



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis de complejos de rutenio con ligandos derivados de la protoporfirina
IX**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ANDRÉS CAMILO RESTREPO ACEVEDO

Dr. RONAN LE LAGADEC
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, CDMX. ENERO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis de complejos de rutenio con ligantes derivados de la protoporfirina
IX**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ANDRÉS CAMILO RESTREPO ACEVEDO

Dr. RONAN LE LAGADEC
INSTITUTO DE QUÍMICA



Ciudad de México, enero del 2021

DEDICATORIA

*A mi padre **Victor Hugo Restrepo**, a mi madre **Martha Viviana Acevedo**, a mis hermanos **Sebastián**, **Santiago** y **Daniela**, a mi tío **Ariel Antonio Salazar** y a mi prima **Andrea Jhoana Salazar** porque siempre me han brindado un apoyo incondicional, por compartir conmigo los buenos y malos momentos y porque siempre están para mí cuando necesito de ellos y especialmente a mi abuela **Gloria Amparo Restrepo** por todo el amor que me brinda, a ella infinitas gracias por ser la persona más importante y por ser el motor de mi vida.*

*A **Eliana Moreno** por estar a mi lado en esta etapa de mi vida.*

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la **VOLUNTAD**.” Albert Einstein*

AGRADECIMIENTOS

*Al Instituto de Química de la Universidad Autónoma Nacional de México, a mis amigos del laboratorio de inorgánica 2 y especialmente al **doctor Ronan Le Lagadec** por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia y por su amistad, a su equipo de trabajo por sus consejos y motivación. Cada uno de ustedes se han ganado mi admiración.*

A los sinodales.

*Al **CONACyt** por haber brindado el financiamiento para este proyecto (A1-S-15068) y por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (No. CVU: 996154).*

Al proyecto PAPIIT 207419 por el apoyo y financiamiento.

Al programa de maestría y doctorado en ciencias químicas, al Instituto de Química y especialmente a los profesores que tuve durante esta formación académica.

A todo el personal que labora en el Instituto de Química.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades que más afecta a la población, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2018 se diagnosticaron 18.1 millón personas con esta enfermedad y ocupó la segunda causa principal de muertes a nivel mundial (después de las enfermedades cardiovasculares) dejando aproximadamente 9.6 millones de defunciones [1]. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer ocurrió en personas con malos hábitos de vida como: alto índice de masa corporal, baja ingesta de frutas y verduras, sedentarismo y el consumo abusivo de alcohol y tabaco [1]. Tan solo en el año 2018, los principales tipos de cáncer en el mundo que contribuyeron a la mortalidad fueron el de pulmón, estómago, hepático, colon y de mama, dejando 1.76, 0.862, 0.783, 0.782 y 0.627 millones de defunciones respectivamente [1]. En México, las muertes por cáncer ocupan el tercer lugar (después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes) siendo los tipos de cáncer más comunes y que más decesos causan: pulmón, mama, colon y próstata [2].

Entre los tratamientos para el cáncer, uno de los más usados es la quimioterapia. Los medicamentos quimioterapéuticos más empleados para destruir las células cancerosas son derivados del platino. A pesar del éxito de los medicamentos a base de platino, el uso de estos es problemático ya que causan múltiples efectos secundarios debido a que no pueden diferenciar entre células cancerosas y células sanas, incluidas las de la sangre, la boca, el sistema digestivo y los folículos capilares (baja selectividad para el tejido canceroso sobre el tejido normal) [3].

Es por ello que muchos trabajos de investigación sobre el cáncer están dirigidos a la síntesis de complejos con metales de transición distintos al platino [4,5]. Entre los metales investigados, los complejos de rutenio han atraído un creciente interés en la terapia contra el cáncer al entrar en estudios de ensayos clínicos. La eficacia del rutenio en la terapia del cáncer parece estar asociada a las siguientes tres propiedades: i) presentan una cinética de intercambio de ligantes similar a la de los complejos de platino(II) [6], ii) presentan diferentes estados de oxidación que son accesibles en sistemas biológicos, ya que el glutatión, el ascorbato y las proteínas (mitocondriales y microsómicas) de transferencia de electrones pueden reducir Ru(III) y Ru(IV), mientras que el oxígeno molecular y la citocromo oxidasa, oxidan fácilmente a Ru(II) [7] y iii) la capacidad del rutenio para imitar el hierro al unirse a ciertas moléculas biológica como la transferrina sérica y la albúmina, las cuales son acarreadores del hierro y por lo tanto, podrían disminuir su toxicidad, al reducir la concentración de rutenio en el plasma sanguíneo y aumentando la concentración que puede llegar a las células cancerígenas [7].

Por las razones detalladas anteriormente, es de gran interés estudiar las propiedades anticancerosas de los complejos porfirina-rutenio intentando tener el átomo de rutenio en el centro de la porfirina, ya que la gran mayoría de estudios de estos compuestos (porfirina-rutenio) en cáncer [8-10] presentan los fragmentos metálicos de rutenio en las periferias.

2. ANTECEDENTES

El cáncer es un término que engloba más de 100 enfermedades y todas se caracterizan por el crecimiento incontrolado de células, causado por una alteración en el ADN (ácido desoxirribonucleico), donde las células se dividen rápidamente y se acumulan formando un tumor dentro del órgano afectado [1,2]. Existen dos tipos de tumores que pueden ser: cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos). Los tumores malignos se caracterizan porque pueden extenderse a tejidos sanos que se encuentran al alrededor de este, además, algunas células cancerosas se pueden desprender del tumor original y diseminarse a diferentes partes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o el sistema linfático formando nuevos tumores (este proceso es conocido como metástasis). Por otra parte, los tumores benignos se caracterizan porque crecen lentamente y por lo general no se extienden a otras zonas del cuerpo [11,12].

El cáncer es una enfermedad que es difícil de tratar debido a que puede afectar a una gran variedad de células y órganos en el cuerpo como se mencionó anteriormente. Sin embargo, un diagnóstico temprano de cáncer es esencial para un determinado tratamiento. En la actualidad existen una gran variedad de tratamientos para combatir esta enfermedad. Dentro de los tratamientos más comunes para el cáncer se encuentran: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Las opciones más recientes incluyen la inmunoterapia, el trasplante de células madre, la terapia hormonal láser, entre otras.

La cirugía: Consiste en extirpar el tumor y parte del tejido sano que se encuentre alrededor de este [13,14].

La radioterapia. Es un tratamiento que implementa dosis de radiación (rayos X o gama) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño del tumor [13,15].

La quimioterapia. Emplea medicamentos (denominados antineoplásicos o quimioterápicos) citotóxicos para matar las células cancerosas. Estos medicamentos pueden causar efectos secundarios ya que afectan las células del cuerpo que crecen rápidamente [14,16].

La inmunoterapia. También llamada terapia biológica, o bioterapia es un tratamiento que utiliza el propio sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. La inmunoterapia puede reforzar o cambiar el funcionamiento del sistema inmunitario para que pueda encontrar y atacar las células cancerosas [17,18].

Trasplante de células madre. Es un tratamiento que se puede utilizar para ciertos tipos de cáncer (leucemia, mieloma múltiple, o algunos tipos de linfoma). En este procedimiento el paciente recibe células madre (son la materia prima del cuerpo ya que a partir de ellas se generan todas las demás células) para reemplazar sus propias células madre destruidas por radioterapia o dosis altas de quimioterapia [17,19].

La terapia hormonal. También llamada terapia endocrina, se dirige a los cánceres que usan hormonas para crecer (cáncer de mama, próstata, endometrio y suprarrenal). En esta terapia se administran hormonas sintéticas u otros medicamentos para bloquear las hormonas producidas por el cuerpo y de esta manera demorar o impedir el crecimiento del cáncer. En ocasiones, el paciente se

puede someter a cirugía para extraer un órgano que produce hormonas, como ovarios o testículos. [17, 20].

La práctica de la cirugía y la quimioterapia son los tratamientos oncológicos más usados para tratar el cáncer. La desventaja de la cirugía es que no puede tratar el cáncer que se ha diseminado o el cáncer que está en la sangre, como la leucemia [14]. El fármaco *cis*-diaminocloroplatino(II) ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), más conocido como el cisplatino, ha sido la base de la familia de fármacos que contienen platino. Los medicamentos antineoplásicos a base de platino se encuentran entre los agentes anticancerosos más importantes para el tratamiento de varios cánceres humanos como: cáncer de mama, cáncer de colon, testicular, ovario, vejiga, gástrico y pulmón [21]. Debido al alto nivel y al amplio espectro de actividad antitumoral del cisplatino, se ha continuado una extensa investigación en esta área. Hay tres medicamentos basados en platino que se usan en todo el mundo para el tratamiento del cáncer: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Además, hay cuatro medicamentos basados en platino que tienen aprobación regulatoria en países individuales: heptaplatino (Corea), lobaplatino (China), miriaplatino (Japón) y nedaplatino (Japón) (ver **Figura 1**) [22,23].

Como se mencionó anteriormente, todos los medicamentos a base de platino presentan una serie de efectos secundarios graves que han limitado su uso clínico debido a su baja selectividad para el tejido canceroso sobre el tejido normal (además de ser absorbidos por células cancerosas, también son absorbidos por otros tejidos que crecen rápidamente) [20].

Los tejidos de rápido crecimiento que pueden verse afectados por los medicamentos de platino usados en la quimioterapia incluyen las membranas mucosas de la boca, la garganta, el estómago y los intestinos, los cuales conducen a toxicidades gastrointestinales. También se incluye la médula ósea, lo que puede llevar a una reducción de la producción de glóbulos blancos y rojos. Los folículos capilares también comprenden células de rápido crecimiento, lo que significa que los medicamentos de quimioterapia pueden provocar la pérdida de cabello (alopecia), que incluye cejas, vello facial y corporal, así como folículos capilares en el oído, provocando ototoxicidad (daño en el oído). Finalmente, los medicamentos usados en la quimioterapia también muestran nefrotoxicidad (daño renal) y hepatotoxicidad (daño hepático). El daño renal surge porque la excreción de las drogas ocurre por la orina y la toxicidad hepática surge porque el cuerpo trata de metabolizar y desintoxicar las drogas en el hígado, dando la oportunidad de que el platino pueda ser absorbido por las células de ambos órganos [20].

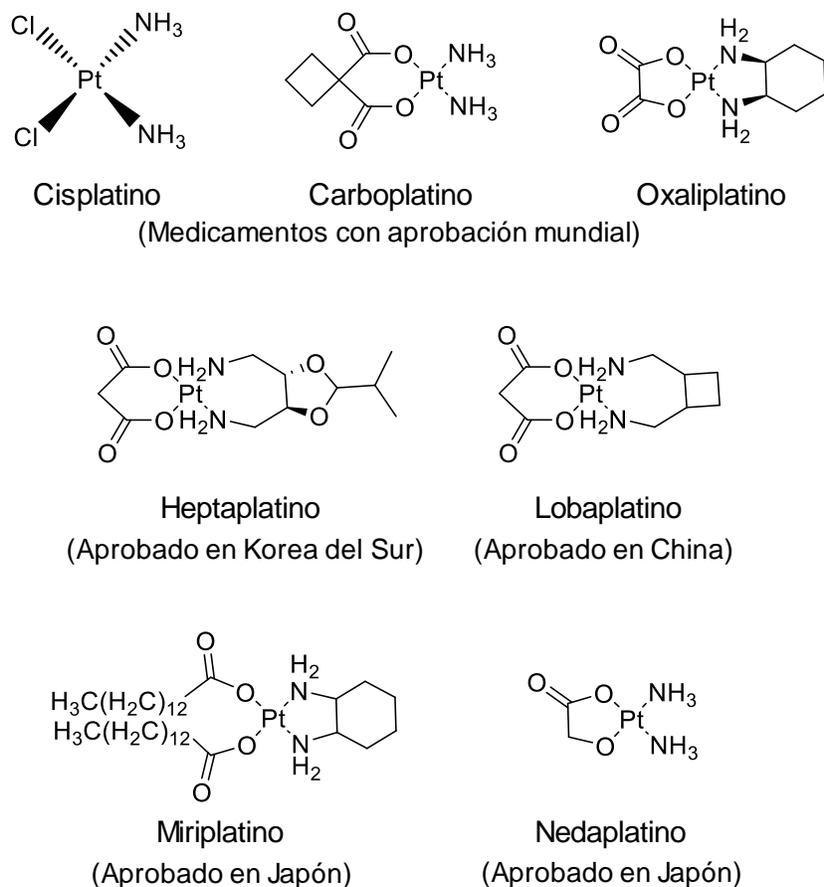


Figura 1. Estructura de fármacos de Pt(II) aprobados a nivel mundial y con aprobación regulatoria en países individuales para el tratamiento del cáncer.

Debido a los efectos secundarios que causan los fármacos a base del platino, en los últimos 20 años se han estudiado complejos de rutenio en la terapia contra el cáncer, gracias a que pueden presentar múltiples estados de oxidación (comúnmente II, III y IV) y adquirir diversas geometrías (octaédrica, medio sándwich, entre otras), permitiendo la disponibilidad de hasta 6 sitios de coordinación. Esto conduce a múltiples combinaciones de ligantes, lo que permite, que complejos de rutenio pueden exhibir diferentes mecanismos de acción y distintas dianas terapéuticas en la terapia contra el cáncer como daño al ADN, estrés del retículo endoplásmico, entre otros (**Figura 2**) [25].

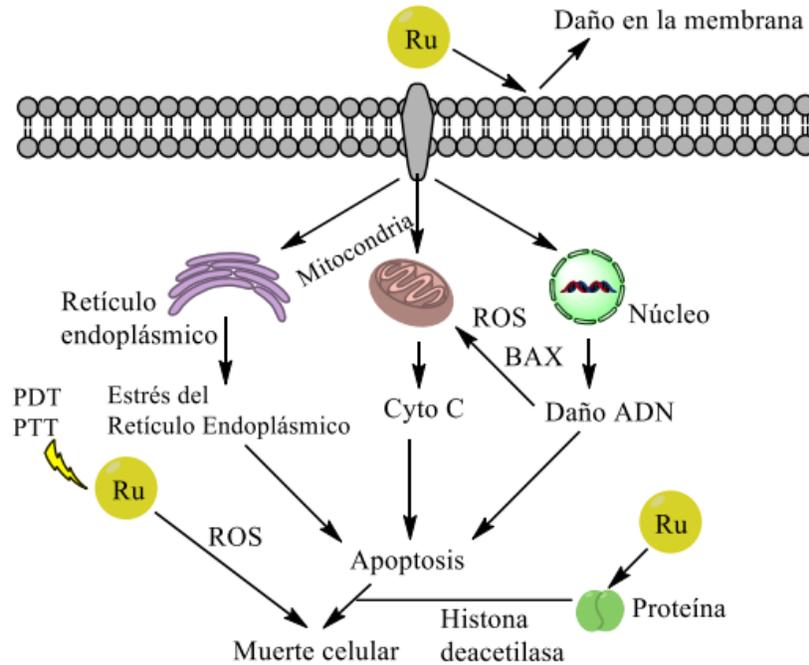


Figura 2. Mecanismos de acción y distintas dianas terapéuticas de complejos de rutenio que conducen a la muerte celular [25].

Son pocos los complejos de rutenio que han avanzado en estudios clínicos (**Figura 3**). El primero en ser aprobado en ensayos clínicos fue el NAMI-A estudiado por el grupo de Alessio. NAMI-A presentó una baja citotoxicidad, pero demostró que tenía potentes efectos inhibitorios sobre la metástasis tumoral. Tuvo éxito en los estudios clínicos de fase I, pero desafortunadamente en los estudios clínicos de fase II mostró una eficacia limitada que impidió un mayor desarrollo clínico de NAMI-A [26,27].

El grupo de Keppler sintetizó un análogo estructural del NAMI-A, el KP1019 que entró en ensayos clínicos por ser citotóxico *in vitro* contra el cáncer colorrectal. KP1019 altera el equilibrio redox en la célula, bloqueando la síntesis de ADN e induciendo la apoptosis a través de la vía mitocondrial. Sin embargo, la escasa solubilidad del KP1019 en agua limitó su desarrollo [28]. Con el fin de mejorar la solubilidad en agua del KP1019, se sintetizó el KP1339 el cual muestra una eficacia anticancerosa prometedora y actualmente se encuentra en ensayos clínicos [28].

Así mismo el TLD1443, un compuesto polipiridínico de Ru(II) sintetizado por el grupo de McFarland, entró en ensayos clínicos y actualmente se encuentra en estudios de fase II para el tratamiento del cáncer con terapia fotodinámica (PDT) [26,28].

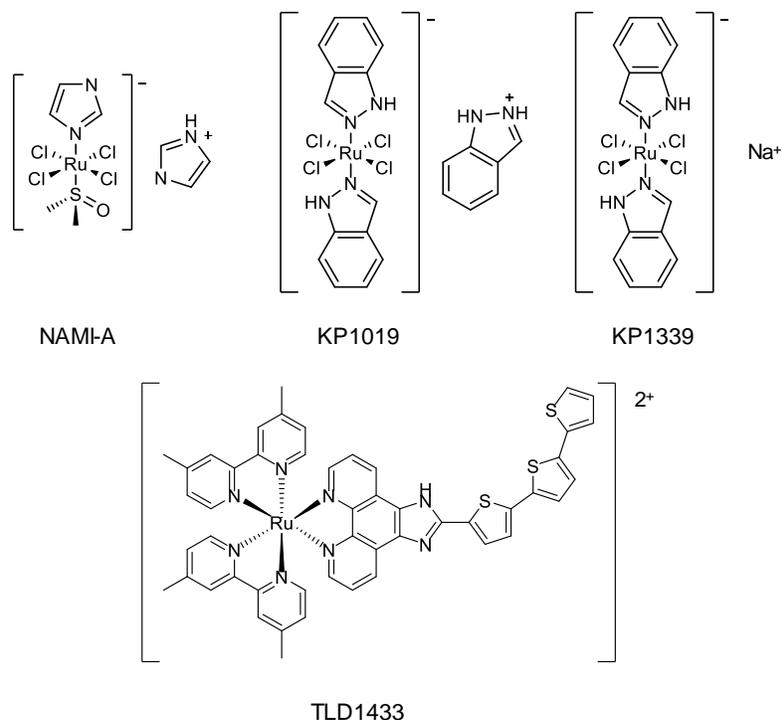


Figura 3. Complejos de rutenio estudiados en ensayos clínicos.

Otros complejos metálicos de rutenio(II) con actividades antitumorales *in vitro* e *in vivo* son los complejos de fórmula $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamanteno) (**Figura 4**), tales como: $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (RAPTA-C) y $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-tolueno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (RAPTA-T). RAPTA-C y RAPTA-T exhibieron baja toxicidad *in vivo* mostrando una acción notable sobre tumores metastásicos [29]. Recientemente, se ha demostrado que el complejo RAPTA-C reduce el crecimiento de tumores primarios en modelos preclínicos en carcinomas de ovario y colorrectal mediante un mecanismo antiangiogénico (agente químico o biológico que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) [30].

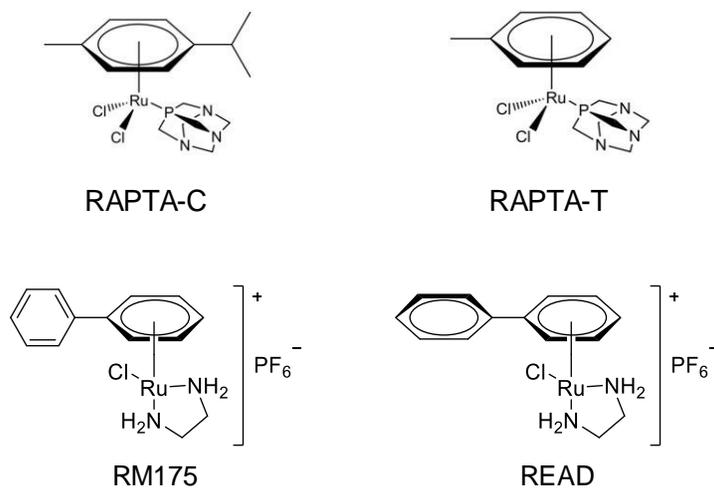


Figura 4. Complejos de rutenio-areno estudiados en terapia contra el cáncer.

RM175 y READ son complejos a base de rutenio del tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH-N,N}')^+]\text{PF}_6^-$ (**Figura 4**) que han sido estudiados en terapia contra el cáncer. RM175 indujo a la apoptosis y READ tiene la capacidad de unirse al ADN y formar aductos con guanina. Este tratamiento con rutenio mostró una potente citotoxicidad en células neoplásicas (formación de un neoplasma o tumor) *in vitro* mediante interacciones con el ADN [26].

Nuestro grupo de investigación ha investigado una serie de compuestos organometálicos ciclometalados de Ru(II) denominados RDC (**Figura 5**) [31]. Muchos de estos compuestos inducen efectos citostáticos y citotóxicos sobre células tumorales con mejor eficacia que el cisplatino. Los estudios celulares demostraron que varios compuestos RDC pueden inducir apoptosis en diversas líneas tumorales [31].

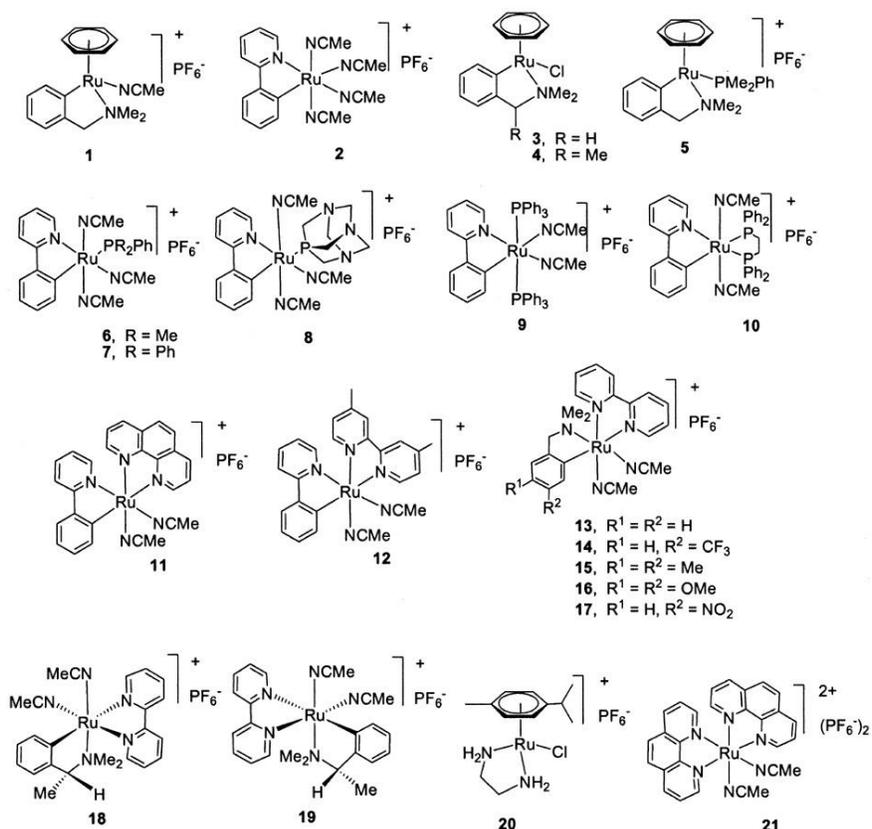


Figura 5. Ejemplos de RDCs (compuestos derivados de rutenio) [31].

Se ha demostrado que los complejos de rutenio(II) con ligandos aromáticos π -extendidos y 1,10-fenantrolina (fen) interactúan con el ADN [32] y al ser irradiados con luz visible pueden exhibir una alta citotoxicidad [33]. Recientemente nuestro grupo de investigación estudió una serie de complejos ciclometalados de rutenio del tipo $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{N}\sim\text{N})_2]^+$ (**Figura 6**), donde C~N es un ligante ciclometalado π -expansivo y N~N es la 1,10-fenantrolina o la 2,2'-bipiridina y se evaluaron en dos líneas celulares diferentes de cáncer gástrico (células KATO III y AGS). Los resultados mostraron que todos los complejos presentaron una actividad citotóxica elevada en las dos líneas celulares estudiadas, las cuales son resistentes al

cisplatino. Esta serie de compuestos mostró un aumento en su actividad citotóxica tras la irradiación con luz visible y estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) permitieron vincular tal incremento en la actividad con la fotoproducción de oxígeno singlete que puede activar una apoptosis relacionada con un mayor daño del ADN. Además, estudios de movilidad de plásmido de ADN, mostraron que estos compuestos son capaces de intercalarse con el plásmido de ADN, indicando que compuestos de la forma $[Ru(C\sim N)(N\sim N)_2]^+$ podrían causar daño al ADN [34].

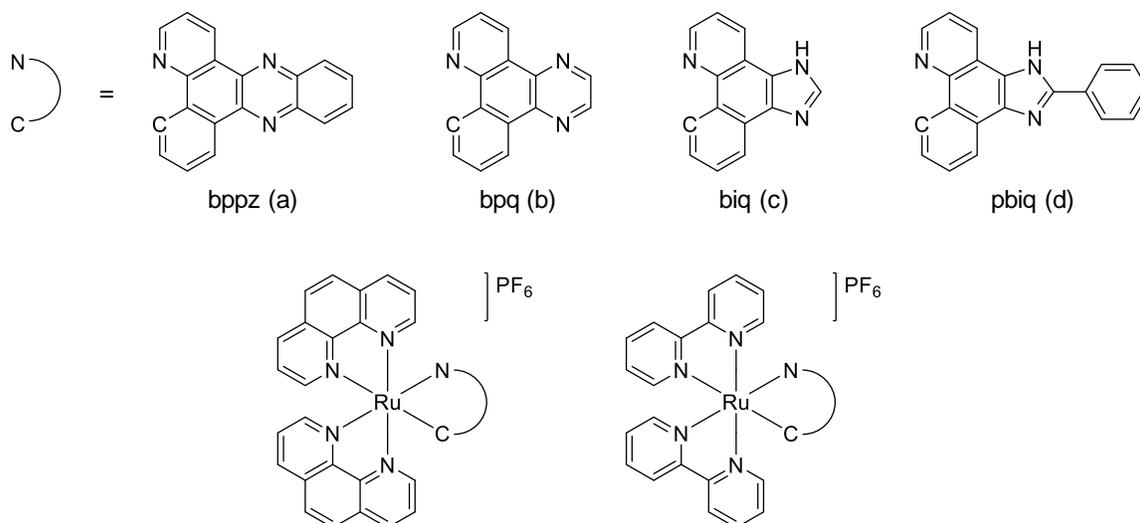


Figura 6. Complejos ciclotalados de rutenio del tipo $[Ru(C\sim N)(N\sim N)_2]^+$.

Por otro lado, el crecimiento incontrolado de células no ocurre solo por alteración al ADN, otra ruta de gran importancia para el crecimiento de los tumores es la vía de señalización Hippo, la cual participa activamente en el control del tamaño de los órganos regulando la proliferación celular y la apoptosis. Las proteínas YAP (YES-associated protein) y TAZ (Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) son los principales inhibidores de la ruta Hippo, y al activarse dan lugar a procesos importantes para estimular la regeneración de los tejidos [35,36]. Sin embargo, si la activación de YAP/TAZ se da de manera anormal y persistente, podría conducir a la acumulación de estas proteínas en el núcleo aumentando su actividad transcripcional oncogénica (formación de tumores malignos). Esta vía incluye dos quinasas (enzima que cataliza la transferencia de grupos fosfato a sustratos específicos, este proceso se conoce como fosforilación) claves: MST1/2 y LATS1/2 que se activan secuencialmente [37-40].

La activación (Hippo “Encendida”, **Figura 7**) de las quinasas MST1/2 y LATS1/2 dependen de las interacciones con las proteínas SAV1 y con el activador MOB1A/B respectivamente. El resultado fisiológico de estas quinasas es fosforilar y restringir las actividades las proteínas YAP/TAZ reteniéndose en el citoplasma al unirse a la proteína 14-3-3, o mediante la degradación proteolítica (degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas peptidasas, o por medio de degradación intracelular) [40-42].

Por el contrario, cuando la quinasa LAST1/2 está inactiva (Hippo “Apagada”, **Figura 7**), las proteínas YAP/TAZ no se fosforilan y se acumulan en el núcleo donde interactúan con el factor transcripcional TEAD1-4. El complejo formado (YAP/TAZ-TEAD1-4) regula la expresión de genes que promueven el crecimiento y la proliferación [40,41].

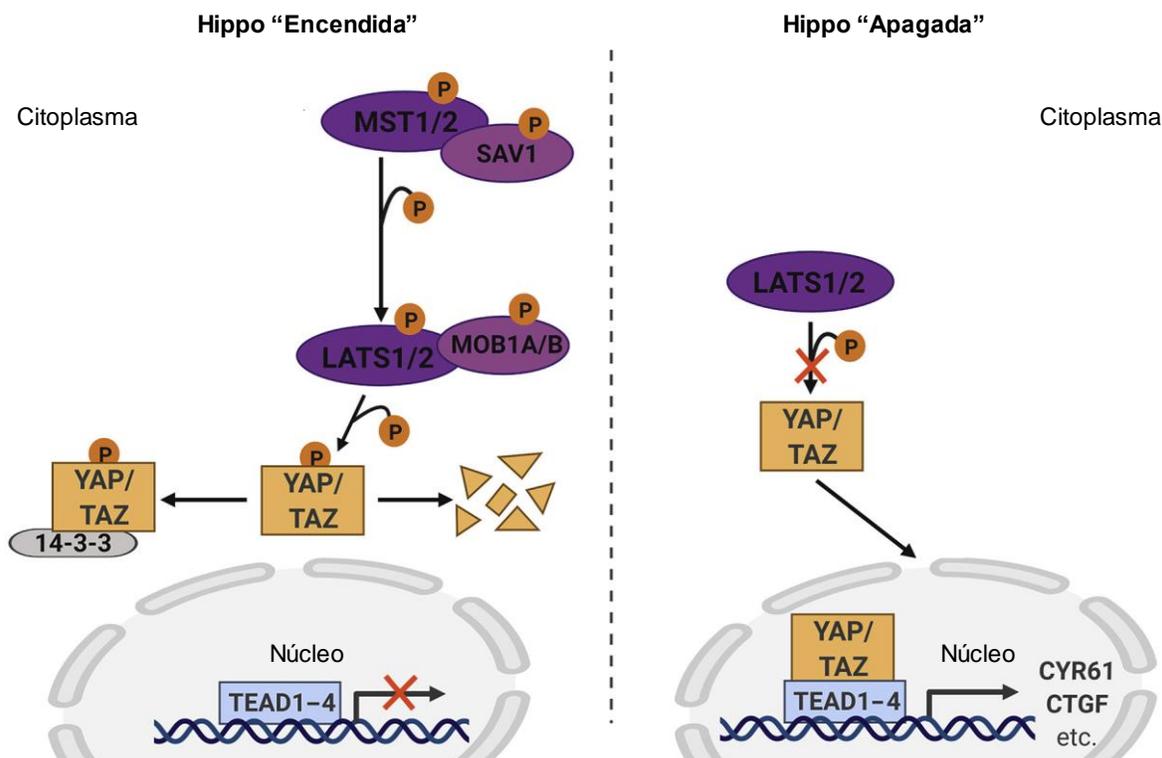


Figura 7. Vía de señalización Hippo y regulación de las proteínas YAP/TAZ [41].

La verteporfina (medicamento usado para tratar enfermedades del ojo por terapia fotodinámica, cuya estructura está basada en la benzoporfirina) es el primer compuesto supresor de la proteína YAP y que a su vez bloquea la actividad transcripcional oncogénica [41,43-47]. Sin embargo, complejos con el fragmento $[Ru^{II}(\eta^5-C_5H_5)(CO)]$ y ligandos derivados de la staurosporina (un inhibidor de varias proteínas cinasas) ha demostrado ser un inhibidor potente y específico a la proteína quinasa MST1 [48].

La quinasa 20 estéril de mamíferos (MST1), es un miembro de la familia de proteínas 20 estéril (Ste-20), es una quinasa citosólica proapoptótica que juega un papel importante en la respuesta celular al estrés oxidativo. Meggers informó sobre el desarrollo de un inhibidor de la quinasa MST1 potente y selectivo basado en un andamio de rutenio medio sándwich usando como ligante ciclopentadienilo (Cp) sustituido con el grupo amida, denominadas ciclopentadienilamidas. Los estudios mostraron que el compuesto de rutenio **9E1 (Figura 8)**, presenta un valor de IC_{50} (concentración inhibidora media máxima) de 45nM para la quinasa MST1. Además, los resultados mostraron que los complejos **9, 10, 11, 12 y 13 (Figura 8)**

también eran inhibidores de MST1 a concentraciones que se encuentran en el rango nano molar [48].

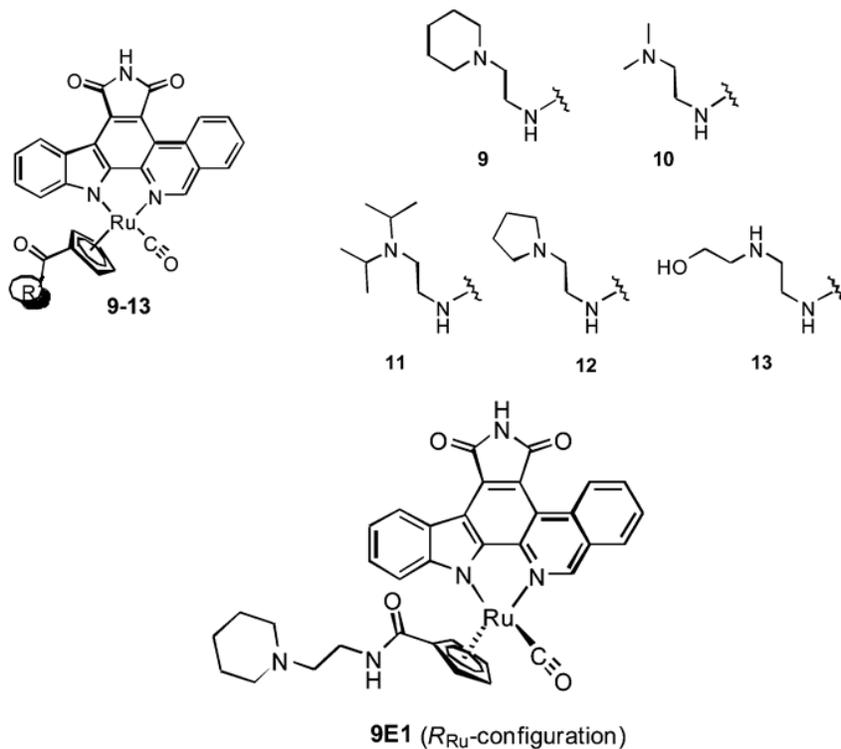


Figura 8. Complejos de rutenio estudiados como inhibidores de MST1 [44].

3. HIPÓTESIS

Los nuevos complejos de rutenio con ligantes derivados de la protoporfirina IX proporcionarán estructuras que pueden interactuar con proteínas YAP/TAZ o regular cinasas involucradas en la ruta de señalización Hippo, permitiendo arrojar información fundamental sobre el papel de dicha vía de señalización en el desarrollo de cánceres.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Coordinar al rutenio los nuevos ligantes derivados de la protoporfirina IX, caracterizar los nuevos complejos de rutenio(II) resultantes y evaluar su actividad biológica.

4.2. Objetivos específicos

Sintetizar y caracterizar el ligante protoporfirina IX dimetilester a partir de la protoporfirina IX en forma de sal disódica.

Sintetizar y caracterizar el ligante clorina análogo de la verteporfina mediante una cicloadición entre la protoporfirina IX dimetilester y acetilenodicarboxilato de dimetilo.

Evaluar los nuevos complejos de rutenio(II) resultantes como posibles inhibidores de proteínas cinasas en la vía de señalización Hippo.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos

Los reactivos sal disódica de protoporfirina IX (90%), acetilenodicarboxilato de dimetilo (99%), sulfato de sodio (99%) y ácido sulfúrico (99%) fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich y se emplearon sin ningún tratamiento previo. El tricloruro de rutenio (99%) fue comprado en Pressure Chemical.

5.2. Disolventes

Los disolventes fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich. Para llevar a cabo las reacciones, se empleó como disolvente: 1,2-dicloroetano anhidro (99.8%), acetonitrilo anhidro (99%), cloroformo grado reactivo y metanol. Solo fue necesario purificar el metanol y se realizó mediante la técnica de destilación simple usando magnesio bajo atmósfera de nitrógeno, no hubo necesidad de almacenarlo porque una vez destilado se usó de manera inmediata.

5.3. Equipos

Todas las reacciones se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno con la ayuda de líneas mixtas vacío/argón usando las técnicas de Schlenk. Para la caracterización de los compuestos obtenidos se realizaron experimentos de espectrofotometría en la región infrarroja (IR) los cuales se registraron en un equipo Bruker Alpha-p ATR. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron registrados en un espectrómetro Bruker Advance que opera a 300 MHz para ^1H y a 75 MHz para ^{13}C . Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro JEOL modelo JMS-SX102A adquirido por el método de bombardeo con átomos rápidos FAB⁺ (3-6 eV). Los espectros de ultravioleta-visible (UV-Vis) se tomaron en un espectrofotómetro UV-2600 Shimadzu.

6. RESULTADOS

Con base en los antecedentes presentados en este trabajo, el objetivo principal era obtener las benzoporfirinas clorina A y clorina B mediante una reacción de clicoadición del acetileno dicarboxilato de dimetilo con dme-PPIX [49,50], así como la obtención de nuevos complejos de rutenio con los ligantes clorina A y clorina B (ver **Figura 9**). Para la respectiva coordinación de las clorinas al rutenio se tenía planeado adicionar la porfirina a un matraz de Schlenk con acetonitrilo y CaCO_3 , en esta etapa se iba a realizar un seguimiento de la reacción por RMN ^1H para determinar en qué momento estaba desprotonada la porfirina. Una vez desprotonada la porfirina el paso a seguir era la adición del precursor $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$ (el cual fue preparado siguiendo la metodología reportada en la literatura [51]) en cantidades equimolares. El sólido obtenido se pensaba purificar en una columna empacada con silica gel-60 y usando 1,2-dicloroetano como eluyente. Una vez obtenidos y caracterizados estos nuevos complejos de porfirina-rutenio se iban a evaluar como posibles inhibidores de las proteínas cinasas y YAP/TAZ presentes en la ruta de señalización Hippo. Además, sabiendo que las propiedades fotoquímicas de las porfirinas son bien estudiadas, se pensaba que al tenerlas coordinadas a rutenio se podrían estudiar como posibles fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica contra el cáncer o como posibles agentes teragnósticos para el tratamiento del cáncer.

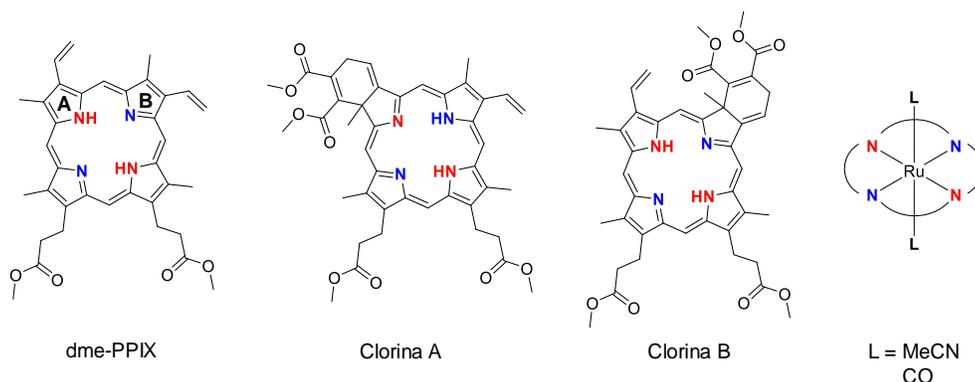


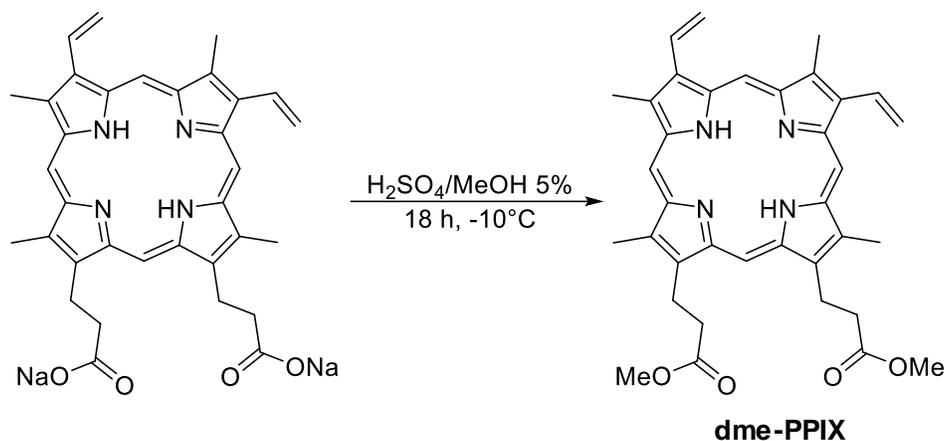
Figura 9. Estructura de los ligantes derivados de la protoporfirina IX y complejos de rutenio propuestos.

6.1. Síntesis y caracterización

6.2. Síntesis del ligante protoporfirina IX dimetilester (dme-PPIX) [52,53]

Se adicionaron 120 mg (0.203 mmol) de la sal disódica de protoporfirina IX a un matraz de Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno y 10 mL de una disolución de H₂SO₄/MeOH al 5%. La mezcla se colocó en agitación durante 18 horas a -10 °C y en la oscuridad.

Pasado este tiempo, se neutralizó la reacción con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 10%, se realizó una extracción con CHCl₃ (30 mL) y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó el disolvente y el sólido se purificó en una columna empacada con silica gel-60, usando una mezcla de 1,2-dicloroetano-éter etílico (10:1) como eluyente y se obtuvo una fracción color violeta. Finalmente, se evaporó el disolvente al vacío hasta sequedad y se obtuvieron 81 mg (0.137 mmol) de un sólido color violeta cuyo rendimiento fue del 70% (ver **Esquema 1**).



Esquema 1. Síntesis del ligante dme-PPIX

Los datos de IR, EM, RMN ¹H y ¹³C, y Uv-Vis correlacionaron apropiadamente con los reportados en la literatura [52,53] y se muestran a continuación.

En la **Figura 10** se muestra el espectro IR del compuesto dme-PPIX. En él se observa una banda fina y de poca intensidad correspondiente a la frecuencia de vibración del enlace N–H a 3311 cm⁻¹, a 3091 cm⁻¹ se observa la banda de vibración asimétrica de los =CH₂, a 2949 y 2850 cm⁻¹ se observan los estiramientos asimétricos y simétricos a los C–H alifáticos, además, se observa una banda fina e intensa a 1734 cm⁻¹ la cual es de gran importancia ya que es típica del grupo C=O tipo éster, finalmente a 1163 cm⁻¹ se observa la frecuencia de vibración correspondiente al estiramiento C–O.

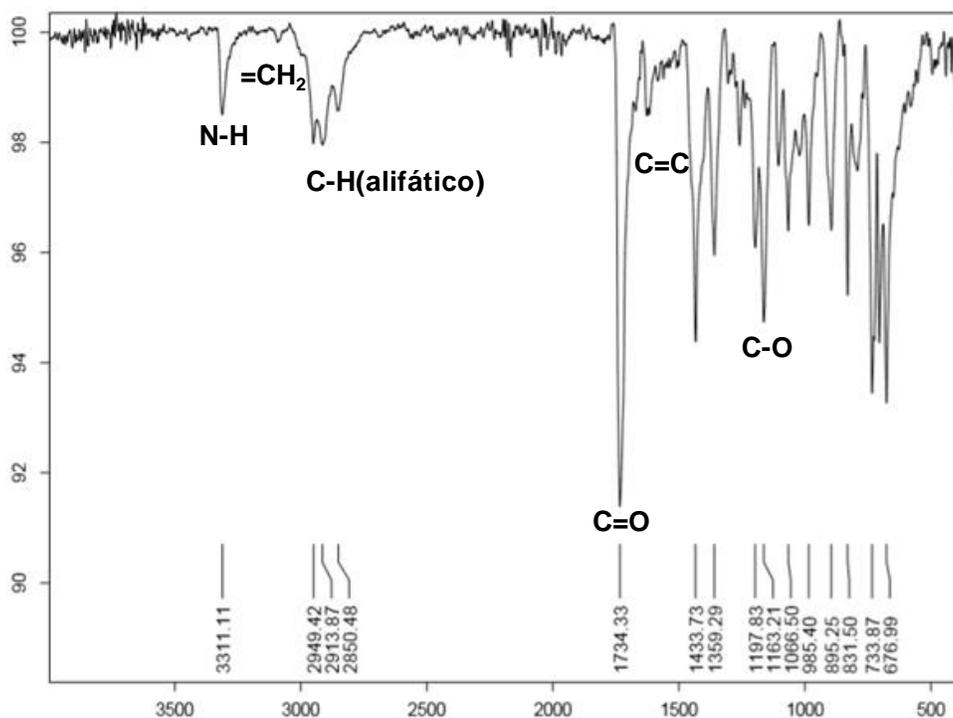


Figura 10. Espectro FT-IR obtenido por ATR del ligante dme-PPIX

En la **Figura 11** se muestra el espectro de masas adquirido por el método de bombardeo con átomos rápidos del compuesto dme-PPIX. En donde se observa m/z de 591 correspondiente el aducto del ion molecular $[M+H]^+$ siendo este consistente con el peso molecular esperado para dicho compuesto.

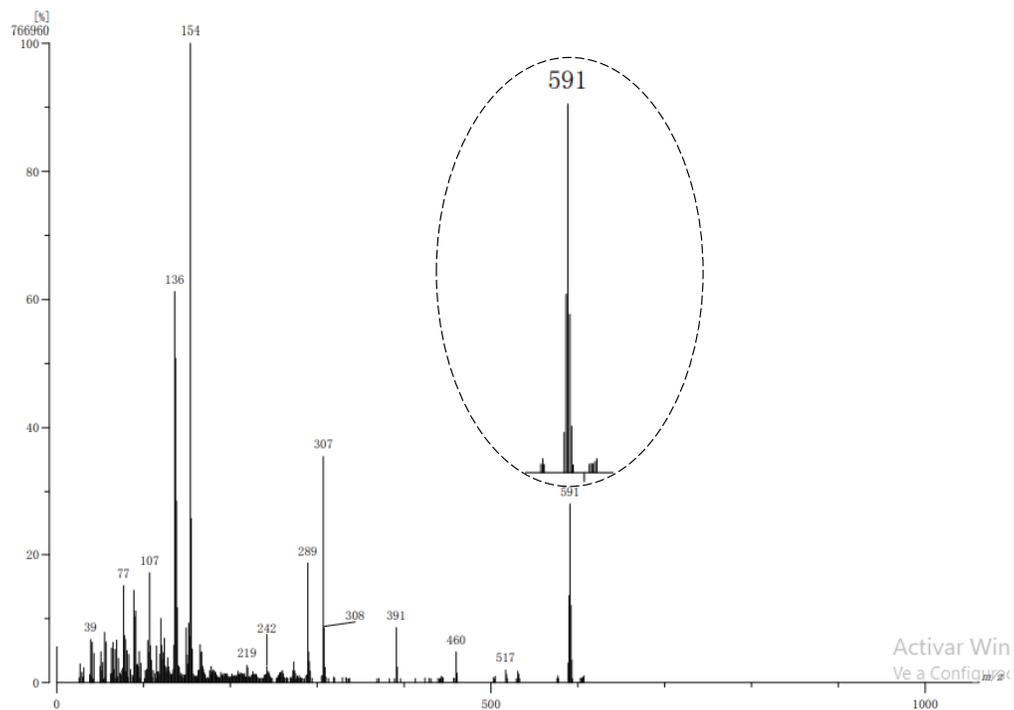


Figura 11. Espectro FAB⁺ del compuesto dme-PPIX.

En el espectro de RMN ^1H tomado en CDCl_3 mostrado en la **Figura 12**, se observan 8 señales que integran para un total de 38 protones. Se destaca el singulete que aparece en 3.67 ppm que integra para 6 protones y es asignado al metilo base de oxígeno proveniente del éster, lo cual indica que la esterificación se ha llevado a cabo. El resto de protones fueron asignados de la siguiente manera: (δ en ppm): -4.15 (s, 2H, N-H); 3.24 (t, 4H, $J = 7.691$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$); 3.52, 3.53, 3.56, 3.57 (12H, pertenecientes a los CH_3 1, 5, 9, 14); 4.32 (t, 4H, $J = 7.598$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$); 6.14 (dd, 2H, $J_{AB} = 1.021$ Hz, $J_{AX} = 11.373$ Hz, H_A); 6.30 (dd, 2H, $J_{BA} = 1.083$ Hz, $J_{BX} = 17.723$ Hz, H_B); 8.15 (dd, 2H, $J_{XA} = 11.849$ Hz, $J_{XB} = 17.401$ Hz, H_X); 9.81, 9.84, 9.93, 9.96 (4H, H-metinos $\alpha, \beta, \gamma, \delta$).

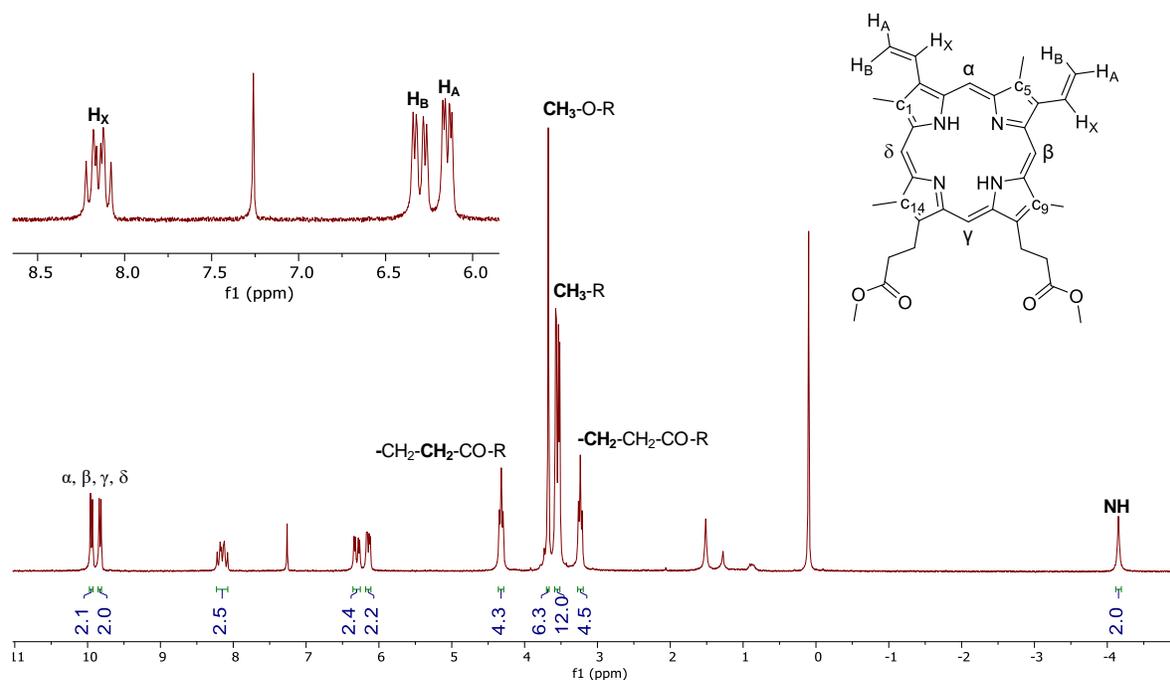


Figura 12. Espectro RMN ^1H en CDCl_3 del ligante dme-PPIX

La **Figura 13** muestra el espectro RMN ^{13}C del compuesto dme-PPIX tomado en CDCl_3 . Las señales fueron asignadas de la siguiente manera (δ en ppm): 11.73, 12.76 (C: 1, 5, 9, 14); 21.92 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$); 37.04 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$); 51.76 ($-\text{COOCH}_3$); 96.03, 97.01, 97.34, 97.92 (C: $\alpha, \beta, \gamma, \delta$); 120.27 ($\text{CH}_2=\text{CH}-$); 130.38 ($\text{CH}_2=\text{CH}-$); 173.71 (C=O).

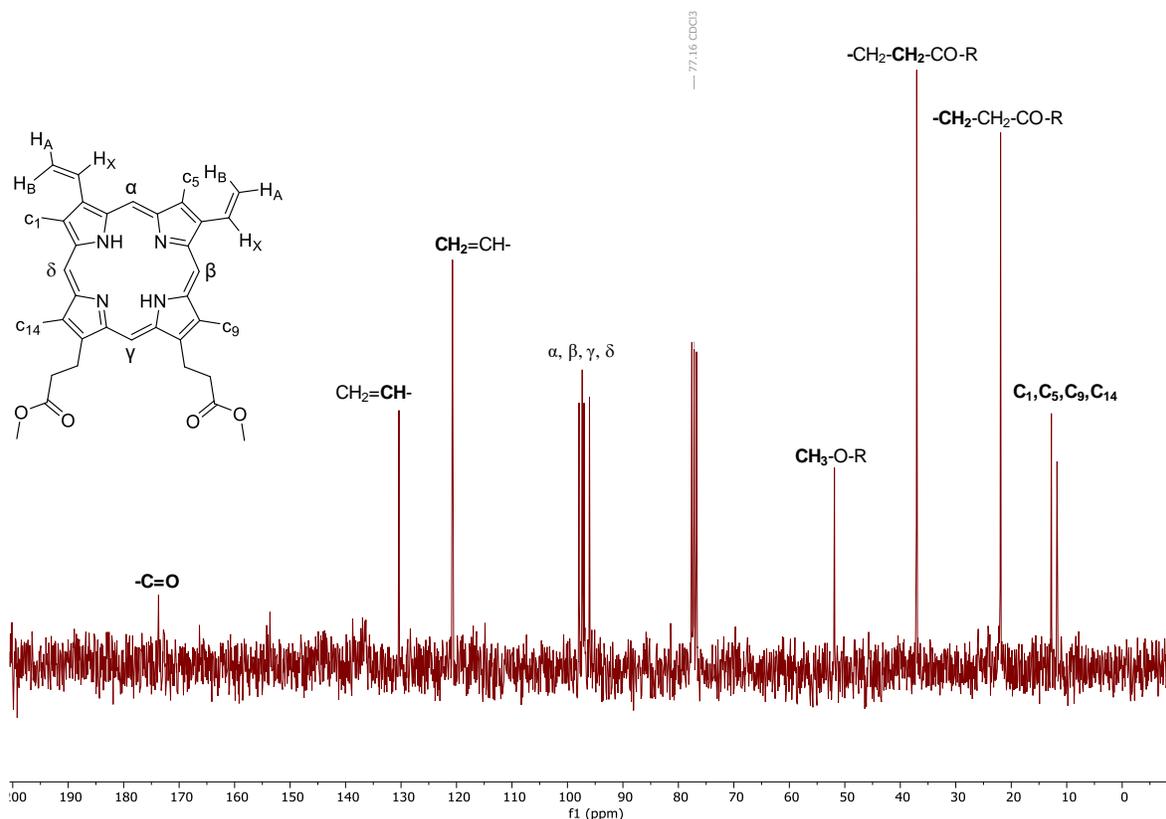


Figura 13. Espectro RMN ^{13}C en CDCl_3 del ligante dme-PPIX

Finalmente, en la **Figura 14** se muestra el espectro de absorción Uv-Vis del ligante dme-PPIX tomado en cloroformo. La disolución de dme-PPIX mostró una amplia banda de absorción a 411 nm y cuatro bandas relativamente más débiles a 510, 546, 579 y 632 nm, las cuales coinciden con los espectros electrónicos reportados en la literatura [53,54].

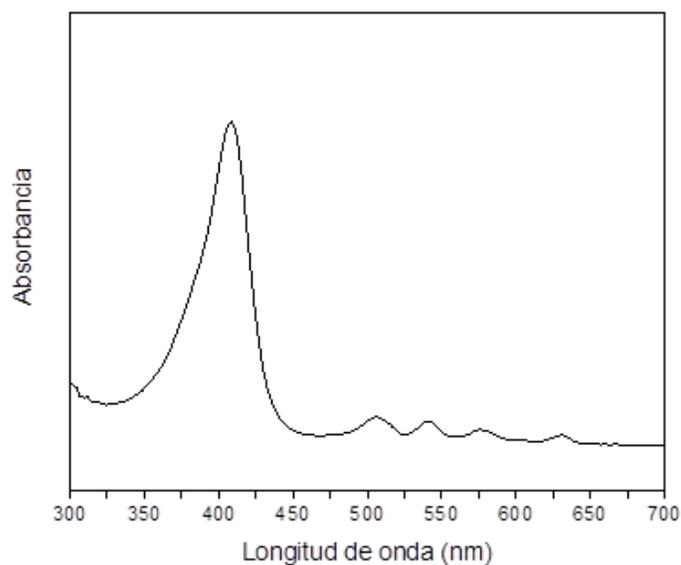
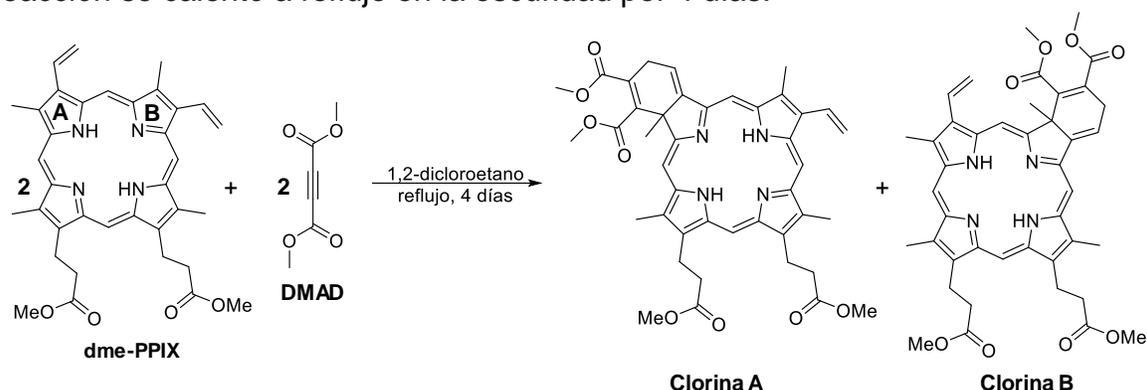


Figura 14. Espectro de absorción del ligante dme-PPIX (CHCl_3 , 1.5×10^{-6} M a 27°C)

6.3. SÍNTESIS DEL LIGANTE CLORINA [49,50]

A una disolución de 50 mg (0.085 mmol) de dme-PPIX en 25 mL de 1,2-dicloroetano, en un matraz de Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron 5 mL (50.95 mmol) de acetilenoedicarboxilato de dimetilo (DMAD). La mezcla de reacción se calentó a reflujo en la oscuridad por 4 días.



Esquema 2. Síntesis de clorinas A y B

Nota: Las unidades pirrólicas de las porfirinas se nombran con letras de la A-D. Como la reacción de cicloadición se da en los anillos A y B los productos son nombrados como clorina A y clorina B.

La reacción fue monitoreada por espectrofotometría UV-Vis (una gota de la mezcla de reacción en 5 mL de cloroformo a una temperatura de $\sim 28^\circ\text{C}$). Al cabo del cuarto día se observó una nueva banda de absorción en el espectro Uv-Vis en aproximadamente 665 nm (**Figura 15**) la cual es característica de las clorinas A/B [49]. Además, se observa una amplia banda de absorción con un fuerte pico de a 406 nm y cuatro bandas relativamente más débiles a 502, 537, 608 y 665 nm.

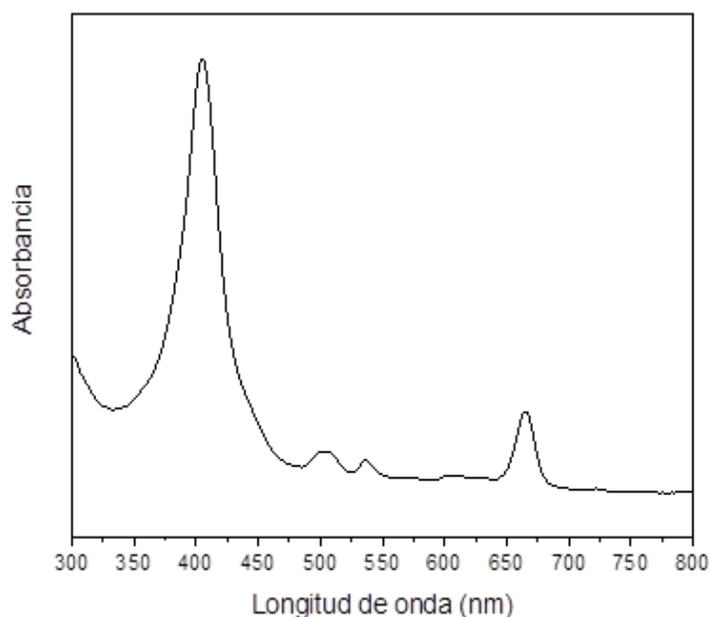


Figura 15. Espectro de absorción de la mezcla de reacción entre dme-PPIX y DMAD a 4 días de reacción (CHCl_3 a 28°C)

Desafortunadamente no se lograron realizar los experimentos (cromatografía en columna y en capa) correspondientes para la separación de las clorinas A y B debido al cierre del laboratorio por causa de la pandemia, y por lo tanto no se pudo seguir con la caracterización de estos compuestos. Una vez obtenidas, separadas y caracterizadas las clorinas A y B el paso a seguir era realizar la coordinación a rutenio con el objetivo de intentar tener dicho metal en el centro de las clorinas para formar los nuevos complejos de rutenio (II).

7. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar y caracterizar el compuesto dme-PPIX, el cual se hizo reaccionar con DMAD para obtener las clorinas A y B derivadas de la verteporfina. El espectro de absorción de la mezcla de reacción nos dio indicio a que la formación de las clorinas A y B se estaba llevando a cabo. Desafortunadamente no se tuvo la oportunidad de separarlas y caracterizarlas. La técnica espectroscopia RMN en 2D NOESY es decisiva para definir la regioquímica de la reacción y determinar si la cicloadición se da en el anillo A o B de la dme-PPIX (ver **Esquema 2**). Posteriormente se pretendía hacer reaccionar cada clorina con rutenio y formar los nuevos complejos, una vez caracterizados se pretendía estudiarlos en la vía de señalización Hippo como posibles inhibidores de la proteína YAP/TAZ. Lamentablemente no se pudieron realizar estos experimentos a causa de los problemas mencionados anteriormente y por ende no se pudo seguir con el desarrollo de este proyecto.

8. REFERENCIAS

- [1] World Health Organization, Cancer, (2019). Recuperado de: <https://www-who-int.pbidi.unam.mx:2443/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2] Cancer Research UK, How cancer starts, (2017). Recuperado de: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts>
- [3] Sociedad Americana de Cáncer, (2020). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia.html>
- [4] U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman, Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective, Drug Des. Devel. Ther., 11 (2017) 599-616.
- [5] P. Pedrosa, A. Carvalho, P. V. Baptista, A. R. Fernandes, Inorganic Coordination Chemistry: Where We Stand in Cancer Treatment?, 1ra ed., (2018) 37-65.
- [6] I. Zuba, M. Zuba, M. Piotrowski, A. Pawlukojć, Ruthenium as an important element in nuclear energy and cancer treatment, Appl. Radiat. Isotopes 162 (2020) 0969-8043.
- [7] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects, Platin. Met. Rev., 45 (2001) 62-69.
- [8] F. Schmitt, NPE Barry, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, Efficient photodynamic therapy of cancer using chemotherapeutic porphyrin–ruthenium metallacubes Bioorg. Medicina. Chem. Letón., 22 (2012) 178-180.

- [9] Y. Liu, T. Chena, YS. Wong, WJ. Meia, XM. Huang, F. Yang, J. Liu, WJ. Zhenga, DNA binding and photocleavage properties and apoptosis-inducing activities of a ruthenium porphyrin complex [(Py-3')TPP-Ru(phen)₂Cl]Cl and its heterometallic derivatives, *Chem. Biol. Interact.*, 183 (2010) 349-356.
- [10] M.I.F. Barbosa, G.G. Parra, R.S. Correa, R.N. Sampaio, L.N. Magno, R.C. Silva, A.C. Doriguetto, J. Ellena, N.M. Barbosa Neto, A.A. Batista, P.J. Gonçalvesef, Reactive nitrogen/oxygen species production by nitro/nitrosyl supramolecular ruthenium porphyrin complexes, *J. Photochem. Photobiol. A*, 338 (2017) 152-160.
- [11] H. Zubair, A. Ahmad, Chapter 1 - Cancer Metastasis: An Introduction, (2017) 3-12.
- [12] A. C. Obenauf, J. Massagué, Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis, *Trends Cancer*, 1 (2015) 76-91.
- [13] Tipos de tratamiento del cáncer, (2015). Recuperado de: <https://www.webmd.com/cancer/immunotherapy-approach-19/basics/slideshow-cancer-treatments>
- [14] Instituto Nacional del Cáncer, (2015). Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia>
- [15] Instituto Nacional del Cáncer, (2019). Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia#2>
- [16] Sociedad Americana de Cáncer, (2020). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia.html>
- [17] Tipos de tratamiento del cáncer, (2020). Disponible en: <https://www.webmd.com/cancer/immunotherapy-approach-19/basics/slideshow-cancer-treatments>
- [18] Sociedad Americana de Cáncer, (2020). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/inmunoterapia.html>
- [19] Células madre: qué son y qué hacen, (2020). Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/bone-marrow-transplant/in-depth/stem-cells/art-20048117>
- [20] Instituto Nacional del Cáncer, (2019). Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/terapia-hormonal>
- [21] S. Dehghanpoura, H. R. Pourzamani, M. M. Amin, K. Ebrahimpour, Evaluation of toxic effects of platinum-based antineoplastic drugs (cisplatin, carboplatin and oxaliplatin) on green alga *Chlorella vulgaris*, *Aquat. Toxicol.* 223 (2020) 105495.
- [22] S. D. Brown, P. Nativo, J. A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham, N. J. Wheate, Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4678-4684.
- [23] D. Lebwohl, R. Canetta, Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update, *Eur. J. Cancer*, 34 (1998) 1522-1534.
- [24] R. Oun, Y. E. Moussa, N. J. Wheate, The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists, *Dalton Trans.*, 47 (2018) 6645.

- [25] A. H. Lorenzo, Evolución y desarrollo de los complejos de rutenio como agentes antitumorales, (2019). Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/92441/HERRERO%20LORENZO%2C%20ALEJANDRO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [26] S. Thota, D. A. Rodrigues, D. C. Crans, E. J. Barreiro, Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics?, *J. Med. Chem.*, 61 (2018) 5805-5821.
- [27] E. Alessio, Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2017) 1549-1560.
- [28] J. Liu, H. Lai, Z. Xiong, B. Chen, T. Chen, Functionalization and Cancer-targeting Design of Ruthenium Complexes for precise cancer therapy, *Chem. Commun.*, 55 (2019) 9904-9914.
- [29] C. Gaiddon, M. Pfeffer, The Fate of Cycloruthenated Compounds: From C–H Activation to Innovative Anticancer Therapy, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 12 (2017) 1639-1654.
- [30] A. Weiss, R. H. Berndsen, M. Dubois, C. Muller, R. Schibli, A. Griffioen, P. J. Dyson, P. Nowak-Sliwinska, In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(PTA)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas, *Chem. Sci.*, 5 (2014) 4742-4748.
- [31] L. Leyva, C. Sirlin, L. Rubio, C. Franco, R. Le Lagadec, J. Spencer, P. Bischoff, C. Gaiddon, J.P. Loeffler, M. Pfeffer, Synthesis of Cycloruthenated Compounds as Potential Anticancer Agents, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 19 (2007) 3055-3066.
- [32] L. Wang, H. Yin, M.A. Javed, M. Hetu, C. Wang, S. Monro, X. Zhu, S. Kilina, S.A. McFarland, W. Sun, π -Expansive heteroleptic ruthenium(II) complexes as reverse saturable absorbers and photosensitizers for photodynamic therapy, *Inorg. Chem.*, 56 (2017) 3245-3259.
- [33] E. Wachter, D.K. Heidary, B.S. Howerton, S. Parkin, E.C. Glazer, Light-activated ruthenium complexes photobind DNA and are cytotoxic in the photodynamic therapy window, *Chem. Commun.*, 48 (2012) 9649-9651.
- [34] J. A. Solís-Ruiz, A. Barthe, G. Riegel, R. O. Saavedra-Díaz, C. Gaiddon, R. Le Lagadec, Light activation of cyclometalated ruthenium complexes drives towards caspase 3 dependent apoptosis in gastric cancer cells, *J. Inorg. Biochem.*, 208 (2020) 111080.
- [35] R.W. Justice, O. Zilian, D.F Woods, M. Noll, P.J Bryant, The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation, *Genes Dev.*, 9 (1995) 534-546.
- [36] T. Xu, W. Wang, S. Zhang, R.A. Stewart, W. Yu, Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase, *Development.*, 121 (1995) 1053-1063.
- [37] Z. Meng, T. Moroishi, K. L. Guan, Mechanisms of Hippo pathway regulation, *Gene Dev.* 30 (2016) 1-7.
- [38] V. Rausch, C. G. Hansen, The Hippo Pathway, YAP/TAZ, and the Plasma Membrane, *Trends Cell Biol.* 30 (2020) 32-48.

- [39] F. Zanconato, M. Cordenonsi, S. Piccolo, YAP/TAZ at the Roots of Cancer, *Cancer Cell*, 29 (2016) 783-803.
- [40] G. T. K. Boopathy, W. Hong, Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis, *Front. Cell Dev. Biol.*, 7 (2019) 1-12.
- [41] R. Valentina, C. G. Hansen, The Hippo Pathway, YAP/TAZ, and the Plasma Membrane, *Trends Cell. Biol.*, 30 (2020) 32-48.
- [42] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 3-25.
- [43] C. Zhaoa, C. Zenga, S. Yeb, X. Daic, Q. Hea, B. Yanga, H. Zhu, Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif (TAZ): a nexus between hypoxia and cancer, *Acta. Pharm. Sin. B.* (2019) 1-14.
- [44] C. Wang, X. Zhu, W. Feng, Y. Yu, K. Jeong, W. Guo, Y. Lu, G. B. Mills, Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm, *Am. J. Cancer. Res.* 6 (2015) 27-37.
- [45] W. S. Chen, Z. Cao, C. Krishnan, N. Panjwani, Verteporfin without light stimulation inhibits YAP activation in trabecular meshwork cells: Implications for glaucoma treatment, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 466 (2015) 221-225.
- [46] J. Feng, J. Gou, J. Jia, T. Yi, T. Cui, Z. Li, Verteporfin, a suppressor of YAP-TEAD complex, presents promising antitumor properties on ovarian cancer, *Oncotargets. Ther.* 9 (2016) 5371-5381.
- [47] X. Ma, P. Li, P. Chen, J. Li, H. Huang, C. Wang, W. Li, J. Ding, Y. Zhao, F.Xing Yu, X. Qi, L. Zhang, Staurosporine targets the Hippo pathway to inhibit cell growth, *J. Mol. Cell Biol.*, 10 (2018) 267-269.
- [48] R. Anand, J. Maksimoska, N. Pagano, E. Y. Wong, P. A. Gimotty, S. L. Diamond, E. Meggers, R. Marmorstein, Toward the development of a potent and selective organoruthenium mammalian sterile 20 kinase inhibitor, *J. Med. Chem.* 52 (2008) 1602-1611.
- [49] S. Pangka, A. R. Morgan, D. Dolphin. Diels-Alder Reactions of Protoporphyrin IX Dimethyl Ester With Electron-Deficient Alkynes. *J. Org. Chem.*, 51 (1986) 1094-110.
- [50] F. A.B. dos Santos, A. F. Uchoa, M. S. Baptista, Y. Iamamoto, O. A. Serra, T. J. Brocksom, K. T. de Oliveira, Synthesis of functionalized chlorins sterically-prevented from self-aggregation, *Dyes Pigm.*, 99 (2013) 402-411.
- [51] R. A. Zelonka, M. C. Baird, Benzene Complexes of Ruthenium(II), *Can. J. Chem.*, 50 (1972) 3063-3072.
- [52] J. H. Fuhrhop, K. M. Smith in *Porphyryns and Metalloporphyryns* (Ed.: K. M. Smith), Elsevier, New York, (1975) 835-836.
- [53] K. Miyata, S. Yasuda, T. Masuya, S. Ito, Y. Kinoshita, H. Tamiaki, T. Oba. Facile iodination of the vinyl groups in protoporphyrin IX dimethyl ester and subsequent transformation of the iodinated moieties. *Tetrahedron*, 74 (2018) 3707-3711.
- [54] T. Wang, H. Ke, S. Chen, J. Wang, W. Yang, X. Cao, J. Liu, Q. Wei, R. A. Ghiladi, Q. Wang, Porous protoporphyrin IX-embedded cellulose diacetate electrospun microfibers in antimicrobial photodynamic inactivation, *Mater. Sci. Eng. C*, 118 (2021) 111502.