lípidos¹⁹, nucleación y/o catálisis por proteínas ricas en histidina 2 (HRP-2)²⁰ involucrando ambos: lípidos y HRP-2 en el proceso²¹, más recientemente, se evidenció que la nucleación de la hemozoína en la vacuola digestiva ocurre en la membrana y que la cristalización ocurre en su mayor parte en la fase acuosa, mientras que la orientación morfológica del cristal está gobernada por la fase lipídica²².

La naturaleza y estructura química de la hemozoína fueron determinadas en 1991 mediante difracción de rayos X. Los cristales están constituidos por agregados diméricos de Fe(III)PPIX, en donde, los grupos hemo se enlazan entre sí a través del enlace de Fe1-O41-O40, mientras que los dímeros se unen a través de los enlaces entre los hidrógenos localizados en los O36 y O37²³, tal como se muestra en la figura 2.

En dicho trabajo además se demostró la existencia de un análogo sintético, denominado β-hematina²³, el cual es química y estructuralmente idéntico a la hemozoína. La formación de la β-hematina puede lograrse por diversos métodos químicos sencillos²⁴, lo cual ha permitido modelar tanto la formación de la hemozoína, como su inhibición por parte de diversos compuestos antimaláricos.

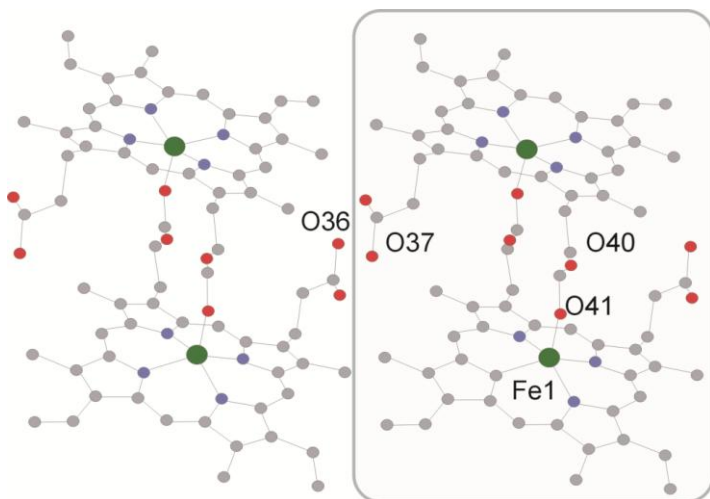


Fig. 2: Estructura molecular de la hemozoína.

Formación de la hemozoína sintética (β -hematina)

La formación de β -hematina puede lograrse por diversos métodos, entre los cuales destacan la síntesis a partir de hematina en una solución acuosa ácida en presencia de varios agentes²⁵, los cuales incluyen ácidos orgánicos, lípidos, entre otros preformando así la β -hematina, en HRP-2 a 37°C, también puede formarse en solución no acuosa de hemin (Cl-Fe(III)PPIX) por la abstracción de HCl usando 2,6-lutidina en metanol seco o usando una base como el NaOH²⁶.

Uno de los problemas en la formación de la hemozoína sintética *in vitro* bajo las condiciones comentadas, es la introducción directa de la Fe^{III}PPIX, en un medio ácido. Este proceso resulta en una precipitación inmediata de Fe^{III}PPIX amorfa, la cual puede convertirse a β -hematina solo lentamente, probablemente por disolución y reprecipitación. La Fe^{III}PPIX en los parásitos de malaria es liberada en un proceso continuo y se ha determinado que la formación de hemozoína en los mismos es un proceso rápido. Egan²⁷, tomando en cuenta el rol fundamental de la interface agua/lípido en la formación de hemozoína, propone un método simple donde simula la interface mediante un sistema n-octanol/agua y la Fe^{III}PPIX es introducida cerca de la interface de los dos líquidos, a través de IRTF y microscopía electrónica, después de 30 min de llevada a cabo la reacción, se evidenció la formación de β -hematina corroborándose la similitud con los cristales de hemozoína extraída del *Plasmodium*.

Aunque el mecanismo de formación de la hemozoína es aún incierto, está bien establecido que diversas drogas tienen como blanco de acción la inhibición de su formación. Los principales estudios en esta área se han llevado a cabo en análogos sintéticos (hemin, hematina, β -hematina), lo cual ha permitido comprender el mecanismo de acción de muchas drogas antimaláricas específicamente

las aminoquinolinas como la cloroquina, quinina y mefloquina conocidos fármacos eficaces para el tratamiento y la profilaxis de malaria.

Interacción entre las aminoquinolinas y análogos sintéticos de la hemozoína

Los principales resultados en el modo de interacción entre las 4 aminoquinolinas y la hematina indican la formación de complejos π - π , a través de una interacción coplanar, entre el anillo aromático de la quinolina y el sistema porfirínico. La estabilidad de este complejo no está directamente relacionada con el solapamiento de los orbitales π de ambos sistemas²⁸, de hecho, las interacciones hidrofóbicas son probablemente la principal fuente de estabilidad, además los factores electrónicos han demostrado cumplir un rol fundamental en la estructura de estos complejos droga-hematina. La evidencia más fuerte para el acomplejamiento π - π es la capacidad de la cloroquina (CQ, una de las principales drogas anti-maláricas) para formar complejos con porfirinas libres de metal²⁹, lo cual está claramente demostrado por diversos estudios como los desplazamientos en las señales en RMN y las líneas paramagnéticas²⁹, estos resultados permiten postular que no es posible la formación de un complejo de coordinación entre la droga y el Fe(III) de la hematina.

Existen pocos estudios en el intento de modelar las interacciones de los medicamentos antimaláricos de quinolina con hematina por técnicas computacionales³⁰. Un estudio mecánico molecular en el cual se evalúa la interacción entre la CQ con un modelo de hierro porfirina en la N-acetilmicroperoxidasa-8, revela un arreglo de mínima energía de las interacciones coplanares de la quinolina con la porfirina, pero este no define la conformación preferencial del complejo, además este estudio falla en consignar el solvente. Aunado a esto, diversos estudios demostraron el rol crítico del solvente en la estabilización de estos complejos usando métodos de dinámica y mecanismos moleculares³¹, los mismos toman en cuenta moléculas de agua, e indican que ambas interacciones coplanares entre el anillo quinolínico y las porfirinas de hierro (específicamente las interacciones de puente de hidrógeno de la cadena terminal de la amina de las drogas y los grupos propíonatos) juegan un rol crítico en la estabilidad del complejo. Estudios más recientes, en donde se evaluaron la superficies de potencial electrostático de la cloroquina y de varios análogos, calculados usando métodos de mecánica cuántica *ab-initio*, indican el papel fundamental de la densidad de los electrones π de C8, C8a, C4 y C4a (figura 3) de las quinolinas en la capacidad de interactuar con la hematina³².

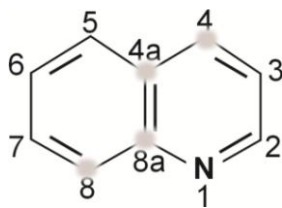


Fig. 3: Densidad electrónica en las quinolinas

Las quinolinas son ricas en electrones π , por lo cual se sugiere la interacción con regiones deficientes en electrones alrededor del centro de hierro de la hematina para formar el complejo tipo sandwich, este estudio es soportado por resultados experimentales para varias quinolinas, los cuales demuestran la importancia de la relación entre la actividad biológica de las drogas y la densidad electrónica de los átomos C8a, C4 y C4a³³.

El entendimiento empírico de las interacciones entre las quinolinas y la hematina ha avanzado considerablemente en los últimos años, con miras a elucidar mecanismos y desarrollar nuevas drogas a partir de esos resultados. Es importante recalcar que la fuerza de las interacciones quinolina-hematina no está directamente correlacionada con la actividad antiplasmodíca. La evidencia sugiere que el enlace con la hematina es un requerimiento necesario pero no suficiente para la actividad biológica.

A pesar de la falta de claridad en cuanto al mecanismo exacto de cómo los antimaláricos quinolínicos inhiben la formación de hemozoína, hay evidencia considerable para tomar al grupo "hemo" (ya sea en forma de hematina libre, hemin, hematina consolidada o hemozoína) como el blanco de acción de estos fármacos. La evidencia aunque indirecta, concluye para el caso de la CQ:

- a.- La CQ es activa en la etapa sanguínea del parásito, en donde se cataboliza la mayor cantidad de hemoglobina.
- b.- La CQ es inactiva en parásitos de *Babesia*, una familia cercana a los *Plasmodium*, los cuales infectan los glóbulos rojos pero no forman hemozoína y aparentemente tampoco digieren hemoglobina³⁴.
- c.- La CQ es quiral, pero ambos enantiómeros son igualmente activos, lo cual sugiere la no quiralidad del objetivo, consistente con hematina.
- d.- La actividad biológica de análogos de CQ contra cepas sensibles, está relacionado con la fuerza de inhibición en la formación de β -hematina de dichos análogos, además de la acumulación en la vacuola digestiva del parásito³⁵.

En vista de los resultados mencionados, en la actualidad la dirección más prometedora para predecir la capacidad antimalárica de los nuevos compuestos, es el estudio del blanco de acción: hemozoína, por medio de sus derivados sintéticos.

Hemozoína como blanco de acción de complejos metálicos

La aparición de la resistencia de los parásitos a los medicamentos comúnmente utilizados, ha impulsado el diseño de novedosas estrategias de síntesis para nuevos fármacos, entre las cuales se incluye la modificación de drogas conocidas mediante su acomplejamiento a metales de transición³⁶. Generalmente, este enfoque implica mantener el blanco de acción de la droga parental, aunado a la posibilidad de evitar la resistencia presentada por el parásito debido a la presencia del metal. Se han sintetizado una gran cantidad de complejos metálicos usando dicha estrategia³⁷, tres grupos han destacado en esta área, inicialmente Sánchez-Delgado y Navarro en 1996 publicaron la síntesis, caracterización y actividades biológicas de análogos metal cloroquina, de esta forma proponen la modificación de la CQ por medio de un enlace coordinativo a metales de transición. Los primeros complejos metálicos fueron $\text{RhCl}(\text{COD})\text{CQ}$ y $[\text{RuCl}_2(\text{CQ})]_2$ (complejos 1-2, figura 4). El complejo 2 logró incrementar 4,5 veces la actividad biológica con respecto a la droga parental (CQ) en cepas resistentes, demostrando que la coordinación a Ru-CQ logró no solo incrementar la actividad biológica sino además evadir la resistencia presentada por los parásitos³⁸. Posteriormente el grupo de Sánchez-Delgado, adoptó un nuevo diseño molecular en la búsqueda de incrementar la actividad biológica de la primera generación de los complejos de Ru, variando los otros ligandos y la carga total de los complejos, de esta manera los complejos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{CQ})\text{Cl}_2]$ (complejos 3-6, figura 4), mostraron un importante incremento en la actividad biológica, en cepas tanto sensibles como en resistentes de *Plasmodium*³⁹. Otros centros metálicos han sido ensayados por el grupo y de esta manera se reportó la síntesis del complejo $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$ (complejo 7, figura 4), el cual causa una importante inhibición del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium berghei*, además presentó una actividad biológica de 5 a 10 veces superior con respecto a la cloroquina tanto en cepas sensibles como resistentes a la CQ⁴⁰. Todos estos resultados muestran un importante incremento de la actividad anti-parasitaria de la CQ al formar estos complejos de coordinación, demostrando la validez de este concepto en la búsqueda de nuevas drogas antimaláricas, capaces de evadir la resistencia⁴¹.

Otra estrategia interesante propuesta por Brocard y Biot, en la búsqueda de nuevos complejos ha sido la introducción del ferroceno dentro de drogas orgánicas de conocida actividad biológica. Se han sintetizado aproximadamente 150 derivados con diferentes compuestos entre los que destacan: mefloquina, quinina⁴², artemisina⁴³, atovaquona⁴⁴, chalconas⁴⁵, carbohidratos conjugados de ferrocenil⁴⁶, ciprofloxacina⁴⁷⁻⁴⁹, ferrocenil pirrolo⁵⁰, ferroceno-estrichnobraisilina⁵¹, mepacrina y más recientemente con primaquina⁵². Aunque estos complejos no han incrementado

la actividad biológica de su droga parental de manera satisfactoria, demostraron que la introducción del ferroceno tiene una influencia importante en la resistencia del parásito. El mayor éxito de esta estrategia, ha sido incluir el grupo

ferrocenil en la cadena lateral de una 4 aminoquinolina a través de un enlace covalente a uno de los anillos ciclopentadienilo formando lo que se ha denominado ferrocloquinina (FQ, SSR97193, complejo 8, figura 4)⁵³.

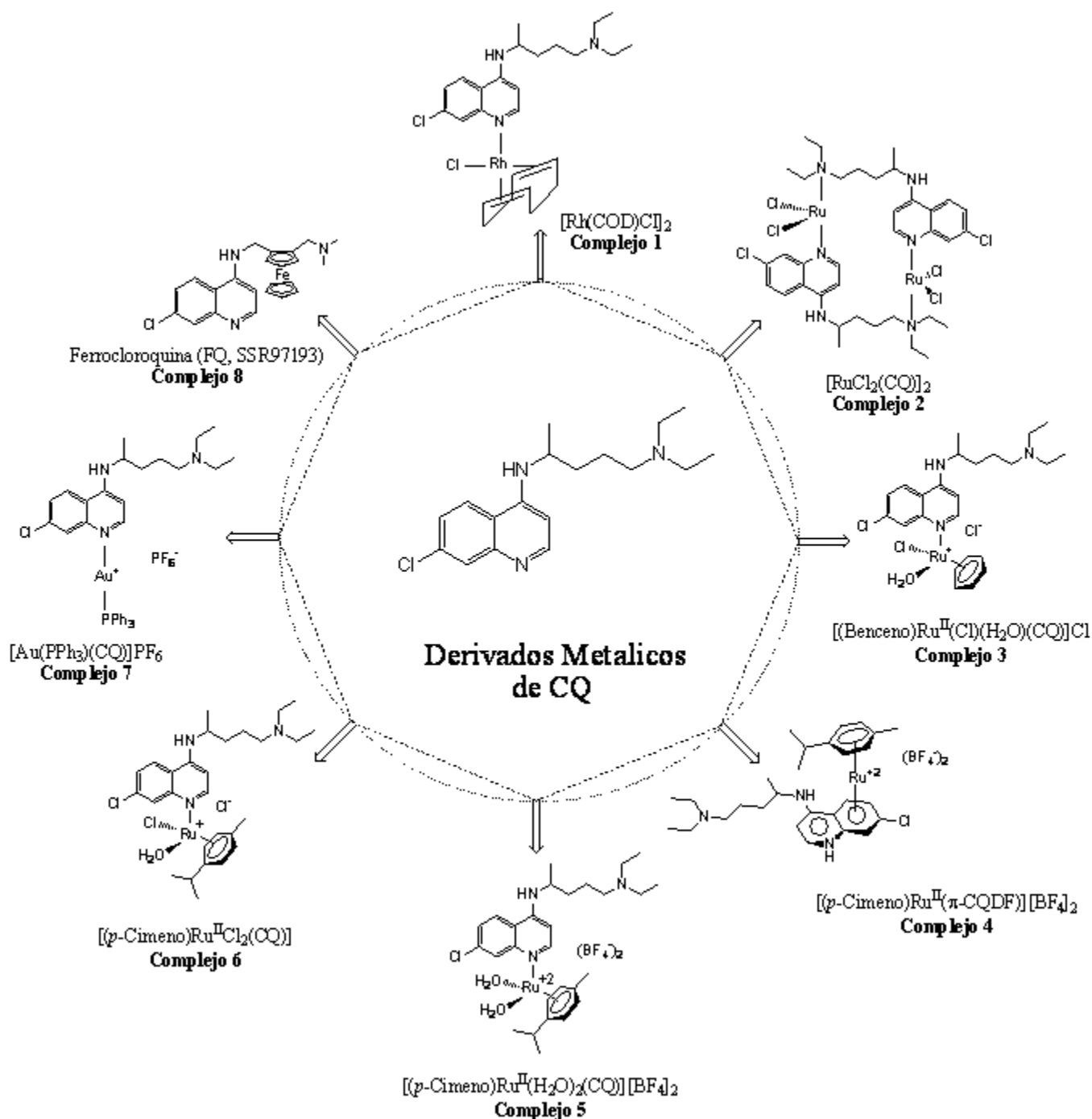


Fig. 4: Estructuras propuestas para derivados metálicos antimaláricos.

En comparación a la CQ, la actividad antimalárica *in vitro* en diversas cepas del *Plasmodium Falciparum*^{40,41}, es alrededor de 5 veces más activa contra cepas moderadamente sensibles y mucho más activa (hasta 30 veces) contra cepas resistentes. Se ha postulado que la inhibición de resistencia por parte de la FQ está relacionada con diferencias en (i) forma, (ii)

volumen, (iii) lipofilicidad, (iv) efectos en basicidad y (v) su perfil electrónico⁵⁴. Todas estas características modifican drásticamente su comportamiento biológico con respecto a su droga parental, y la idea que se maneja con mayor fuerza es que reducen la afinidad con respecto a los transportadores que provocan la resistencia de la CQ.

Debido a estos importantes resultados uno de los objetivos primordiales ha sido elucidar el mecanismo de acción de estos complejos, y comparar el comportamiento de los mismos con respecto a la CQ para comprender como estos complejos logran incrementar la actividad biológica, específicamente los complejos $[\text{RuCl}_2(\text{CQ})]_2$ ⁵⁵, $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ ⁵⁶. La serie (areno)Ru-CQ y FQ fueron estudiadas partiendo de la hipótesis que dichos complejos mantendrían el blanco de acción de la droga parental. Diversos estudios reportan como principal mecanismo de acción para la CQ, la inhibición de la formación de la hemozoína, por medio de la concentración de la droga en la vacuola digestiva del *Plasmodium*, promoviendo daño en la membrana y la subsecuente muerte del parásito⁵⁷. Es incierta la forma como funciona este mecanismo, pero está bien establecido que la CQ forma complejos con la hematina en solución y de esta manera actúan como inhibidores de la formación de la β -hematina^{58,59}. Para estudiar la posible interacción de estos complejos metálicos con este blanco de acción, se han desarrollado diversos métodos para evaluar diversas características físico-químicas que pueden ser asociadas con la actividad antimalárica, dichos métodos los discutiremos a continuación:

Interacción con la hematina

La capacidad de la cloroquina de formar complejos con la hematina fue reconocida en 1964⁶⁰ y dio lugar a proponer la hematina como blanco de acción en 1980⁶¹. Estos hallazgos motivaron numerosos estudios relacionados con la interacción en soluciones acuosas, usando técnicas espectroscópicas tales como UV-Visible, Mössbauer y RMN, por medio de los cuales se ha obtenido evidencia de las interacciones droga-hematina⁶², específicamente con cloroquina, amodiaquina, quinina y mefloquina.

Inicialmente se reportaron constantes de asociación en medios acuosos, basados en un método de equilibrio de diálisis, el principal problema con estos estudios, fue la omisión de la dimerización de la hematina en medio acuoso, por lo cual actualmente se reportan las constantes de asociación con un medio acuoso al 40% de DMSO para asegurar la forma monomérica de la hematina⁶³. De esta manera a partir de titulaciones espectroscópicas, siguiendo la banda en 402nm, y asumiendo un modelo de acomplejamiento 1:1 droga/hemin, se obtienen constantes de interacción que se logran correlacionar de una manera adecuada con la actividad biológica.

En el caso de los complejos metálicos se han medido sus constantes de asociación con Fe(III)PPIX, por medio de un método propuesto por Egan *et. al*⁶⁴ los resultados de dichas constantes (Log K) son resumidos en la tabla 1. Los valores de las constantes para el caso de los complejos Ru-CQ^{65,66} y para FQ⁶⁷ se encuentran levemente por debajo de los encontrados para la CQDF (cloroquina difosfato) bajo las condiciones experimentales, indicando que estos derivados interaccionan con la hematina de manera similar o comparable a como lo hace la CQDF bajo las condiciones usadas. En el caso del complejo $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$, la constante de asociación hallada es superior comparada con la CQDF⁶⁸ (en las mismas condiciones experimentales), indicando que el complejo interacciona con la hematina más fuerte que la CQDF. Estos resultados sugieren a los autores que las interacciones electrostáticas (incluyendo interacción del tipo catión- π) pueden preponderar la especificidad y la geometría de la interacción, esto ocurre en procesos dinámicos tales como las interacciones proteína-proteína.

Tabla 1: Resultados de la interacción de complejos metálicos con Fe(III)PPIX y sus actividades biológicas

Complejos	Interacción con Fe(III)PPIX			Actividades biológicas en cepas de <i>Plasmodium</i>							
	Log (K) ^a	CI ₅₀ en buffer ^b	CI ₅₀ en interface	FcB1	FcB2	PFB	F32	3D7	D2d	K1	W2
CQDF	4,82 ± 0.02	0,69 (1.0)	2,92 (1.0)	45,6	110	58,3	8,2	39,5	1184	1883	2155
$[\text{RuCl}_2\text{CQ}]_2$	4,81 ± 0.09	–	–	10,5	46,5	–	–	–	–	–	–
$[(p\text{-Cimeno})\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{CQ})]$ (3)	4,57 ± 0.08	0,96 (0.7)	1,47 (2.0)	120,0	–	109,0	11,5	19,6	483	600	1667
$[(\text{Benceno})\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{CQ})]$ (4)	4,67 ± 0.03	0,67 (1.0)	2,42 (1.2)	81,6	–	79,0	13,2	17,9	442	508	1619
$[(p\text{-Cimeno})\text{Ru}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CQ})][\text{BF}_4]_2$ (5)	4,52 ± 0.16	0,65 (1.1)	1,73 (1.7)	96,5	–	122,6	22,5	19,5	234	353	906
$[(p\text{-Cimeno})\text{Ru}^{\text{II}}(\pi\text{-CQDF})][\text{BF}_4]_2$ (6)	4,71 ± 0.03	0,67 (1.0)	2,15 (1.4)	65-70	–	–	–	19,3	557	529	2549
$[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (7)	7,69 ± 0.01	3,42 (0.1)	0,64 (5)	5,1	23	–	18	–	–	99	70
Ferroquina (8)	4,95 ± 0.05	0,8 (2.4)	–	–	–	–	–	3,4	18,9	13,5	7,6

(a) Log (K) Constantes de enlace con hemin (pH 4,97) a partir de titulaciones espectrofotométricas

(b) CI₅₀ es la relación droga-hemin requerida para inhibir el 50% de agregación del hemo contra un experimento control en ausencia de la droga.

Actividad inhibitoria de agregación del hemo (HAIA por sus siglas en ingles) de complejos metálicos en buffer de acetato y en una interface buffer acetato/n-octanol.

Se han propuesto un gran cantidad de métodos para la evaluar la capacidad de un determinado compuesto en inhibir la formación de la β -hematina (hemozoína sintética)⁶⁹⁻⁷¹. Específicamente para los complejos metálicos dos métodos han marcado la pauta, el primero de ellos propuesto por Baelmans⁷² y posteriormente modificado por Domínguez⁷³, en donde se preforma la β -hematina, en un medio acuoso a un pH de 4,4 a partir de Fe(III)PPIX-Cl para luego hidrolizarla y formar hematina libre la cual es cuantificada a una longitud de onda de 405nm, (para la evaluación de los complejos metálicos, se agregan en el medio de reacción antes de formar la β -hematina). Sánchez-Delgado reportó los valores de CI_{50} (concentración necesaria para inhibir el 50%) de formación de β -hematina por este método para los complejos Ru-CQ y reportó que estos complejos son capaces de inhibir el proceso de agregación. Adicionalmente se evidenció que el complejo [(*p*-Cimeno)Ru^{II}Cl₂(CQ)] parece ser menos activo que la CQDF, todos los demás complejos Ru-CQ () demostraron una actividad muy similar a la CQDF. En el caso de la FQ el CI_{50} fue 0,8 equivalentes con respecto a hematina mientras para la CQDF fue de 1,9⁷⁴.

En 2009, Sánchez-Delgado postula una variación del método para medir la capacidad de los complejos en inhibir la formación de la β -hematina discutido hasta ahora. Tomando en cuenta la importancia que Egan y otros autores reportan⁷⁵ de la interface lipídica para la formación de la hemozoína, en el nuevo método para medir la capacidad de los complejos de inhibir la formación de la β -hematina se usa una interface n-octanol/agua a un pH de 4,9, en el cual la hematina es colocada cuidadosamente cerca de la interface y posteriormente los compuestos a evaluar; Error! Marcador no definido.. Todos los complejos metal-CQ evaluados por este método inhiben de manera más efectiva la formación β -hematina con respecto a la CQDF, en contraste con los resultados obtenidos por el método donde solo se usa el buffer de acetato. Una comparación más interesante es con respecto los resultados obtenidos por medio de su actividad biológica en cepas sensibles y resistentes de *Plasmodium falciparum*. Los valores obtenidos por HAIA en buffer predice que la actividad biológica de los complejos será similar o hasta inferior que la CQDF, en contraste con los resultados obtenidos por medio del ensayo en interface agua/n-octanol el cual predice que todos los complejos serán más efectivos que la CQDF. Los valores reportados para la actividad biológica contra cepas resistentes a la CQ (Dd2, W2 y K1) demuestran que los complejos son más activos que la CQDF consistente con los resultados encontrados

por el método de interface agua/n-octanol, de esta manera los autores evidencian que los resultados hallados por medio del método de la interface son un mejor indicador del potencial antimalárico contra cepas resistentes que los ensayos que se realizan solo en buffer. Adicionalmente Navarro y Sánchez-Delgado evaluaron la capacidad de [Au(CQ)(PPh₃)]PF₆ de inhibir la formación de la β -hematina por ambos métodos, los resultados hallados en buffer de acetato indicaron que el complejo es menos efectivo (un orden de magnitud mayor) comparado con la CQDF, en contradicción a la elevada actividad antimalárica observada para este compuesto. Cuando se miden los valores de CI_{50} por medio del método interface agua/n-octanol, el complejo es alrededor de 5 veces mejor inhibidor que la CQDF, en excelente correlación con los resultados antimaláricos *in vitro* obtenidos para este complejo contra cepas resistentes a CQ de *Plasmodium falciparum* (FcB1 y FcB2). Estos resultados apoyan la idea que los valores de inhibición de agregación del hemo, obtenidos por el método de la interface n-octanol/agua predicen de una manera más efectiva la actividad biológica *in vitro* que la clásica prueba en buffer de acetato.

Conclusión

Los estudios presentados en este resumen evidencian la efectividad de la estrategia propuesta, la cual consiste en modificar drogas orgánicas de conocida actividad antimalárica (como la CQ) mediante su acomplejamiento a metales de transición, manteniendo el blanco de acción de la droga parental, que en este caso es la inhibición de la hemozoína. Específicamente los complejos M-CQ interaccionan con el grupo hemo, generalmente de manera más fuerte que la droga estándar CQDF; además, inhiben de manera eficiente la formación de la β -hematina, específicamente en la interface agua/n-octanol. Estos resultados son a su vez consistentes con las actividades antimaláricas medidas en cepas resistentes de *P. falciparum*, concluyendo así claramente que el proceso de agregación de la hematina hacia hemozoína se mantiene como principal blanco de acción de los complejos metal-CQ. De esta manera el aumento observado en la actividad biológica, con respecto a la cloroquina, se postula que tiene una relación directa con el incremento de la lipofilicidad de los compuestos M-CQ, con respecto a la CQ libre, el cual resulta en una mayor acumulación en la cercanía de las interfaces agua/lípido dentro de la vacuola del parásito, donde tiene lugar el proceso de agregación de la hematina.

Referencias

1. Ph Rosenthal. Antimalarial Chemotherapy: mechanism of action, resistance and new directions in drug discovery. In Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, cap 1.5 (2001).

2. World Health Organization. World Malaria Report. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed Apr 24, 2012)
3. S Choia, P Mukherjee, M Avery. The Fight Against Drug-Resistant Malaria: Novel Plasmodial Targets and Antimalarial Drugs. **Curr. Med. Chem.**, **15**, 161 (2008)
4. S Dzekunov, L Ursos, P Roepe. Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **110**, 107 (2000)
5. T Egan, J Combrinck, J Egan, G Hearne, H Marques, S Ntenti, B Sewell, P Smith, D Taylor, D van Schalkwyk, J C Walden. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochem. J.**, **365**, 343 (2002)
6. M Davies. Detection of peroxy and alkyl radicals produced by reaction of hydroperoxides with heme-proteins by electron spin resonance spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, **964**, 28 (1988)
7. J van der Zee, D Barr, R Mason. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide. **Free Radic. Biol. Med.**, **20**, 199 (1996)
8. A Tappel. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. **J. Biol. Chem.**, **217**, 721 (1955)
9. J Gutteridge, A Smith. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. **Biochem. J.**, **256**, 861 (1988)
10. R Aft, G Mueller. Hemin-mediated DNA strand scission. **J. Biol. Chem.**, **258**, 12069 (1983)
11. R Aft, G Mueller. Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. **J. Biol. Chem.**, **259**, 301 (1984)
12. A Chou, C Fitch. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. **J. Clin. Invest.**, **68**, 672–677 (1981)
13. T Schmitt, W Frezzatti, S Schreier. Hemin-Induced Lipid Membrane Disorder and Increased Permeability: A Molecular Model for the Mechanism of Cell Lysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, **307**, 96–103 (1993).
14. A Graca-Souza, C Maya-Monteiro, G Paiva-Silva, G Braz, M Paes, M Sorgine, M Oliveira, P Oliveira. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, **36**, 322 (2006)
15. S Abdalla, G Pasvol. Malaria: A Hematological Perspective: A Hematological Perspective. In: Tropical Medicine: Science and Practice, Vol. 4, Imperial College Press, London (2004).
16. A Slater, A Cerami. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature**, **355**, 167 (1992)
17. T Egan, D Ross, P Adams. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of β -haematin (malaria pigment). **FEBS Lett.**, **352**, 54 (1994)
18. A Dorn, R Stoffel, H Matile, A Bubendorf, R Ridley. Malarial haemozoin/ β -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature**, **374**, 269 (1995)
19. K Bendrat, B. J. Berger, A. Cerami. Haem polymerization in malaria. **Nature**, **378**, 138 (1995)
20. D Sullivan, I Gluzman, D Goldberg. Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. **Science**, **271**, 219 (1996)
21. A Pandey, V Babbarwal, J Okoyeh, R Joshi, S Puri, R Singh, V Chauhan. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **308**, 736 (2003)
22. S Kaphishnikov, A Weiner, E Shimoni, P Guttmann, G Schneider, N Dahan-Pasternak, R Dzikowski, L Leiserowitz, M Elbaum. Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. In press** (2012)
23. S Pagola, P Stephens, D Bohle, A Kosar, S Madsen. The structure of malaria pigment β -haematin. **Nature**, **404**, 307 (2000).
24. (a) A Slater, W Swiggard, B Orton, W Flitter, D Goldberg, A Cerami, G Henderson. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **88**, 325 (1991).
(b) A Dorn, S Vippagunta, H Matile, A Bubendorf, J Vennerstrom, R Ridley. A Comparison and Analysis of Several Ways to Promote Haematin (Haem) Polymerisation and an Assessment of Its Initiation In Vitro. **Biochem. Pharmacol.**, **55**, 737 (1998).
25. (a) E Hempelmann, T Egan. Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*. **Trends Parasitol.**, **18**, 11 (2002).
(b) A Dorn, S Vippagunta, H Matile, A Bubendorf, J Vennerstrom, R Ridley. A Comparison and Analysis of Several Ways to Promote Haematin (Haem) Polymerisation and an Assessment of Its Initiation In Vitro. **Biochem. Pharmacol.**, **55**, 737 (1998).
26. D Bohle, A Kosar, S Madsen. Propionic acid side chain hydrogen bonding in the malaria pigment β -hematin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **294**, 132 (2002)
27. T Egan, J Chen, K de Villiers, T Mabothea, K Naidoo, K Ncokazi, S. Langford, D McNaughton, S Pandiancherri, B Wood. Haemozoin (β -haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. **FEBS Letters.**, **580**, 5105 (2006)
28. C Hunter, J Sanders. The nature of $\cdot\pi$ - π interactions. **J. Am. Chem. Soc.**, **112**, 5525 (1990)
29. S Moreau, B Perly, C Chachaty, C Deleuze. A nuclear magnetic resonance study of the interactions of antimalarial drugs with porphyrins. **Biochim. Biophys. Acta**, **840**, 107 (1985)
30. H Marques, K Voster, T Egan. The interaction of the heme-octapeptide, N-acetylmicroperoxidase-8 with anti-malarial

- drugs: Solution studies and modeling by molecular mechanics methods. **J. Inorg. Biochem.**, **64**, 7 (1996).
31. P O' Neill, D Willock, S Hawley, P Bray, R Storr, S Ward, K Park. Synthesis, Antimalarial Activity, and Molecular Modeling of Tebuquine Analogues. **J. Med. Chem.**, **40**, 437 (1997)
32. S Vippagunta, A Dorn, H Matile, A Bhattacharjee, J Karle, W Ellis, R Ridley, J Vennerstrom. Structural Specificity of Chloroquine–Hematin Binding Related to Inhibition of Hematin Polymerization and Parasite Growth. **J. Med. Chem.**, **42**, 4630 (1999).
33. T Egan, R Hunter, C Kaschula, H Marques, A Misplon, J Walden. Structure-Function Relationships in Aminoquinolines: Effect of Amino and Chloro Groups on Quinoline-Hematin Complex Formation, Inhibition of β -Hematin Formation, and Antiplasmodial Activity. **J. Med. Chem.**, **43**, 283 (2000).
34. L Weiss. Babesiosis in humans: a treatment review. **Exp. Opin. Pharmacother.**, **3**, 1109 (2002)
35. C Kaschula, T Egan, R Hunter, N Basilico, S Parapini, D Taramelli, E Pasini, D Monti. Structure–Activity Relationships in 4-Aminoquinoline Antiplasmodials. The Role of the Group at the 7-Position. **J. Med. Chem.**, **45**, 3531 (2002)
36. N Wash, H Singh, A Raichowdhary. Synthesis of metal complexes of antimalarial drugs and in vitro evaluation of their activity against plasmodium falciparum. **Inorg. Chim. Acta.** **135**, 133 (1987).
37. C Biot, W Castro, C Bottéd, M Navarro. The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action. **Dalton Trans.**, **41**, 6335-6349 (2012).
38. R Sánchez-Delgado, M Navarro, H Pérez, J Urbina. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 2. Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of New Ruthenium– and Rhodium–Chloroquine Complexes. **J. Chem. Med.**, **39**, 1095 (1996).
39. C Rajapakse, A Martínez, B Naoulou, A Jarzecki, L Suárez, C Deregnacourt, V Sinou, J Schrevel, E Musi, G Ambrosini, G Schwartz, R Sánchez-Delgado. Synthesis, Characterization, and in vitro Antimalarial and Antitumor Activity of New Ruthenium(II) Complexes of Chloroquine. **Inorg. Chem.**, **48**, 1122 (2009).
40. R Sánchez-Delgado, M Navarro, H Pérez. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 3. Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of the New Gold–Chloroquine Complex $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$. **J. Chem. Med.**, **40**, 1937 (1997).
41. C Biot, W Castro, C Bottéd, M Navarro. The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action. **Dalton Trans.** **41**, 6335 (2012)
42. C Biot, L Delhaes, L Maciejewski, M Mortuaire, D Camus, D Dive, J Brocard. Synthetic ferrocenic mefloquine and quinine analogues as potential antimalarial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, **35**, 707 (2000).
43. L Delhaes, C Biot, L Berry, L Maciejewski, D Camus, J Brocard, D Dive. Novel ferrocenic artemisinin derivatives: synthesis, in vitro antimalarial activity and affinity of binding with ferroprotoporphyrin IX. **Bioorg. Med. Chem.**, **8**, 2739 (2000).
44. A Baramée, A Coppin, M Mortuaire, L Pelinski, S Tomavo, J Brocard. Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. **Bioorg. Med. Chem.**, **14**, 1294 (2006).
45. X Wu, P Wilairat, M Go. Antimalarial activity of ferrocenyl-chalcones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **12**, 2299 (2002).
46. C Ferreira, C Ewart, C Barta, S Little, V Yardley, C Martins, E Polishchuk, P Smith, J Moss, M Merkel, M Adam, C Orvig. Synthesis, Structure, and Biological Activity of Ferrocenyl Carbohydrate Conjugates. **Inorg. Chem.**, **45**, 8414 (2006).
47. A Saleh, J Friesen, S Baumeister, U Gross, W Bohne. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *QnrA*, *QnrB*, and *QnrS* among Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, **51**, 1217 (2007).
48. R Winter, K Kelly, M Smilkstein, R Dodean, D Hinrichs, M Riscoe. Antimalarial quinolones: Synthesis, potency, and mechanistic studies. **Exp. Parasitol.**, **118**, 487 (2008).
49. F Dubar, R Wintjens, E Martins-Duarte, R Vommaro, W de Souza, D Dive, C Pierrot, B Pradines, A Wohlkonig, J Khalife, C Biot. Ester prodrugs of ciprofloxacin as DNA-gyrase inhibitors: synthesis, antiparasitic evaluation and docking studies. **Med. Chem. Commun.**, **2**, 430 (2011).
50. J Guillon, S Moreau, S Mouray, V Sinou, I Forfar, S Fabre, V Desplat, P Millet, D Parzy, C Jarry, P Grellier. New ferrocenic pyrrolo[1,2-a]quinoxaline derivatives: Synthesis, and in vitro antimalarial activity. **Bioorg. Med. Chem.**, **16**, 9133 (2008).
51. D Razafimahefa, L Pelinski, M Martin, D Ramanitr-ahasimbola, P Rasoanaivo, J Brocard. Synthesis and chloroquine-enhancing activity of Na-deacetyl-ferroce-noyl-strychnobrasiline. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **15**, 1239-1241 (2005).
52. J Matos, F da Cruz, É Cabrita, J Gut, F Nogueira, V do Rosário, R Moreira, P Rosenthal, M Prudêncio, P Gomes. Novel Potent Metallocenes against Liver Stage Malaria. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, **56**, 1564 (2011).
53. C Biot, G Glorian, L Maciejewski, J Brocard. Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene-Chloroquine Analogue. **J. Med. Chem.**, **40**, 3715 (1997).
54. F Dubar, T Egan, B Pradines, D Kuter, K Ncokazi, D Forge, P Jean-Francois, C Pierrot, H Kalamou, J Khalife, E Buisine, C Rogier, H Vezin, I Forfar, C Slomianny, X Trivelli, S Kapishnikov, L Leiserowitz, D Dive, C Biot. The Antimalarial Ferroquine: Role of the Metal and Intramolecular Hydrogen Bond in Activity and Resistance. **ACS Chem. Biol.**, **6**, 275 (2011)

55. A Martínez, C Rajapakse, B Naoulou, Y Kopkalli, L Davenport, R Sánchez-Delgado. The mechanism of antimalarial action of the ruthenium(II)-chloroquine complex $[\text{RuCl}_2(\text{CQ})]_2$. **J. Biol. Inorg. Chem.**, **13**, 703 (2008).
56. M Navarro, W Castro, A Martínez, R Sánchez-Delgado. The mechanism of antimalarial action of $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$: structural effects and increased drug lipophilicity enhance heme aggregation inhibition at lipid/water interfaces. **J. Inorg. Biochem.**, **105**, 276 (2011).
57. A Dorn, S Vippagunta, H Matile, C Jacquet, J Vennerstrom, R Ridley. An Assessment of Drug-Haematin Binding as a Mechanism for Inhibition of Haematin Polymerisation by Quinoline Antimalarials. **Biochem. Pharmacol.**, **55**, 727 (1998).
58. T Egan, E Hempelmann, W Mavuso. Characterisation of synthetic β -haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. **J. Inorg. Biochem.**, **73**, 101 (1999).
59. T Egan, R Hunter, C Kaschula, H Marques, A Mispion, J Walden. Structure-Function Relationships in Amino-quinolines: Effect of Amino and Chloro Groups on Quinoline-Haematin Complex Formation, Inhibition of β -Haematin Formation, and Antiplasmodial Activity. **J. Med. Chem.**, **43**, 283 (2000).
60. S Cohen, K Phifer, K Yielding. Complex Formation between Chloroquine and Ferrihaemic Acid in vitro, and its effect on the Antimalarial Action of Chloroquine. **Nature**, **202**, 805 (1964).
61. A Chou, R Chevli, C Fitch. Ferriprotoporphyrin IX Fulfills the Criteria for Identification as the Chloroquine Receptor of Malaria Parasites. **Biochem.**, **19**, 1543 (1980).
62. (a) J Martiney, A Cerami, A Slater. Membranes and Bioenergetics. **J. Biol. Chem.**, **270**, 22393 (1995).
- (b) D Warhurst. The quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity. **Biochem. Pharmacol.**, **30**, 3323 (1981).
- (c) S Moreau, B Perly, J Biguet. Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX: Étude par résonance magnétique nucléaire. **Biochimie**, **64**, 1015 (1982).
- (d) S Moreau, B Perly, C Chachaty, C Deleuze, A nuclear magnetic resonance study of the interactions of antimalarial drugs with porphyrins. **Biochim. Biophys. Acta**, **840**, 107-116 (1985).
63. (a) T Egan, W Mavuso, D Ross, H Marques. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, **68**, 137 (1997).
- (b) T Egan, E Hempelmann, W Mavuso. Characterisation of synthetic β -haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. **J. Inorg. Biochem.**, **73**, 101 (1999).
64. T Egan, W Mavuso, D Ross, H Marques. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, **68**, 137 (1997).
65. A Martinez, C Rajapakse, B Naoulou, Y Kopkalli, L Davenport, R Sanchez-Delgado. The mechanism of antimalarial action of the ruthenium (II)-chloroquine complex $[\text{RuCl}_2(\text{CQ})]_2$. **J. Biol. Inorg. Chem.**, **13**, 703 (2008)
66. A Martínez, C Rajapakse, D Jalloh, C Dautriche, R Sánchez-Delgado. The antimalarial activity of Ru-chloroquine complexes against resistant *Plasmodium falciparum* is related to lipophilicity, basicity, and heme aggregation inhibition ability near water/n-octanol interfaces. **J. Biol. Inorg. Chem.**, **14**, 863 (2009).
67. C Biot, D Taramelli, I Forfar-Bares, L Maciejewski, M Boyce, G Nowogrocki, J Brocard, N Basilico, P Olliaro, T Egan. Insights into the Mechanism of Action of Ferroquine Relationship between Physicochemical Properties and Antiplasmodial Activity. **Mol. Pharm.**, **2**, 185 (2005).
68. M Navarro, W Castro, A Martínez, R Sánchez-Delgado. The mechanism of antimalarial action of $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$: Structural effects and increased drug lipophilicity enhance heme aggregation inhibition at lipid/water interfaces. **J. Inorg. Biochem.**, **105**, 276 (2011)
69. T Egan. Haemozoin formation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **157**, 127 (2008).
70. T Egan. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. **J. Inorg. Biochem.**, **102**, 1288 (2008).
71. S Parapini, N Basilico, E Pasini, T Egan, P Olliaro, D Taramelli, D Monti. Standardization of the Physicochemical Parameters to Assess in Vitro the β -Haematin Inhibitory Activity of Antimalarial Drugs. **Exp. Parasitol.**, **96**, 249 (2000).
72. R Baelmans, E Deharo, V Muñoz, M Sauvain, H Ginsburg. Experimental Conditions for Testing the Inhibitory Activity of Chloroquine on the Formation of β -Haematin. **Experimen. Parasitol.**, **96**, 243 (2000).
73. J Domínguez, C León, J Rodrigues, N Gamboa de Domínguez, J Gut, P Rosenthal. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **II Farmaco**, **60**, 307 (2005).
74. F Dubar, J Khalife, J Brocard, D Dive, C Biot. Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug-Thoughts on the Mechanism of Action. **Molecules**, **13**, 2900 (2008).
75. T Egan, J. Chen, K de Villiers, T Mabothe, K Naidoo, K Ncokazi, S Langford, D McNaughton, S Pandiancherri, B Word. Haemozoin (β -haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. **FEBS Lett.**, **580**, 5105 (2006).