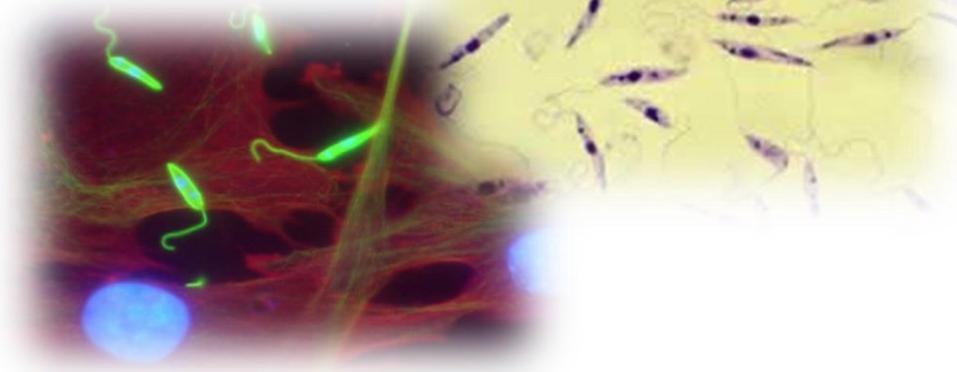




**“Estudios preclínicos de
potenciales agentes contra
Leishmaniasis: estudios
toxicológicos *in vitro* e *in vivo*”.**



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Lic. Cintya Perdomo

Universidad de la República

**“Estudios preclínicos de potenciales agentes
contra *Leishmaniasis*: estudios toxicológicos *in
vitro e in vivo*”.**

Tesis de Maestría en Biología

Lic. en Biología Cintya Daniela Perdomo Machado

**CENUR Litoral Norte - Sede Paysandú - Universidad de
la República**

PEDECIBA

**Directores de Tesis: Dr. Guzmán Álvarez Touron, Dra.
Ileana Corvo Mautone**

**Universidad de la República
Uruguay
Junio, 2019**

Dedicado a mis hermosos hijos de 4 patas, Matilda y Gastón

Agradecimientos

A mis tutores Guzmán e Ileana

A mis padres Daniel y Elsie

A Sofía...

A mi prima Alice, mi hermano Joaquín y su esposa Laura

A mis amigos, especialmente a Juanma

A mi ex tutor, mentor y amigo Fernando Pérez-Miles

A mis compañeros de trabajo

A todas las personas que colaboraron conmigo de una u otra manera para hacer posible este trabajo: Nallely Cabrera y Dr. Ruy Montfort de México; Gloria Yaluff, Elva Serna, Isabel Vera de Vilbao (IICS) de Paraguay; Celeste Vega, Cathia Coronel, Antonieta Rojas de Arias, Miriam Rolón (CEDIC); Paula Faral (IPMont).

A las siguientes Instituciones:

UdelaR, ANII, CSIC, IPMont, PEDECIBA.

Instituto de Fisiología Celular- UNAM-México.

Instituto de Ciencias de la Salud- UNA- Paraguay.

CEDIC. Centro para el desarrollo de la investigación científica. Paraguay.

Contenido

Pág.

Resumen	6
Abreviaturas	7
Introducción	
1. Leishmaniasis: una enfermedad desatendida	9
1.1. El vector	12
1.2. El reservorio	14
1.3. El parásito	15
1.4. Diagnóstico de Leishmaniasis	19
1.5. Control de la Leishmaniasis	20
2. Etapas de desarrollo de un fármaco	23
2.1. Identificación de la diana terapéutica	23
2.1.1. Blancos moleculares de tripanosomatídeos	23
2.2. Validación de la diana	25
2.3. Identificación de compuestos líderes	26
2.4. Fase de desarrollo pre-clínica	26
2.5. Fase de desarrollo clínico	27
3. Antecedentes: selección de moléculas a ser evaluada	28
Objetivos generales y específicos	32
Materiales y métodos	33
1. Expresión, purificación y evaluación de la actividad enzimática de la TIM de <i>L. mexicana</i>	33
1.1 Expresión recombinante de la TIM de <i>L. mexicana</i> en <i>E. coli</i>	33
1.2 Purificación de la TIM mediante cromatografía de afinidad	34
1.3 Análisis de la purificación mediante SDS-PAGE	35
1.4 Medición de actividad enzimática de la TIM	35
2- Actividad <i>in vitro</i> sobre <i>Leishmania spp.</i>	36

3- Ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad	38
3.1 Ensayo de citotoxicidad en fibroblastos	38
3.2 Ensayo de citotoxicidad en macrófagos	38
3.3 Ensayo de Genotoxicidad (Test de Micronúcleos).	39
4. Toxicidad aguda <i>in vivo</i>	40
5. Predicción de parámetros farmacocinéticas teóricos	41
6. Estudios <i>in vivo</i> en modelo agudo cutáneo murino	41
Resultados y discusión	43
1. Producción de TIM recombinante	43
2. Evaluación de la inhibición de la TIM de <i>L. mexicana</i>	44
3. Actividad <i>in vitro</i> sobre <i>Leishmania spp</i>	47
4. Estudios de genotoxicidad y citotoxicidad	59
5. Parámetros farmacocinéticos	64
6. Estudios <i>in vivo</i> en modelo cutáneo murino	66
Conclusiones	69
Bibliografía	71

Resumen

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por más de 20 especies del trypanosomátido parásito *Leishmania*, que afecta a 12 millones de personas en 98 países, y mil millones están en riesgo de infección. Se presenta en distintas formas clínicas, de las cuales la leishmaniasis visceral (LV) es la más agresiva. Se ha observado un aumento en los casos de LV en el Cono Sur de América Latina, en Uruguay se detecta por primera vez en 2015 en perros, en los departamentos de Salto y Artigas. Es importante tener en cuenta que no hay vacunas o medicamentos disponibles para prevenir o tratar eficazmente estas infecciones. Por lo tanto, existe una necesidad inminente de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de la leishmaniasis. Con este objetivo, se evaluó la actividad de una serie de 50 compuestos *in vitro* contra *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*. Para los compuestos activos, se determinó la citotoxicidad *in vitro* sobre fibroblastos y macrófagos no infectados para evaluar la selectividad de sus efectos antiparasitarios, y se evaluó su actividad sobre las cepas de *Leishmania* circulantes en nuestro país. Se hallaron 17 compuestos con buena actividad anti-trypanosomatídea, con valores de IC₅₀ en el rango de 90 nM – 25 µM y una selectividad mayor a 10 en relación al IC₅₀ en fibroblastos y macrófagos murinos. La selectividad de estos compuestos activos fue mejor que la de los fármacos de referencia: glucantime y miltefosina. Dado que varios compuestos fueron sintetizados inicialmente como inhibidores de la triosafosfato isomerasa (TIM) de *T. cruzi*, se investigó si esta enzima constituye su blanco molecular. Para ello estudiamos si los compuestos inhiben la forma recombinante de TIM de *L. mexicana* sintetizada en bacterias, encontrando que no inhiben la enzima, por lo que no sería este el mecanismo de acción de los compuestos. Se realizaron además estudios de toxicidad *in vivo* y la prueba de concepto en el modelo murino de la forma cutánea de la enfermedad. De los compuestos evaluados, se hallaron 3 que controlan en un 50% la infección, con un 100% de supervivencia de los animales infectados bajo tratamiento. Estos resultados nos alientan a continuar el desarrollo de estas moléculas para su uso como agentes anti-leishmanicidas.

Abreviaturas

AEMPS. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

ATP. Del inglés Adenosín trifosfato.

CDC. Del inglés Comunicable Disease Center.

DHAP. Del inglés Dihidroxiacetona fosfato.

DMEM. Del inglés Dulbecco modified Eagle minimal essential médium.

DMSO. Dimetilsulfóxido.

DO. Densidad óptica.

ELISA. Del inglés Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EMA. Del inglés Agencia Europea de Medicamentos.

ENC. Eritrocitos normocromáticos.

EPCs. Eritrocitos policromaticos.

EPCMNs. Eritrocitos policromaticos micronucleados.

ETC. Del inglés Cadena de transporte de electrones.

FDA. Del inglés Administración de Medicamentos y Alimentos.

GLP. Del inglés Good Laboratory Practice.

G3P. Gliceraldehído-3-fosfato.

IC₅₀. Del inglés Concentración que inhibe el 50% de la actividad biológica.

ICT. Inmunocromatografía.

I + D. Investigación y desarrollo.

IFA. Inmunofluorescencia.

IPTG. Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

IS. Índice de selectividad.

LB. Luria Bertani, medio de cultivo.

LD₅₀. Del inglés dosis letal media.

LC. Leishmaniasis cutánea.

LV. Leishmaniasis visceral.

MTT. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NADH. Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido.

NDA. Del inglés Aplicación de nuevas drogas.

PAINS. Del inglés Pan-assay interference compounds.

PBS. *Buffer* fosfato salino.

PCR. Del inglés Reacción en cadena de la polimerasa.

RPMI. Roswell Park Memorial Institute, medio de cultivo.

SFB. Suero fetal bovino.

TA. Temperatura ambiente.

TIM. Triosa fosfato isomerasa.

TR. Tripanotona reductasa.

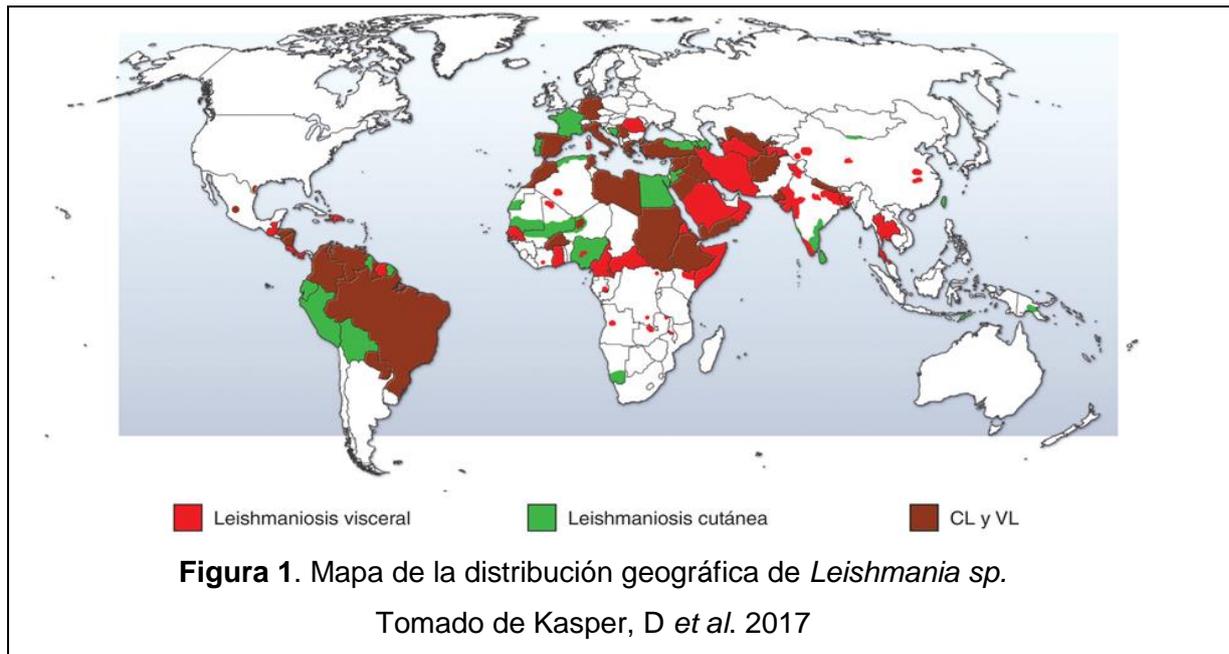
TryS. Tripaniotión Sintetasa.

TrxR. Tiorredoxina reductasa.

Introducción

1. Leishmaniasis: una enfermedad desatendida

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas producidas por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*. La enfermedad es transmitida por insectos dípteros hematófagos, de la familia Psychodidae que corresponden a diferentes especies de flebótomos (*Lutzomyia sp.*) (Sharma *et al.* 2008) y el reservorio son animales vertebrados. Estas enfermedades se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped. Son enfermedades crónicas de patogenicidad baja y morbilidad y mortalidad moderada, pero altamente mutilantes (Chappuis *et al.* 2007). Se contemplan dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas, prevalente en 98 países en los 5 continentes (mayoritariamente en África y América) (Fig. 1). Se estiman unos 2 millones de casos nuevos al año, de los cuales se reportan solo la mitad. Unos 500.000 casos corresponden a la enfermedad visceral y un millón y medio a la forma cutánea o a la mucocutánea (Desjeux 2004; Herwaldt 1999).



La forma visceral es la manifestación más grave de la enfermedad y es producida por *Leishmania donovani* en África. *Leishmania infantum* vive en las áreas que rodean el Mediterráneo y *Leishmania chagasi* en América. Éstas son idénticas, si bien reciben diferente nombre por cuestiones geográficas, ambas causantes de leishmaniasis visceral (LV) (Rioux *et al.* 1990; Mauricio *et al.* 2000).

Los seres humanos son el único reservorio conocido de *L. donovani*, mientras que los cánidos (lobos, coyotes, zorros, perro doméstico entre otros) proporcionan el reservorio para *L. infantum* y *L. chagasi*. Sin embargo, individuos con parasitemia asintomática consumidores de drogas intravenosas que comparten dispositivos inyectables parecen ser un reservorio adecuado para *L. infantum*, completando un ciclo artificial, con las agujas como vectores (Pineda *et al.* 2002). También, *L. infantum* es conocida por causar infecciones oportunistas en pacientes con VIH /SIDA (Dujardin *et al.* 2008).

Por otro lado, la bibliografía nos indica que los niños, adultos mayores y embarazadas son más vulnerables a la infección con este parásito. En el caso de los niños el motivo seguramente sea que su sistema inmunitario todavía no está bien desarrollado, afectando principalmente a niños de entre 12 a 23 meses de edad (López *et al.* 1991). Se han realizado estudios comparando como se diferencia la enfermedad entre niños y personas de edad media. Se ha demostrado que el metabolismo de la L-arginina mediado por la arginasa, una

enzima hidrolasa que se encuentra presente en varios tejidos y participa en el ciclo de la urea, se modula con la edad y afecta la capacidad de los macrófagos para expresar la arginasa. El aumento de la capacidad para regular esta enzima en individuos más jóvenes (niños) da como resultado un entorno más favorable para el crecimiento de los parásitos, como así también el aumento de la gravedad de la enfermedad y la patología (Choi *et al.* 2008).

En América se diagnosticó el primer caso de LV en el año 1911 en Paraguay, hoy en dicho país la prevalencia de la enfermedad en caninos en la capital (zona urbana) es del 70% y en humanos del 30% (Leguizamón 2012). En Brasil y Argentina fue descrita una decena de años después, pero hoy día están teniendo la misma problemática epidemiológica. En Uruguay en el año 2010 se registra por primera vez el vector *Lutzomyia longipalpis* en los departamentos de Salto y Artigas. La especie de *Leishmania* transmitida por este vector es *Leishmania infantum*, causante de LV, como se menciona anteriormente. En ese año ya existían casos caninos y humanos en las zonas fronterizas con Argentina y Brasil, por lo que Uruguay pasó a ser catalogado como “VULNERABLE” a la transmisión de Leishmaniasis (Salomón *et al.* 2011).

En 2015 se registran por primera vez casos autóctonos de LV en perros (Fig. 2), en los departamentos de Salto y Artigas (Satragno *et al.* 2017) desencadenando una alerta importante, donde el Ministerio de Salud Pública decide la eutanasia de los perros infectados (aproximadamente unos 60 perros de diferentes localidades).



Figura 2. Primer brote de leishmaniasis de transmisión autóctona (Duque).

Tomado de

http://www.infectologia.edu.uy/index.php?option=com_k2&Itemid=393&id=209_1e21b6abc0d1fed0d044896c072252fc&lang=es&task=download&view=item. 29/04/19

En vista de los cambios climáticos, las inundaciones y otros agentes, esta tarea se hizo más complicada, incrementando el riesgo de la infección en humanos, a lo que se suma la falta de tratamientos que aseguren una cura definitiva.

En diciembre del 2018 se registra el primer caso en humanos en Uruguay, en una niña en el departamento de Salto (Diario El PAIS, 5/12/2018, Montevideo, Uruguay). Ese mismo mes se encuentra el primer perro infectado en el departamento de Paysandú, el cual se encuentra a 120 km de la ciudad de Salto, por lo cual esta parasitosis comenzó a expandirse en el norte de nuestro país. A principios de 2019 se registra el segundo caso en humanos, con el fallecimiento de la paciente infectada (Diario El PAIS, 12/2/2019, Montevideo, Uruguay). Las condiciones ambientales, como cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población.

1.1 El vector

Lutzomyia longipalpis es el vector más importante de la LV en América, es un díptero hematófago de la familia *Psychodidae* (Ibáñez-Bernal 2005). Los adultos de este insecto son de muy pequeño tamaño (2 a 3 mm) y se caracterizan por tener el tórax incurvado y el cuerpo vellosos de color oscuro. Poseen un único par de alas lanceoladas que durante el reposo ubican abiertas sobre el tórax formando una V (Fig. 3). Sus hábitos son crepusculares y nocturnos, por lo cual es conveniente colocar trampas para colectarlos en horas nocturnas y preferentemente a 80 cm aproximadamente del suelo. En su ciclo de vida las hembras colocan de 30 a 100 huevos, y las larvas se alimentan de la materia orgánica del suelo, dado que su ciclo no depende del agua como es el caso de los mosquitos (Fig. 3).

Es de destacar que todo el ciclo (1 a 2 meses) se desarrolla en suelos con ciertos requerimientos de humedad. La mosca hembra pone sus huevos en los arbustos, en la corteza de los árboles viejos, en edificios en ruinas, en las grietas de las paredes de las casas, en los refugios de animales y en los desperdicios domésticos, o en entornos donde las larvas pueden encontrar la materia orgánica, el calor y la humedad necesarios para su desarrollo. El cuerpo y las pequeñas alas son muy peludas. Son voladores pobres y tienen un rango de vuelo de unos pocos kilómetros, por lo general vuelan bastante bajo y permanecen cerca de su caldo de cultivo. No pueden volar en presencia de ningún viento producido por un ventilador o una fuerte corriente de aire (Sharma *et al.* 2008). Las hembras se alimentan de sangre de mamíferos y los machos con el néctar de diversas plantas (Soares *et al.* 2003). Los factores meteorológicos, como la temperatura y la humedad, juegan un papel importante en la dinámica de transmisión de la enfermedad, ya que afectan los parámetros que aumentan la probabilidad de transmisión de la infección, actuando sobre la supervivencia del flebótomo, sus hábitos de alimentación y la duración del ciclo biológico del parásito (Suárez Rodríguez *et al.* 2012). Por estos motivos el control del vector no parece factible, lo cual limita las herramientas disponibles para mitigar el avance de esta enfermedad.

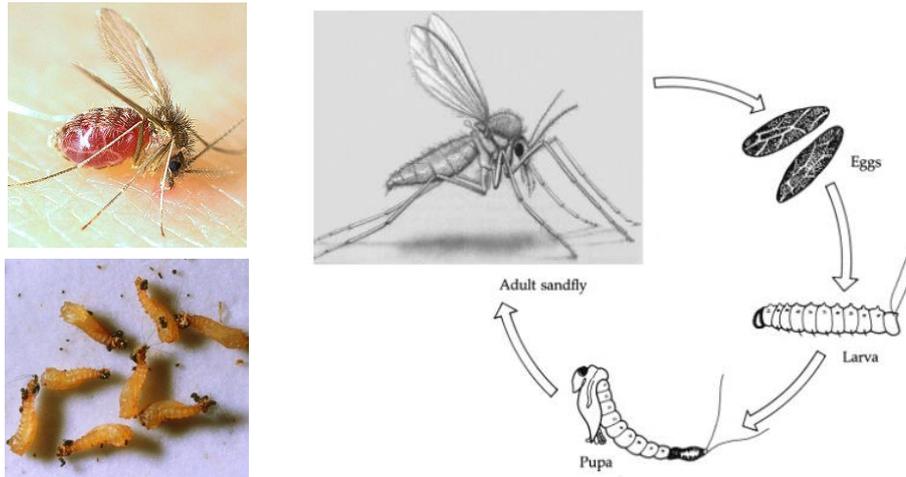


Figura 3. Vector *Lutzomyia longipalpis*. Arriba izquierda (hembra adulta), abajo izquierda (estadios larvarios). A la derecha ciclo biológico del vector. Tomado de Berenger & Parola, 2017.

La infección llega a Uruguay después de cien años de estar presente en la región. Sería deseable aprovechar racionalmente la ventaja de esos años de experiencia en los países vecinos a la hora de diseñar estrategias de control en nuestro país. Sabemos que el vector es difícil de controlar por su ciclo de vida no dependiente de agua (como sí lo es el mosquito, por ejemplo) y además es difícil de ver a simple vista, lo que define el fracaso del control con insecticidas. Existen diferentes tipos de trampas las cuales son usadas para monitorear la presencia del flebótomo, las cuales consisten en un dispositivo con una luz que los atrae y un ventilador el cual los atrapa dentro de una red de pequeño diámetro. Este tipo de trampas se las conoce como trampa de luz ultravioleta miniatura CDC (del inglés “Communicable Disease Center”). En el caso de las trampas CDC la entrada de los flebótomos es por la parte superior la cual contiene la luz LED. Funciona a 6 Volts (batería G8111) y lleva incorporada célula fotoeléctrica (Fig. 4). Cabe destacar que no todas las especies de *Lutzomyia* son atraídas por la luz, por lo cual se podría desestimar la presencia e importancia epidemiológica de especies flebotomíneas con esa característica (Parra-Henao *et al.* 2011). Este tipo de trampas se coloca en lugares peri domiciliarios cercanos a sitios de acumulación de materia orgánica y/o presencia de animales domésticos (por ejemplo gallineros). También se ha visto que por

sus hábitos crepusculares y nocturnos, es conveniente colocarlas entre las 18 y las 22 horas (Salomón *et al.* 2016).



Figura 4. Izquierda trampa CDC comercial, derecha trampa realizada en forma casera para estudiar la presencia del vector en Paysandú. Tomado de <https://entomopraxis.com/tienda/es/trampas-de-captura-y-accesorios/911-trampa-cdc-mosquitos-luz-uv.html>. 13/02/19.

1.2 El reservorio

Canis familiaris es el principal reservorio aunque no el único, y el principal reservorio de leishmaniasis visceral humana dado su cercanía con las personas (Maia *et al.* 2010). Por esto es el más estudiado y monitoreado, pero existe evidencia de que otros reservorios son factibles en la vida silvestre, como la mulita, el zorro y la liebre (Díaz-Sáez *et al.* 2014; Da Costa *et al.* 2015; Palatnik-de-Sousa *et al.* 2011).

En el caso de los perros no existe predilección por sexo o raza. Los caninos infectados con *Leishmania spp* generalmente cursan de forma asintomática. El periodo de incubación varía de 3 meses a 7 años. Los signos clínicos pueden aparecer poco después de adquirir la infección, pueden no aparecer nunca o manifestarse en cualquier momento de la vida, especialmente frente a una inmunosupresión. La incidencia de la enfermedad en los perros es siempre superior a la incidencia en humanos y usualmente la infección en perros precede a los brotes en humanos (Spickler *et al.* 2011).

Los síntomas clínicos en perros cuando comienza la enfermedad consisten en disminución de su apetito y su actividad diaria, así como la presencia de pelaje opaco. Se desarrolla una dermatitis exfoliativa generalizada; alopecia, que va

aumentando con el tiempo, no tiene bordes definidos y es posible observar una pérdida de pelo alrededor de los ojos dando el aspecto de un antifaz. Junto con el adelgazamiento progresivo es posible hallar úlceras dérmicas que son más frecuentes en las zonas de flexión, pero también se encuentran en los espacios interdigitales. Las uñas comienzan a crecer en forma desmedida (onicogrifosis) superando el desgaste natural y es común la aparición de poliadenopatías, sobre todo de los ganglios preescapulares y poplíteos (Casanova *et al.* 2019).

Debido a que no solo el perro puede ser el reservorio, su sacrificio no lleva al control de la infección, de hecho la eutanasia de perros infectados se lleva a cabo en Paraguay desde hace más de 50 años, y el resultado sugiere que no es el camino adecuado.

1.3 El parásito

Leishmania incluye un conjunto de parásitos protozoarios pertenecientes al filo Sarcomastigóforos, familia Trypanosomatidae. Es un género de protistas responsables de la enfermedad conocida como leishmaniasis, o leishmaniosis, que contempla más de 20 especies. El grupo mejor caracterizado del género *Leishmania* son los *Euleishmania*, compuesto de 4 subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* (parásitos de lagartos) y el complejo de *L. enriettii*. El subgénero *Leishmania* tiene 4 especies principales: *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. tropica*, mientras en el subgénero *Viannia* se reconocen las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, entre otras. Las especies y subespecies se agrupan dentro de complejos en constante revisión (Akhoundi *et al.* 2017).

La existencia de especies similares a *Leishmania* prehistóricas se documenta en fósiles de ámbar. El primer fósil fue encontrado en la probóscide y tracto alimenticio de la extinta mosca de la arena *Palaenomyia burmitis* preservada en ámbar de 100 millones de años (Steverding 2017).

Los parásitos del género *Leishmania* adoptan dos formas morfológicas durante su ciclo de vida: los promastigotes, tienen una forma alargada que puede medir de 10 a 15 μm , un flagelo anterior y multiplicación extracelular en el intestino del invertebrado vector. Por otro lado tenemos a los amastigotes, los cuales tienen un tamaño menor, forma esférica con un flagelo muy corto que no sobresale de la bolsa flagelar, de modo que sólo es apreciable en el microscopio electrónico.

Este se multiplica dentro de macrófagos y células del sistema retículoendotelial del huésped vertebrado. Aunque a primera vista las formas promastigote y amastigote parecen ser muy diferentes, la estructura celular está muy conservada. Por delante del núcleo se encuentra el kinetoplasto, una región que contiene la única mitocondria del parásito, donde se localiza el ADN mitocondrial formado por miles de moléculas circulares concatenadas. El kinetoplasto está conectado con el cuerpo basal del que emerge el flagelo. En la base del flagelo se encuentra una invaginación de la membrana celular que recibe el nombre de bolsillo flagelar, lugar especializado en los procesos de endocitosis y exocitosis y que está conectado con el aparato de Golgi (Sunter *et al.* 2017).

En la Figura 5 se esquematiza el ciclo del parásito. La Leishmaniasis es transmitida por la picadura del flebótomo (Fig. 6), quien inyecta en la sangre la forma infecciosa del parásito, promastigotes. Estos son fagocitados por los macrófagos y se transforman en amastigotes, los que se multiplican en las células infectadas y afectan a distintos tejidos, dependiendo de la especie de *Leishmania*, originando las manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis (Fig. 6). El insecto se infecta al ingerir sangre con macrófagos que contienen amastigotes. En el intestino del insecto, los parásitos se diferencian en promastigotes (Fig. 6), que se multiplican y migran a la probóscide. Si el insecto realiza otra picadura, los promastigotes pasan a la sangre del huésped, completándose el ciclo.

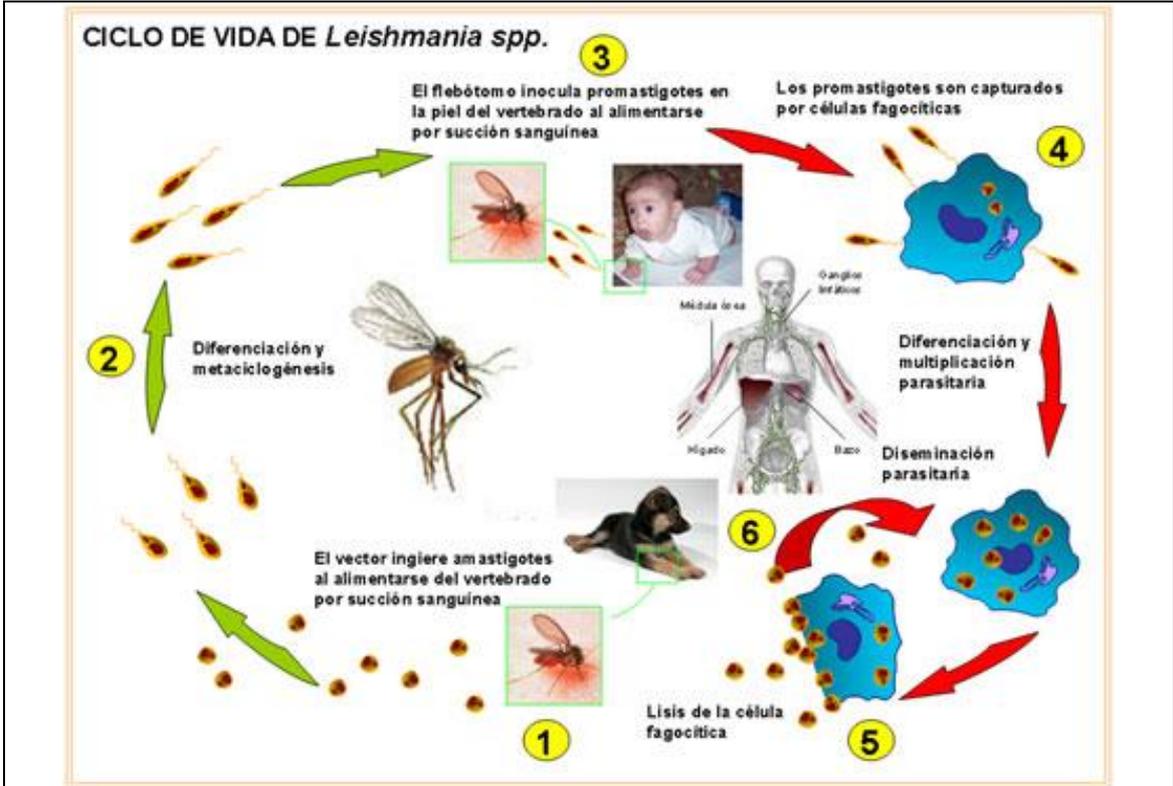


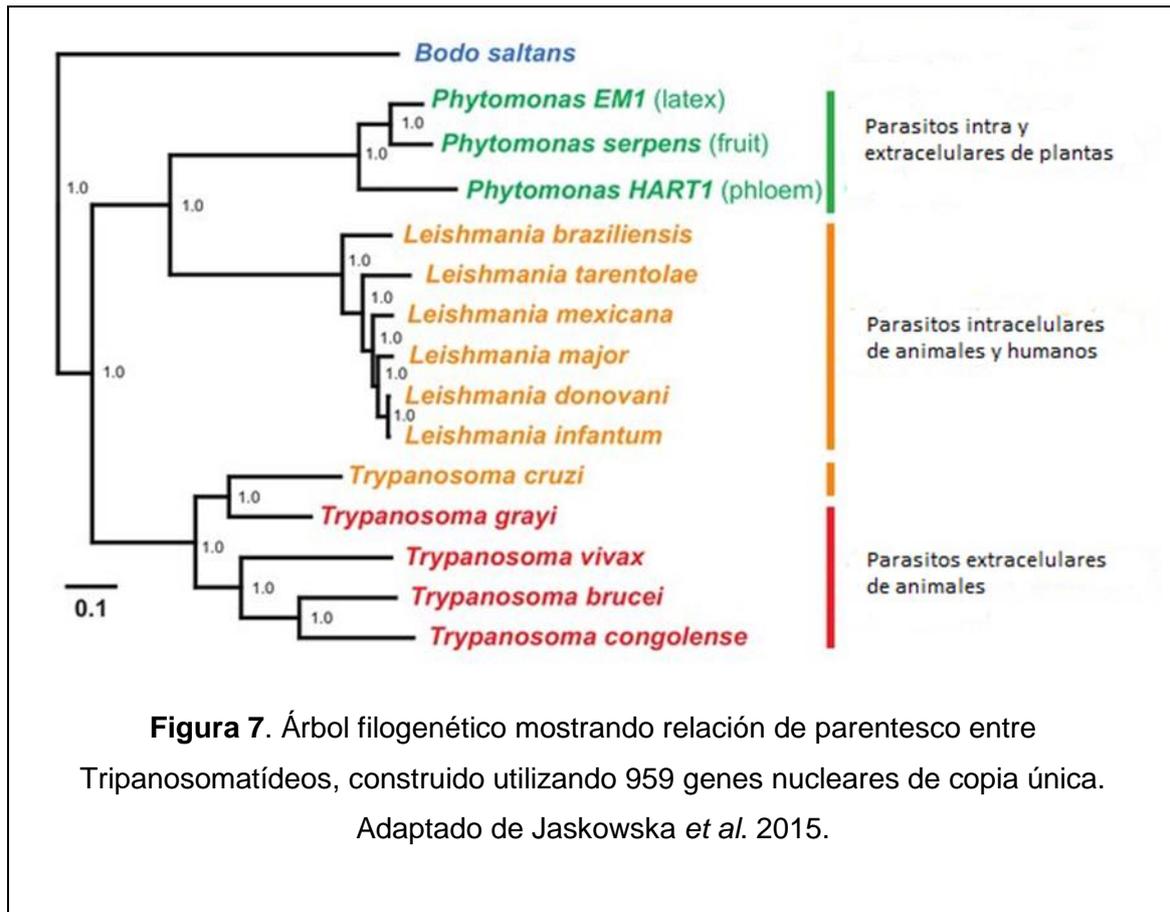
Figura 5. Ciclo de *Leishmania* adaptado al español (Nieto A et al. 2011).



Tanto *Leishmania* spp., *Tripanosoma cruzi* y *Tripanosoma brucei* pertenecen al grupo de protozoarios kinetoplastidos, por lo cual están emparentados

filogenéticamente (Fig. 7). Estos parásitos causan devastadoras enfermedades humanas, incluida la tripanosomiasis humana africana (*Trypanosoma brucei*), enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), y la leishmaniasis. El taxón unificador, Kinetoplastea es definido principalmente por la presencia del kinetoplasto (Maslov *et al.* 2013). Comparten características que son atribuibles a su condición de parásitos obligados, como la ausencia de vías biosintéticas para el grupo hemo, purinas y aminoácidos aromáticos. Además, presentan una familia génica que codifica para proteínas de la superficie celular que son específicas de cada linaje, como las glicoproteínas variantes de superficie (VSG) en *T. brucei*, las trans-sialidasas en *T. cruzi* y los antígenos de superficie de los promastigotas (PSA) y la *d*-amastina en las especies de *Leishmania*. Estos antígenos que están expuestos en la superficie del parásito cumplen una importante función en la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Jackson *et al.* 2016). En general, los morfotipos tripanosomátidos se distinguen por su forma celular, la posición relativa de su núcleo con respecto al kinetoplasto, posicionamiento del flagelo y apego al cuerpo celular. Estas características definitorias de taxón bajo el sistema clásico deben reconsiderarse a la luz del desarrollo de la genética molecular (Kaufer *et al.* 2017).

La transcripción en tripanosomátidos es policistrónica en todas las especies, y su genoma está organizado en unidades conservadas de transcripción policistrónica, siendo la regulación post-transcripcional su principal mecanismo de control de la expresión génica (Jackson *et al.* 2016). Estudios utilizando genes de la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma, sugieren que todos los tripanosomas sanguíneos de vertebrados son monofiléticos y que su ancestro debió de ser un parásito de insectos que se adaptó a los vertebrados (Hamilton *et al.* 2004, Harmer *et al.* 2018).



1.4 Diagnóstico de Leishmaniasis

Existen varios métodos para diagnosticar esta enfermedad frente a la presencia de síntomas clínicos. Estos deben cumplir varios requisitos para ser de uso práctico. Deben ser sensibles y específicos, de bajo costo (en particular para uso en países en desarrollo) y fáciles de realizar bajo condiciones adversas de campo (Schallig *et al.* 2002).

Una prueba rápida consiste en una tira reactiva inmunocromatográfica (ICT) rk39 para la detección cualitativa de anticuerpos anti-leishmania. Esta prueba utiliza antígenos recombinantes de *Leishmania* (rK39), un epítipo inmunodominante repetitivo relacionado con una proteína kinesina altamente conservada entre las especies viscerotrópicas de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi* (Mniouil *et al.* 2018). Sin embargo, los anticuerpos anti-*Leishmania* pueden durar meses después de la cura clínica y pueden encontrarse en personas sanas que fueron infectadas pero permanecieron asintomáticas. Hay también métodos más sensibles de detección de anticuerpos, como los ensayos de inmunofluorescencia (IFA) o los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas

(ELISA). IFA es una de las pruebas de uso frecuente (Morales-Yuste. 2012), y se considera el “patrón de oro” de métodos serológicos, siendo la referencia establecida por la OMS (Paz *et al.* 2018).

Sin embargo, los métodos inmunológicos son a menudo insuficientes para fines clínicos. Puede llevar hasta 3 años para que se detecten anticuerpos después de la infección y algunos perros permanecen con serología negativa indefinidamente (Solano-Gallego *et al.* 2001; Leontides 2002). Además, las pruebas de detección de anticuerpos pueden producir falsos positivos debido a la reactividad cruzada con anticuerpos contra otros agentes infecciosos (Selder *et al.* 2018).

En comparación, la técnica de PCR proporciona la detección de los parásitos en concentraciones mínimas circulantes en la sangre. Por lo tanto, el diagnóstico por PCR debe considerarse como una herramienta útil para estructurar programas de Control de Leishmaniasis, asistiendo a profesionales de la salud en el diagnóstico definitivo y, en consecuencia, en la eutanasia pertinente y concienzuda de los animales (Monteiro *et al.* 2018).

1.5 Control de la Leishmaniasis

Los avances recientes en prevención de la leishmaniasis canina incluyen nuevas vacunas para prevenir la infección por *Leishmania spp.* (Miro *et al.* 2017). En el mercado se encuentra CaniLeish® (Virbac, Francia), una vacuna compuesta por proteínas secretadas y excretadas por *Leishmania infantum* y un extracto purificado de *Quillaja saponaria* (QA-21). Tiene un curso de vacunación primaria de tres inyecciones a intervalos de tres semanas, seguido de inyecciones de refuerzo anuales (Fernandez-Cotrina *et al.* 2018).

En los dos últimos años se han desarrollado dos vacunas preventivas de la leishmaniasis en Brasil, ambas con el mismo esquema de administración de CaniLeish. Leishmune® (Zoetis, Brasil) se basa en el ligando de fucosa-manosa de *L. donovani*, un complejo glicoproteico que inhibe fuertemente la infección *in vitro* de macrófagos murinos con promastigotes de *L. donovani* (Dantas-Torres 2006), con el adyuvante QuilA. Sin embargo Leishmune no está recomendada por el Ministerio de Salud Brasileño debido a que la vacuna puede interferir en el diagnóstico serológico preconizado (Campos *et al.* 2017; Cotrina *et al.* 2018). Por otro lado tenemos Leish-Tec® (Hertape Calier, Brasil), compuesto por el

antígeno A2. Los genes A2 están presentes dentro de una familia multigénica que codifican para las proteínas A2 que van desde 45 hasta 110 kDa, que se requieren para la supervivencia de *Leishmania* en los huéspedes mamíferos. Los antígenos A2, administrados como proteína recombinante o ADN, son protectores contra la infección de *L. donovani*, *L. amazonensis* y *L. chagasi* en ratones. Los anticuerpos anti-A2 han sido detectados en muestras de suero de pacientes con LV activa, lo que confirma que las proteínas A2 se expresan durante la infección activa. Leish-Tec ha demostrado buenos resultados en cultivos experimentales (Fernandes *et al.* 2008).

A pesar de estos avances, las vacunas disponibles no previenen la infección en el 100% los casos, como en la mayoría de las parasitosis, ya que estos organismos tienen múltiples estrategias de evasión del sistema inmune. Por ejemplo, la acción de citoquinas supresoras, el agotamiento de células T específicas, la pérdida de la arquitectura del tejido linfoide y una respuesta humoral defectuosa (Rodrigues *et al.* 2016), dejando como última alternativa el tratamiento farmacológico (Solano-Gallego *et al.* 2009).

Se han desarrollado algunos medicamentos para curar la leishmaniasis, uno de ellos es la Miltefosina (hexadecilfosfocolina), un análogo de la fosfatidilcolina originalmente desarrollado como agente antineoplásico. La Miltefosina tiene la ventaja de ser administrada vía oral, a diferencia de los otros medicamentos disponibles en el mercado, pero su costo es elevado y presenta problemas de toxicidad. Estos problemas son por ejemplo: complicaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea y en algunos casos provoca insuficiencia renal. Por otro lado también se ha registrado el potencial teratogénico de este medicamento por lo cual las mujeres en edad fértil que constituyen una proporción significativa de las pacientes, deben evitar quedarse embarazadas durante el tratamiento y durante los dos meses siguientes en vista de la larga vida media del fármaco (Sundar *et al.* 2007; Soto *et al.* 2006; Pérez Tort *et al.* 2009). También tenemos la Anfotericina B, Paromomicina, Pentamidina y el antimonio de meglubina (Glucantime) pero su eficacia, costo y efectos adversos siguen siendo estudiados.

El alopurinol, análogo de purina sintetizado inicialmente como antineoplásico, es utilizado para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral

en humanos y en perros. Es efectivo frente a la LV combinado con imidazoles, pero con un alto porcentaje de recaídas (56%) y con ciertos niveles de toxicidad (Moore *et al.* 2010). Un estudio indica que los antimoniatos en combinación con alopurinol producen mejores resultados en el tratamiento de la leishmaniasis canina que la utilización de los fármacos por separado (Denerolle *et al.* 1999; Manna *et al.* 2008).

Por lo tanto, existe una necesidad inminente de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de esta enfermedad. Cabe destacar que el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso muy largo y costoso. Desde que se comienza a investigar una molécula innovadora hasta que el medicamento llega al mercado, pueden transcurrir entre 10 y 15 años (Fig. 8). El descubrimiento de un medicamento nuevo tiene una tasa de éxito muy baja, se estima que solo 250 de cada 10.000 moléculas de la etapa de investigación básica se convierten en prototipos y pasan a la fase de investigación preclínica (Magos Guerrero *et al.* 2009).

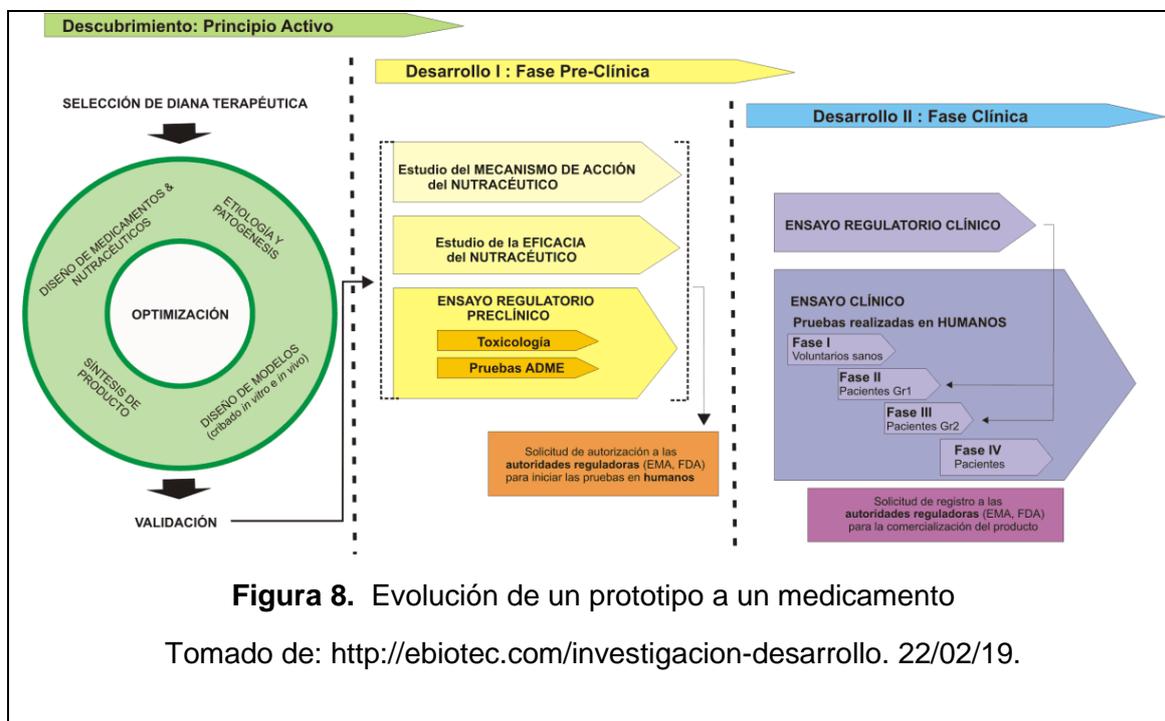


Figura 8. Evolución de un prototipo a un medicamento

Tomado de: <http://ebiotec.com/investigacion-desarrollo>. 22/02/19.

2. Etapas del desarrollo de un fármaco

2.1 Identificación de la diana terapéutica

El primer paso del desarrollo de medicamentos es la etapa de estudios básicos de la etiología de la enfermedad en cuestión e incluye todos los estudios biológicos de las macromoléculas que están involucradas en su desarrollo. Desde el punto de vista farmacológico serán de importancia aquellas moléculas cuya modulación revierta el estado patológico o mejore la calidad de vida del paciente. En el caso de enfermedades infecciosas serán blancos moleculares todas aquellas macromoléculas esenciales para la vida del agente infeccioso (Romanha *et al.* 2010), que deben ser correctamente identificadas y validadas al inicio de la investigación.

2.1.1. Blancos moleculares de tripanosomatídeos

La mitocondria de estos protozoos puede considerarse como el orgánulo más valioso a evaluar para el desarrollo de fármacos, debido a su estructura y función única en comparación con el hábitat natural del hospedador. De hecho, los sistemas respiratorios de estos parásitos típicamente muestran una mayor diversidad en las vías electrónicas que sus animales hospederos. Estos aspectos únicos de los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC) y sus enzimas relacionadas representan objetivos prometedores para la quimioterapia (Sen *et al.* 2008).

Asimismo, los tripanosomatídeos tienen un metabolismo redox único basado en tiorredoxina, en el que la tripanotiona (*N1-N8*-bis (glutathionil) espermidina, T (SH)₂) y la tripanotiona reductasa (TR) reemplazan muchas de las funciones antioxidantes y metabólicas de la glutatión / glutatión reductasa y tiorredoxina / tiorredoxina reductasa (TrxR) presentes en el hospedero. La tripanotion sintetasa (TryS) y la TR son necesarias para la supervivencia de los protozoos. En consecuencia, las enzimas involucradas en la síntesis de T (SH) vital para la supervivencia del parásito y su utilización, en particular, TryS y TR, son blancos moleculares prometedores para el desarrollo de fármacos (Manta *et al.* 2018).

Existen otros blancos moleculares estudiados, como las enzimas de la degradación de purinas (alantoinasa) y aquellas del ciclo del glioxalato, isocitrato liasa, aldo-ceto reductasas y malato sintasa, al igual que la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), una enzima de la vía de las pentosas-fosfato (Serrano-Martin *et al.* 2005). Otros blancos podrían ser los esteroides de las membranas celulares, los cuales son vitales para la función celular y el mantenimiento del parásito y su estructura. En las células de mamífero, el esteroide principal de la membrana es el colesterol, pero los tripanosomátidos sintetizan ergosterol y otros 24-metil esteroides que se requieren para su crecimiento y viabilidad (Chawla *et al.* 2010).

Por otra parte, la glucólisis se percibe como un blanco prometedor para nuevos fármacos contra los protozoos parásitos tripanosomatídeos, porque esta vía desempeña un papel esencial en su suministro de ATP. Los glicosomas de todas las formas de tripanosomátidos estudiados contienen una vía glucolítica extendida que cataliza la glucosa para dar succinato u otros intermediarios parcialmente oxidados (Maugeri *et al.* 2003). Además, estos orgánulos contienen enzimas para otros procesos, como la vía pentosas-fosfato, la β -oxidación de ácidos grasos, el rescate de purinas y las vías biosintéticas para las pirimidinas y esteroides (Michels *et al.* 2006). La glucólisis tripanosomátida es única ya que está compartimentada y muchas de sus enzimas presentan características estructurales y cinéticas particulares. Para algunas enzimas tripanosomátidas, ya se han desarrollado inhibidores potentes y selectivos que afectan solo el crecimiento de tripanosomátidos en cultivo, y no de células de mamíferos (Verlinde *et al.* 2001; Wyllie *et al.* 2018).

De los blancos estudiados por nuestro grupo se encuentra la Triosafosfato isomerasa (TIM), enzima glucolítica que cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en gliceraldehído-3-fosfato (GAP). La simplicidad de esta reacción, la ausencia de cofactores y la alta eficiencia catalítica de la enzima la convierte en un blanco interesante para el desarrollo de fármacos que inhiban su actividad (Noble *et al.* 1991).

Las TIMs son el prototipo de la familia de proteínas que comparten el motivo de plegamiento tipo barril (β/α)₈ en su estructura tridimensional (Fig. 9) (Rodríguez-Bolaños *et al.* 2016). Todas las TIMs conocidas son homodímeros siendo activas solamente en su forma dimérica. Esta característica resulta de gran importancia

al momento de buscar compuestos que interaccionen en la interfase entre los monómeros con el objetivo de inducir modificaciones estructurales que alteren la integridad del dímero, provocando así la inactivación de la enzima (Waley 1973; Téllez-Valencia *et al.* 2002). La TIM de *Leishmania mexicana* posee un 68% de identidad de secuencia con la TIM de *T. brucei*, y esta presenta una identidad del 74% con la enzima de *T. cruzi* (Williams *et al.* 1999; Rodríguez-Bolaños *et al.* 2016). A pesar de ser una enzima presente en todos los organismos y poseer una estructura tridimensional altamente conservada, tiene variaciones estructurales según la especie en la interfase de los monómeros que forman el dímero activo. Estas les confieren a las enzimas diferencias en sus propiedades fisicoquímicas, como la termo-estabilidad del dímero en solución, la cinética de repliegado de sus monómeros y la susceptibilidad a distintos reactivos (Rodríguez-Bolaños *et al.* 2016), y hacen posible el descubrimiento de inhibidores específicos de cada enzima (Mande *et al.* 1994). De hecho, se han reportado benzotiazoles capaces de inhibir selectivamente las TIMs de *L. mexicana*, *T. cruzi* y *T. brucei* pero no son activos frente a las TIM de otras especies como *P. falciparum*, levaduras y humanos (Olivares-Illana *et al.* 2006).

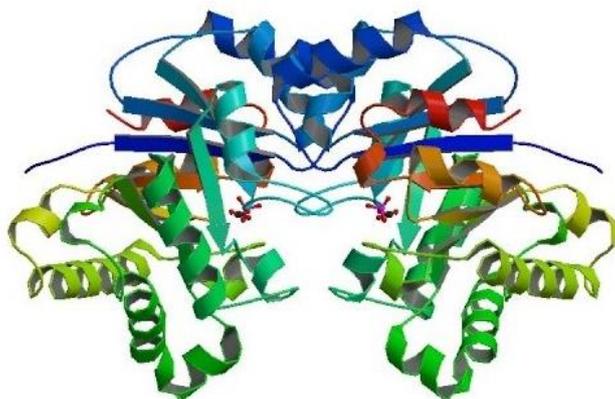


Figura 9. Dímero de TIM de *L. mexicana*. Tomada del Protein Data Bank (PDB), código 1AMK. 14/05/19

2.2 Validación de la diana

Consiste en definir con exactitud cuál es la relación entre el blanco terapéutico seleccionado y la enfermedad de interés, esto es, el impacto cuantitativo que tiene

sobre el proceso patológico la activación o desactivación de la diana en concreto. Se realizan pruebas para confirmar qué interacciones con la diana están asociadas con una modulación favorable para el organismo. En el caso de un patógeno, la muerte del mismo sería lo esperado (Corpas-López *et al.* 2018).

2.3 Identificación de compuestos líderes

Luego de identificado el blanco terapéutico éste se puede utilizar en estrategias de cribado masivo para identificar moléculas con actividad moduladora, que luego podrán ser líderes de programas de diseño racional para el desarrollo de un fármaco. También es posible realizar un cribado masivo en un organismo entero, en ese caso se le llama cribado fenotípico, y resulta de la identificación de moléculas capaces de inhibir el crecimiento de un tipo de célula u organismo patógeno. Un compuesto líder o un hit es aquel que tiene potencial para tratar la enfermedad, teniendo una actividad en el blanco estudiado. Puede ser un compuesto de síntesis, un compuesto natural, un péptido o un anticuerpo que se une a la diana y tiene un efecto activador o inhibidor sobre ella. Este líder es el punto de partida para desarrollar moléculas relacionadas (mediante diseño racional), hasta la obtención de una serie de candidatos con parámetros optimizados en base a estudios de relación estructura-actividad, sobre los que se trabaja en las fases preclínicas (Bustamante *et al.* 2011).

2.4 Fase de desarrollo pre-clínica

En esta fase del desarrollo de un nuevo fármaco, se realizan diversos ensayos del compuesto seleccionado en el laboratorio para confirmar que será segura su administración en humanos. Esta fase incluye:

1. Ensayos en organismos vivos (*in vivo*) y en células o tejidos (*in vitro*). Estudios toxicológicos, evaluación en modelos que predigan diferentes tipos de toxicidad inespecífica como: toxicidad aguda, toxicidad hepática, toxicidad en el desarrollo embrionario, genotoxicidad, mutagenicidad. También se evalúa la potencia de los compuestos en modelos relevantes de la enfermedad.
2. Características galénicas. Composición química, pureza, calidad, etc.
3. Formulación del medicamento para uso en pruebas clínicas. Vías de administración, solubilización.

4. Estudio de farmacodinamia, en esta sección se evalúa el mecanismo de acción del compuesto. En el caso de aquellos compuestos que surgen de un cribado fenotípico, se debe hacer la caracterización completa del mecanismo de acción, así como la validación del mismo.

5. Estudios de farmacocinética. Se evalúan los aspectos que tienen que ver con la acción del organismo sobre el fármaco, desde estabilidad en diferentes pH, medios o soluciones tanto *in vitro* e *in vivo*, absorción, biodistribución, entre otras. Los resultados de estos ensayos deben suministrarse a las agencias reguladoras correspondientes (AEMPS en España, EMA en Europa, FDA en EEUU, del inglés *Food and Drug Administration*) con el fin de obtener el permiso para empezar las fases de ensayos clínicos en humanos. Todos los ensayos antes mencionados deben hacerse bajo las normas aprobadas para cada caso, tipo GLP (Schenone *et al.* 2013).

2.5 Fase de desarrollo clínico

Para iniciar la fase clínica del desarrollo de un fármaco debe realizarse una solicitud al Instituto de Investigaciones de nuevos fármacos de la FDA o la Institución correspondiente. Se presenta un paquete de información que se somete a los organismos reguladores correspondientes antes de poder realizar los ensayos clínicos en humanos. Debe contener los resultados preclínicos, estructura química, modo de acción, toxicidad y efectos secundarios de los ensayos en animales y el proceso de producción del compuesto.

Fase I. Incluye los primeros estudios que se realizan en seres humanos, pretenden demostrar la seguridad del compuesto y orientar hacia la pauta de administración más adecuada para estudios posteriores. Por lo general se hace en individuos sanos.

Fase II. Tiene como objetivo proporcionar información preliminar sobre la eficacia del producto y establecer la relación dosis-respuesta; son estudios terapéuticos exploratorios. Depende mucho del tipo de patología, pero en general se estudia un grupo pequeño pero representativo de la población objetivo.

Fase III. Estos ensayos evalúan la eficacia y seguridad del tratamiento experimental en las condiciones de uso habituales y con respecto a las

alternativas terapéuticas disponibles para la indicación estudiada, en las condiciones habituales de la patología a tratar.

5- Fase IV (aprobación /regulatoria). NDA (del inglés *New Drug Application*). Se remite a las agencias reguladoras competentes la solicitud para la comercialización de un nuevo medicamento.

6- Post autorización. Ensayos clínicos Fase IV. Se realizan después de la comercialización del fármaco para estudiar condiciones de uso distintas de las autorizadas, como nuevas indicaciones. Esto continua por largo tiempo, es un monitoreo continuo de las consecuencias de la administración del fármaco para detectar efectos secundarios no reportados inicialmente o problemas de resistencia, entre otros.

3. Antecedentes: selección de moléculas a ser evaluadas

Nuestro grupo viene trabajando en el desarrollo de medicamentos para enfermedades causadas por parásitos de la familia Trypanosomatidae desde el año 2007. En ese proceso se han abordado varias de las etapas de desarrollo de fármacos mencionadas anteriormente, desde el descubrimiento hasta las etapas preclínicas, con un fuerte énfasis en la toxicología de las nuevas moléculas. En este periodo se sintetizaron y caracterizaron cientos de moléculas mayoritariamente con actividad en *Trypanosoma cruzi*. Decenas de compuestos líderes surgieron tanto de cribados fenotípicos como de estudios sobre blancos terapéuticos aislados (Álvarez *et al.* 2010; ^bÁlvarez *et al.* 2015).

Muchos de los compuestos a evaluar en esta tesis fueron sintetizados buscando la inhibición de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (Aguilera *et al.* 2016). Dado que esta enzima también se encuentra en otros tripanosomatideos como *Leishmania*, se pensó en ella como blanco molecular principal de los compuestos activos evaluados en este trabajo. Es de esperar que *T. cruzi* y *Leishmania spp.* presenten alta similitud en sus vías metabólicas dado su parentesco a nivel evolutivo y por ende existe la posibilidad de encontrar compuestos con actividad antiparasitaria en ambos grupos. En base a los resultados de los cribados y los estudios preclínicos previos de compuestos con

actividad en *T. cruzi* se seleccionaron moléculas para evaluar su actividad frente a *Leishmania spp.* buscando identificar compuestos líderes para continuar con estudios preclínicos.

Históricamente el diseño inicial de las moléculas fue sobre análogos de Nifurtimox, muchas moléculas con potente actividad tripanosomicida surgieron de esta serie de compuestos que mayoritariamente eran nitrofuranos con motivos de tiosemicarbazidas (Gerpe *et al.* 2009) (Fig. 10A). Los aspectos toxicológicos de esta familia no fueron buenos, la mayoría presentaba efectos genotóxicos y/o mutagénicos. Estos efectos al igual que la propia actividad tripanosomicida se asoció al grupo nitrofurano. Se decidió entonces generar moléculas híbridas con análogos de terbinafine, un inhibidor de la biosíntesis de ergosterol. La supresión del grupo nitro en la mayoría de los casos determinó la pérdida de la actividad tripanosomicida, a excepción de un compuesto derivado de furilacroleína. Esta molécula nos mostró una relación positiva entre los dobles enlaces conjugados con el furano y la actividad tripanosomicida (Álvarez *et al.* 2014; Álvarez *et al.* 2015; Aguilera *et al.* 2016). Con ese motivo conservado se sintetizaron decenas de nuevas moléculas con potente actividad *in vitro* en epimastigotes de *T. cruzi* y sin efectos mutagénicos o genotóxicos, con buenos índices de selectividad.

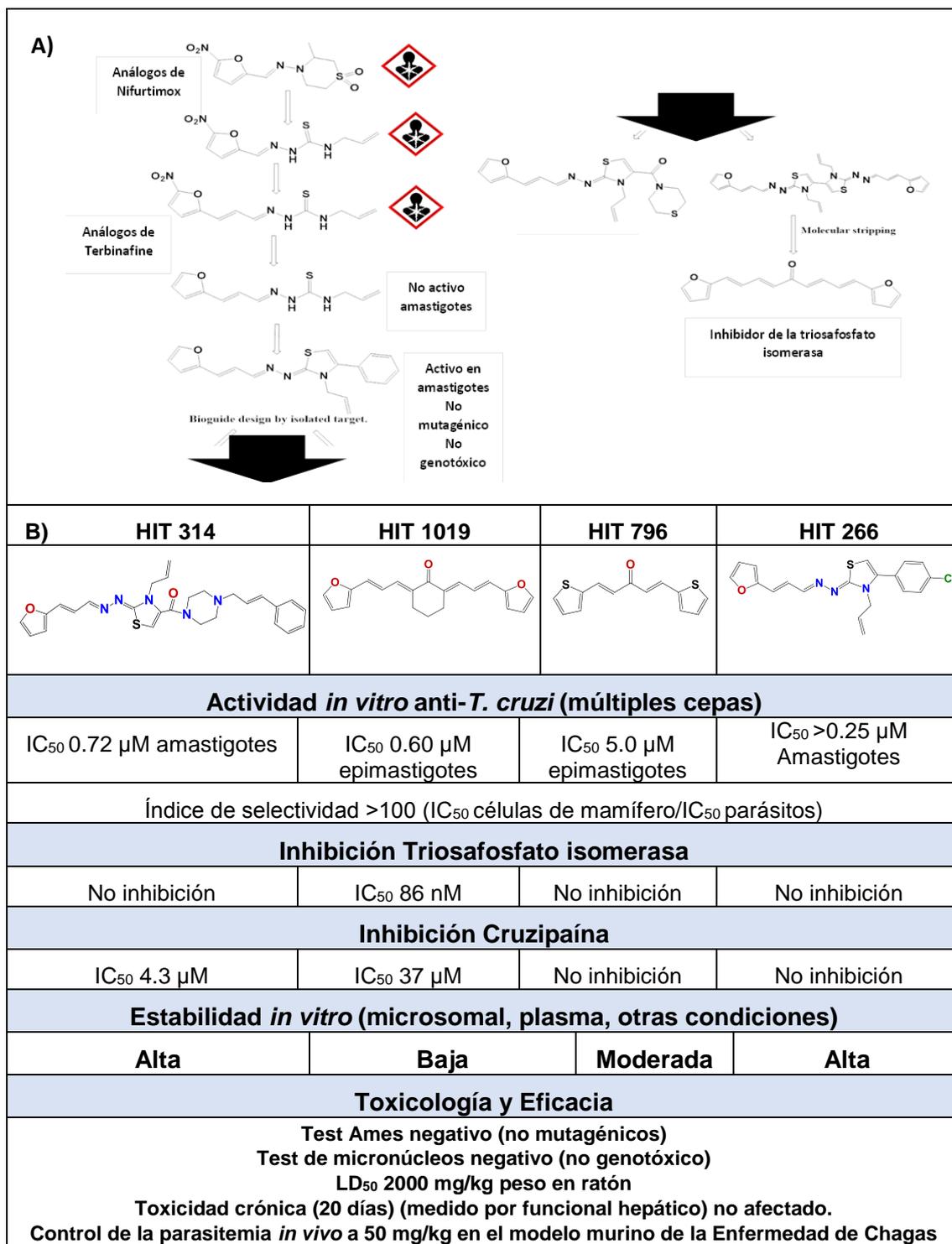


Figura 10. A) Diseño histórico de los HIT B) Esquema que resume la información previa generada para los compuestos con actividad tripanosomicida. Se muestra la estructura de los 4 compuestos líderes, su actividad tripanosomicida y sus parámetros de estabilidad y toxicidad *in vitro* e *in vivo*. Estos compuestos reúnen las características necesarias para ser considerados compuestos líderes para el tratamiento de estas enfermedades.

El problema surgió cuando se probaron estas moléculas en el modelo *in vitro* con amastigotes, donde no resultaron igual de potentes. Se decidió entonces desarrollar moléculas con mayor lipofilia ciclando el motivo tiosemicarbacida para dar los tiazoles correspondientes. Estas nuevas moléculas mostraron excelente actividad frente a amastigotes, dando el surgimiento del **HIT 266** (Álvarez *et al.* 2014). Luego, con el objetivo de incorporar nuevos farmacóforos tales como inhibidores de la cruzipaína, una proteasa esencial del parásito *T. cruzi*, se sintetizaron una serie de amidas derivadas del **HIT266**, dando el surgimiento del **HIT314** (Álvarez *et al.* 2015). Buscando obtener inhibidores de la TIM, se generaron moléculas simétricas utilizando motivos con actividad tripanosomicida tomados de las familias mencionadas, surgiendo los **HIT1019** y **HIT796** (Aguilera *et al.* 2016) (Fig. 10B).

Para la realización de este trabajo se seleccionaron 70 moléculas de la quimioteca de nuestro Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas tomando como criterio la actividad frente al estadio epimastigote del parásito *T. cruzi* y la inhibición de la actividad de la TIM de este parásito. Se incluyeron también otros compuestos con potencial antiparasitario no evaluados previamente en *T. cruzi*, como el grupo de los esteroides.

Este grupo de moléculas se sintetiza de forma sencilla y económica con metodologías amigables con el ambiente. Esto es de gran importancia para el proceso de desarrollo de un medicamento para una enfermedad desatendida donde uno de los principales obstáculos es la accesibilidad económica al tratamiento.

A partir de los resultados previos mencionados, en esta tesis de posgrado nos planteamos identificar moléculas que posean acción también en parásitos del género *Leishmania* y a partir de los mismos realizar el desarrollo preclínico para identificar candidatos a estudios clínicos para la leishmaniasis canina.

Objetivos

Objetivo General: realizar estudios preclínicos de compuestos con actividad leishmanicida para seleccionar compuestos como potenciales fármacos para realizar estudios clínicos en perros.

Objetivos específicos:

- 1- Estudio de inhibición de los compuestos frente a la Triosafosfato isomerasa de *L. mexicana*.
- 2- Estudio de la actividad de los compuestos en la cepa de referencia de *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*.
- 3- Evaluación del efecto de los compuestos en los aislados obtenidos de la cepa de *Leishmania infantum* circulante en Uruguay.
- 4- Análisis de toxicidad de los compuestos *in vitro* e *in vivo*.
- 5- Estudios de eficacia *in vivo* en el modelo agudo cutáneo murino de Leishmaniasis.

Materiales y Métodos

1- Expresión, purificación y evaluación de la actividad enzimática de la TIM de *L. mexicana*

1.1 Expresión recombinante de la TIM de *L. mexicana* en *E. coli*

Se realizó la transformación de bacterias competentes de *E. coli* BL21 codon plus con los plásmidos de expresión que contienen el gen de la TIM de *L. mexicana* y el gen de la TIM de *H. sapiens*, gentilmente cedidos por el Dr. Montfort de la Universidad Autónoma de México. La transformación de las células competentes preparadas por el método de cloruro de calcio se realizó mediante choque térmico como se describe a continuación:

Se realizó un precultivo en 3 ml de LB con 50 µg/ml de cloranfenicol (1% tripton, 0.5% extracto de levadura, 1% cloruro de sodio) inoculado con una colonia de bacterias BL21 codón plus. Se colocó durante una noche en agitador, a 220 rpm 37°C.

Posteriormente se inoculó 20 ml de LB cloranfenicol con 200 µl del precultivo. Se midió la densidad óptica en espectrofotómetro, y cuando esta alcanzó 0.4 se tomó 3 ml en 3 microtubos. Se procedió a centrifugar los mismos durante 1 minuto a 10000 g, se retiró el sobrenadante, y se volvió a centrifugar por 1 minuto. Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 100 µl de Cloruro de calcio 0,1 M estéril, se centrifugó 1 minuto a 10000g y retiró el sobrenadante. Luego se resuspendió nuevamente en Cloruro de Calcio, se agregó el plásmido (5 ng) y se colocó en hielo durante 60 minutos.

Posteriormente se realizó en choque térmico, en donde se sacaron los microtubos del hielo y se colocaron 3 minutos a 37 °C, luego rápidamente se volvieron al hielo durante 3 minutos. Se agregaron 400 µl de LB cloranfenicol y se agitó durante 60 minutos a 220 rpm a 37°C. Finalmente, se sembraron 200 µl de este cultivo en placas LB agar cloranfenicol + ampicilina 100 µg/ml. Las placas se colocaron en estufa a 37 °C durante una noche.

Para la expresión de las enzimas se realizó un precultivo de 3 ml de LB con cloranfenicol + ampicilina, en el cual se tomó una colonia de las bacterias recombinantes. Se dejó creciendo durante 8 horas y luego se inocularon 20 ml

de LB cloranfenicol + ampicilina con 200 μ l de precultivo, se colocó en agitador durante una noche a 37 °C a 220 rpm. Al siguiente día se inoculó 1 L de medio LB cloranfenicol + ampicilina con el precultivo. Se creció a 37°C, 220 rpm controlando la DO_{600nm}, la cual al llegar a 0,7 se procede a la inducción del cultivo agregando IPTG 1mM durante 3 horas. Luego se colectaron las células por centrifugación a 4000xg durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 5ml de buffer de resuspensión (50mM tris-Cl, PH 8.0; 100mM NaCl, autoclavado o filtrado) y se guardó a -20°C.

1.2 Purificación de la TIM mediante cromatografía de afinidad

Para esto se procedió al lisado de las células mediante sonicado. Se descongelaron las células a TA y se realizaron 3 pulsos de 2 minutos cada uno, con 30 segundos encendido y 30 segundos de descanso con una potencia máxima de 95% manteniendo el tubo en hielo. Se procedió a centrifugar a 20000xg durante 15 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante que representa la fracción soluble, y se filtró para cargarlo a la columna de purificación. Para la cromatografía de afinidad se utilizó la columna HisTrap de 1ml de GE y las siguientes soluciones: *buffer* de equilibrio (50 mM Hepes, 500 μ M NaCl, 10% Glicerol a PH 7,5); *buffer* de elución (igual al anterior más 250 mM imidazol) y *buffer* de lavado (igual al primero más 50 mM de imidazol).

Se equilibró la columna IMAC (His-Trap 1mL GE) utilizando una jeringa pasando 5v de agua destilada filtrada (5v = 5 volúmenes de columna =5mL). Luego se pasa a equilibrar la misma con 5mL de *buffer* de equilibrio. Se carga la muestra (fracción soluble), la cual debe ser filtrada con anterioridad por un filtro 0,45 μ m. Se lava pasando por la columna 20mL de *buffer* de equilibrio. Para eluir se pasa 6mL del *buffer* con imidazol y se recogen alícuotas de 1,5mL de las diferentes fracciones. Se procede a medir en espectrofotómetro las diferentes fracciones a 280nm para detectar la presencia de proteínas. Se seleccionan las fracciones con mayor absorbancia a 280nm para analizar mediante SDS-PAGE. La concentración de enzima en la fracción pura se determinó utilizando la ecuación $C = \text{Abs}/\epsilon \cdot b$ con el ϵ 36340 M⁻¹ cm⁻¹ reportado para la TIM de *L. mexicana*.

1.3 Análisis de la purificación mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

Se utilizó gel de acrilamida al 12%, preparado en base a las siguientes soluciones *stock* (acrilamida-bisacrilamida 29:1, Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (gel corrida) o 0.5 M pH 6.8 (gel carga) con SDS 0.4%, persulfato de amonio 10% y TEMED). Las muestras se mezclaron con el volumen correspondiente de *buffer* de carga reductor 4X (Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 6% DTT, 0.002 % azul de bromofenol) y posteriormente se hirvieron durante 5 minutos. Se procedió a enfriar a temperatura ambiente antes de cargar las muestras en el gel junto a un marcador de peso molecular (LMW Calibration kit, Amersham GE). La corrida normalmente se realizó a 120V durante 2 horas en *buffer* de corrida (3.3 g Tris-base, 14.4 g glicina, 1 g SDS en 1L de agua). Para la tinción se sumergió el gel en una solución de azul de Coomassie (8% ácido acético, 25% etanol, 0.4 % azul de Coomassie R) durante una hora con agitación suave. Luego se cambió a la solución de desteñir (igual a la de tinción sin el azul de Coomassie) y se incubó con agitación suave hasta la visualización de las bandas.

1.4 Medición de actividad enzimática de la TIM

La actividad se determinó mediante una reacción indirecta, en dónde la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato catalizada por la TIM se acopla a la conversión de dihidroxiacetona fosfato en glicerol 3-fosfato realizada por la enzima α -glicerol-fosfato deshidrogenasa (α GDH) (Fig. 11). Esta reacción consume NADH, por lo que puede medirse la actividad de α GDH siguiendo el descenso en la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro a 25 °C. La mezcla de reacción contiene trietanolamina 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, gliceraldehído-3-fosfato 1 mM y 0.9 unidades de α GDH. La reacción enzimática comienza con el agregado de la TIM. Para la inhibición se incubaron los compuestos a 100 μ M con 5.0 μ g de TIM en 1.0 mL de *buffer* por 2 h a 37°C. De aquí se tomaron 5 ng de TIM y se agregaron a la mezcla de reacción para medir la actividad. Los compuestos (1 mg) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración de DMSO en la mezcla de incubación

no excedió el 10%v/v en ningún caso. El porcentaje de inhibición de la TIM se calculó relativo a un control de actividad de la enzima con 10% de DMSO.

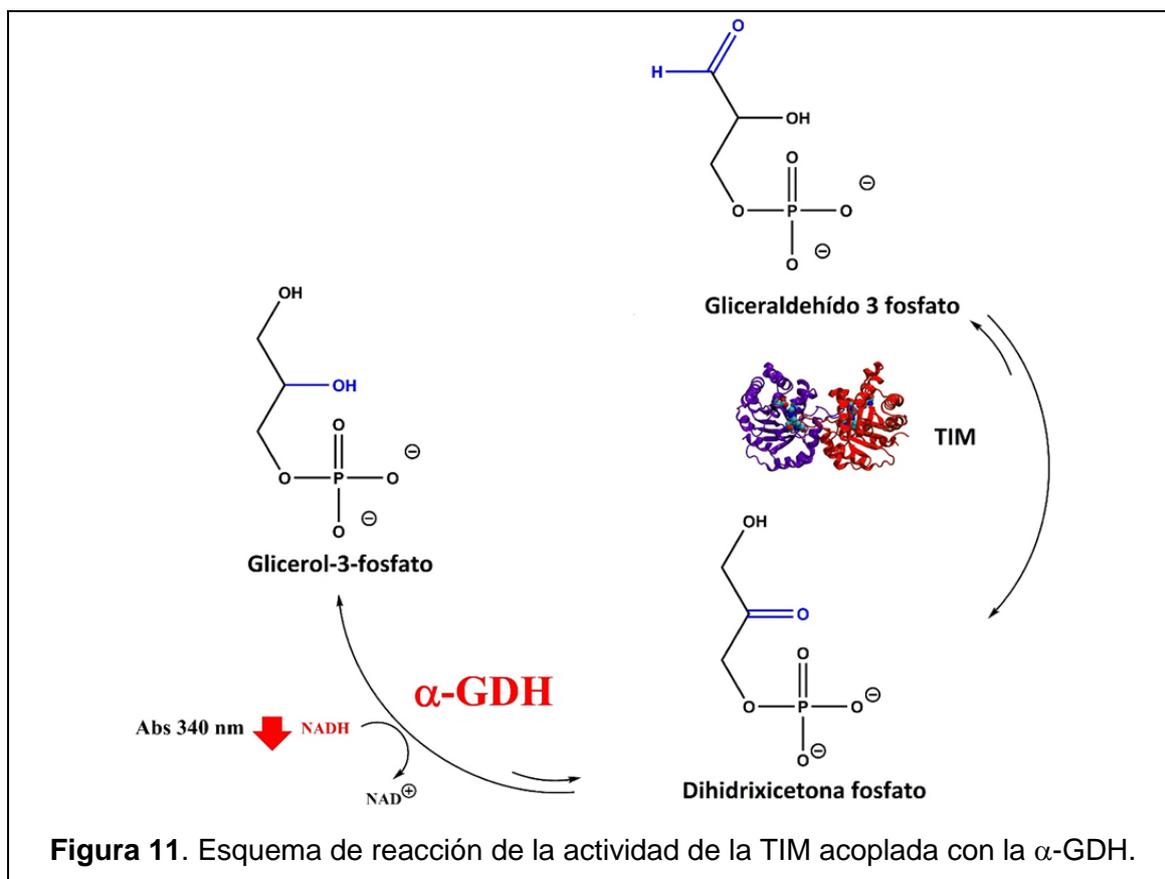


Figura 11. Esquema de reacción de la actividad de la TIM acoplada con la α -GDH.

2- Actividad *in vitro* sobre *Leishmania* spp.

El mantenimiento de las cepas *L. braziliensis* (MHOM / BR / 75 / M2904) y *L. infantum* (MHOM / FR / 91 / LEM2259V), la forma de cultivo y el aislamiento de la forma del promastigote se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía. Los promastigotes fueron cultivados a 28 °C en medio *Drosophila* de Schneider suplementado con SFB al 20%. Los promastigotes (2×10^6 parásitos / pocillo) se cultivaron en placas de plástico de 96 pocillos. Los compuestos se disolvieron en DMSO. Se añadieron diferentes diluciones de los mismos con un volumen final de hasta 200 μ L (sin exceder el 1% v/v de DMSO). Después de 48 horas a 28°C, se añadieron 20 μ L de una solución de resazurina 2 mM, y se cuantificó la oxidación-reducción a 490 y 595 nm para medir la viabilidad de los parásitos. La solución de resazurina se preparó a 2,5 mM en solución tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4, y se filtró a través de membrana de 0,22 μ m antes de su uso. La eficacia de cada compuesto se estimó calculando

los valores de IC₅₀ (como se describe más abajo). Cada experimento se realizó por duplicado y cada concentración se probó por triplicado. En las placas se colocaron los compuestos dejando dos columnas o filas libres para los controles (control medio y control parásitos).

Para la evaluación del efecto leishmanicida de los compuestos en *L. infantum* circulante en Uruguay, se contó con la colaboración del Instituto Pasteur Montevideo, laboratorio del Dr. Carlos Robello. Se utilizaron dos aislados obtenidos de 2 perros infectados (Chicha y Pluto), caracterizados por el Dr. Robello. Esta cepa se mantuvo en cultivo RPMI modificado con 20 % de SFB a 28 °C. Se realizaron pasajes sucesivos para el mantenimiento de los parásitos. Se preparó una suspensión de parásitos 6 X 10⁶ p/ml (fase exponencial de crecimiento) para agregar 100 µl en los pocillos (placa de 96 pocillos) en los cuales se les colocó los compuestos dejando dos columnas o filas libres para los controles correspondientes.

Los compuestos (1 mg) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se les agregó 1 ml del medio de cultivo. De este *stock* se diluyeron 200 µl de solución en 800 µl de medio, quedando a una concentración de 100 mg/mL y 0.4% de DMSO. Se realizaron diluciones seriadas al medio en donde se evaluaron 10 concentraciones diferentes, comenzando con 100µM. Para el recuento de viabilidad de los parásitos se utiliza la resazurina, en una concentración final de 2,5mM. Se agrega la resazurina en todos los pocillos, inclusive los blancos y a las 4 horas se mide la absorbancia a 490 nm y 595 nm.

Cálculo de IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de los parásitos):

$$R = \frac{\text{Promedio control medio A 490}}{\text{Promedio control medio A 595}}$$

$$\text{Promedio control medio A 595}$$

$$A = A_{490} - (A_{595} * R)$$

La IC₅₀ se definió como la concentración de fármaco a la que el 50% de las células son viables, en relación al control (sin agregado de fármaco), y se determinó mediante Regresión sigmoidea utilizando el software OriginLab8.5® (% de células viables en función del logaritmo de la concentración del compuesto).

3- Ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad

3.1 Ensayo de citotoxicidad en fibroblastos

Los fibroblastos murinos NCTC-Clone929 se cultivaron en medio esencial mínimo (Sigma) suplementado con SFB al 10% inactivado por calor, penicilina G (100 U/mL) y estreptomina (100 g/mL). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Para medir la viabilidad se utilizó el procedimiento con resazurina. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos a 3x10⁴ células / pocillo en 100 µl de medio de crecimiento. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%. Posteriormente, se eliminó el medio y se añadieron los compuestos a concentraciones de 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400 µM llevando el volumen de la placa a 200 µl. Después de 24 horas de incubación, se agregaron 20 µl de una solución de resazurina 2 mM a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 3 h y se midió la absorbancia a 490 y 595 nm. Cada concentración se ensayó por triplicado. Se utilizaron controles de medio y de fármaco en cada prueba como blancos. Los datos fueron analizados como se describió anteriormente.

3.2 Ensayo de citotoxicidad en macrófagos

Los macrófagos murinos J774.1 (ATCC, USA) se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina-estreptomina. Los macrófagos se siembran en una placa de 96 pocillos (5.0 x10⁴ células en 200 µL de medio de cultivo) y se incuban durante 48 h a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se retira y los compuestos disueltos en DMSO (< 0,5 %) se adicionan con medio fresco DMEM a las concentraciones finales deseadas (12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400 µM). A continuación, la placa se incuba durante 48 h a 37°C y 5 % de CO₂. Posteriormente, el medio de cultivo se retira y la viabilidad celular se evalúa midiendo la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) a formazán por acción de reductasas celulares. Para esto, se adiciona una solución de MTT (0.1 mg/mL), en PBS glucosa (0.2%) estéril y se incuba durante 3 h a 37 °C y 5% de CO₂. Se remueve la solución anterior y se disuelven los cristales de formazán adicionando 200 µL

de una mezcla de DMSO (180 μ L) y *buffer* fosfato para MTT (20 μ L) (0.1M glicina, 0.1M NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 10.5). Se mide la absorbancia a 560 nm en lector de ELISA. El valor de la IC₅₀ se determina en base al porcentaje de inhibición de experimentos realizados por duplicado.

3.3 Ensayo de Genotoxicidad (Test de Micronúcleos)

Se realiza el tratamiento agudo vía oral de ratones CD-1 de 3 meses de edad con 150 mg/kg de peso del compuesto a estudiar. Se emplean 3 grupos de tratamiento; GRUPO I: control negativo, tratado con 200 μ L de Vehículo, GRUPO II: tratado con 150 mg/Kg del compuesto a evaluar. GRUPO III: control positivo, tratado con 150 mg/Kg de ciclofosfamida. El tratamiento de cada grupo fue repetido cinco veces, totalizando 5 animales por concentración. La vía utilizada en la administración del control negativo y del compuesto en el grupo I y II fue oral utilizando una cánula esofágica y en el grupo III la vía fue intraperitoneal, para el fármaco utilizado como control positivo. La intervención se hizo en dos dosis: a las 24 y 48 h antes del sacrificio, salvo la ciclofosfamida que se administró en única dosis, 24 h antes del sacrificio. Al final del experimento se retiran los fémures y se remueve la médula ósea roja con SFB, mantenido a 37°C. Se homogeniza el material y se transfiere a un tubo de centrífuga cónico. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se prepararan las muestras con las células restantes, fijándolas en metanol absoluto por 5 minutos. Se tiñen las muestras con colorante Giemsa al 4% por 3 minutos. Se analizan en microscopio óptico de inmersión y se cuentan 1000 eritrocitos policromáticos (EPCs) por animal tratado, incluyendo los que presentaron micronúcleos (EPCMNs). También se evaluó la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) versus los eritrocitos normocromáticos (ENC), en 100 células. La proporción de EPCMNs fue calculada para cada grupo y los grupos de tratamiento con el compuesto y ciclofosfamida se comparan con el grupo control negativo. El análisis estadístico se realizó a partir de los valores individuales de los parámetros evaluados, calculándose los valores medios y sus desviaciones estándar, para cada uno de los grupos experimentales. Los datos

fueron procesados mediante el software de análisis estadístico SPSS 21.0. ANOVA ($p < 0.05$).

Se siguieron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, 2007). Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

4- Toxicidad aguda *in vivo*

Para el ensayo de *up & down* se utilizaron ratones CD1 y Balb/c, de 3 meses de edad, con un peso aproximado de entre 18-20 g empleando 2 ratones por cada grupo. Los compuestos se administraron por vía oral utilizando cánula intragástrica con el vehículo indicado a las dosis recomendadas por la FDA (se utilizó el software en línea para predicción de la dosis: Nucleic Acids Research, 2018, 46, W257–W263; doi: 10.1093/nar/gky318). Luego de la administración se observaron los animales durante 24 horas y si no había signos de toxicidad se duplicaba la dosis administrada. Se observaron por 24 horas más y, si no habían signos de toxicidad, se administraba una dosis diez veces mayor (hasta un máximo de 2000 mg/kg). Se observaron los ratones por 24 horas luego de esa última administración y se dejaron sin tratamiento con alimentación y agua *Ad libitum* por una semana. Como medida de toxicidad se observa el aspecto general y comportamiento del animal y el cambio de peso diario. Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se realizó la necropsia y se observaron macroscópicamente los órganos para visualizar signos de toxicidad. Para la predicción del DL_{50} del compuesto 1260 se utilizó el mismo software (http://tox.charite.de/prottox_II/).

5- Predicción de parámetros farmacocinéticos teóricos

Las predicciones se realizaron con el *software* gratuito en línea SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), una herramienta que permite predecir diferentes parámetros farmacocinéticos como la solubilidad en agua, la absorción gastrointestinal, penetrabilidad a través de la piel, lipofilia, biodisponibilidad, entre otros. El *input* del *software* SwissADME utiliza los códigos SMILES de las moléculas, los cuales se generaron con el programa ChemBioOffice 2010.

6- Estudios *in vivo* en modelo agudo cutáneo murino

El estudio *in vivo* en el modelo agudo cutáneo murino de Leishmaniasis se realizó en el marco de una pasantía en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) Departamento de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Asunción en Paraguay.

En este estudio se utilizaron ratones Balb/c machos de 4 a 6 semanas de edad, con un peso de 20-25 g. Se incluyeron seis ratones en cada grupo de tratamiento o grupo de control y se inocularon por vía subcutánea en la superficie superior de la pata izquierda con 1×10^7 parásitos / 50 μ l amastigotes (*Leishmania Amazonensis* PH8) obtenidos de hamsters infectados. *L. amazonensis* MHOM/IFLA/BR/67PH8, fue mantenida en el bioterio del IICS, mediante pasajes cada 8 semanas en Hamsters dorados (Golden hamsters *Mesocricetus auratus*). Después de 8 días de inoculación, los ratones se trataron por 15 días con una dosis de compuesto a evaluar de 50 mg/kg de peso corporal y misma dosis de Glucantime. Los tamaños de las lesiones se midieron semanalmente durante 5 semanas después de la infección. A los 35 días de la inoculación se termina el experimento con el sacrificio de los animales y se cuantifican los parásitos totales de la pata inoculada, por conteo en Microscopio óptico de preparados teñidos con Giemsa.

Preparación del vehículo: Constituido por 10% de tensoactivo compuesto por aceite de ricino polioxil- 40 - hidrogenado Eumulgin HRE® 40, oleato de sodio y fosfatidilcolina de soja (8:6:3), 10% de fase oleosa formada por colesterol y 80 % de *buffer* fosfato (pH = 7,4). Primero se disuelve el colesterol, Eumulgin y

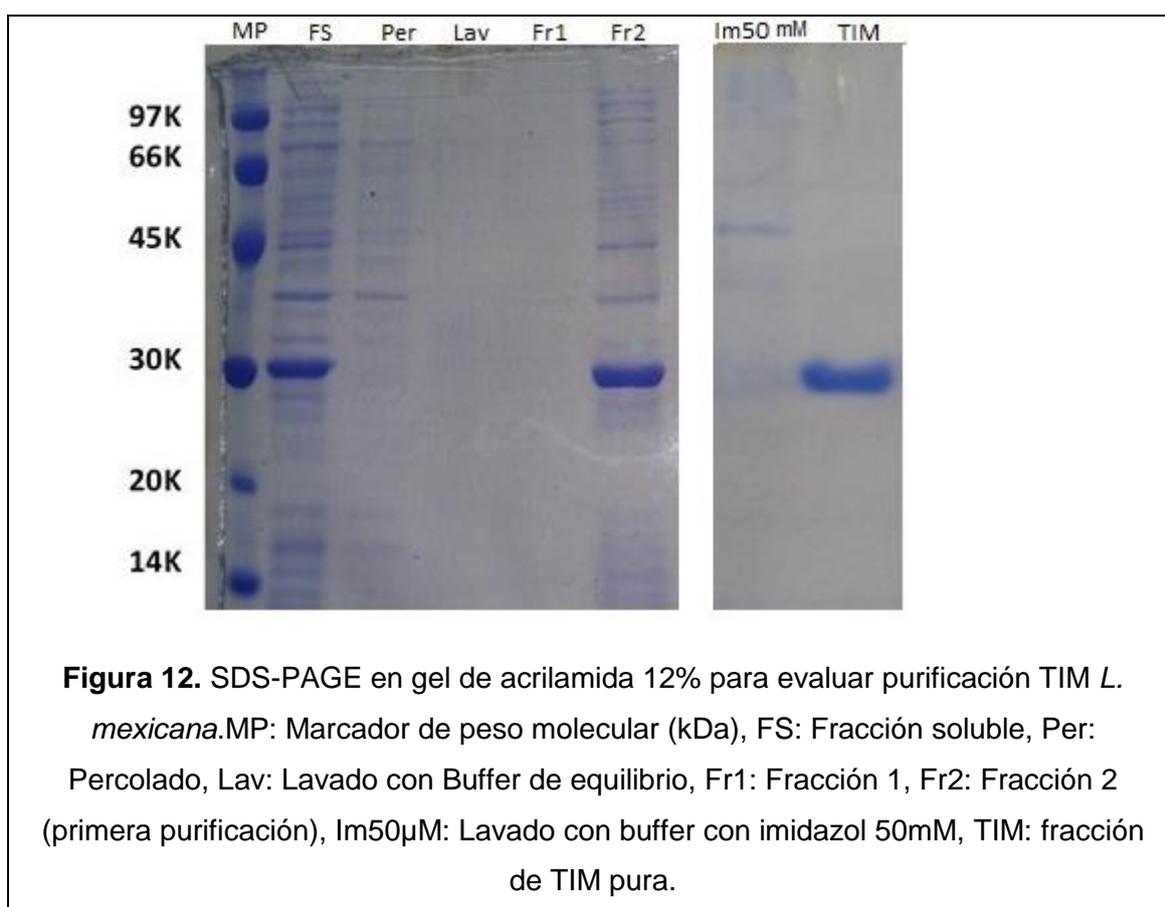
fosfatidilcolina con el compuesto, si corresponde, en cloroformo hasta solubilización completa, y se evapora a vacío el disolvente hasta sequedad.

Para asegurar la total remoción del cloroformo se hace pasar una corriente de N₂ por 5 min. Paralelamente se disuelve el oleato de sodio en el *buffer* y se deja en agitación orbital durante 12 h a temperatura ambiente. Luego se adiciona esta solución a la mezcla sólida obtenida previamente, se homogeniza y se sumerge en un baño de ultrasonido a máxima potencia durante 30 minutos. De no ser homogénea la solución o no tener la consistencia deseada, se sumerge en baño de ultrasonido durante 30 minutos más.

Resultados y discusión

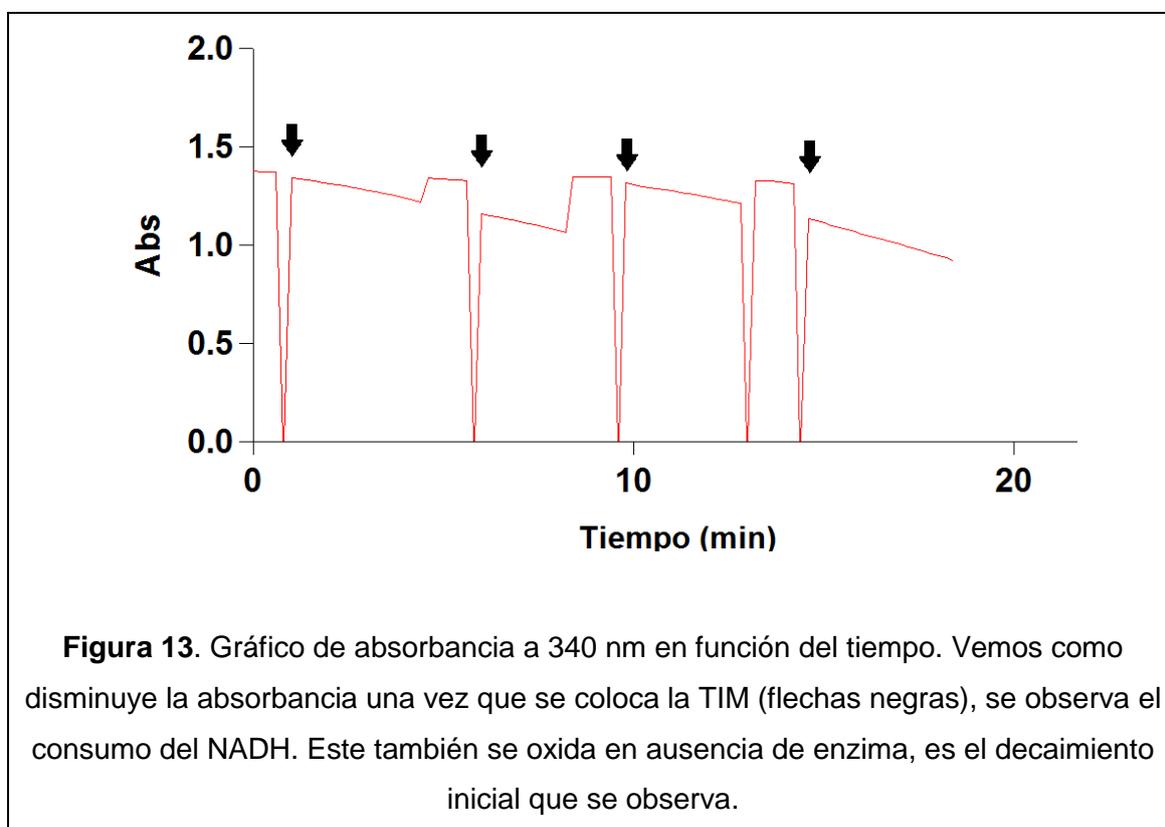
1- Producción de la TIM recombinante

Para evaluar la actividad de los compuestos seleccionados sobre la enzima TIM de *L. mexicana* se expresó la enzima recombinante en forma soluble en *E. coli* y se purificó mediante cromatografía de afinidad por níquel. El proceso de purificación de la TIM se analizó mediante SDS-PAGE (Fig. 12). Como se observa en la figura la enzima se obtiene en la fracción soluble (FS), con un peso molecular aproximado de 30 kDa. Al realizar la elución lavando previamente con *buffer* de equilibrio, la proteína eluye junto con impurezas (Fr2). Para eliminarlas se repite el procedimiento lavando con un *buffer* que contiene imidazol 50 mM antes de eluir la proteína. De esta forma se obtuvo la enzima pura (TIM).



Se midió la actividad de la enzima purificada de acuerdo al procedimiento descrito, siguiendo el consumo de NADH mediante el descenso en la

absorbancia a 340 nm. El resultado de un ensayo tipo se muestra en la figura 13. Los parámetros de velocidad fueron similares a los reportados previamente para esta enzima, asegurando la calidad de la preparación enzimática (Olivares-Illana *et al.* 2006).

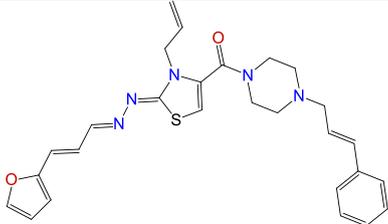
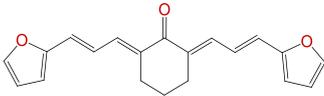
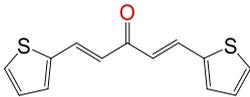
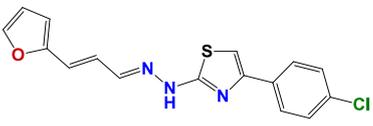
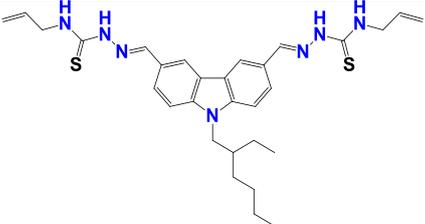


2- Evaluación de la inhibición de la TIM de *L. mexicana*

Se evaluó la actividad inhibitoria de la triosafosfato isomerasa de *L. mexicana* en 48 compuestos, de los cuales algunos fueron seleccionados en base a su capacidad de inhibir la TIM de *T. cruzi*, uno de los blancos moleculares descritos para este parásito. Nos sorprendió que ninguno de ellos resultó inhibitor de la TIM de *L. mexicana*, a pesar de la similitud estructural de las enzimas de ambos parásitos. Sin embargo, debemos recordar que los compuestos fueron diseñados buscando la desestabilización de la interfase dimérica de la TIM, la cual es la región más variable entre especies, además de que la interacción entre los monómeros es dinámica en solución (Álvarez *et al.* 2010). De los compuestos no evaluados previamente en la TIM de *T. cruzi* pero que poseen simetría estructural como la mayoría de los inhibidores reportados, se encontraron solo 2 que inhiben la TIM de *L. mexicana* a una concentración de 50 μM (moléculas **901** y **1368**). Los resultados se muestran en la Tabla 1 junto con el resultado obtenido

para los 4 compuestos líderes, previamente evaluados en *T. cruzi*. Estos 2 compuestos tienen una potencia muy baja comparada con inhibidores de TIM reportados previamente en *T. cruzi* (5×10^3 veces menor con respecto al compuesto **1019**), por lo que no se profundizará en el estudio de su actividad inhibitoria.

Tabla 1. Actividad inhibitoria de compuestos frente a la TIM de *L. mexicana* y la comparación con la actividad inhibitoria en la TIM de *T. cruzi* (Aguilera *et al.* 2016). Nd: no determinado

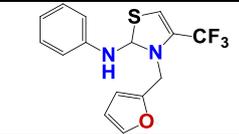
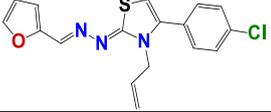
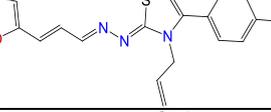
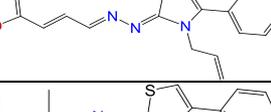
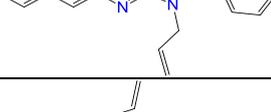
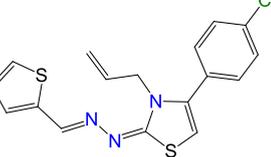
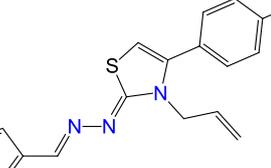
Código	Estructura	% Inhibición en <i>Lm</i> TIM (50 μ M)	IC ₅₀ en <i>Tc</i> TIM (μ M)
Hit 314		0	>25
Hit 1019		0	0.09
Hit 796		0	>25
Hit 266		0	>25
901		50	Nd
1368		50	Nd

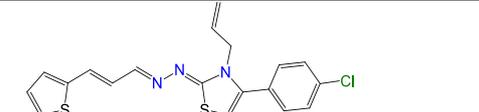
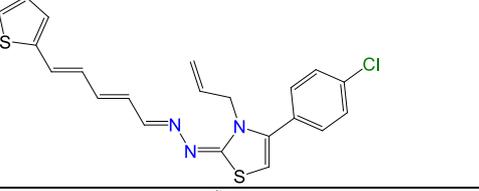
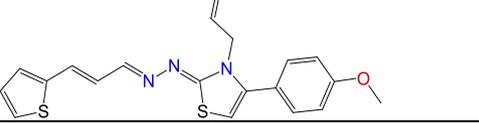
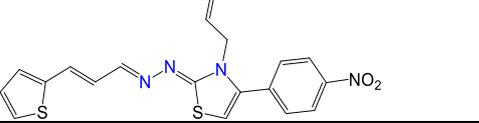
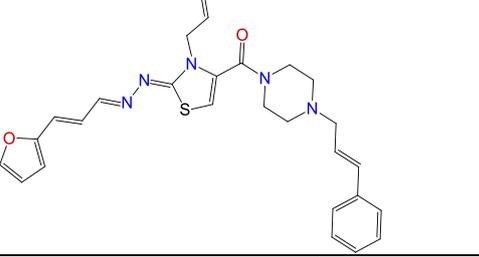
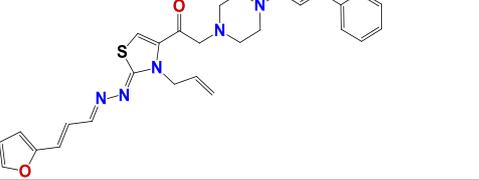
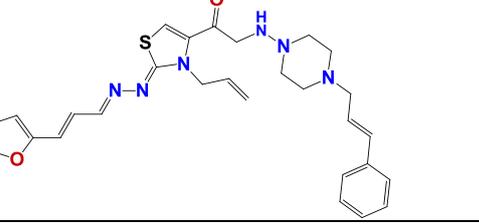
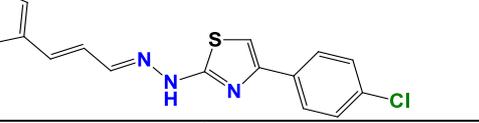
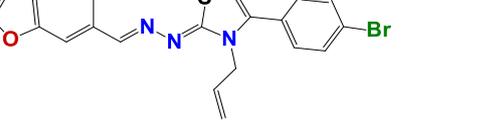
3- Actividad *in vitro* sobre *Leishmania* spp.

El segundo criterio que utilizamos para la identificación de moléculas bioactivas en el género *Leishmania* fue emplear moléculas con reconocida actividad tripanosomicida frente a *T. cruzi*. Además, se evaluaron moléculas derivadas de hits identificados con potencial citotóxico en diferentes parásitos kinetoplastideos. En la Tabla 2 (A-E) se puede observar el IC₅₀ de los diferentes compuestos, en amarillo se marcaron aquellos compuestos con potencia moderada con IC₅₀ entre 20-25 µM y en verde aquellos con IC₅₀ menor a 20µM como moléculas con alta potencia tripanosomicida. Los compuestos con IC₅₀ mayores a 25 µM fueron considerados inactivos. Las moléculas están agrupadas en 5 familias: Tiazolidenhidrazinas, Hidrazinas, Curcuminoides, Esteroides y los Seleno compuestos. En la tabla se reporta la actividad de compuestos en epimastigotes de *T. cruzi*, en promastigotes de *L. amazoniensis* (leishmaniasis cutánea) y/o *L. brasiliensis* (leishmaniasis cutánea), de *L. infantum* (leishmaniasis visceral) y de *L. infantum* aislada de 2 perros uruguayos infectados: Pluto (p) y Chicha (c). También se encuentran los datos de inhibición de los fármacos de referencia: Nifurtimox, Glucantime y Miltefosina.

Tabla 2. Actividad *in vitro* sobre *Leishmania spp*, se evaluaron especies que causan leishmaniasis cutánea o visceral, en la forma promastigotes. También se muestra la actividad de estas moléculas frente a epimastigotes de *T. cruzi*.

Tabla 2 A. TIAZOLIDENHIDRAZINAS

Estructura	Código	IC ₅₀ ± %DS (μM) epimastigotes <i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. braziliensis/L. amazonensis</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum/uy*p/c</i>
	Nifurtimox	7±2	Nd	6±2	10±2 ^c
	Glucantime	Nd	18±2	20±9	Nd
	Miltefosina	8±2	Nd	0.9±0.2	5±2
	1385	19±4	Nd	>25	9±1/>25
	1109	>25	>100	22 ± 3	Nd
	Hit 266	1.6±0.5	7±1	2.0±0.2	9±1
	872	3.0±0.5	10±1	8±2	10±5/38
	873	0.09±0.02	33±11	58±12	>25
	295	3.5±0.2	>100	>100	Nd
	133	>25	>100	33±3	Nd
	877	15±3	23±9	32±12	Nd

	1134	>25	>100	39±11	Nd
	311	13±2	>100	>100	Nd
	1133	31±10	>100	34±12	Nd
	907	>50	>100	>100	Nd
	Hit 314	3.1±0.2	12±5	4±1	1.3±0.5/ 25
	1112	1.2±0.2	>25	>25	1.5±0.2/ >25
	1115	11±4	25	>25	Nd
	901	1.2±0.3	>25/15	<25	Nd
	1153	<3	>25	>25	>25

*Aislados de dos perros infectados del primer brote en Salto-Uruguay/2016

Dentro de la familia de las **tiazolidenhidrazinas** se evaluó la actividad de 17 compuestos. Si bien 13 de estos compuestos tienen actividad tripanosomicida en epimastigotes de *T. cruzi*, solo 4 resultaron ser activos en *Leishmania* (**Hit 266, 872, Hit 314 y 901**), los cuales inhibieron la proliferación de promastigotes

de *L. infantum* a dosis menores a 25µM. Dos de ellos son los compuestos **Hit 314** y **Hit 266**. Nuestros resultados demuestran su actividad frente a diferentes especies de *Leishmania*, sumado a los perfiles farmacológicos interesantes que presentan, los convierte en candidatos para el tratamiento de la leishmaniasis.

Si hacemos un análisis cualitativo de estructura actividad puede observarse que la resonancia de los electrones con la posible apertura del anillo furano es determinante de la actividad biológica en *Leishmania*, sugiriendo que este motivo estructural es parte del farmacóforo de las moléculas. Por ejemplo, comparando el compuesto **1109** que no posee un doble enlace conjugado con el anillo furano, con respecto a los compuestos **Hit 266** y **872**, vemos que solo estos últimos presentan actividad biológica. Si variamos la densidad electrónica a lo largo de esta conjugación con la incorporación de un grupo metilo (compuesto **873**), observamos que la actividad disminuye significativamente. Al comparar con el compuesto **1134**, donde cambia un anillo furano por un tiofeno, la disminución en la actividad podría deberse a que la probabilidad de apertura de este anillo aromático es menor que la del furano (Fig. 14) (Peterson *et al.* 2014)

Es interesante notar que el compuesto **901** que mostró actividad inhibitoria de la TIM, tiene actividad tripanosomicida en *T. cruzi* y en *Leishmania spp.* La baja inhibición de la enzima no justifica su actividad biológica, lo que sugiere que esta no constituye el blanco molecular del compuesto.

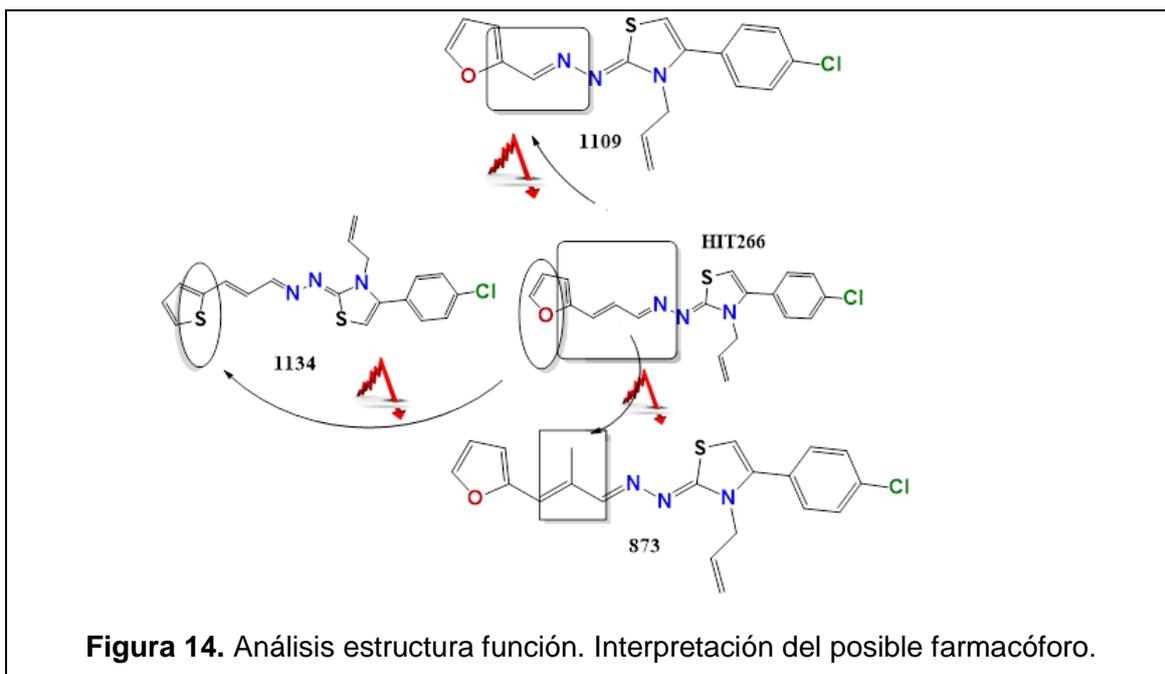
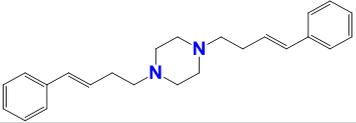
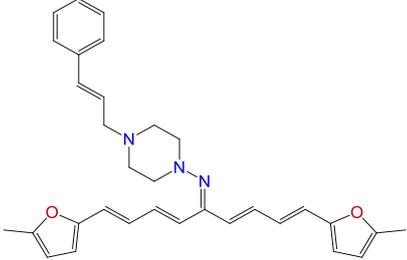
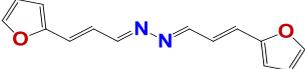
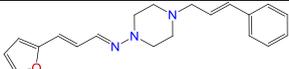
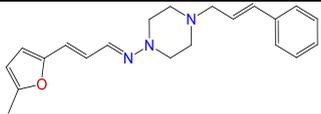
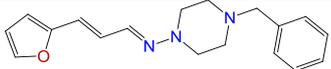
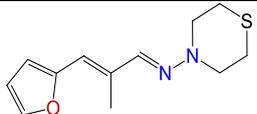
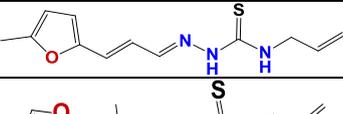
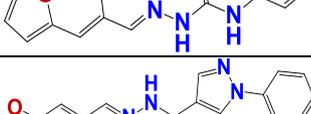
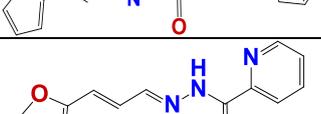
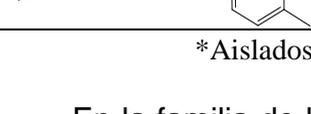


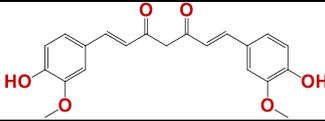
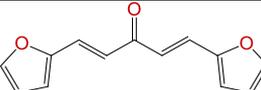
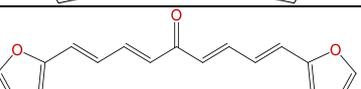
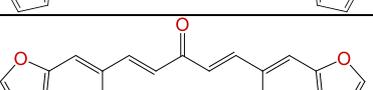
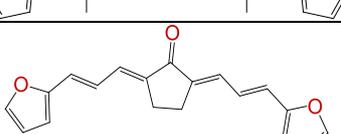
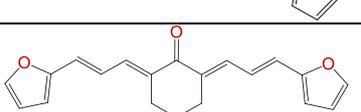
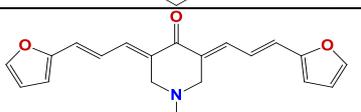
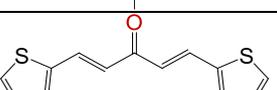
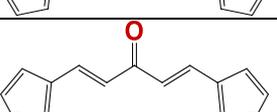
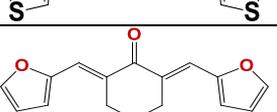
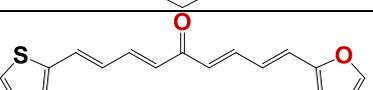
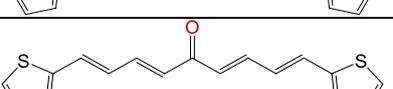
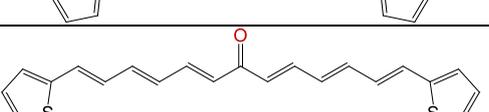
Tabla 2 B. HIDRAZINAS

Estructura	Código	IC ₅₀ ± %DS (μM) epimastigotes <i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. braziliensis</i> / <i>L. amazonensis</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum</i> uy*p/c
	1119	Nd	>25	>25	<6/>25
	1102	1.6 ± 0.3	16 ± 4	14 ± 2	5±2/>25
	1140	>25	Nd	>25	>25
	912	>25	18±5	21±2	<0.4/>25
	903	12±2	>25	>25	3±1/>25
	874	>25	> 100	> 100	Nd
	722	>25	>100	>100	Nd
	263	5±1	>25	23	<0.3/23
	909	6±1	Nd	23	10/ >25
	1366	12 ± 2	>25	>25	25/>25
	1367	>25	>25	>25	>25
	1369	15±5	>25	>25	8±2/>25

*Aislados de dos perros infectados del primer brote en Salto-Uruguay/2016

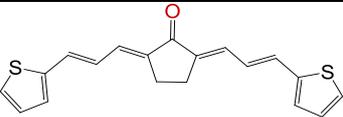
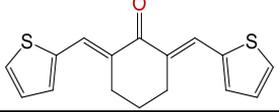
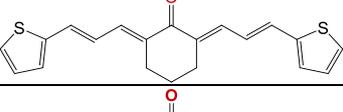
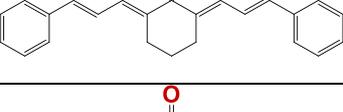
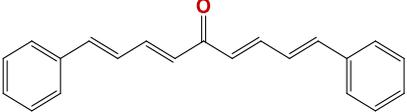
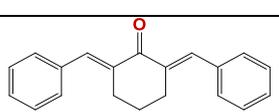
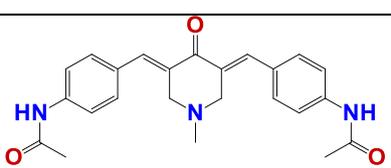
En la familia de las **hidrazinas** se evaluaron un total de 12 compuestos, donde solo el **1102** presentó buena actividad tripanosomicida. Tampoco se observa una clara correlación entre los resultados con la cepa *L. infantum* (IC₅₀ 14 μM) y las cepas circulantes en Uruguay (IC₅₀ >25 μM).

Tabla 2 C. CURCUMINOIDES

Estructura	Código	IC ₅₀ ± %DS (μM) epimastigotes <i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. braziliensis/L. amazonensis</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum uy*p/c</i>
	Curcumina	6±1	6±1	6±1	Nd
	795	24±2	10±6	6±2	Nd
	793	5.0±0.7	36±9	31±9	<0.3/>25
	809	8±2	16±2	6±1	Nd
	1223	5±2	18±4	16±4	Nd
	Hit 1019	0.6±0.2	7±1	13±7	>25
	1282	>25	>25	>25	Nd
	Hit 796	5.0±0.8	8±2	4.0±0.5	10±2/10±2
	1387	16±2	Nd	>25	25
	808	7±2	>25	>25	Nd
	1414	12±1	>25	>25	>25
	798	13±1	36±3	19±5	<0.3/>25
	805	>25	>100	30 ± 8	Nd

*Aislados de dos perros infectados del primer brote en Salto-Uruguay/2016

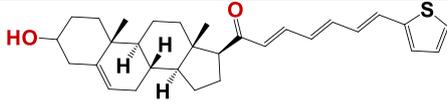
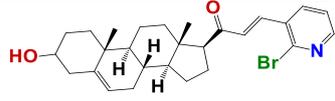
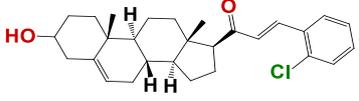
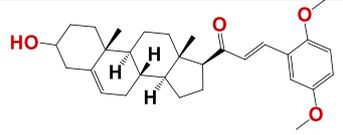
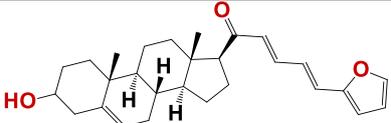
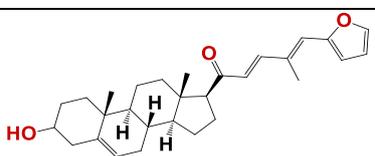
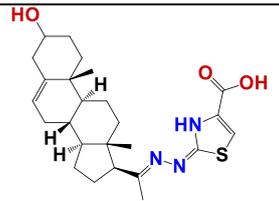
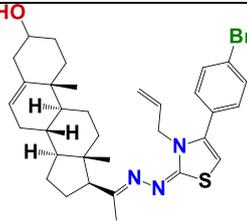
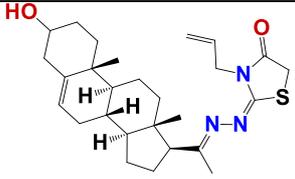
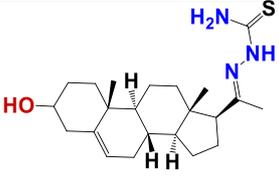
Tabla 2 C. CURCUMINOIDES

Estructura	Código	IC ₅₀ ± %DS (μM) epimastigotes <i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. braziliensis/L. amazonensis</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum</i>	IC ₅₀ ± %DS (μM) promastigotes <i>L. infantum uy*p/c</i>
	1018	0.04±0.01	>100	11±3	>25
	807	3.6±0.9	>100	>100	Nd
	1245	0.6±0.2	>100	16±3	>25
	800	14±3	>25	>25	>25
	1284	5±3	>25	>25	20
	797	11±1	>25	>25	Nd
	799	5.1±0.3	4.2±0.7	9.6±0.9	<0.3/ 12
	1281	Nd	<10/<25	<10	Nd

*Aislados de dos perros infectados del primer brote en Salto-Uruguay/2016

En el caso de los **curcuminoides** se evaluaron 20 compuestos, de los cuales 6 mostraron buena actividad sobre los promastigotes de las cepas de *Leishmania* y sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Sólo 2 de estos presentan actividad consistente entre las distintas especies de *Leishmania*, los compuestos **Hit 796** y **799**. El compuesto **Hit 1019** presentó actividad en las cepas de referencia de *Leishmania*, pero no mostró actividad tripanosomicida en las cepas aisladas en Uruguay. Los compuestos de la familia de la curcumina tienen reportada actividad biológica en diferentes organismos, incluido *Leishmania*, pero tienen la desventaja estructural de que son metabólicamente inestables. En el caso de nuestro compuesto más activo, **Hit 796**, la estabilidad metabólica podría estar incrementada por la presencia del anillo tiofeno en lugar del benceno. De todas formas, este tipo de moléculas siguen considerándose interferentes (“PAIN”) por poseer un aceptor de Michael en su estructura. Esto puede derivar en toxicidad inespecífica (Katsuno. *et al.* 2015).

Tabla 2 D. ESTEROIDES

	1319	Nd	>25	>25	Nd
	1257	Nd	>25	<20	Nd
	1259	Nd	23	>25	12/ >25
	1316	Nd	>25	>25	12/ >25
	1289	Nd	>25	<24	>25
	1287	Nd	23	<23	Nd
	1258	Nd	>25	<22	19/>25
	1272	Nd	<16	>25	3±1/>25
	1125	Nd	<20	>25	25/>25
	1260	Nd	<22	0.2±0.1	0.4±0.1/ <0.2

*Aislados de dos perros infectados del primer brote en Salto-Uruguay/2016

Por su parte en la familia de los **esteroides** se probaron 10 compuestos, que no fueron evaluados previamente en *T. cruzi*, de los cuales el compuesto **1260** presenta excelente actividad biológica sobre todas las cepas de *Leishmania*, mostrando IC₅₀ de 0.2 µM con la cepa *L. infantum* de referencia y 0.4 µM para la cepa aislada en Uruguay, siendo el compuesto más activo de los ensayados. Esta familia surge de un compuesto esteroideo aislado del huevo de la garrapata del ganado, cuya función es protegerlo de patógenos del ambiente (Zimmer *et al.* 2013) Con el objetivo de analizar compuestos derivados del mismo, se sintetizaron estas 10 moléculas sencillas. Es importante destacar que esta molécula no ha sido reportada anteriormente con actividad antiparasitaria. Sí hay descritas moléculas esteroideas con actividad biológica en *T. cruzi* y *T. brucei* (Ortiz *et al.* 2016; Cordeiro *et al.* 2008), cuyo blanco molecular es la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, por lo que esta enzima podría ser uno de los blancos moleculares a evaluar buscando dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos.

Tabla 2 E. SELENO COMPUESTOS

	1222	Nd	20	>25	25/ >25
	1219	>25	>25	>25	Nd
	1147	Nd	<28	<12	5±1/9±2
	1097	Nd	>25	20	Nd

*Aislados de dos perros infectados del primer brote en Salto-Uruguay/2016

La familia de los **seleno compuestos** surge de la sustitución del azufre de la familia de tiazoles antes descrita, por un selenio como bioisómero del mismo. Se evaluaron 4 compuestos de los cuales el **1147** es el que presentó mejor actividad biológica, siendo su IC₅₀ para *L. infantum* de referencia <12 µM, mientras que en los aislados de *L. infantum* de Uruguay presento un IC₅₀ de 5 y 9 µM.

De todos los compuestos evaluados, 7 fueron más activos (Fig. 15) en *L. infantum* de referencia en comparación con el Glucantime. De estos 7 compuestos 4 resultaron ser más activos (**796, 266, 799, 1260**) sobre la cepa de *L. infantum* aislada de Uruguay en comparación con el mismo fármaco de referencia (Glucantime). Destacándose el compuesto **1260** el cual inhibió más que el Glucantime, la Miltefosina y Nifurtimox en *L. infantum* de referencia y aislado de Uruguay. Además 40% de las moléculas con actividad contra *T. cruzi* fueron activas en *Leishmania spp*, demostrando que el criterio de selección fue exitoso. Si bien la actividad citotóxica fue evaluada solo en la forma promastigote, dado que estos compuestos fueron probados previamente en la forma amastigote de *T. cruzi* demostrando mayor potencia que en la forma epimastigote, esperamos un comportamiento similar para estas moléculas

(Álvarez *et al.* 2015, ^bÁlvarez *et al.* 2014). De todas formas, como perspectiva nos planteamos evaluar los compuestos activos en la forma amastigote de *Leishmania*.

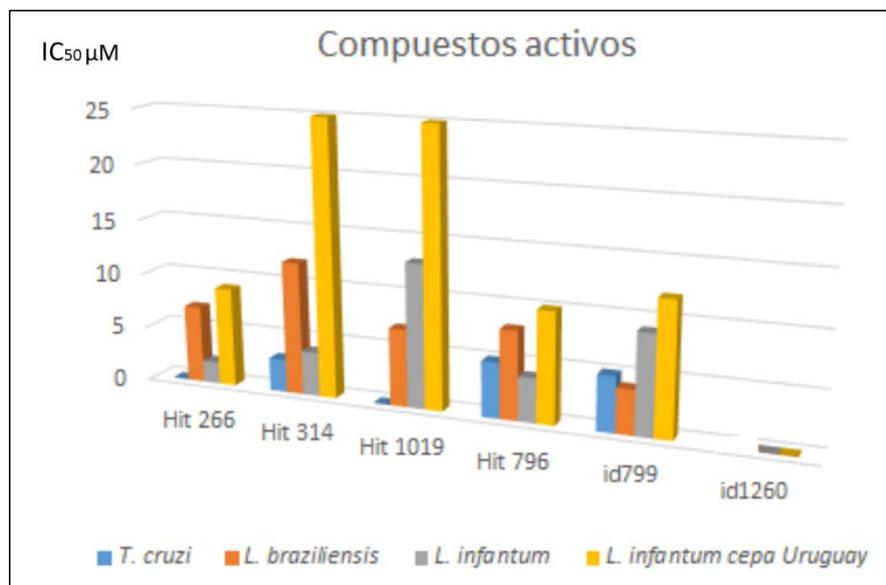


Figura 15. Compuestos con buena actividad frente a diferentes trypanosomatideos.

4- Estudios de genotoxicidad y citotoxicidad

Esta sección se divide en tres partes: toxicidad *in vitro* en células de mamíferos y análisis de la selectividad; genotoxicidad por el test de micronúcleos y toxicidad aguda oral *in vivo*. En la tabla 3 se determinó la citotoxicidad inespecífica de los compuestos con mejor actividad antiparasitaria. Para esto se tomó como criterio que el compuesto tenga actividad en las 3 especies de parásitos analizadas (*T. cruzi*, *L. amazonensis* y *L. infantum*) o que sean compuestos muy activos en *L. infantum*. Los compuestos con índice de selectividad mayor a 10 se marcaron en verde. Este se realizó comparando los IC₅₀ en las células de macrófagos (células relevantes en la infección *in vivo* con *L. infantum*) y los IC₅₀ en cultivos *in vitro* de *L. infantum*, utilizando la cepa de referencia y el aislado circulante en Uruguay.

Tabla 3. Citotoxicidad sobre células de mamífero. Se utilizaron macrófagos murinos y fibroblastos murinos. Se muestra el índice de selectividad calculado mediante la relación del IC₅₀ en macrófagos y el IC₅₀ en *L. infantum*.

Estructura	Código	IC ₅₀ ± %DE (μM) Macrófagos	IC ₅₀ ± %DE (μM) Fibroblastos	IS Macrófagos/ <i>L. infantum</i>	IS Macrófagos/ <i>L. infantum</i> /uy ^c
	Nifurtimox	200±9	Nd	33	20
	Glucantime	15±1	Nd	0.75	Nd
	Miltefosina	50±7	Nd	56	10
FAMILIA DE TIOZOLIDENHIDRAZINAS					
	Hit 266*	60±6	405±10	30	7
	872	66±7	319±16	8	2
	Hit 314	30±5	346±9	8	1
FAMILIA DE CURCUMINOIDES					
	Curcumina	10±2	Nd	2	Nd
	795	115±2	114±6	19	Nd
	809	33±8	543±6	6	Nd
	1223	19±6	Nd	1	Nd
	Hit 796*	38±7	158±5	10	4
	799*	115±8	Nd	12	10
FAMILIA DE ESTEROIDES					
	1260	50±2	Nd	250	250

^ces la cepa *L. infantum* aislada de la perra Chicha; * compuestos con actividad en todas las especies analizadas

De los 9 compuestos seleccionados con actividad antiparasitaria, 5 tienen índices de selectividad mayores a 10. Sin embargo todos ellos demostraron ser más selectivos que el glucantime, uno de los fármacos de referencia. Dentro de la familia de las **tiazolidenhidrazinas**, de los dos *hits* activos el **Hit 314** fue menos selectivo que el **Hit 266**. Además, en relación a la cepa circulante en Uruguay el **Hit 266** fue igualmente selectivo que la miltefosina, el fármaco empleado en el tratamiento de la leishmaniasis visceral (Pérez Tort *et al.* 2009) y fue activo en todas las especies parasitarias analizadas. Dentro de la familia de los **curcuminoideos** vemos que la curcumina es poco selectiva en comparación con los derivados activos **795**, **Hit 796** y **799**. Los curcuminoideos a pesar de ser compuestos que usualmente son considerados “PAIN”, nuestros resultados demuestran que pueden encontrarse moléculas selectivas. Además, los compuestos **796** y **799** mostraron actividad biológica en todas las especies de kinetoplástidos estudiadas. De la familia de los **esteroides** el único que mantuvo la actividad leishmanicida en la cepa circulante en Uruguay fue el compuesto **1260**. El estudio de citotoxicidad mostró que posee excelente índice de selectividad, superior a todos los fármacos de referencia empleados actualmente. Para evaluar la citotoxicidad utilizamos además fibroblastos murinos, observándose que los compuestos con baja toxicidad muestran resultados consistentes en ambos tipos celulares. Para todos los compuestos analizados la citotoxicidad hacia fibroblastos fue menor que para macrófagos, siendo otro motivo por el cual el índice de selectividad se estimó utilizando este último tipo celular.

En la Tabla 4, se presentan los resultados del test de micronúcleos, utilizado para evaluar la genotoxicidad con un tratamiento a una dosis fija en ratones de 150 mg del compuesto **1260** /kg de peso. Se emplea un control negativo administrando únicamente el vehículo y un control positivo de tratamiento intraperitoneal con 40 mg/Kg de ciclofosfamida, un conocido agente genotóxico. Este ensayo está incluido en los recomendados por la FDA para predecir toxicidad sobre el ADN durante el proceso de desarrollo de medicamentos. En trabajos previos de nuestro grupo ya se había realizado este test a los compuestos **Hit 266**, **796** y **314**, encontrándose que no son genotóxicos. Los

mismos tienen también el test de AMES negativo que evalúa la capacidad mutagénica de las moléculas (Álvarez *et al.* 2014, ^bÁlvarez *et al.* 2015).

Tabla 4. Resultados del ensayo de micronúcleos para el tratamiento con 150 mg/Kg de **1260**.

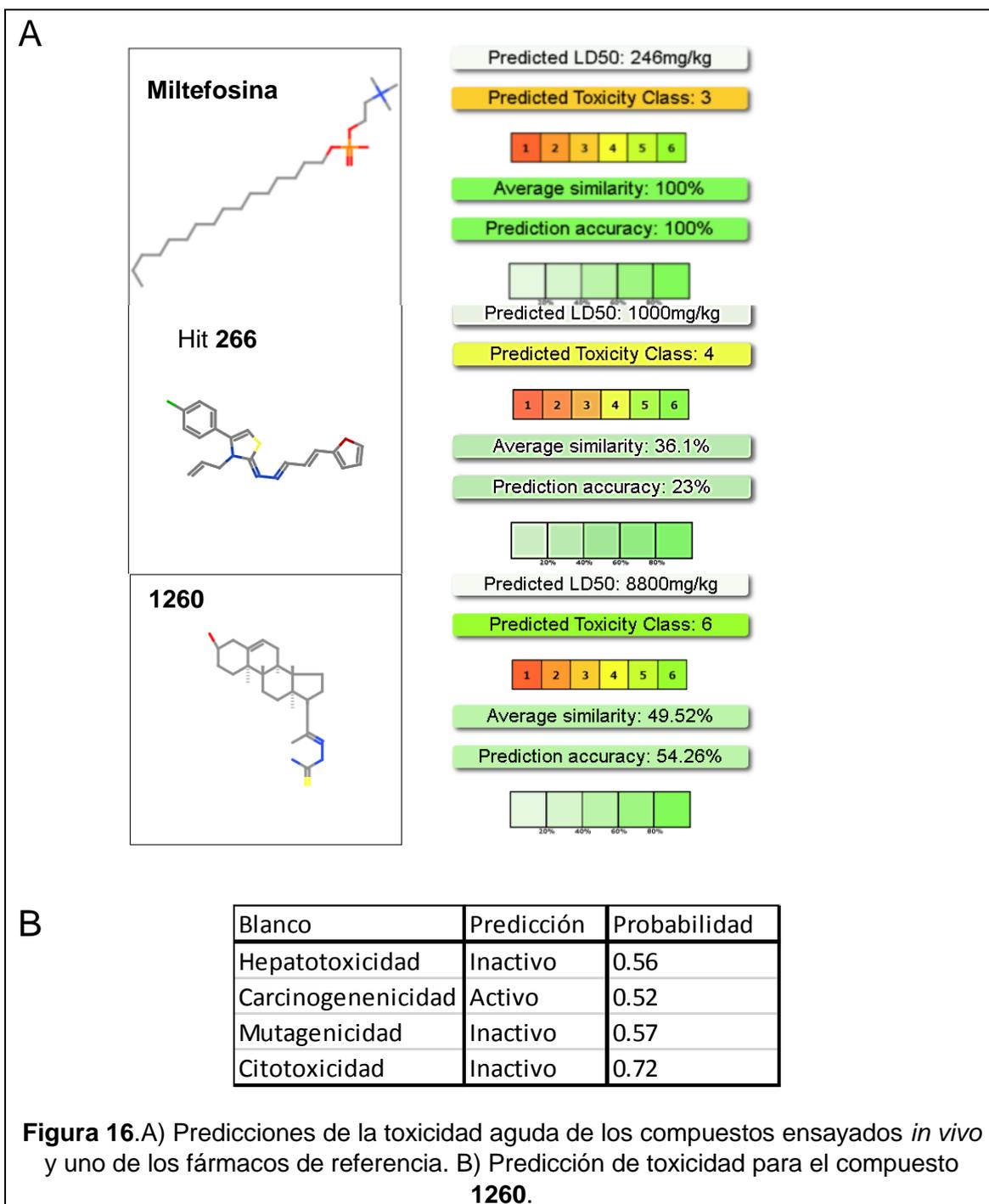
Tratamiento*	Número de EPMn**	Número de EPC ⁺	Media de Mn/ ratón ±DE**
Control	19	5000	4±1
1260	24	5000	5±1
Ciclofosfamida	180	5000	36±2

*Se realizan 5 ensayos idénticos en momentos independientes, **Sumatoria de los eritrocitos policromáticos micronucleados encontrados en los 5 ensayos, ⁺Eritrocitos policromáticos observados en total, ^{**}Porcentaje de eritrocitos policromáticos micronucleados ± desviación estándar

Se observa que el número de células aberrantes en el tratamiento con el compuesto **1260** es de 24, similar al control negativo y significativamente menor en comparación con el control positivo donde se encontraron 180 eritrocitos policromáticos micronucleados. Podemos concluir entonces que el compuesto evaluado no presenta genotoxicidad.

Finalmente se evaluó la toxicidad aguda en ratones del compuesto **Hit 796** por el ensayo de *up & down*, resultando una DL₅₀ >2000 mg/kg de peso. Los compuestos **Hit 266** y **314** ya fueron evaluados previamente en nuestro grupo mediante este ensayo obteniéndose el mismo resultado (Álvarez *et al.* 2014, ^bÁlvarez *et al.* 2015). Por lo cual ninguno de estos compuestos presenta toxicidad aguda *in vivo*. Para el compuesto **1260** se utilizó un *software* predictor de toxicidad, ProTox-II, que utiliza un conjunto de millones de grupos químicos asociados a efectos tóxicos y predice la DL₅₀ a partir de la estructura química del compuesto. Además, la predicción fue de una similitud de alrededor del 50% (*Average similarity* y *Prediction accuracy*) lo cual significa que es confiable, ya que este compuesto fue similar a otros con toxicidad reportada experimentalmente. En la Figura 16A y B se muestran los resultados de la predicción de toxicidad para el compuesto **1260**, obteniéndose una DL₅₀ de 8800 mg/kg, por lo que se clasifica en la clase 6 (compuestos de toxicidad muy baja). Además, el programa estima que el compuesto no presenta hepatotoxicidad,

mutagenicidad ni citotoxicidad, aunque sí lo clasifica como carcinogénico (Fig. 16B). Para comparar se realizó también la predicción para el **HIT 266** y para el fármaco de referencia Miltefosina (Fig. 16A). Se obtuvieron resultados de no toxicidad para el **HIT 266** concordantes con los ensayos experimentales, con DL_{50} de 1000 mg/kg. Es interesante notar que la toxicidad de la Miltefosina es mucho más elevada que la de nuestros compuestos, 246 mg/kg, clasificándose en la categoría 3 (compuestos con toxicidad moderada).



Si bien los perfiles toxicológicos de los compuestos son prometedores, deben realizarse más evaluaciones, como por ejemplo estudiar el efecto teratogénico, el efecto hepatotóxico, la toxicidad por administración a largo plazo, entre otros. Para los compuestos **HIT314** y **HIT266**, se realizaron estos estudios en trabajos previos, incluyendo el chequeo de función hepática en ratón, no encontrándose signos de toxicidad a las dosis ensayadas (Álvarez *et al.* 2014, ^bÁlvarez *et al.* 2015). Por consiguiente, la exploración toxicológica realizada es suficiente para continuar con estudios de eficacia *in vivo*.

5- Parámetros farmacocinéticos

En la Tabla 5 se presentan los parámetros farmacocinéticos que comúnmente se evalúan en etapas tempranas del desarrollo de un fármaco, para los compuestos líderes y para los fármacos de referencia para la Leishmaniasis y la Enfermedad de Chagas, Miltefosina y benznidazol, respectivamente. En la figura 17 se muestra como ejemplo la predicción de los parámetros para el compuesto **1260**. Se realizó el mismo análisis con todos los compuestos y los resultados se presentan en la Tabla 5. Todos los compuestos evaluados son poco solubles en agua al igual que la Miltefosina, y presentan una solubilidad entre 10 y 100 veces menor que el Benznidazol. Asimismo, la Miltefosina y nuestros compuestos poseen una alta lipofilia. Por otro lado, las moléculas estudiadas muestran mayor penetrabilidad a través de la piel, una característica que puede ser ventajosa para la administración tópica del tratamiento de la leishmaniasis cutánea. Finalmente, es interesante destacar que el único compuesto que atravesaría la barrera hematoencefálica sería el **HIT796**, lo que sugiere que podría ser activo frente a *Trypanosoma brucei* y emplearse para el tratamiento de la enfermedad del sueño (Dauchy *et al.* 2016). Previamente fue evaluada la estabilidad metabólica de los compuestos **HIT266**, **HIT314** y **HIT796** utilizando la fracción microsomal, los dos primeros demostraron estabilidad a más de 4 horas mientras el **HIT796** comienza a ser metabolizado en menos de 2 horas (Álvarez *et al.* 2014, ^aÁlvarez *et al.* 2015, Aguilera *et al.* 2016). Se podría trabajar en la optimización de la solubilidad y la estabilidad metabólica de las moléculas mediante modificaciones químicas que mantengan la actividad antiparasitaria.

Tabla 5. Predicción de parámetros farmacocinéticos empleando el software SwissADME.

Compuesto	Solubilidad (mg/ml)	Absorción gastrointestinal	Permeabilidad BHE*	Penetrabilidad de la piel (cm/s)	Biodisponibilidad	Lipofilia
Miltefosina	1.9 x10 ⁻³	Baja	No	-4.0	0.55	3.8
Benznidazol	2.3	Alta	No	-7.2	0.55	0.5
1260	9.7 x10 ⁻³	Alta	No	-5.8	0.55	3.9
314	3.5 x10 ⁻³	Alta	No	-6.3	0.55	4.2
266	2.2x10 ⁻³	Alta	No	-5.2	0.55	4.8
796	3.9x10 ⁻²	Alta	Si	-5.3	0.55	3.7

*barrera hematoencefálica

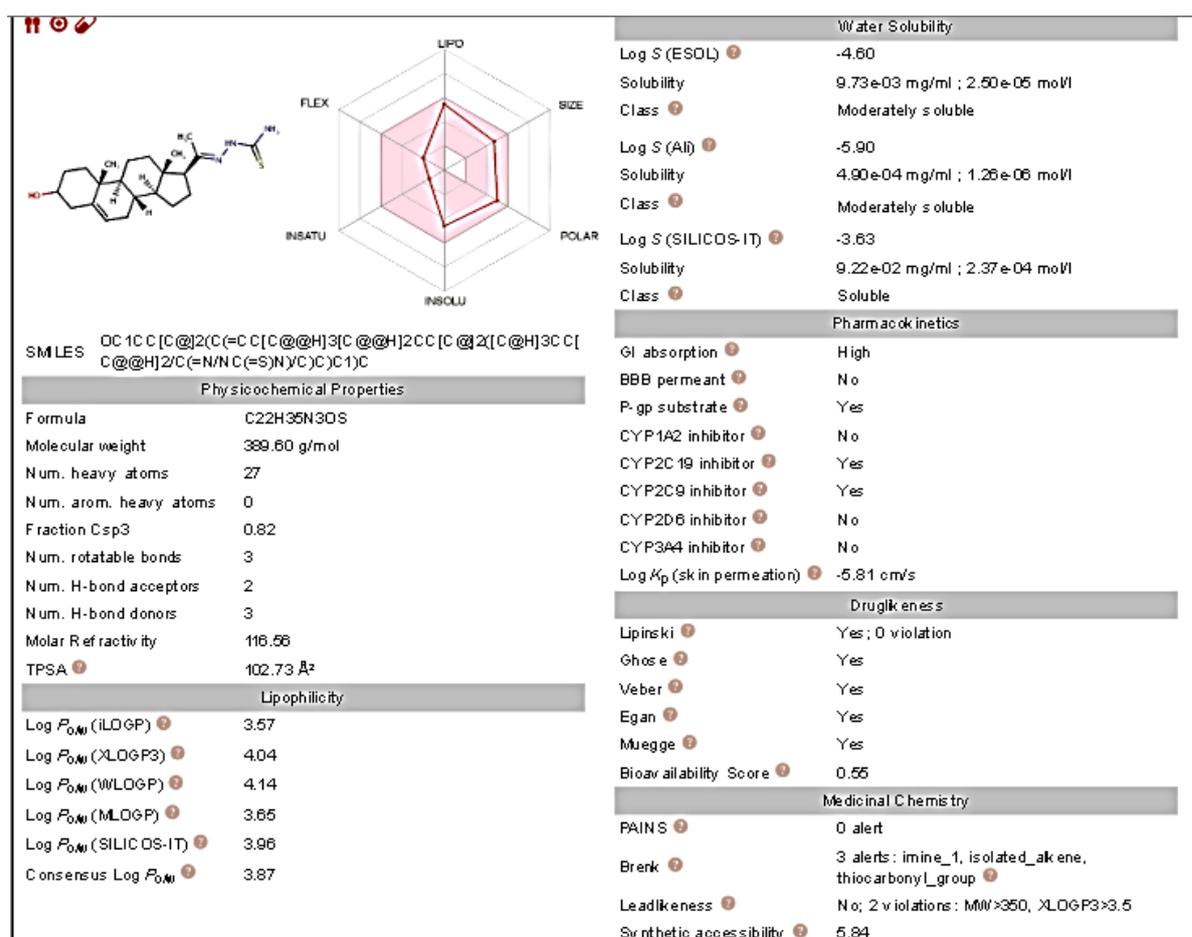


Figura 17. Predicción de los parámetros farmacocinéticos para el compuesto 1260

6- Estudios *in vivo* en modelo agudo cutáneo murino

Se seleccionaron 4 compuestos para evaluar la eficacia *in vivo* en un modelo murino de leishmaniasis cutánea. Los resultados se presentan en la Tabla 6. Se empleó este modelo en vez del modelo visceral, por su sencillez metodológica y porque permite reducir significativamente el número de animales necesarios para el ensayo. Además, como observamos que en general los compuestos activos se comportan de forma similar en las especies de *Leishmania* que causan la enfermedad cutánea y visceral estudiadas en este trabajo (*L. amazonensis* y *L. infantum*, respectivamente), esperamos tener eficacia similar en ambos modelos.

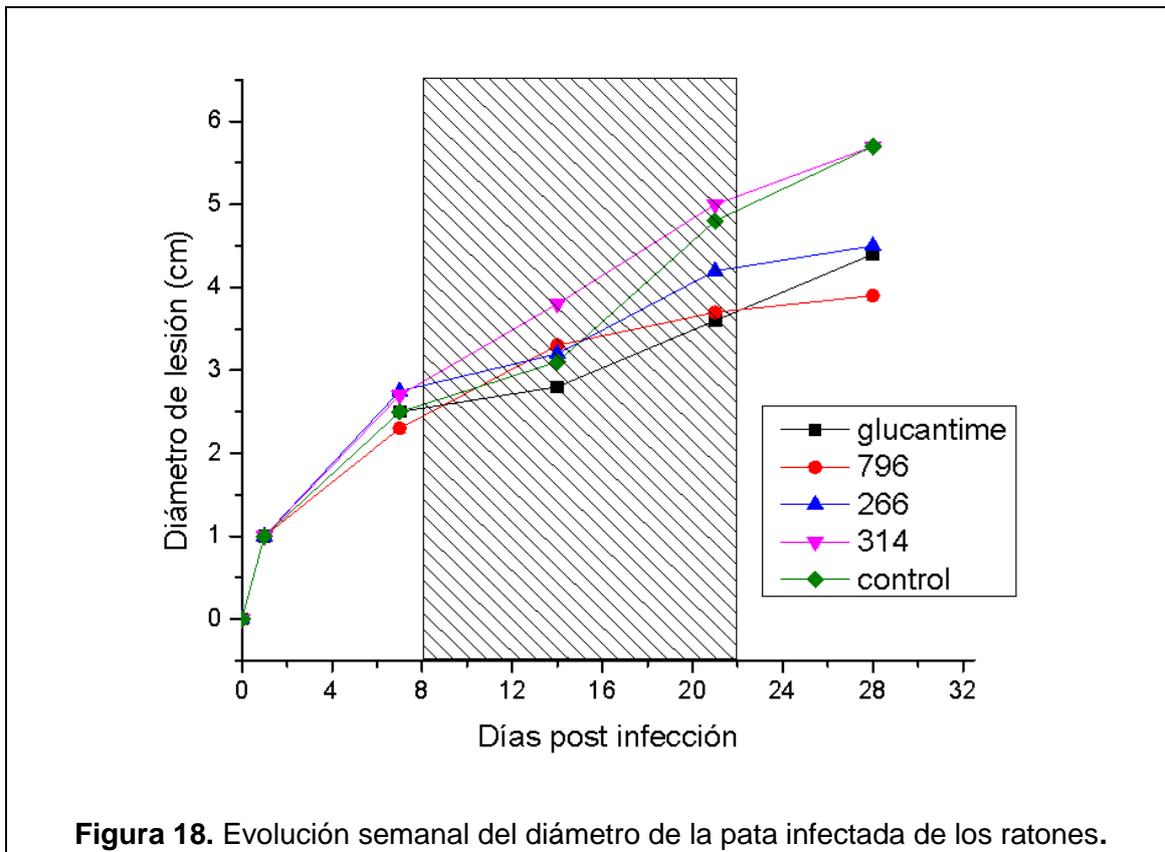
En este ensayo 1×10^7 parásitos amastigotes de *L. amazonensis* PH8 fueron inoculados en la parte superior de la pata izquierda de los ratones. Como se muestra en la Figura 17, al día 8 post-infección se comenzó el tratamiento durante 14 días con los compuestos mencionados y el medicamento de referencia, Glucantime. Los ratones se sacrificaron a los 35 días post-infección.

Se evaluó el efecto antiparasitario por dos métodos: la evolución semanal del diámetro de la pata infectada durante todo el experimento (Fig. 18) y la cuantificación de la carga parasitaria en la zona infectada al finalizar el experimento (Tabla 6. Porcentaje de supresión de parásitos).

Tabla 6. Ensayo *in vivo* en el modelo de leishmaniasis cutánea murina para los compuestos líderes.

Compuesto	Dosis mg/kg	Dosis μ mol/kg	Duración tratamiento en días	Vía	% de supresión de parásitos*
Hit 796	50	203	14	Oral	55
Hit 314	50	102	14	Oral	10
Hit 266	50	135	14	Oral	30
796/314/266	5/25/25	20/50/68	14	Oral	43
1260	50	128	14	Oral	27
Glucantime	100	273	14	Subcutánea	40
Control	0	0	14	Oral	0

*porcentaje de parásitos en la pata inoculada del ratón al finalizar el experimento, con respecto al ratón control



De los 3 compuestos líderes, el **HIT 796** presentó un 55% de supresión de parásitos, comportándose mejor que el fármaco Glucantime (43%), incluso siendo administrado a una dosis menor. El porcentaje de supresión de parásitos de las demás moléculas evaluadas fue menor a 30%. Hay evidencia de que la administración conjunta de tiadiazolhidrazinas y curcuminoídes tienen efectos sinérgicos sobre *T. cruzi* (Aguilera. *et al.* 2018). Se decidió entonces evaluar en una misma formulación los 3 compuestos líderes a dosis menores, el **HIT** más activo **796** se redujo 10 veces su concentración mientras que la dosis de los **HIT 314** y **266** se redujo a la mitad. El porcentaje de supresión de parásitos obtenido fue de 43%, cercano al que mostró inicialmente el **HIT796** al ser administrado a una dosis 10 veces mayor, lo que sugiere que hay sinergismo en el efecto biológico observado.

Por otro lado, en la Figura 17 podemos observar que cuando comienza el tratamiento con los compuestos **HIT796** y **HIT266** el diámetro de la pata

comienza a estabilizarse, indicando la estabilización en la inflamación que se supone es directamente proporcional a la carga parasitaria.

Nos sorprendió que no se observara actividad leishmanicida frente a la administración del compuesto **HIT314**. Este compuesto fue el que mejor respuesta demostró en el modelo *in vivo* de infección con *T. cruzi* (^aÁlvarez *et al.* 2015, ^bÁlvarez *et al.* 2015), reduciendo más del 60% de la parasitemia con un 100% de sobrevida a la misma dosis evaluada en *Leishmania*. Esto podría deberse en parte a que observamos gran variabilidad del aspecto final de las formulaciones en la preparación del vehículo con el compuesto **HIT314**, que no pudimos mejorar debido a problemas de solubilidad. Esto es determinante en la correcta absorción *in vivo* y el concomitante efecto antiparasitario. Por esto, la variabilidad observada entre ensayos posiblemente refleja problemas farmacocinéticos, ya que este compuesto compartiría farmacóforo con el **HIT266**.

El Glucantime se comporta de forma similar a nuestros compuestos activos (**HIT 796** y **266**). Cuando dejan de administrarse los fármacos, el diámetro de la pata continua aumentando, por lo que este tiempo de tratamiento no es suficiente para matar a todos los parásitos. Esto demuestra que hay que ajustar los parámetros farmacocinéticos y optimizar el tiempo y dosis de administración de los compuestos para obtener una cura de la infección. Cabe destacar que el efecto anti-leishmanicida de estos compuestos se obtuvo mediante un tratamiento oral, lo que representa el método preferido de administración en comparación con las vías más invasivas que requieren el uso de inyectables.

Conclusiones

De los 50 compuestos evaluados en este trabajo, podemos concluir que 3 de los compuestos líderes (**HIT 796, 266, 314**) y el compuesto **1260**, resultaron tener buena actividad antiparasitaria en diferentes especies de tripanosomatideos. Además, estas moléculas tienen bajos efectos citotóxicos inespecíficos, y no mostraron efectos genotóxicos *in vivo*, ni mutagénicos según el test de AMES. Además muestran una ventana terapéutica amplia ya que vemos efecto en los modelos *in vivo* a dosis 50 veces menores que las tóxicas.

En cuanto al mecanismo de acción de los compuestos evaluados, cabe destacar que la TIM no sería su blanco molecular, por lo cual el mecanismo de acción aún no está claro. Dada la importancia de conocer el blanco de un fármaco a la hora de optimizar el diseño de moléculas que tengan mayor eficacia y menor toxicidad, la determinación del mecanismo de acción de estos compuestos es una de las perspectivas de este trabajo. Igualmente, se identificó un motivo estructural como posible farmacóforo de estos compuestos que involucra un anillo aromático conjugado a un doble enlace, que parece derivar en dos motivos distintos con perfiles de actividad biológica diferentes. En las tiazolidenhidrazinas sería el anillo furano conjugado a dobles enlaces y un nitrógeno, mientras que en los curcuminoides el farmacóforo estaría representado por un anillo aromático conjugado a dobles enlaces y un carbonilo.

En relación a los parámetros farmacocinéticos de los compuestos que se probaron en el modelo *in vivo*, se observa que las predicciones fueron similares a los parámetros que muestra la miltefosina. Incluso, algunos se estima que poseen mayores niveles de absorción gastrointestinal y, absorción en piel, cualidades deseables para un fármaco a utilizarse en el tratamiento de la leishmaniasis. Igualmente algunos parámetros deben ser optimizados, como la solubilidad y la estabilidad metabólica, sugiriendo modificaciones estructurales para trabajos futuros con estas moléculas.

Es importante mencionar que la administración por vía oral de los compuestos utilizada en el modelo *in vivo*, fue eficiente para mostrar efectos antiparasitarios. Esto último tiene muchas ventajas en este tipo de enfermedades desatendidas, donde el costo del fármaco debe ser bajo y su vía de administración sencilla.

A esto se suma que el tratamiento también tiene que ser adecuado para ser utilizado en perros. En este sentido, se puede resaltar que la síntesis de estas moléculas es sencilla y económica si lo comparamos con los fármacos de referencia, lo cual puede derivar entonces en medicamentos de bajo costo.

Antes de continuar hacia una fase clínica en perros, es necesario el escalado en la síntesis de los compuestos para obtener cantidades suficientes para los estudios clínicos. Esto no sería una limitante dado que las moléculas líderes presentan buenos rendimientos sintéticos. Además, se deben de optimizar los parámetros farmacocinéticos y definir un esquema de tratamiento adecuado, que nos permita determinar la eficacia de los compuestos para la cura de la leishmaniasis canina.

Bibliografía

Aguilera, E., Varela J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N., Cerecetto, H., Alvarez, G., González, M. (2018). Looking for combination of benzimidazole and *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors for Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 113(3): 153-160.

Aguilera, E., Varela, J., Birriel, E., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Alvarez, G. (2015). Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. ChemMedChem, 11(12), 1328–1338.

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D., (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis, Mol. Asp. of Med. 57, 1-29.

Álvarez, G., Aguirre-López, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., López, G. V., Lavaggi, M. L., Porcal, W., Di Maio, R., González, M., Cerecetto, H., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (2010) Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. European Journal of Medicinal Chemistry. 45, 5767-5772.

Álvarez, G., Varela, J., Márquez, P., Gabay, M., Arias Rivas, C.E., Cuchilla, K., Echeverría, G. A., Piro, O. E., Chorilli, M., Leal, S. M., Escobar, P., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N. I., González, M., Cerecetto, H. (2014). Optimization of antitrypanosomatid agents: identification of nonmutagenic drug candidates with *in vivo* activity. J Med Chem. 57(10):84-99.

^aÁlvarez, G., Varela, J., Cruces, E., Fernández, M., Gabay, M., Leal, S. M., González, M. (2015). Identification of a New Amide-Containing Thiazole as a Drug Candidate for Treatment of Chagas' Disease. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(3), 1398–1404.

^bÁlvarez, G., Martínez, J., Varela, J., Birriel, E., Cruces, E., Gabay, M., Leal, S. M., Escobar, P., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Yaluff, G., Torres, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., González, M. y Cerecetto, H. (2015). Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Identification of new nonmutagenic agents that are active *in vivo*. Eur J Med Chem, 10, 46-56.

Berenger, J. M; Parola, P. (2017). 12 - Arthropod Vectors of Medical Importance. Infectious Diseases, Elsevier (4ta Edición), 1:104-112.e1

Bustamante, J. M., & Tarleton, R. L. (2011). Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. Expert Opinion on Drug Discovery, 6(6), 653–661.

Campos, M. P. de., Luca, P. M. D., Renzetti, A. R. dos S., Souza, S. M. M. de., Mendes Júnior, A. A. V., Barros, R. S., & Figueiredo, F. B. (2017). Can vaccines against canine

visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health?, *Ciência Rural*, 47(4).

Casanova, M. I., Martín, S., Marco, A., & Solano-Gallego, L. (2019). Detection of *Leishmania spp.* Infection by Immunohistochemistry in Archived Biopsy Samples from Dogs with Colitis in an Area Endemic for Leishmaniasis. *Journal of Comparative Pathology*, 167, 12–17.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., y Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Review Microbiology*, 5(11), 873-882.

Chawla, B., & Madhubala, R. (2010). Drug targets in *Leishmania*. *Journal of Parasitic Diseases*, 34(1), 1–13.

Choi, B. S., Abebe, T., Modolell, M., Fuentes, J. M., Munder, M., Müller, I., Hailu, A. (2008). Age-Related Alteration of Arginase Activity Impacts on Severity of Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(5), e235.

Corpas-lopez, V., Moniz, S., Thomas, M., Wall, R. J., Torrie, L. S., Zander-dinse, D., Tinti, M., Brand, S., Stojanovski, L., Manthri, S., Hallyburton, I., Zuccotto, F., Wyatt, P. G., Rycker, M. D., Horn, D., Michael, A., Ferguson, J., Clos, Joachim., Read, Kevin D., Fairlamb, Alan H., Gilbert, Ian H., Wyllie, Susan. (2018). Pharmacological validation of N -myristoyltransferase as a drug target in *Leishmania donovani*. *ACS Infectious Diseases*. 5 (1), 111-122

Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 1–8.

Dauchy, F. A., Bonhivers, M., Landrein, N., Dacheux, D., Courtois, P., Lauruol, F., Robinson, D. R. (2016). *Trypanosoma brucei* CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(11), e0005125.

Denerolle, P. and Bourdoiseau, G. (1999). Combination Allopurinol and Antimony Treatment versus Antimony Alone and Allopurinol Alone in the Treatment of Canine Leishmaniasis (96 Cases). *J Vet Intern Med*; 13:413–415

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27(5), 5-18.

Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F. y Martín-Sánchez, J. (2014). High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet Parasitol* 202(3-4), 119-127.

Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavete, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozobel, Y. y Boelaert, M. (2008). Spread of vector borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 1013-1018.

Fernandes, A. P., Costa, M. M. S., Coelho, E. A. F., Michalick, M. S. M., de Freitas, E., Melo, M. N., Tafuri, W. L., de Melo Resende, D., Hermont, V., de Freitas Abrantes, C., Gazzinelli, R. T. (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26(46), 5888–5895.

Fernández Cotrina, J., Iniesta, V., Monroy, I., Baz, V., Hugnet, C., Marañón, F., Fabra, M., Gómez-Nieto, L. C., Alonso, C. (2018). A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniasis. *Vaccine*, 36(15), 1972–1982.

Gerpe, A., Alvarez, G., Benítez, D., Boiani, L., Quiroga, M., Hernández, P., Sortino, M., Zacchino, S., González, M., Cerecetto, H. (2009) 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg Med Chem*. 1;17(21):7500-7509.

Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J., & Gibson, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, 34(12), 1393–1404.

Harmer, J., Yurchenko, V., Nenarokova, A., Lukeš, J., Ginger, M. L. (2018). Farming, slaving and enslavement: histories of endosymbioses during kinetoplastid evolution. *Parasitology* 145, 1311–1323.

Hartley, M. A., Kohl, K., Ronet, C., & Fasel, N. (2013). The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), 119–130.

Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*. 354(9185), 1-9.

Ibañez-Bernal, S. (2005). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia França*. *Folia Entomol, Mex*. 44(2): 195-212.

Jackson, A. P., Otto, T. D., Aslett, M., Armstrong, S. D., Bringaud, F., Schlacht, A., Berriman, M. (2016). Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. *Current Biology*, 26(2), 161–172.

Jaskowska, E., Butler, C., Preston, G., Kelly, S. (2015). *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. *PLoS Pathog* 11(1): e1004484

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J. L., Loscalzo, J. Harrison's Principles of Internal Medicine. (2017). 19th Edition. McGraw Hill. Part 8, Section 18, 251: Leishmaniasis.

- Katsuno, K., Burrows, J. N., Duncan, K., van Huijsduijnen, R. H., Kaneko, T., Kita, K., Slingsby, B. T. (2015). Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(11), 751–758.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*. 8. 10(1), 28.
- Leguizamón, M. A. (2012). A 101 años del primer caso de Leishmaniasis visceral en las Américas. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 10(1), 3-4.
- Leontides, L. S., Saridomichelakis, M. N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A. F., Galatos, A. D., & Mylonakis, M. E. (2002). A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology*, 109(1-2), 19–27.
- López, A., de Molina, C. A., Bueso, A. y Fuentes, F. (1991). Leishmaniasis Visceral en Niños La Experiencia en 35 casos. *Revista Médica Honduras*. 59(3)
- Magos Guerrero, G. A. y Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*. 52(6), 260-264.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., y Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop*, 116(3), 193-199.
- Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. O. R. H., Goraj, K., Martial, J. A., & Hol, W. I. M. G. J. (1994). Crystal structure of recombinant human triose phosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Science*, 3, 810–821.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L. M., & Gravino, A. E. (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*, 177(2), 279–282.
- Mans, DRA; Kent AD, Hu RVPF, Schallig HDFH. (2017). Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res*. 8(2), 1-16.
- Maslov, D. A., Votýpka, J., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, 29(1), 43–52.
- Maugeri, D.A., Cazzulo, J.J., Burchmore, R. J. S., Barrett, M. P., Ogbunude, P. O. J., (2003). Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 117–125.
- Mauricio, I. L., Stothard, J. R., & Miles, M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*; 16, 188–189.

- Miro, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennis, M., Ferrer, L., Oliva, G. (2017). Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends in Parasitology*, 33(9), 718–730
- Michels, P. A. M., Bringaud, F., Herman, M., & Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1463–1477.
- Moore, E. M., y Lockwood, D. N. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2(2), 1-8.
- Monteiro, F. M., Machado, A. S., Rocha-Silva, F., Assunção, C. B., Graciele-Melo, C., Costa, L., Portela, A. S., Ferraz Coelho, E. A., de Figueiredo, S. M., Caligiorne, R. B. (2018). Canine visceral leishmaniasis: Detection of *Leishmania spp.* Genomein peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). *Microbial Pathogenesis*, 126, 263-268.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-Sánchez, C., & Martín-Sánchez, J. (2012). Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitology Research*, 111(1), 155–164.
- Mniouil, M., Fellah, H., Amarir, F., Sadak, A., Et-touys, A., Bakri, Y., Moustachi, A., Tassou, F.Z., Hida, M., Lyagoubi, M., Adlaoui, E.B., Rhajaoui, M., Sebti, F. (2018). Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. *Acta Tropica*, 182, 185–189.
- Nieto, A., Domínguez-Bernal, G., Orden, J. A., De La Fuente, R., Madrid-Elena, N. y Carrión, J. (2011). Mechanisms of resistance and suceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian haámster model. *Veterinary Research*, 42(1), 39.
- Noble, M. E. M., Wierenga, R. K., Lambeir, A. -M, Opperdoes, F. R., Thunnissen, A. W. H., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. (1991). The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 10(1), 50–69.
- Olivares-Illana, V., Pérez-Montfort, R., López-Calahorra, F., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez Puyou, A. (2006). Structural Differences in Triosephosphate Isomerase from Different Species and Discovery of a Multitrypanosomatid Inhibitor. *Biochemistry*, 45(8), 2556–2560.
- Ortiz, C., Moraca, F., Medeiros, A., Botta, M., Hamilton, N., & Comini, M. (2016). Binding Mode and Selectivity of Steroids towards Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from the Pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*, 21(3), 368.

- Palatnik-de-Sousa, C. B., & Day, M. J. (2011). One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 197
- Parra-Henao, G. J. (2014). Entomología y control de vectores. Leishmaniasis. *Biomédica*, 31(sup3.2), 267.
- Paz, G. F., Rugani, J. M. N., Marcelino, A. P., & Gontijo, C. M. F. (2018). Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania spp.* in urban pet dogs. *Acta Tropica*, 182, 198–201.
- Pérez Tort, G., y Marchesi, D. (2009). Miltefosina: una Nueva Alternativa para el Tratamiento de la Leishmaniasis Canina. *Perfil farmacológico. Veterinaria Argentina*. 26 (253), 1-8.
- Peterson Lisa, A. (2014). Reactive Metabolites in the Biotransformation of Molecules Containing a Furan Ring. *Chem Res Toxicol*. Author manuscript; available in PMC. *Chem Res Toxicol*, 18; 26(1): 6–25.
- Pineda, J. A., Martín-Sánchez, J., Macías, J., y Morillas, F. (2002). *Leishmania spp* infection in injecting drug users. *Lancet*, 360 (9337), 950-951.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitology. Hum: Comp.*; 65(3): 111-125.
- Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R. y Estaquier, J. (2016). Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. 1; 9 -18.
- Rodríguez-Bolaños, M., Cabrera, N., & Perez-Montfort, R. (2016). Identification of the critical residues responsible for differential reactivation of the triosephosphate isomerases of two trypanosomes. *Open Biology*, 6(10), 160-161.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J. A., Gómez-Barríos, A. (2006). Development of Resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *Parasitol. Res* 99, 103-107.
- Romanha, A. J., Castro, S. L., Soeiro, M. de N., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., Bourdin, B., Blum, B., Olivieri, B., Zani, C., Spadafora, C., Chiari, E., Chatelain, E., Chaves, G., Calzada, J. E., Bustamante, J. M., Freitas-Junior, L. H., Romero, L. I., Bahia, M. T., Lotrowska, M., Soares, M., Andrade, S. G., Armstrong, T., Degraeve, W., Andrade, Z. de A. (2010). *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 105, 233–238.
- Salomón, O. D., Basmajdian, Y., Fernández, M. S. y Santini, M. S. (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106(3), 381-382.
- Salomón, O. D., Mastrángelo, A. V., Santini, M. S., Liotta, D. J. y Yadón, Z. D. (2016). La eco-epidemiología retrospectiva como herramienta aplicada a la vigilancia de la

leishmaniasis en Misiones, Argentina, 1920-2014. *Revista Panamericana Salud Pública*. 40(1), 29-39.

Satragno, D., Faral-Tello, P., Canneva, B., Verger, L., Lozano, A., Vitale, E., Greif, G., Soto, C., Robello, C. y Basmadján, Y. (2017). Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. *Emerg Infect Dis*. 23(3), 536-538.

Selder, R., Weber, K., Bergmann, M., Geisweid, K., & Hartmann, K. (2018). Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, 232, 46–51.

Sen, N., & Majumder, H. (2008). Mitochondrion of Protozoan Parasite Emerges as Potent Therapeutic Target: Exciting Drugs are on the Horizon. *Current Pharmaceutical Design*, 14(9), 839–846.

Serrano-Martin, X., González-Luna, D., Fuentes, J., Campos, J., Franco, M. A., Luis, J., Ponte-Sucre, A., Payares, G. y Mendoza-León, A. (2005). Evaluación de drogas en *Leishmania sp.*: Estudios genéticos y moleculares de nuevos blancos. Estudios *in vitro* e *in vivo* de la resistencia a drogas. Memoria del Instituto de Biología Experimental (UCV) Caracas. Venezuela. 4, 117-120.

Schallig, H. D, Canto-Cavalheiro, M, da Silva, E. S. (2002). Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Oct; 97(7):1015-1018.

Sharma, U. y Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: Distributios, phisiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(4), 255-272.

Schenone, M., Dančik, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 9(4), 232–240.

Soares, R. y Turco, S. (2003). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*. 75(3), 301-330.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Olvida, G. y Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 165(1-2), 1-18.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 560–563.

Soto, J. y Soto. P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*. 25(Supl.1), 207-217.

Spickler, A. R., Roth, J. A., Galyon, J., Lofstedt, J. y Lenardón, M. V. (2003). *Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales*. CFSPH Iowa State University.

- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1).
- Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J. y Amela Heras, C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Revista Española de Salud Pública*. 86(6), 555-564.
- Sundar, S., & Olliaro, P. L. (2007). Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and clinical risk management*, 3(5), 733–740.
- Téllez-Valencia, A., Avila-Rios, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., López-Calahorra, F., Gómez-Puyou, A. (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*, *Biochem Biophys Res Commun*, 295, 958–963.
- Trav, B. L. (2000). Leishmaniasis visceral canina. *Revista MVZ Córdoba*. 5(1), 29-32.
- Universidad de la República Uruguay. (2015). Primer brote de Leishmaniasis de transmisión autóctona, localidad: Arenitas Blancas, Salto. Recuperado de: <http://www.suvepa.org.uy/images/pdf/leishmaniasisSALTO2015.pdf>
- Verlinde, C. L., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Périé, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G. y Michels, P. A. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat*. 4(1), 50-56.
- Waley, S. G. (1973). Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem J*, 135, 165–172.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Wierenga, R. K. (1999). Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Engineering, Design and Selection*, 12(3), 243–250.
- Wyllie, S., Thomas, M., Patterson, S., Crouch, S., De Rycker, M., Lowe, R., Gilbert, I. H. (2018). Cyclin-dependent kinase 12 is a drug target for visceral leishmaniasis. *Nature*, 560(7717), 192–197
- WHO | The disease and its epidemiology. World Health Organization. https://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Giordani, R. B., Conceição, J. M., Nicastro, G. G., Boechat, A. L. Termignoni, C. (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, 15(7), 2008–2018.
- (30 de octubre de 2015) Buscarán en Salto y Paysandú el transmisor de la leishmaniasis. *Diario El Telégrafo*, Uruguay. <http://archivos.eltelgrafo.com/index.php?id=105297&seccion=locales&fechaedicion=2015-10-30>

(Diciembre, 2018) Por primera vez se confirmó en Uruguay un caso de leishmaniasis visceral en un humano. Diario EL PAIS.
<https://www.elpais.com.uy/informacion/salud/primer-vez-confirmando-uruguay-caso-leishmaniasis-visceral-humano.html>