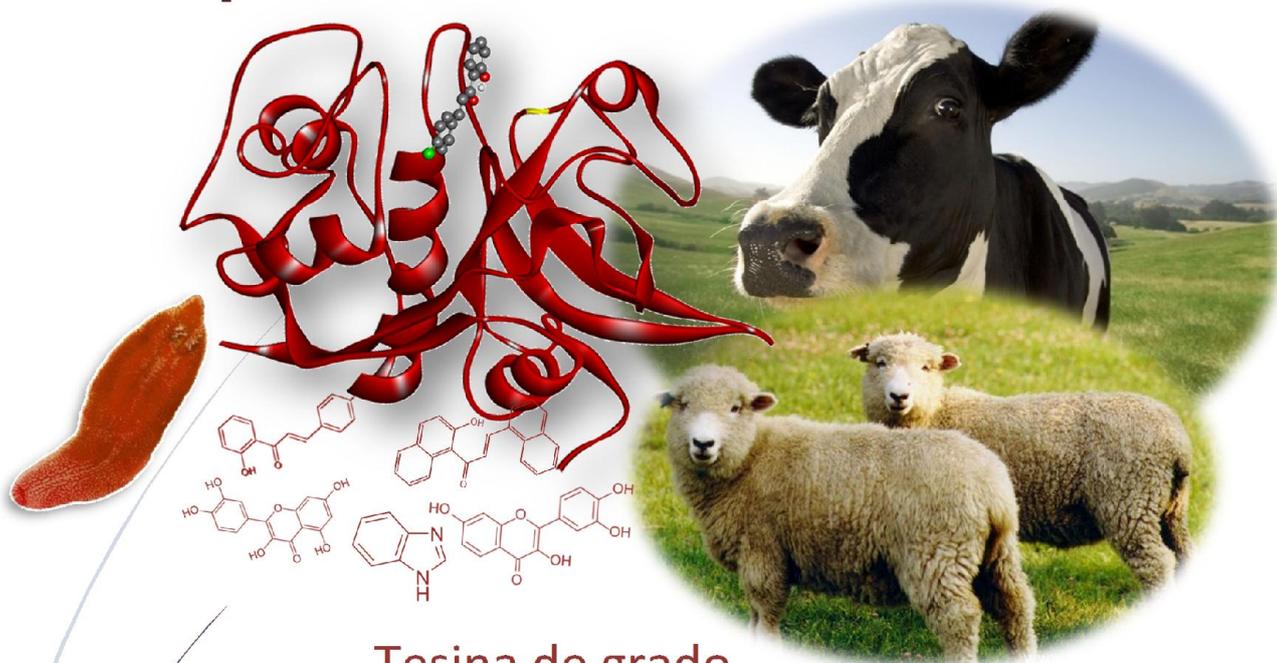




Licenciatura en Bioquímica  
Facultad de Ciencias - Facultad de Medicina  
Universidad de la República

# Búsqueda de inhibidores de cisteína proteasas esenciales del parasito *Fasciola hepatica* como potenciales fármacos



Tesina de grado  
**Florencia Ferraro**

**Orientadores: Dra. Ileana Corvo y Dr. Mauricio Cabrera**



*Contenidos*

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	5
<b>I. Introducción</b> .....	6
1. <i>Fasciola hepatica</i> : interacción parásito-hospedero y potencial biótico .....	7
1.1 Enfermedades helmínticas de alto impacto .....	7
1.2 Fascioliasis: del mundo a Uruguay .....	8
1.3 Ciclo vital del parásito .....	8
1.4 Actuales estrategias de control y prevención de la Fascioliasis .....	10
2. Efectores esenciales de la interfaz parásito-hospedero.....	13
2.1 Cisteína-proteasas: clásicas protagonistas en la invasión al hospedero .....	13
2.2 Características estructurales de las catepsinas .....	15
2.3 Las catepsinas de <i>Fasciola hepatica</i> .....	17
3. Principales inhibidores de cisteína proteasas .....	21
3.1 Inhibición de cisteína proteasas como estrategia general para el combate de diversas patologías .....	21
3.1.1 Catepsina K y osteoporosis.....	21
3.1.2 Catepsina S y patologías autoinmunes.....	22
3.1.3 Catepsinas B y L y cáncer .....	23
3.1.4 Catepsinas S, B y L: implicancias en enfermedad de Alzheimer (EA) .....	24
3.2 Catepsinas L de <i>Fasciola hepatica</i> : Blancos efectivos para el control de la fascioliasis .....	24
<b>II. Objetivo</b> .....	<b>25</b>
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
<b>III. Materiales y métodos</b> .....	<b>27</b>
1. Selección de los compuestos a evaluar de la quimioteca .....	28
2. <i>Screening</i> de los compuestos seleccionados: ensayos de inhibición .....	28
3. Caracterización de los compuestos con mejor porcentaje de inhibición....	29
3.1 Cálculo del IC <sub>50</sub> .....	29
3.2 Ensayos de <i>slow-binding</i> .....	29
3.3 Ensayos de reversibilidad.....	29

4. Estudios <i>in vitro</i> con JRD.....	29
5. Estudios de <i>docking</i> molecular ligando-proteína para flavonoides en <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> .....	30
5.1 Preparación de las estructuras proteicas.....	30
5.2 Optimización de las estructuras de los compuestos .....	31
5.3 <i>Docking</i> molecular ligando-proteína .....	32
<b>IV. Resultados y discusión .....</b>	<b>33</b>
1. <i>Screening</i> de compuestos seleccionados: ensayos de inhibición.....	34
1.1 Flavonoides.....	34
1.2 Benzofuroxanos y análogos .....	41
1.3 Quinoxalinas, furoxanos, compuestos nitrogenados y químicamente diversos .....	41
2. Caracterización de los compuestos con mejor porcentaje de inhibición ..	47
2.1 Cálculo del IC <sub>50</sub> .....	47
2.2 Ensayos de <i>slow-binding</i> .....	48
2.3 Ensayos de reversibilidad.....	50
3. Estudios <i>in vitro</i> con JRD .....	51
4. Estudios de <i>docking</i> molecular ligando-proteína para flavonoides en <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> .....	53
4.1 Preparación de las estructuras proteicas.....	53
4.2 <i>Docking</i> molecular ligando-proteína .....	53
4.2.1 Compuesto 12 vs. 13.....	55
4.2.2 Compuesto 34 vs. TCBZ .....	57
<b>V. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>59</b>

*A mis abuelos María y Nelson.*

## Agradecimientos

Desde pequeña mis padres me enseñaron que la única cosa importante en la vida es buscar aquello que nos hace felices, que nos hace plenos y permite verdaderamente realizarnos como personas. En esa búsqueda que comenzó desde que tengo memoria me encontré especialmente seducida por la bioquímica. Sin lugar a dudas mi visión acerca de esta disciplina ha cambiado desde aquellos hoy lejanos 5 años, cuando oí por primera vez la palabra, pero creo que lo más importante es que, como quien se enamora de algo, el encanto y la magia que en mí despierta están intactos, aunque la adversidad y los obstáculos muchas veces me superen. En el arte de la ciencia, lo que he aprendido no solo en esta tesina sino en mi recorrido académico es que, el amor, el esfuerzo, la rigurosidad, la dedicación, la perseverancia y estar en el lugar indicado en el momento justo, hacen que los monstruos que acechan, queden pequeños ante el sentimiento invaluable de percibir que por fin encontré mi camino en la vida y puedo transitarlo.

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, por darme la vida y acompañar con dedicación excepcional e incondicional cada uno de mis pasos, permitiéndome alcanzar uno a uno mis sueños de niña. El camino recorrido hubiese sido muy diferente sin ustedes, los amo.

A mi familia en su totalidad por brindarme su amor y apoyo, a lo largo de todos estos años de carrera, bastante vertiginosos e intensos, que muchas veces me dejaron afuera de alguna que otra circunstancia especial. Sabrán entenderme y disculparme, el amor no tiene horarios.

A Nacho, un hermano que me dio este camino, por compartir esta pasión y muchas otras, sos una de esas personas de las que no dudo ni un segundo que la vida nos unió sin razón y por muchas razones. El tiempo transcurre tirano desde aquella vez que nos conocimos cuando éramos adolescentes sin rumbo y en la institución de mi vida, tengo la certeza de que personas como vos nunca van a pasar.

A mis compañeros de todas las horas, de todas las batallas, de todas las lágrimas, de todas las risas y de todas las fiestas, mi familia de la vida, gracias por permitirme entrar en la suya y por estar en cada momento presente en la mía. Que la vida les devuelva de la mejor forma todo el amor que me han dado. Ro, Lee, Gabriel, Mechi, Noé y Mimi.

A las personas que pasaron por mi vida y ya no están, pero fueron importantes e hicieron que sea lo que soy.

A la Dra. Mercedes González y al Dr. Hugo Cerecetto del Grupo de Química Medicinal, por permitirme realizar este trabajo con los compuestos que han sintetizado a lo largo de muchos años los seres que han formado parte del mismo. A todos ellos el mayor de los agradecimientos, sin sus horas de neuronas sinápticas y síntesis eterna este trabajo no hubiese sido posible.

Al Departamento de Genética de Facultad de Medicina por permitirme usar sus instalaciones y el material necesario para los ensayos que sustentan los resultados presentados. En particular a Nicolás Dell'Oca por la ayuda con los ensayos *in vitro*.

A toda la gente del Laboratorio de Química Teórica y Computacional de Facultad de Ciencias, por abrirme sus puertas y las del camino de la investigación. En especial a la Dra. Alicia Merlino por supervisar parte del trabajo presentado, no siendo incluso formalmente mi tutora, acompañándome en mis locuras. Y a las chicas que hicieron cada día más corto con su presencia y sus ocurrencias, Flor y Sai.

A mis padres académicos, la Dra. Ileana Corvo y el Dr. Mauricio Cabrera que me han acompañado en esta tarea tan maravillosa de investigar y ser lo que siempre quise ser. Gracias por su paciencia, comprensión y conocimientos brindados.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la beca de iniciación en la investigación.

## ABREVIATURAS

<b>JRD</b>	Juveniles recientemente desenquistados
<b>PES</b>	Productos de excreción-secreción
<b>TCBZ</b>	Triclabendazol
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria del 50%
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ADNc</b>	Ácido desoxiribonucleico copia
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetraacético
<b>AMC</b>	Amino-metil cumarina
<b>URF</b>	Unidades Relativas de Fluorescencia
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>DFT</b>	<i>Density Functional Theory</i>
<b>IEF-PCM</b>	<i>Integral Equation Formalism - Polarizable Continuum Model</i>
<b>RMSD</b>	<i>Root-mean square deviation</i>
<b>-I</b>	Electrón atrayente por efecto inductivo
<b>-M</b>	Electrón atrayente por efecto mesomérico
<b>+M</b>	Electrón dador por efecto mesomérico

## **I. Introducción**



## 1.2 Fascioliasis: del mundo a Uruguay

La fascioliasis, causada por *F. hepatica* y *F. gigantica* en regiones subtropicales y tropicales, respectivamente, es considerada una de las parasitosis más importantes entre los animales ganaderos alimentados por pasturas, fundamentalmente a nivel de bovinos y ovinos. El gran número de animales productivos que afecta la enfermedad es sinónimo de las cuantiosas pérdidas económicas que ocasiona la misma a nivel mundial, que se estiman en 3 mil millones de dólares anuales<sup>7</sup>. Entre las consecuencias más graves registradas se encuentran la merma en la producción de carne, lana y leche, así como interferencias en la fertilidad, susceptibilidad a adquirir nuevas infecciones bacterianas y costos asociados a la aplicación de tratamientos muy poco efectivos.

*Fasciola hepatica* se encuentra ampliamente distribuida en Uruguay, fundamentalmente en aquellos establecimientos ganaderos en los que se alterna el pastoreo de bovinos con el de ovinos, lo que favorece la infección de los mismos y la continuidad de su ciclo vital. La prevalencia del parásito es mayor para bovinos que ovinos, ello se atribuye fundamentalmente a que la alimentación de los primeros, se da en pasturas más húmedas y bajas que los segundos. Algunos estudios realizados en el último tiempo muestran una prevalencia de aproximadamente 57% en bovinos<sup>8</sup>, no obstante en la mayoría de estos casos el estado de la enfermedad se encuentra en etapas subclínicas o crónicas. Para los ovinos, la misma se presenta en etapas agudas con un alto nivel de morbilidad y letalidad a lo que se suma el hecho de que el 47% de los hígados son decomisados por la presencia de *Fasciola hepatica* según la Auditoría de Calidad de la Cadena Cárnica Ovina en estudios realizados en 2007-2008<sup>9</sup>.

## 1.3 Ciclo vital del parásito

El conocimiento detallado del ciclo vital de *Fasciola hepatica* es fundamental a la hora de intentar desarrollar un tratamiento efectivo, que no solo permita combatir la enfermedad sino erradicarla del ámbito productivo y sanitario.

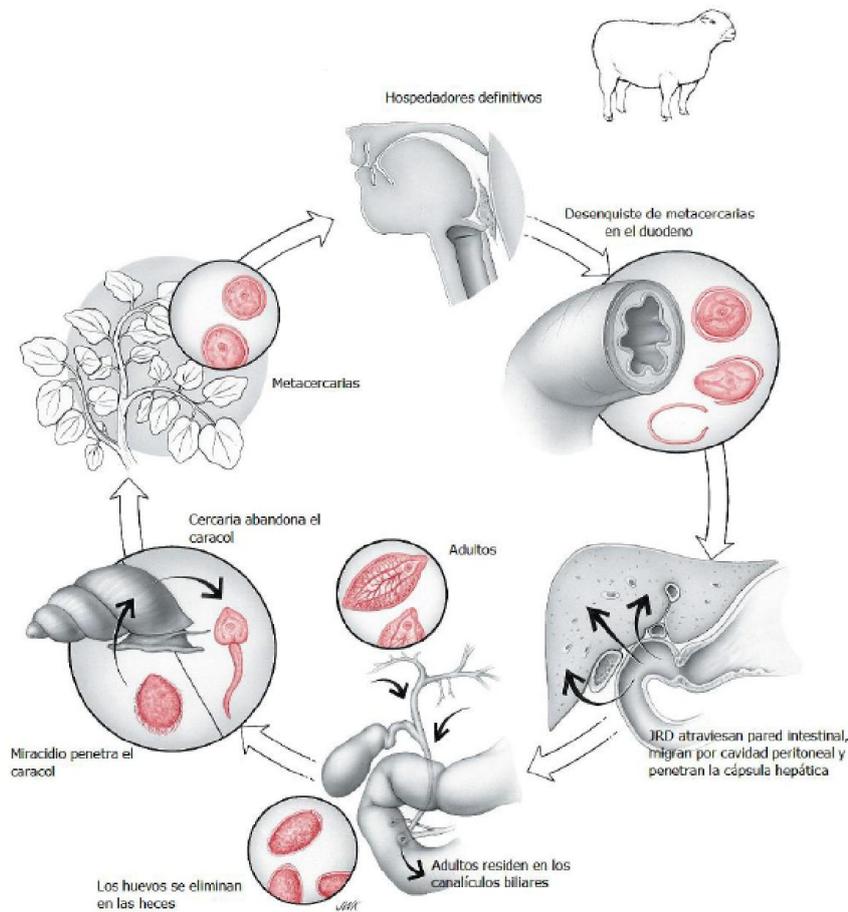
*Fasciola hepatica* posee un ciclo considerablemente complejo, que cuenta con un gran número de estadios intermedios (Fig. 2), teniendo como hospedero definitivo a mamíferos, como es el caso del hombre y el ganado.

La infección de su hospedero definitivo inicia cuando se ingiere vegetación que posee metacercarias (Fig. 3), que constituyen la forma quística resistente del parásito. Una vez que llegan al intestino desenquistan, dando lugar a un gran número de juveniles recientemente desenquistados (JRD) (Fig. 3), que con su gran motilidad y productos de excreción-secreción (PES) son capaces de atravesar la pared intestinal a nivel del duodeno y migrar hacia el hígado por la cavidad peritoneal. Una vez llegan a su órgano destino, penetran la capsula hepática y avanzan por su parénquima como juveniles inmaduros (durante 8 a 12 semanas) hasta alcanzar los conductos biliares, lugar en donde se produce la maduración y evolución hacia el estadio adulto.

<sup>7</sup> S. Mas-Coma, M. D. Bargues & M. A. Valero. *Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses*. *Int. J. Parasitol.* vol. 35, pp. 1255–1278, 2005.

<sup>8</sup> smu.org Recuperado el 18 de febrero de 2015 de: <http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1996v1/lopez.htm>

<sup>9</sup> inac.gub.uy Recuperado el 18 de febrero de 2015 de: [http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/3001/1/4.fase\\_ii\\_ovinos.pdf](http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/3001/1/4.fase_ii_ovinos.pdf)



**Figura 2.-** Ciclo vital de *Fasciola hepatica*<sup>10</sup>

En cada una de las etapas hasta ahora descritas, es imprescindible que el parásito se adapte a los cambios en el microambiente fisiológico que lo rodea (cambios de pH, disponibilidad de oxígeno, cambios en los niveles de citoquinas y quimioquinas), mientras avanza por las diferentes cavidades y órganos de su hospedero, además de la necesidad de disgregar los tejidos que correspondan para abrirse camino y combatir la respuesta inmune que se desarrolla en respuesta a su invasión.

Cuando alcanza el árbol biliar la *Fasciola* adulta (Fig. 2) se alimenta fundamentalmente de sangre, la cual es fuente de carbohidratos, necesarios para la producción de energía, así como de aminoácidos y ácidos grasos para el desarrollo del anabolismo del parásito. Es aquí donde alcanza su madurez sexual, siendo capaz de reproducirse tanto asexualmente como sexualmente, dando lugar a los huevos.

La arquitectura de la superficie externa del estadio adulto está constituida como un gran tegumento sincitial que se caracteriza por tener una amplia permeabilidad a una gran variedad de moléculas, siendo fundamental para la absorción y distribución en los diferentes tejidos y órganos del parásito. Su intestino ciego es el encargado de digerir las macromoléculas obtenidas del hospedador y absorber los productos solubles. El contenido del mismo suele expulsarse al medio cada 3-4 h conteniendo diferentes productos de excreción/ secreción.

<sup>10</sup> Recuperado el 25 de febrero 2015 de: [www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org)

El desarrollo de una fase crónica de la enfermedad muchas veces se debe a la presencia del parásito adulto en los canalículos biliares, aunque muchas veces el animal convive con él en fases tanto infectivas como crónicas debido a las reinfecciones recurrentes.

En el siguiente paso del ciclo, los huevos son liberados por el conducto biliar hasta el intestino y posteriormente son eliminados con las heces. Al eclosionar, una vez en el exterior, liberan una larva ciliada, el miracidio quién en la porción anterior ensanchada lleva una papila cónica diminuta y una *mancha ocular* prominente, adelgazándose hacia la porción posterior. Al ponerse en contacto con el manto del caracol, del género *Lymnea*, el miracidio móvil pierde los cilios, transformándose en esporocisto joven que penetra al molusco. En este último ocurren una serie de reproducciones asexuadas consecutivas en las que se da lugar primero la redia y luego la cercaria (Fig. 3), que culminan con la liberación al medio de un gran número de formas de vida libre llamadas cercarias. Estas rápidamente se enquistan en la vegetación originando las metacercarias, que al ser ingeridas por el hospedador definitivo completarán el ciclo del parásito<sup>11-12</sup>.

#### 1.4 Actuales estrategias de control y prevención de la Fascioliasis

Si bien en la actualidad la industria farmacéutica ha encontrado una respuesta relativamente rápida a la necesidad del desarrollo terapéutico para esta enfermedad, el uso indiscriminado e inadecuado de los fármacos que mostraron ser efectivos para combatirla, ha ocasionado la rápida aparición de aislamientos del parásito resistentes a estos tratamientos, además de generar hepatotoxicidad<sup>13-14</sup>.

Los tratamientos ofrecidos para combatir esta parasitosis se basan fundamentalmente en el uso de fármacos antihelmínticos, destacándose dentro de la familia de los benzimidazoles, el triclabendazol (TCBZ), que fue uno de los primeros en emplearse con éxito para combatir la enfermedad. No obstante, la resistencia al mismo no tardó en aparecer, volviéndose inefectivo en ganado de Irlanda, Inglaterra, Holanda, España y Australia<sup>13-15-16</sup>. Si bien en la actualidad se han desarrollado tratamientos relativamente efectivos, en general implican el suministro de combinaciones o drogas de amplio espectro, que a su vez generan resistencia a otros parásitos helmintos.

Esto hace que sea urgente desarrollar estrategias que permitan no solo combatir la enfermedad, mediante el empleo de nuevos fármacos más específicos y efectivos, sino prevenirla, mediante esquemas de vacunación. Se ha estudiado el potencial antigénico de un gran número de enzimas tanto nativas como recombinantes de *Fasciola hepatica*, como es el caso de la glutatión-S-

<sup>11</sup> T. Carrada-Bravo. “*Fasciola hepatica* : Ciclo biológico y potencial biótico” .*Rev. Mex. Patología Clin.* Vol. 54, pp. 21–27, 2007.

<sup>12</sup> Imágenes recuperadas el 25 de febrero de 2015 de: <http://www.southampton.ac.uk/~ceb/Insideafluke/Liverfluke.html>

<sup>13</sup> Y. M. Brockwell, T. P. Elliott, G. R. Anderson, R. Stanton, T. W. Spithill & N. C. Sangster. *Confirmation of Fasciola hepatica resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle.* *Int. J. Parasitol.* Vol. 4, no. 1, pp. 48–54, 2014.

<sup>14</sup> V. Medicines and E. Unit, “Committee for Veterinary Medicinal Products,” *DNA Repair (Amst)*. pp. 4–9, 1997.

<sup>15</sup> P. Ortiz, S. Scarcella, C. Cerna, C. Rosales, M. Cabrera, M. Guzmán *et al.* *Resistance of Fasciola hepatica against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Perú): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep.* *Vet. Parasitol.* Vol. 195, pp. 118–121, 2013.

<sup>16</sup> L. Moll, C. P. H. Gaasenbeek, P. Vellema, & F. H. M. Borgsteede. *Resistance of Fasciola hepatica against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands.* *Vet. Parasitol.* Vol. 91, pp. 153–158, 2000.

transferasa y la leucin-amino-peptidasa, alcanzándose niveles de protección de un 65 y 89 %, respectivamente<sup>17-18</sup>.

También se han empleado algunas catepsinas de *Fasciola* como es el caso de *FhCL3* y *FhCL1* con una protección entre 65 y 74% en ratas<sup>18-19-20</sup>. Si bien se han logrado obtener relativamente buenos niveles de protección, fundamentalmente mediante el empleo de proteasas, en la actualidad no se encuentra ninguna vacuna disponible en el mercado.

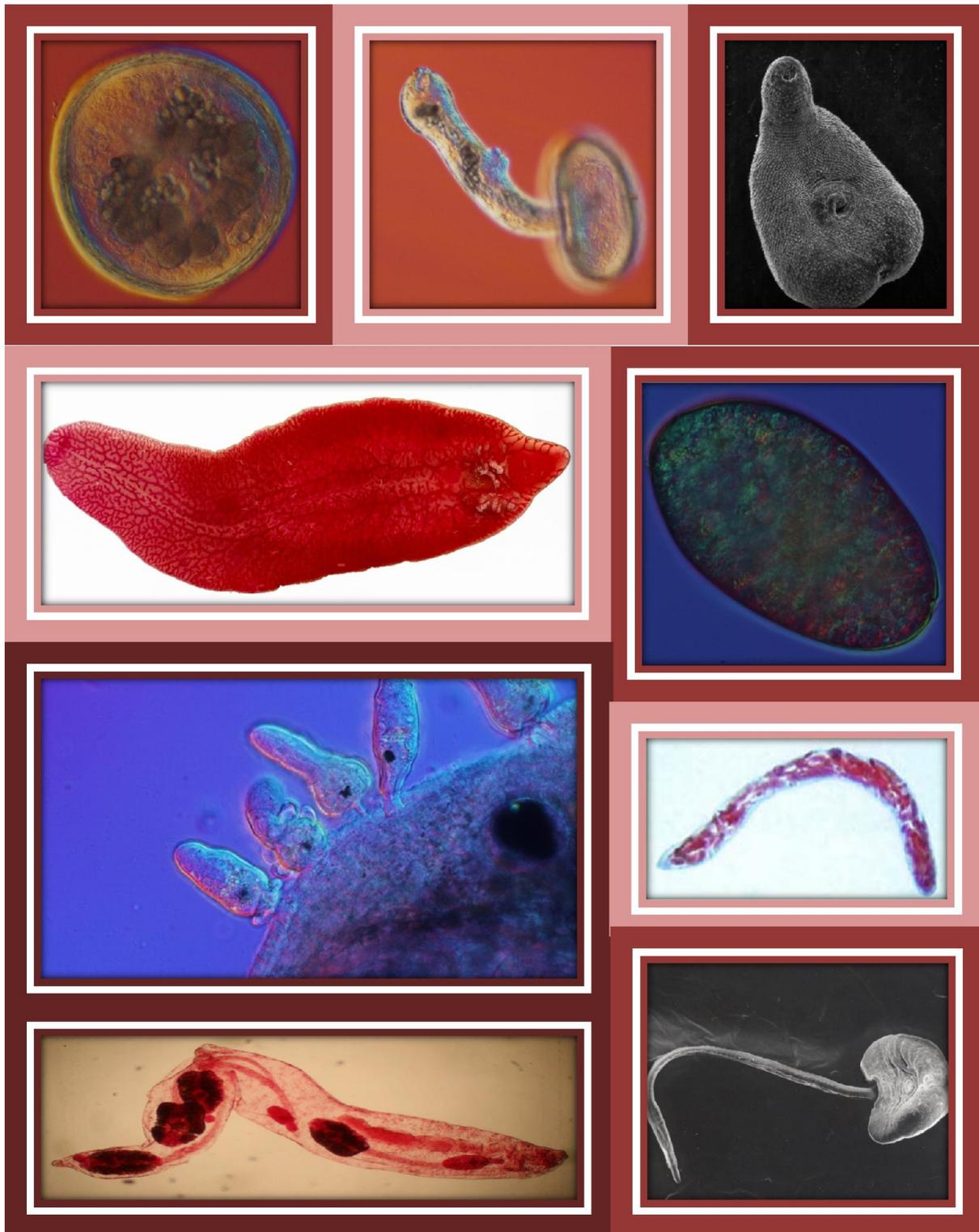
---

<sup>17</sup> G. Maggioli, D. Acosta, F. Silveira, S. Rossi, S. Giacaman, T. Basika, et al. *The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against Fasciola hepatica infection in sheep*. *Vaccine*. Vol. 29, pp. 9057–9063, 2011.

<sup>18</sup> D McManus & J. Dalton. *Vaccines against the zoonotic trematodes Schistosoma japonicum, Fasciola hepatica and Fasciola gigantica*. *Parasitology*. Vol. 133, pp. 43-61, 2006.

<sup>19</sup> M. Harmsen, J.B Cornelissen, H. E. Buijs, W. J. Boersma, S. H. Jeurissen, & F. J. Van Milligen. *Identification of a novel Fasciola hepatica cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide*. *Int. J. Parasitol.* Vol. 34, pp. 675-682, 2003.

<sup>20</sup> N. Reszka, M. Harmsen, J.B Cornelissen, K. Bieńkowska-Szewczyk, J de Bree, W. J. Boersma, et al. *Fasciola hepatica procathepsin L3 protein expressed by baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis* *Vaccine*. Vol. 23, pp. 2987-2993, 2005.



**Figura 3.-** En esta figura se pueden distinguir los diferentes estadios del parásito *Fasciola hepatica*. En primer lugar, la metacercaria posee una envoltura con tres estratos y es la forma infectante del parásito. A la derecha, se observan los JRD que resultan del desenquiste de las metacercarias en microscopía óptica 40x, destacándose su superficie rugosa y dos ventosas por microscopía electrónica de barrido. Estos juveniles migran hacia el hígado dando lugar a la forma adulta del parásito (microscopía campo claro, tinción carmín). El adulto se reproduce y expulsa los huevos en conjunto con la bilis. Estos huevos dan origen a entidades ciliadas, los miracidios que son la forma infectiva del molusco intermediario. Una vez que ingresan al caracol, el esporocisto resultante se caracteriza por presentar división celular, para dar lugar a redias que pueden reproducirse asexualmente y aumentar en número, incrementando el potencial biótico del parásito. Por último estas redias dan lugar a las cercarias, con cabeza piriforme y cola móvil ambas de utilidad para desplazarse en medios acuosos.<sup>12</sup>

## 2. Efectores esenciales de la interfaz parásito-hospedero

### 2.1 Cisteína-proteasas: clásicas protagonistas en la invasión al hospedero

Todo parásito cuenta con un *pool* esencial de componentes biológicos que son fundamentales, no solo para la invasión, sino también para su permanencia en el hospedero, ya que se encargan de modular y controlar la respuesta inmune del mismo, promoviendo tanto su supervivencia como su posterior desarrollo. Dado su relevancia, estas herramientas bióticas son los primeros blancos plausibles de atacar a la hora de combatir cualquier infección en la que un parásito esté implicado. En el caso concreto de *Fasciola hepatica* los principales efectores detectados en mamíferos infectados, son enzimas proteolíticas o proteasas, junto con otras proteínas menos abundantes como es el caso de enzimas reguladoras de procesos oxidativos, como la tiorredoxina, peroxirredoxina y glutatión-S-transferasa, así como proteínas de unión a ácidos grasos<sup>21-22</sup>.

Las proteasas son enzimas que catalizan la degradación de polipéptidos mediante la hidrólisis del enlace peptídico. Según el sitio donde cortan la cadena polipeptídica se clasifican en: endopeptidasas, si hidrolizan los enlaces peptídicos internos, o exopeptidasas cuando el clivaje del sustrato se produce en su extremo. Por otra parte de acuerdo al residuo principal, empleado en su mecanismo catalítico se pueden clasificar en cinco clases: cisteína, aspártico, serina, treonina y metalo-proteasas. Podría considerarse una sexta clase minoritaria: las glutámico proteasas. Con el objetivo de hacer más sencillo su estudio también se han agrupado en familias basadas en la similitud tanto a nivel de secuencia como a nivel estructural y catalítico<sup>23</sup>.

En particular, las cisteína-proteasas constituyen una familia de enzimas que se hacen presentes en prácticamente todos los organismos. Dentro de estas se encuentra una gran familia, la superfamilia de la papaína, cuyo nombre se atribuye a la enzima aislada de la fruta papaya. En esta superfamilia se incluye, además de algunas cisteína proteasas de otras plantas, a las catepsinas presentes en animales<sup>22</sup>. Las más estudiadas en mamíferos, con ortólogos presentes en todos los organismos, son las B, L, K, y S. Las ligeras diferencias presentes en su actividad catalítica se correlacionan con secuencias específicas flanqueantes a las que determinan el sitio activo. Si bien se pensaba que la función de estas enzimas se limitaba a su capacidad proteolítica en el interior de los lisosomas, los recientes progresos en la comprensión de las funciones fisiológicas de estas entidades catalíticas, empleando modelos de ratones deficientes en las mismas, han proporcionado una visión renovadora sobre su rol biológico. De hecho es pertinente destacar su protagonismo en procesos como la resorción ósea y homeostasis del calcio<sup>24</sup> (catepsina K), activación de pro-enzimas (C y B), la maduración de hormonas peptídicas (B y L), presentación de antígenos (V, S, L y F), degradación y recambio de proteínas (B, H y L) y la homeostasis epidérmica a cargo de la catepsina L<sup>25</sup>. En parásitos además suelen ser secretadas al medio extracelular para cumplir diversas funciones,

<sup>21</sup> M. W. Robinson, J. F. Tort, J. Lowther, S. M. Donnelly, E. Wong, W. Xu, *et al.* *Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen Fasciola hepatica: expansion of a repertoire of virulence associated factors.* *Mol Cell Prot.* Vol 6, pp. 1111-1123, 2008.

<sup>22</sup> V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk & D. Turk, *et al.* *Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers.* *BBA- Bioenergetics.* Vol. 1824 pp. 68-88. 2012.

<sup>23</sup> J. D. A. Tyndall T. Nall & D. P. Fairlie. *Proteases universally recognize beta strands in their active sites.* *Chem. rev.* Vol. 105, pp 973-999 2005.

<sup>24</sup> M. A. Gentile Y. Soung do, C. Horrell, R. Samadfam, H. Drissi & T. Duong le. *Increased fracture callus mineralization and strength in cathepsin K.* *Bone.* Vol 66, pp. 72-81, 2014.

<sup>25</sup> F. Lecaille J. Kaleta & D. Brömme. *Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design.* *Chem. Rev.* Vol 102, pp. 4459-4488, 2002.

manteniéndose estables a diferencia de las catepsinas de mamíferos, en un amplio rango de pH<sup>26</sup>. Particularmente en *Fasciola*, son las primeras en ser secretadas por los JRD en el duodeno para favorecer la ruptura de los tejidos necesaria para su ingreso en la cavidad peritoneal y por lo tanto constituyen una herramienta necesaria para vencer las barreras parásito-hospedero.

En general un 80% de las enzimas en parásitos helmintos son catepsinas de tipo B y L<sup>27</sup>. Estas son sin dudas las halladas mayoritariamente en los PES de *Fasciola* y trematodos relacionados, especialmente en estadios que necesitan penetrar y migrar a través de algún tejido del hospedador, por lo que es lógico atribuirles un rol importante en la invasión por parte del parásito. Se caracterizan por ser en general endopeptidasas, con algunas excepciones como es el caso de la catepsina B, que también tiene función carboxipeptidasa<sup>28</sup>.

Paralelamente se ha encontrado evidencia de que estas proteasas están implicadas en el desenquiste y la eclosión de muchos helmintos, como ser el caso de *Fasciola hepatica* y *Paragonimus westermani*, penetrando ambos por el tracto gastrointestinal pero teniendo distintos destinos, hígado y pulmón respectivamente<sup>29-30-31</sup>.

Poseen además un rol fundamental en la alimentación de muchos hematófagos, como es el caso de *Fasciola hepatica* y *Schistosoma masoni*, los que emplean estas enzimas para digerir los componentes proteicos sanguíneos y proveer de materia prima para su metabolismo anabólico. En el caso de *S. masoni*, se ubican en la gastrodermis e intestino del parásito y en *Fasciola* son secretadas a nivel intestinal<sup>31</sup>.

Por otra parte, están involucradas en la defensa parasitaria contra la respuesta inmune de su hospedero, dada su capacidad de degradar *in vitro* la región bisagra de las inmunoglobulinas del hospedero<sup>32</sup>. No obstante su capacidad de evasión se potencia con la facultad de modular la respuesta inmune mediada por linfocitos T, reprimiendo la respuesta de linfocitos Th1 y favoreciendo la expresión de factores que estimulan la diferenciación hacia células Th2, cuyo rol es moderar la respuesta inmune y por lo tanto son beneficiosas para el desarrollo del parásito sin demasiada interferencia de su hospedero<sup>33-34</sup>.

---

<sup>26</sup> AJ. Dowd M. Dooley C. Fagain J.P. Dalton *et al.* Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Enzyme. Microb. Technol.* Vol 27, pp. 599-604, 2000.

<sup>27</sup> J. Dzik. *Molecules released by helminth parasites involved in host colonization.* *Act. Biochim. Polo.* Vol. 53, pp. 33-64, 2006.

<sup>28</sup> D. Brömme & S. Wilson. *Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis.* *Biology of Extracellular Matrix.* pp. 23-53, 2011.

<sup>29</sup> L. McGonigle A. Mousley, N. J. Marks, G. P. Brennan, J. P. Dalton, T. W. Spithill, *et al.* The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int. J. Parasitol.* Vol 38, pp. 149-155, 2008.

<sup>30</sup> B. Na, S. H. Kim, E. G. Lee, T. S. Kim, Y. A. Bae, I. Kang, *et al.* Critical roles for excretory-secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus estermani* newly excysted metacercariae. *Cell Microbiol.* Vol. 8, pp. 1034-1046, 2006.

<sup>31</sup> S. Parker-Manuel, A. Ivens, G. Dillon & R. Wilson. *Gene Expression Patterns in Larval Schistosoma masoni Associated with Infection of the Mammalian Host.* *PLoS Neg. Trop. Dis.* Vol 5, pp. e1274, 2011.

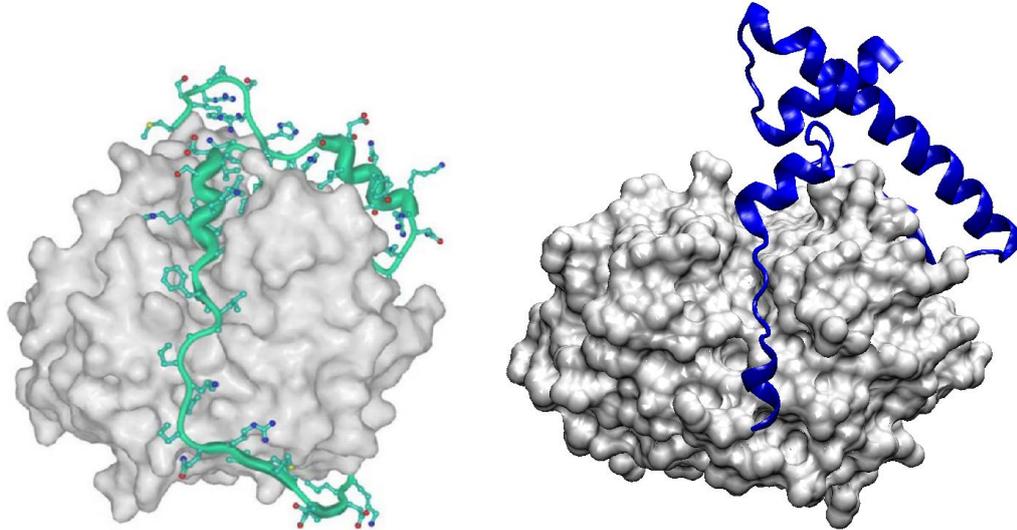
<sup>32</sup> P. Berasain, C. Carmona, B. Frangione, J. P. Dalton & F. Goñi, *et al.* *Fasciola hepatica* parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp. Parasitol.* Vol 94, pp. 99-100, 2000.

<sup>33</sup> W. Gause, J. Urban & M. Stadecker. *The immune response to parasitic helminth: insights from murine models.* *Trends in Immun.* Vol. 24, pp. 269-277, 2003.

<sup>34</sup> E. Carmona, É Dufour, C. Plouffe, S. Takebe, P. Mason, J. S. Mort, & R. Ménard. *Potency and Selectivity of the Cathepsin L Propeptide as an Inhibitor of Cysteine Proteases* *Biochemistry.* Vol 35, pp. 8149-8157, 1996.

## 2.2 Características estructurales de las catepsinas

En un análisis primario de la base de datos del genoma humano, fue posible evidenciar la existencia de al menos 11 catepsinas diferentes, con cierto grado de homología entre sí, al mismo tiempo que se han encontrado un gran número de estas a nivel parasitario. Se caracterizan por la presencia de un péptido señal, un propéptido y un dominio catalítico (Fig. 4), que adopta una conformación activa cuando la proteasa adquiere su madurez catalítica<sup>25</sup>.



**Figura 4.-** A la derecha estructura de la catepsina B humana, con su correspondiente propéptido en *New cartoon* con residuos destacados en bolas y varillas en verde. A la izquierda catepsina L1 de *Fasciola hepatica* con su propéptido en azul en representación *New cartoon* (codigoPDB: 2O6X). Ambos propéptidos (mostrados en verde y azul) se extienden por la hendidura del futuro sitio catalítico presente en la estructura de la enzima madura representada en gris.

Los péptidos señal son responsables de la translocación al retículo endoplásmico durante la expresión de la proteína por parte del ribosoma y cuentan en promedio con unos 10 a 20 aminoácidos de longitud. Por otra parte los propéptidos son de longitud variable, entre 36 aminoácidos en la catepsina X humana y 315 aminoácidos en la falciparina perteneciente al parásito *Plasmodium falciparum*<sup>25</sup>.

Los prodominios actúan en general como andamio para la proteína y su plegamiento, necesario para la formación del dominio catalítico activo. Además tienen un importante papel en la translocación de la pro-enzima al compartimento endosomal-lisosomal, además de actuar como un inhibidor reversible, necesario para impedir la activación prematura de la enzima y preservar la integridad celular<sup>35</sup>.

En el caso de las catepsinas-B, los propéptidos son selectivos para estas, siendo menos eficaces como inhibidores de las catepsinas-L. En estos elementos aparece una estructura tripartita de triptófanos que parece tener un rol fundamental, ya que la mutación de cualquiera de estos residuos conduce a una disminución significativa en la capacidad inhibidora de los propéptidos<sup>25-34</sup>.

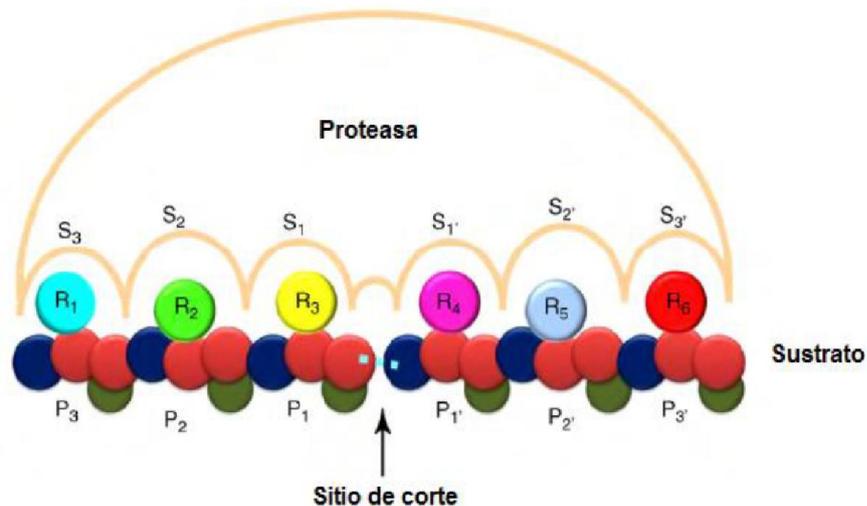
Los dominios catalíticos de estas proteasas tienen entre 220 y 260 aminoácidos en longitud y en algunos parásitos presentan una extensión C-terminal, con función desconocida. Es en este dominio dónde se observa una alta conservación a nivel aminoacídico, destacándose la

<sup>35</sup> J. McKerrow. *Cysteine proteases of parasites: A remarkable diversity of function. Perspect. Drug Disc.* Vol. 2, pp. 437-444, 1995.

presencia de una díada catalítica característica, una cisteína y una histidina, haciéndose presente un tercer residuo de asparagina que muestra un grado similar de conservación<sup>25</sup>.

El residuo de cisteína implicado en la catálisis se ubica en una secuencia peptídica conservada, constituida por Cys-Gly-Ser-**Cys**-Trp-Ala-Phe-Ser (la cisteína catalítica en negrita). En el caso de la histidina, se ubica en un sitio adyacente a aminoácidos pequeños como glicina y alanina, seguidas por cuatro aminoácidos hidrofóbicos alifáticos como valina, leucina e isoleucina y una glicina. Por otra parte la asparagina aparece en un motivo **Asn**-Ser-Trp.

El plegamiento estructural tridimensional también se encuentra ampliamente conservado, contando con dos grandes dominios, uno L y otro R de tamaño similar, lo que hace que el sitio activo esté situado en una estructura ampliamente conservada. El propéptido sin embargo posee una estructura más variable y suele posicionarse en orientación inversa a través de la hendidura de unión al sustrato (Fig. 4)<sup>35</sup>.



**Figura 5.-** Esquema en el que se muestran los sitios de la proteasa posicionados en sus correspondientes residuos a nivel del sustrato y el sitio en el cual se producirá el corte.

Dada la conservación evidenciada en su sitio activo, es coherente que todas las catepsinas presenten un mecanismo catalítico conservado. Los responsables de la hidrólisis del sustrato son los tres aminoácidos antes mencionados, no obstante estas enzimas presentan varios sub-sitios, que varían en mayor medida y son los encargados de posicionar el sustrato para favorecer la ruptura del enlace peptídico. Esto es posible gracias a interacciones no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman los sub-sitios y el sustrato, confiriéndole la especificidad por el mismo. Estos sub-sitios suelen denominarse S1, S2, S3...Sn y así sucesivamente a los que acomodan la parte N-terminal del sustrato, mientras que aquellos que interactúan con la parte C-terminal, suelen llamarse, S'1, S'2, S'3...S'n y se localizan flanqueando una hendidura en forma de V rodeada por dos lóbulos, en la que se encuentran los residuos catalíticos. Por otra parte a los residuos del sustrato se le suele denominar como P1, P2, P3...Pn y P'1, P'2, P'3...P'n para los residuos N y C-terminal respectivamente (Fig. 5).

En la catálisis mediada por estas enzimas, es necesario que se produzca una transferencia protónica desde la cisteína a la histidina catalítica (correctamente posicionada gracias a un residuo de asparagina) formando un par iónico, tiolato-imidazol que es estabilizado además mediante un enlace de hidrógeno por una glutamina. Luego el tiolato de la cisteína actúa como nucleófilo atacando al carbono del carbonilo, perteneciente al enlace peptídico, formando un intermediario tetraédrico que se estabiliza por la presencia de un bolsillo oxianiónico. Este

intermediario favorece la posterior formación de un tiol-éster enzima-sustrato, con la liberación simultánea de la porción N-terminal del sustrato. Este paso es seguido por la hidrólisis de la porción de sustrato unida a la enzima por un agua, formando un segundo intermediario tetraédrico que finalmente da lugar a la enzima libre y la porción del sustrato C-terminal (Fig. 6)<sup>22-25</sup>. Mientras algunas peptidasas presentan una especificidad restrictiva, lo que implica que solo producen el clivaje de su sustrato en presencia de ciertos aminoácidos, otras hidrolizan enlaces peptídicos de una amplia gama de sustratos, mostrando cierta promiscuidad catalítica.

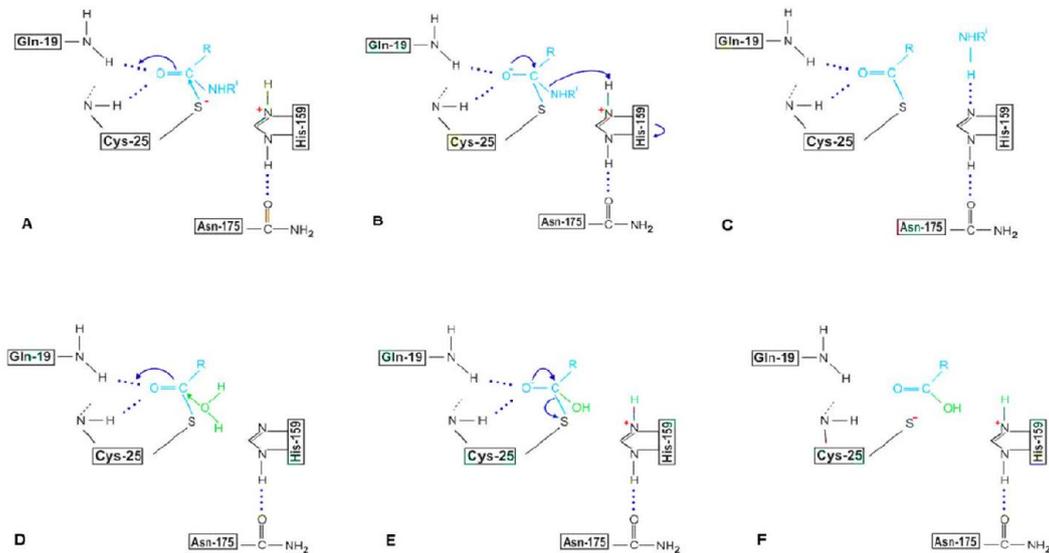


Figura 6.- Esquema del mecanismo catalítico de cisteína proteasas.

### 2.3 Las catepsinas de *Fasciola hepatica*

Las catepsinas son sintetizadas a nivel de las células epiteliales que recubren su tracto digestivo ciego, implicadas tanto en funciones de absorción como de secreción. Si bien estas enzimas se encuentran como proenzimas en el interior de las células, distribuidas en forma diferencial en la cara apical o basal, las mismas son activadas inmediatamente luego de su secreción al tubo digestivo, el cual posee un pH levemente ácido que favorece dicha activación<sup>36</sup>.

*Fasciola hepatica* presenta una de las familias más numerosas de catepsinas, las que forman parte mayoritaria del producto de excreción-secreción de este parásito. En base a análisis filogenéticos, es posible organizar a las catepsinas L en 5 subtipos distintos: *FhCL1*, *FhCL2*, *FhCL3*, *FhCL4* y *FhCL5*<sup>35-37-38-39</sup>. La expresión diferencial de estas enzimas en los diferentes estadios del parásito está finamente regulada y asociada al desarrollo de *Fasciola* en su hospedero definitivo, teniendo un rol protagónico en el desenquiste de los JRD, migración de los mismos y su posterior maduración hacia la forma adulta a nivel hepático.

<sup>36</sup> D. Halton. *Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes*. *Int. J. Parasitology*. Vol. 27, pp. 693-704, 1997.

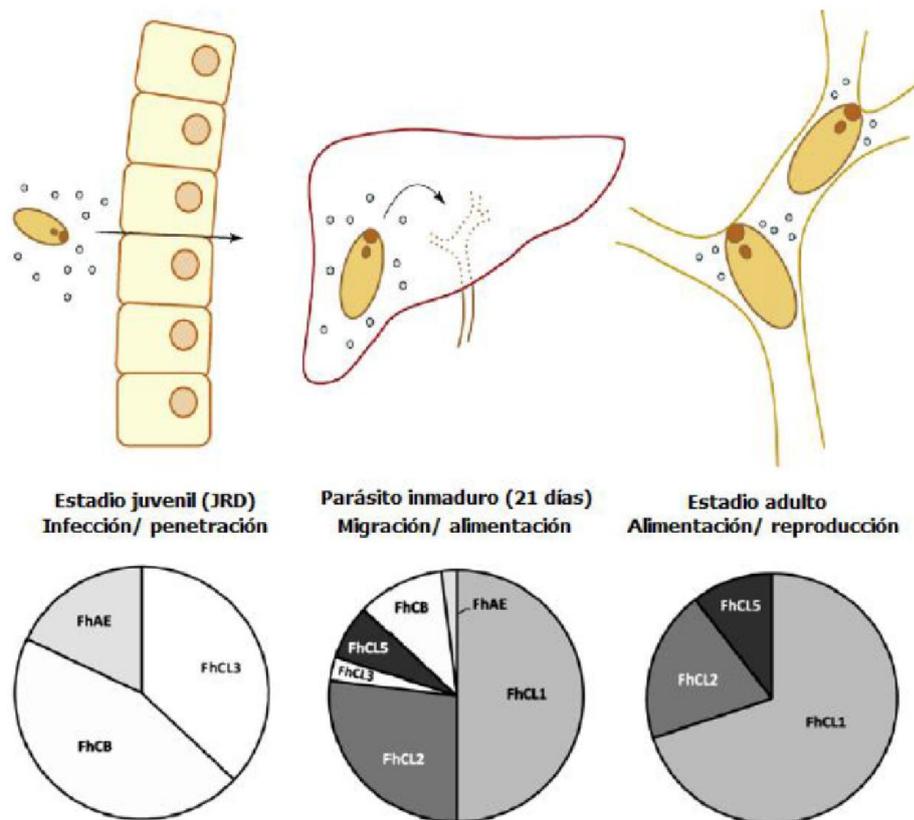
<sup>37</sup> R. Morphew, H. A. Wright, E. J. LaCourse, J. Porter, J. Barret, D. J. Woods, *et al.* *Towards Delineating Functions within the Fasciola Secreted Cathepsin L Protease Family by Integrating In Vivo Based Sub-Proteomics and Phylogenetics*. *PLoS Neg. Trop. Dis.* Vol 5, pp -937. 2011.

<sup>38</sup> M. Robinson & J. Dalton. (2011) *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*. EE.UU: Springer.

<sup>39</sup> J. Irving, T. W. Spithill, R. N. Pike, J. C. Whisstock, & P. M. Smooker. *The Evolution of Enzyme Specificity in Fasciola spp.* *Mol. Biol. Evol.* Vol. 57 pp. 1-15. 2003.

Por otra parte un análisis bioquímico detallado de la producción de estas catepsinas en los diferentes estadios de *Fasciola* permitió elaborar un esquema de esa variación a lo largo de su ciclo vital. En el caso de la forma adulta, se evidenciaron a nivel del producto de excreción-secreción, dos catepsinas L mayoritarias, denominadas catepsina L1 (*FhCL1*) y catepsina L2 (*FhCL2*), las que se diferencian fundamentalmente a nivel de especificidad de sustrato y en ciertas propiedades fisicoquímicas<sup>40-41</sup>.

En el caso de los JRD, en un estudio realizado en 1995, se evidenció la presencia de una catepsina L mayoritaria, diferente a las antes mencionadas<sup>42</sup>, la cual fue clonada posteriormente y recibió el nombre de *FhCL3*<sup>19</sup>. Esta proteasa presenta una identidad de secuencia aminoacídica de un 70% con respecto a las enzimas expresadas en el adulto y si bien su sitio activo se encuentra altamente conservado se han observado diferencias a nivel de los sub-sitios que podrían explicar su comportamiento diferencial y preferencia por distintos sustratos.



**Figura 7.-** Expresión diferencial enzimática de los diferentes estadios de *Fasciola hepatica*. Los gráficos de torta representan los niveles de expresión de las proteasas que fueron determinados a partir de un análisis cuantitativo por espectrometría de masas<sup>21</sup>. FhAE: *Fasciola hepatica* asparaginil endopeptidasas; FhCB: *Fasciola hepatica* catepsinas B; FhCL1-5: *Fasciola hepatica* catepsinas L 1-5.

<sup>40</sup> C. M. Stack, C. R. Caffrey, S. M. Donnelly, A. Seshaadri, J. Lowther, J. F. Tort, et al. *Structural and Functional Relationships in the Virulence-associated Cathepsin L Proteases of the Parasitic Liver Fluke, Fasciola hepatica*. *The Jour. of Bio. Chem.* Vol. 283, pp. 9896-9908, 2007.

<sup>41</sup> A. Smith, J. A. Dowd, M. Heffernan, C. D. Robertson, & J. P. Dalton, et al. *Fasciola hepatica: A secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin*. *Int. J. Parasitol.* Vol 23, pp. 977-983, 1993.

<sup>42</sup> J. Tkalcevic, K. Ashman & E. Meeusen. *Fasciola hepatica: rapid identification of newly excysted juvenile proteins*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 213, pp. 169-174, 1995.

Estudios más recientes mostraron que de las proteasas secretadas por los JRD, un 45% son catepsinas B, un 37% catepsina *FhCL3* y un 18% asparaginil endopeptidasas. Es fascinante notar que el repertorio de secreción varía incluso en etapas tempranas del estadio juvenil, en donde a los 21 días post-infección, ya se detecta una dramática disminución en la secreción de *FhCL3* a un 2 o 3 % para dar lugar a un incremento de catepsinas que serán típicas en adultos como *FhCL1*, *FhCL2* y *FhCL5*. En el estadio adulto *FhCL1* es la enzima mayoritaria, presentándose en un 67%, mientras que *FhCL2*, representa un 27% y *FhCL5* solo un 6% (Fig. 7)<sup>21-43</sup>

Con los avances alcanzados a nivel del desarrollo cristalográfico de proteínas, ha sido posible obtener la estructura de varias catepsinas, entre las que se destacan *FhCL1* de *Fasciola*, papaína, cruzipapaína y varias catepsinas humanas. Esto posibilitó un estudio más detallado acerca de cuáles podrían ser las determinantes estructurales de las catepsinas responsables de su especificidad de sustrato diferencial. En ese sentido, varias de estas enzimas, se han cristalizado ya sea con inhibidores en sus sitios activos o con sus propios sustratos, visualizándose que estos últimos se disponen en una conformación extendida que facilita la catálisis e interacciones específicas entre los residuos P del sustrato y los S de los sub-sitios<sup>40-44-45</sup>.

El sub-sitio S2 está mayoritariamente implicado en la especificidad de sustrato de las catepsinas, siendo además el que se encuentra mejor caracterizado, por presentar una mayor superposición en el análisis cristalográfico de enzima-inhibidor (análogo de sustrato). Se presume que estaría interaccionando en forma similar con los sustratos en todas las enzimas de esta familia. S2 cuenta con la particularidad de abarcar residuos a ambos lados del surco del sitio activo, presentando en general un carácter hidrofóbico, con aminoácidos alifáticos y metioninas. En *FhCL1*, entre los residuos mayoritariamente implicados en la interacción con el sustrato se encuentran la leucina 67 y valina 157, en la entrada del bolsillo S2, del cual también forman parte, la metionina 70, alanina 135, asparagina 161, alanina 163 y por último una leucina 209 que se encuentra en el fondo del bolsillo (numeración de la papaína). Analizando la similitud entre catepsinas de diferentes especies se visualizan pequeñas variaciones en el sub-sitio, que se presume podrían estar implicadas en la diferencia en la especificidad de estas enzimas (Fig. 8)<sup>25-44</sup>.

Por otra parte se reconocen en estas enzimas dos sub-sitios más pequeños en extensión, pero que participan activamente en el correcto posicionamiento del sustrato: S1 y S3. En el primero se hacen presentes los aminoácidos que pertenecen a la diada catalítica cisteína 25 e histidina 162, mientras que en el segundo se hallan tres glicinas, 63, 66 y 67 así como una asparagina en posición 62.<sup>44</sup>

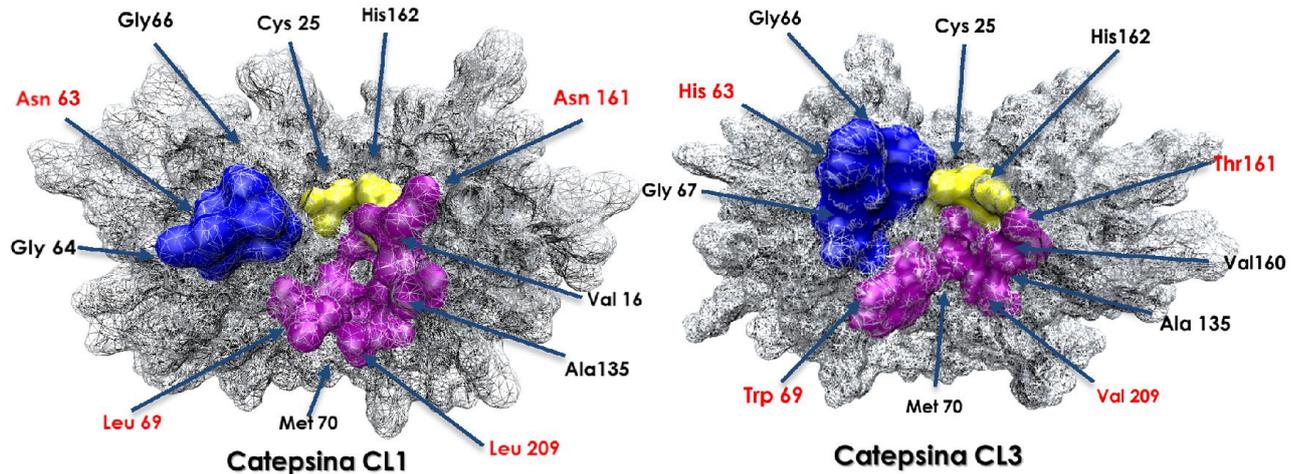
En base al conocimiento cristalográfico de *FhCL1* y de la secuencia aminoacídica de *FhCL3*, fue posible desarrollar un modelo estructural de esta última en su estado de pro-enzima, para analizar las diferencias entre los residuos pertenecientes a los sub-sitios de ambas enzimas. Por ejemplo, *FhCL3* presenta una valina en el lugar de la leucina en posición 209, lo que estaría modificando el fondo del sub-sitio S2. La asparagina 161, es una treonina en *FhCL3*, agregando una cadena lateral diferente, donde el hidroxilo es capaz de formar enlaces de hidrógeno con el residuo del sustrato en posición P2. Otro cambio significativo, se produce a nivel de la posición

<sup>43</sup> C. Linnevers, M. E. Mcgrath, A. Armstrong, F. R. Mistry, M. G. Barnes, J. L. Klaus, *et al.* Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex. *Protein Sci.* Vol. 6, pp. 919-921, 1997.

<sup>44</sup> I. Corvo. 2013. *Estudio de la especificidad de sustrato de la Catepsina L3 secretada por el estadio juvenil de Fasciola hepática* (Tesis doctoral). Departamento de Genética. Facultad de Medicina.

69, donde *FhCL1* posee una leucina y *FhCL3* un triptófano. Residuos aromáticos voluminosos como el triptófano, confieren ciertas restricciones estéricas a la hora de alojar el sustrato, al mismo tiempo que ofrecen la posibilidad de interactuar con otros anillos (Fig. 8)<sup>44</sup>.

Por último, se destacan diferencias a nivel del sub-sitio S3, en donde el residuo 63 cambia de asparagina en *FhCL1* a histidina en *FhCL3*, lo que favorece el hecho de que para *FhCL3* este sub-sitio tenga cierta preferencia por sustratos con cadenas laterales que no sean de gran volumen.



**Figura 8.-** Representación de los sub-sitios que forman parte del sitio activo, correspondientes a las cathepsinas de *Fasciola hepatica*, a la izquierda *FhCL1* a la derecha *FhCL3*. Se destacan en rojo los residuos variables entre ambas enzimas.

Además de diferencias estructurales entre las enzimas expresadas por el estadio adulto y el estadio juvenil, existen diferencias en las modificaciones pos-traduccionales que pueden afrontar. En ese sentido *FhCL3* presenta sitios particulares de *N*-glicosilación, ausentes en *FhCL1*, los que en un principio no estarían modificados en la enzima en su estado nativo<sup>45-46</sup>.

Diferencias en la estabilidad y actividad de estas enzimas, a 37°C y diferentes pHs han sido detectadas. En el caso de *FhCL3*, se ha visualizado que se mantiene estable a dicha temperatura por 8 horas, conservando el 50% de su actividad a pH neutro, siendo este último en el que alcanza su actividad óptima. Para *FhCL1*, se visualiza una actividad óptima a pH levemente ácido, mostrando un 70% de su actividad máxima a pH 5.5. Ambas enzimas necesitan de un pH levemente ácido para madurar (entre 4.0 y 5.0) y son activas en un amplio rango de pH (4.0 a 7.3)<sup>46-37</sup>.

<sup>45</sup> V. Truk & B. Turk. *Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors: Recent Developments*. *Acta Chim. Slov.* Vol. 55, pp. 727-738, 2008.

<sup>46</sup> J. Cornelissen, C. P. Gaasenbeek, F. H. Borgsteede, W. G. Holland, M. M. Harmsen & W. J. Boersma. *Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant Fasciola hepatica cathepsin L-like protease*. *Int. J. Parasitology*. Vol 31, pp. 728-737, 2001.

### 3. Principales inhibidores de cisteína proteasas

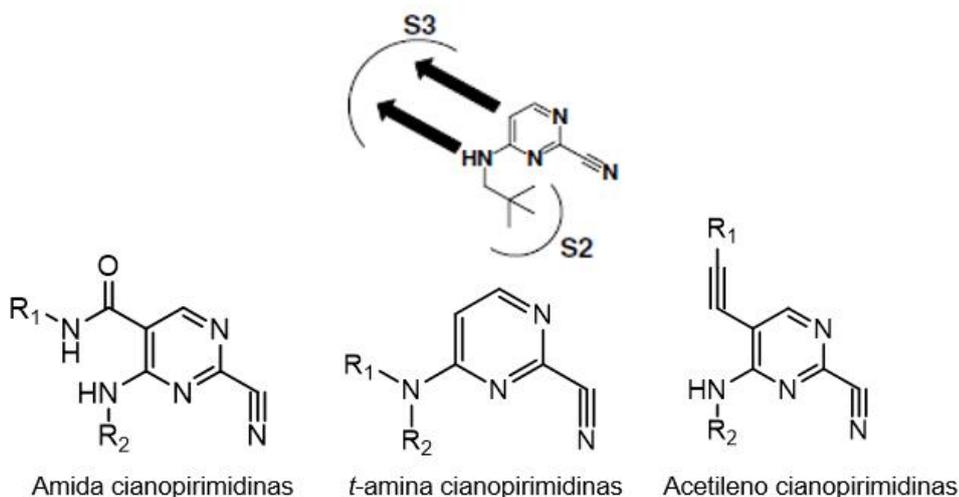
#### 3.1 Inhibición de cisteína proteasas como estrategia general para el combate de diversas patologías

Los avances de la tecnología han incrementado el conocimiento acerca de las causas que originan diversas patologías. Esto ha permitido identificar ciertas entidades biológicas que son plausibles de ser atacadas para tratar de impedir tanto el inicio como el desarrollo de las mismas. Entre los blancos farmacológicos más comúnmente explorados, se encuentran las cisteína proteasas, tanto catepsinas humanas como parasitarias, que son protagonistas como ya se mencionó en un gran número de enfermedades.

##### 3.1.1 Catepsina K y osteoporosis

Un claro ejemplo es el de la catepsina K, cuya expresión y actividad se ve incrementada a nivel lisosomal en los osteoclastos, en cuadros de pacientes que padecen osteoporosis. Esta enzima tiene la capacidad de degradar tanto colágeno tipo I, uno de los componentes mayoritarios de la matriz ósea (un 90%), así como colágeno tipo II<sup>24-47</sup>.

Diversos estudios han mostrado que esta enzima sería una de las responsables, en conjunto con el entorno celular, de la dramática reestructuración que sufre la matriz ósea en esta patología. Es por ello que la búsqueda de inhibidores selectivos de catepsina K se ha convertido en una estrategia para el desarrollo de un tratamiento efectivo de esta enfermedad. De hecho estudios recientes han mostrado que varios inhibidores de esta enzima, tanto *ex-vivo* en cultivos celulares, como en modelos de primates y roedores, revierten los efectos ocasionados por la intensa actividad de la catepsina K, visualizándose una disminución en los indicadores de resorción ósea, así como un incremento en la mineralización de la matriz<sup>48</sup>.

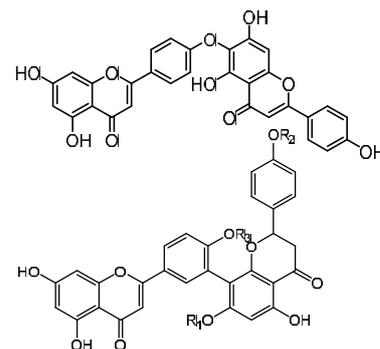


**Figura 9.-** Arriba un esquema con una forma de interacción posible, con los sub-sitios de las catepsinas S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub>. Abajo esqueletos de los tres tipos de inhibidores con los sitios en donde se introducen sustituyentes.

<sup>47</sup> D. Brömme & S. Willson. *Extracellular Matrix Degradation* (2011). *Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis*. Springer: Alemania.

<sup>48</sup> M. Zaidi, B. Troen, B. Moonga & E. Abe. *Cathepsin K, Osteoclastic Resorption and Osteoporosis Therapy*. *J. Bone Min. Res.* Vol 16, pp. 1747-1749, 2001.

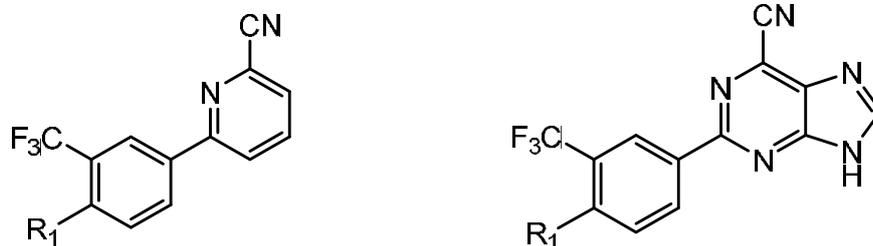
Entre los inhibidores empleados para esta enzima en forma selectiva se encuentran a las ciano-pirimidinas, acetileno, amida y *t*-amina cianopirimidinas, moléculas que han mostrado cierta interacción diferencial con los sub-sitios de la enzima, fundamentalmente a nivel de S2, lo que podría explicar su selectividad inhibitoria con respecto a otras catepsinas como S y L (Fig. 9) <sup>49-50-51</sup>. Por otra parte, en un hallazgo más reciente se destacan como inhibidores de esta enzima a las biflavonas naturales, obtenidas de extractos vegetales, fundamentalmente de *Taxodium mucronatum* y *Cycas guizhouensis* (Fig. 10)<sup>55</sup>.



**Figura 10.-** Esqueleto de las biflavonas, inhibidoras de catepsina

### 3.1.2 Catepsina S y patologías autoinmunes

Por otra parte, otras catepsinas humanas suelen ser blanco para el tratamiento de patologías en las que la autoinmunidad es protagonista, como es el caso de la artritis reumatoidea y la esclerosis múltiple. En estas patologías, la catepsina S se observa sobre-expresada a nivel de las células presentadoras de antígeno, lo que altera dramáticamente el clivaje de los péptidos que posteriormente son presentados a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad. En este sentido, se han descubierto inhibidores selectivos de esta enzima, purinas y pirimidinas pero sustituidas en forma particular. Dos ejemplos de ello son, 2-fenil-9Hpurina-6-carbonitrilo y 6-fenil-piridina-2-carbonitrilo (Fig. 11). Estos inhibidores se diferencian de otros reportados previamente para cisteína proteasas, los arilnitrilos, en donde el nitrilo está flanqueado por dos átomos de nitrógeno aromáticos y electronegativos, ofreciendo alta reactividad con nucleófilos. Los nuevos compuestos son estables frente a nucleófilos, como el glutatión, aunque no han podido optimizar su capacidad inhibitoria a más allá de 10nM<sup>52-53</sup>.



**Figura 11.-** Al a derecha, estructura de 6-fenil-piridina-2-carbonitrilo. A la izquierda estructura de 2-fenil-9Hpurina-6-carbonitrilo.

<sup>49</sup> E. Wiczewzak, P. Drabik, M. Abrahamson & A. Grubb. *In Search of Selective Inhibitors of Cysteine Protease Cathepsin K*. *Int. J. Pep. Res. Ther.* Vol. 11 pp. 203-209. 2005.

<sup>50</sup> N. Teno, O. Irie, T. Miyake, K. Gohda, M. Horiuchi, S. Tada, *et al.* *New chemotypes for cathepsin K inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Vol. 18, pp. 2599-2603, 2008.

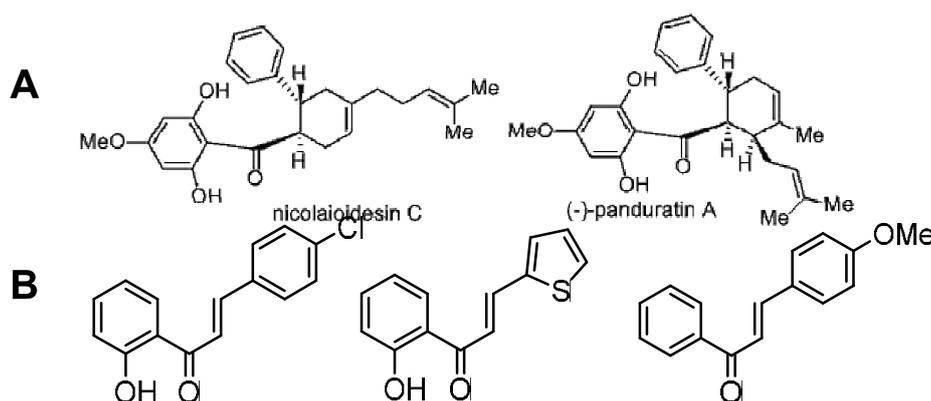
<sup>51</sup> Z. Rankovic, J. Cai, J. Kerr, X. Fradera, J. Robinson, A. Mistry, *et al.* *Design and optimization of a series of novel 2-cyano-pyrimidines as cathepsin K inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Vol. 20, pp. 1524-1527, 2010.

<sup>52</sup> J. Cai, M. Baugh, D. Black, C. Long, D. J. Bennett, M. Dempster *et al.* *6-Phenyl-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-4-carbonitrile as cathepsin S inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Vol 20, pp. 4350-4354, 2010.

<sup>53</sup> M. J. Leyva, F. DeGiacomo, L. S. Kaltenbach, J. Holcomb, N. Zhang, J. Gafni, *et al.* *Identification and Evaluation of Novel Small Molecule Pan-Caspase Inhibitors in Huntington's Disease Models*. *J. Med. Chem.* Vol 49, pp. 6298-6307, 2006.

### 3.1.3 Catepsinas B y L y cáncer

En particular, un grupo de flavonoides sintéticos han tomado en el último tiempo un rol protagónico entre los inhibidores de catepsinas B y L, destacándose entre ellos a las chalconas<sup>54-55</sup>. Las catepsinas humanas B y L se observan sobre-expresadas a nivel lisosomal en células malignas, dónde tendrían un papel primordial en el proceso de progresión tumoral. Estas enzimas son liberadas hacia el medio celular, jugando un rol protagónico en el desarrollo de esta enfermedad. En particular se ha detectado una expresión diferencial de este par de catepsinas en cancer de pancreas. Estudios que involucran el empleo de ratones *knockouts* en ambas enzimas, han mostrado una reducción considerable a nivel de proliferación celular y crecimiento tumoral. Esta evidencia sugiere a estas enzimas como potenciales blancos para el desarrollo de fármacos anti-cancerígenos<sup>56</sup>. Dentro de los flavonoides, las chalconas son protagonistas por su gran versatilidad farmacológica, contando con propiedades: antioxidantes, antiproliferativas, anti-cancerígenas, anti-inflamatorias e incluso impidiendo algunas infecciones. Por otra parte, tanto sus buenos perfiles de actividad así como su baja toxicidad biológica, vuelven a estos compuestos, un buen punto de partida a la hora de desarrollar nuevos fármacos para esta patología. Incluso algunas chalconas naturales, como panduratin A y nicolaioidesin C, han mostrado actividad citotóxica en células de cáncer de próstata, así como inhibición de catepsinas *in vitro* (Fig.12A). Asimismo algunas chalconas sintéticas, han mostrado actividad citotóxica en adenocarcinoma de mama receptor de estrógeno positivo (línea MCF-7) y en células derivadas de carcinoma renal (línea TK-10) (Fig. 12B)<sup>57,58</sup>.



**Figura 12.-** Algunos flavonoides naturales y sintéticos que mostraron actividad citotóxica frente a células de cáncer de próstata (A)<sup>57</sup> y adenocarcinoma de mama receptor de estrógeno positivo y derivadas de carcinoma renal (B)<sup>58</sup>.

<sup>54</sup> S. H. Kim, E. Lee, K. H. Baek, H. B. Kwon, H. Woo, E. S. Lee, et al. *Chalcones, inhibitors for topoisomerase I and cathepsin B and L, as potential anti-cancer agents. Bioorg. Med. Chem. Lett.* Vol. 23, pp. 3320-3324, 2013.

<sup>55</sup> G. Z. Zeng, X. L. Pan, N. H. Tan, J. Xiong & Y. M. Zhang. *Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. J. Med. Chem.* Vol. 41 pp. 1247-1252. 2006.

<sup>56</sup> O. Vasiljeva & B. Turk. *Differential Impact of Cysteine Cathepsins on Genetic Mouse Models of De novo Carcinogenesis: Cathepsin B as Emerging Therapeutic Target. Front. Pharmacol.* Vol. 90, pp. 380, 2008.

<sup>57</sup> D. Majumdar, A. Devanabanda, B. Fox, J. Schwartzman, H. Cong, JA. Porco & HC. Weber. *Synthetic cyclohexenyl chalcone natural products possess cytotoxic activities against prostate cancer cells and inhibit cysteine cathepsins in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol 416, pp. 397-402, 2011.

<sup>58</sup> M. Cabrera. *Flavonoides y análogos como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cancer.* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias. Grupo de Química Medicinal.

### 3.1.4 Catepsinas S, B y L: implicancias en enfermedad de Alzheimer (EA).

Las catepsinas son enzimas que podrían estar implicadas en la patogénesis de este grave desorden neurodegenerativo, especialmente en estadios de la enfermedad en los que se genera la forma insoluble del péptido  $\beta$ -amiloide. Este último es generado a partir de un clivaje secuencial del precursor amiloide (APP) por una enzima especializada en ello, la  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme (BACE1) y por la  $\gamma$ -secretasa. Se ha observado que las catepsinas S, L y B son capaces de realizar dicho clivaje más rápido que BACE1. Evidencias concretas del papel de estas enzimas en el desarrollo de la enfermedad se confirmaron al realizar tratamientos con un inhibidor específico de catepsina B, CA074, en un modelo animal de ratones, en el cual se encontraba mutada la enzima BACE, visualizándose una mejora en la memoria con la concomitante reducción de la formación del péptido  $\beta$ -amiloide<sup>59</sup>.

Los inhibidores sintéticos selectivos para catepsina B más estudiados son ciclo-hidroxiethylaminas y vinil sulfonas derivados (Fig. 13)<sup>60</sup>. Muchos inhibidores de catepsina L fueron desarrollados en base a esas series y a las similitudes estructurales entre B y L. No obstante L no posee residuos tan voluminosos y aromáticos en la hendidura de unión por lo que estos inhibidores serán en general más flexibles que los inhibidores para B<sup>61</sup>.

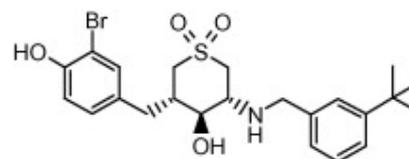


Figura 13.- Inhibidor de BACE1, ciclo - hidroxietilamina.

### 3.2 Catepsinas L de *Fasciola hepatica*: Blancos efectivos para el control de la fasioliasis.

A la luz de esta evidencia, sin lugar a dudas las catepsinas producidas en los diferentes estadios del parásito *Fasciola hepatica* son un blanco plausible de ser explotado para el desarrollo de fármacos, a partir de inhibidores selectivos de estas enzimas. Dado el rol protagónico que ocupan fundamentalmente *FhCL3* en la invasión inicial del hospedero en su forma juvenil, así como *FhCL1* en su estadio adulto, es evidente el carácter esencial de estas enzimas para su correcto desarrollo. De hecho, estudios donde se bloquea la expresión de catepsinas en estadios juveniles mediante ARN interferentes, han mostrado una disminución drástica de su capacidad de invasión<sup>29</sup>. Esto sumado a las pequeñas diferencias que presentan estas enzimas a nivel del sitio activo, vuelven a ambas un blanco de gran interés a la hora de explorar nuevas alternativas para su inhibición selectiva. No obstante un desafío enorme se superpone, ya que al haber enzimas análogas en el hospedero, los inhibidores tendrán que ofrecer una selectividad óptima para estas entidades catalíticas. Es por ello que el avance en el conocimiento de estas enzimas y la búsqueda de nuevos inhibidores, incluye en forma implícita un incremento en el conocimiento de sus análogas en mamíferos, lo que contribuye también al avance en la comprensión de otras patologías donde estén implicadas las catepsinas.

<sup>59</sup> C. M. Lampe & C. S. Gondi. *Cathepsin B Inhibitors for Targeted Cancer Therapy*. *J Cancer Sci Ther*. Vol. 6, pp. 417-421, 2014.

<sup>60</sup> H. Rueeger, JM. Rondeau, C. McCarthy, H. Möbitz, M. Tintelnot-Blomley, U. Neumann, et al. *Structure based design, synthesis and SAR of cyclic hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitors*. Vol. 21, 1942-1947, 2011.

<sup>61</sup> V. Hook, M. Kindy, & G. Hook. *Inhibitors of Cathepsin B Improve Memory and Reduce  $\beta$ -Amyloid in Transgenic Alzheimer Disease Mice Expressing the Wild-type, but Not the Swedish Mutant,  $\beta$ -Secretase Site of the Amyloid Precursor Protein*. *J. Biol. Chem*. Vol. 283, pp. 7745-7753, 2008.

## **II. Objetivos**

## Objetivo general

En base al potencial farmacológico de las catepsinas producidas por *Fasciola hepatica* en diferentes estadios, se propone realizar un *screening* de compuestos utilizando una quimioteca diversa, en búsqueda de inhibidores de *FhCL1* y *FhCL3*. Este aporte al conocimiento de nuevas estructuras químicas inhibidoras de catepsinas, podrá contribuir al desarrollo de fármacos que permitan un control más efectivo de la fascioliasis.

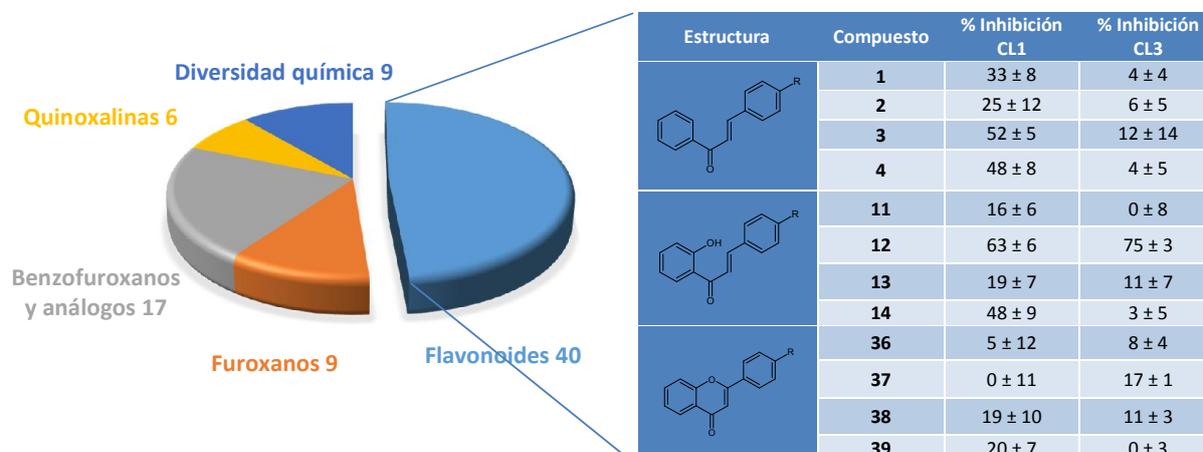
## Objetivos específicos y estrategia de trabajo

-  Evaluar un número significativo de compuestos de la quimioteca perteneciente al Grupo de Química Medicinal, de Facultad de Ciencias, como inhibidores enzimáticos frente a *FhCL1* y *FhCL3*.
-  Seleccionar compuestos que posean un porcentaje de inhibición mayor al 60% para determinar su  $IC_{50}$  y velocidad de unión a la enzima.
-  Seleccionar los compuestos con menor  $IC_{50}$  para evaluar su capacidad trematocida en JRD.
-  Realizar estudios de *docking* molecular con los flavonoides para ambas enzimas intentando establecer el o los potenciales sitios de unión de cada compuesto.
-  Analizar cuáles podrían ser los determinantes estructurales de la inhibición observada experimentalmente.

### **III. Materiales y métodos**

## 1. Selección de los compuestos a evaluar de la quimioteca

Se realizó la selección de 80 compuestos de la quimioteca del Grupo de Química Medicinal, en Facultad de Ciencias, buscando incluir una gran diversidad química, además de tener en cuenta las características propias de los inhibidores conocidos para las catepsinas. Inicialmente, se efectuó un *screening* primario con *FhCL1* y *FhCL3* de unos 16 compuestos



**Figura 14.-** Gráfica de torta mostrando el número de compuestos evaluados de cada familia química. A la derecha se listan 12 de los compuestos evaluados en el *screening* inicial, se aprecia gran diversidad en los porcentajes de inhibición.

de familias diversas, observándose que los flavonoides ofrecieron una mayor variedad en el rango de porcentajes de inhibición, así como en grupos sustituyentes. La vasta experiencia del grupo en síntesis de flavonoides sumado a este resultado, justificó la selección de 38 flavonoides sintéticos y uno natural, la quercetina, principio activo presente en *Achyrocline satureioides*, conocido por su actividad antioxidante y antiinflamatoria. Además de los flavonoides, se evaluaron quinoxalinas, benzofuroxanos y análogos, furoxanos y compuestos de diversidad química entre los que se destacan compuestos nitrogenados e imidazoles, entre otros que por tener gran complejidad química no pudieron ser catalogados en las familias anteriores (Fig. 14).

## 2. *Screening* de los compuestos seleccionados: ensayos de inhibición

Se realizaron ensayos de actividad enzimática para evaluar la capacidad inhibitoria de los diferentes compuestos seleccionados, partiéndose de un stock de los mismos a 10mM en DMSO. En ese sentido, se incubaron durante 5 minutos, la enzima en concentraciones de nM (puesta a punto para trabajar en velocidades iniciales durante todo el tiempo de la medida) y el inhibidor en una dosis fija y moderada de 10  $\mu\text{M}$ <sup>62</sup>, en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH6, 1 mM DTT, 1 mM EDTA a temperatura ambiente. Luego del período de incubación, se inició la reacción enzimática con el agregado de 20  $\mu\text{M}$  del sustrato, un péptido fluorogénico conjugado a AMC específico para cada enzima. Se registró la actividad remanente a velocidades iniciales, midiendo el incremento en la fluorescencia por liberación de AMC en el tiempo (URF/s) con excitación a 340 nm. y emisión a 440 nm., durante 10 a 30 minutos empleando un espectrofluorímetro (Varioskan Thermo®). En el caso de *FhCL1* se empleó el sustrato Z-VLK-AMC, mientras que para *FhCL3* se utilizó Tos-GPR-AMC. Cada compuesto se evaluó por duplicado y en cada ensayo se incluyó un control, positivo de la

<sup>62</sup> F. Ross, P. Hernández, W. Porcal, G. V. López, H. Cerecetto, M. González, *et al.* Identification of Thioredoxin Glutathione Reductase Inhibitors That Kill Cestode and Trematode Parasites. *PLoS one*. Vol. 7, pp. e35033, 2012.

enzima en ausencia de inhibidor, cuyo valor se tomó como el 100% de actividad enzimática. A partir de las pendientes obtenidas en cada caso y el control positivo, se obtuvieron los porcentajes de inhibición para cada compuesto. Como control negativo se empleó un inhibidor irreversible de cisteína proteasas, E-64. Ambas enzimas se obtuvieron recombinantes en el laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Facultad de Medicina, según el protocolo desarrollado por Corvo *et al*<sup>65</sup>.

### 3. Caracterización de los compuestos con mejor porcentaje de inhibición

#### 3.1 Cálculo del IC<sub>50</sub>

Para el cálculo del IC<sub>50</sub> se seleccionaron aquellos compuestos que ofrecieron un porcentaje de inhibición mayor a 60%. Se utilizaron 12 concentraciones diferentes para cada compuesto, 0, 0.625, 0.937, 1.25, 1.875, 2.5, 3.75, 5, 7.5, 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$ . La medida de actividad enzimática se realizó por triplicado, en placa de 96 pocillos, empleando el protocolo descrito en la sección anterior. Los valores obtenidos resultaron de linealizar el gráfico de URF vs concentración de inhibidor, realizando el gráfico de URF vs Logaritmo de la concentración de inhibidor, obteniendo a partir de dicha expresión la concentración de inhibidor a la que la enzima estaba inhibida un 50% con respecto al control sin inhibidor.

#### 3.2 Ensayos de *slow-binding*

En este ensayo, se evaluó si el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática por los compuestos es dependiente del tiempo. Para ello se incubaron por duplicado los compuestos con mejor IC<sub>50</sub> a diferentes tiempos: 3, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos y se determinaron los porcentajes de inhibición para cada tiempo de incubación enzima-compuesto siguiendo el mismo protocolo empleado en los ensayos anteriores.

#### 3.3 Ensayos de reversibilidad

Para poder obtener información acerca de la reversibilidad de la unión de los compuestos de interés se empleó un ensayo por dilución rápida<sup>63</sup>. El mismo consiste en realizar una preparación en la que se coloca la enzima 100x y el inhibidor 10x, con respecto a las concentraciones empleadas en el ensayo de inhibición. Se incuba dicha mezcla 15 minutos. Posteriormente se diluye la mezcla 100 veces con el agregado del sustrato peptídico fluorogénico en el volumen apropiado para llevarlo a la misma concentración que se emplea en el ensayo de inhibición. Se realiza la medida de la actividad remanente de la enzima a velocidades iniciales y se analiza la curva obtenida para cada inhibidor. En función de la misma, se determina si el inhibidor es irreversible, reversible lento o completamente reversible. En este caso se empleó un control de enzima sin inhibidor al igual que en los ensayos anteriores.

### 4. Estudios *in vitro* con JRD

Las metacercarias de *Fasciola hepatica* fueron adquiridas en Baldwin Aquatics Inc. (Monmouth, Oregon) y los JRD fueron obtenidos mediante un protocolo de desenquiste de metacercarias *in vitro* previamente descrito<sup>64</sup>. Brevemente se colocan 100 metacercarias en un soporte tipo netwell con una maya porosa de 100  $\mu\text{M}$  en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Se mantienen a temperatura ambiente por 5 minutos para eliminar la pared

---

<sup>63</sup> R. Copeland (2005). *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. EE.UU: Wiley Interscience.

exterior. Inmediatamente se lavan 3 veces con PBS y se activan las metacercarias incubándolas a 39°C en una mezcla de solución A (0.4% taurocolato de sodio, 120 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 140 mM de NaCl) y solución B (50 mM de HCl, 33 mM de L-cisteína) preparada en el momento. Se mantienen a 39°C de 90 a 180 minutos, controlando la cantidad de metacercarias que desenquistan a medida que transcurre el tiempo. Los JRD que emergen se recogen, se lavan varias veces con medio de lavado RPMI1640 pH 7.2 y se transfieren a una placa de 6 pocillos.

Los parásitos se mantienen a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 suplementado con 200 U/mL de penicilina G sulfato, 200 mg/mL de estreptomycin sulfato, 500 ng/mL de Anfotencina B y 10 mM HEPES<sup>64</sup>. Se cuentan los JRD obtenidos en el desenquiste, se dividen en 4 grupos: dos tratados y dos controles. A los grupos tratados se agrega el inhibidor en una concentración de 20 µM (dilución 1/500 del *stock*) y a los grupos control se le adiciona 0.2% DMSO. Se realiza un seguimiento de cambios morfológicos y motilidad de los JRD entre tratados y control por visualización en el microscopio óptico. Una vez transcurridas 48 hrs. se procede a registrar los cambios observados y se realiza una tinción vital con diacetato de fluoresceína, cuantificándose la intensidad por microscopía de fluorescencia en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 200).

## 5. Estudios de *docking* molecular ligando-proteína de flavonoides en *FhCL1* y *FhCL3*

### 5.1 Preparación de las estructuras proteicas

Tomando los modelos de ambas enzimas producidos por Stack, C. *et al.*<sup>41</sup> y Corvo I. *et al.*<sup>65</sup> mediante modelado por homología, se realizaron minimizaciones clásicas y simulaciones de dinámica molecular de 20 ns con el objetivo de mejorar la calidad de las estructuras. Las mismas serán posteriormente utilizadas para los estudios de *docking* molecular de los compuestos.

Para ello se emplearon protocolos de minimización estándar, con el módulo SANDER del programa AMBER12<sup>66</sup> y el campo de fuerza *ff03.r1*<sup>67</sup>. Tratando de simular condiciones fisiológicas se emplearon contra-iones sodio para neutralizar la carga y se utilizó una caja octaédrica de aguas TIP3P<sup>68</sup>. En la misma, se relajan contra-iones y moléculas de agua, dejando la proteína fija, con calentamiento de 0 a 300 K utilizando el termostato de Langevin<sup>69</sup> a presión y volumen constantes por 100 ps. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron a presión y temperatura constantes durante 20 ns, sin restricciones.

<sup>64</sup> C. Carmona, A. J. Dowd, A. M. Smith & J. P. Dalton. *Fasciola hepatica in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles*. *Mol. Biochem. Parasitol.* Vol. 62, pp. 9-17, 1993.

<sup>65</sup> I. Corvo, M. Cancela, M. Cappetta, N. Pi-Denis, J. F. Tort & L. Roche. *The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile Fasciola hepatica prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen*. *Mol. Biochem. Parasitol.* Vol. 167, pp. 41-47, 2009.

<sup>66</sup> D.A Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke *et al.* AMBER 12, *University of California, San Francisco*. 2012.

<sup>67</sup> Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, *et al.* *A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations*. *J. Comput. Chem.* Vol. 24, pp. 1999-2012, 2003.

<sup>68</sup> W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey & M. L. Klein. *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. *J. Chem. Phys.* Vol. 79, pp 926-935, 1983.

<sup>69</sup> R. W. Pastor. *An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. et al.* *Mol. Phys.* Vol. 65, pp. 1409-1419, 1988.

Para este último paso se empleó el algoritmo *SHAKE*<sup>70</sup> para restringir las distancias de enlace que involucran hidrógenos, termostato de Langevin y baróstato de Berendsen<sup>71</sup>. Las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron consideradas empleando el método Particle Mesh Ewald (PME)<sup>72</sup>. Para el tratamiento de las interacciones electrostáticas no enlazantes se empleó un *cutoff* de 10 Å. Se utilizó un tamaño de paso de 2.0 fs. El análisis de los resultados se realizó mediante el módulo *ptraj* incluido en el paquete *AmberTools 12*. Para la visualización de las trayectorias se utilizó el programa *VMD*<sup>73</sup>.

## 5.2 Optimización de las estructuras de los compuestos

Las estructuras de los flavonoides evaluados experimentalmente, fueron optimizadas a nivel cuántico DFT (*Density Functional Theory*), empleando el funcional híbrido *wb97xd*<sup>74</sup>, con un conjunto de base 6-31+G (*d,p*)<sup>75</sup> incluyéndose de este modo una mejor descripción de los orbitales de valencia, ya que al ser un conjunto de base *split-valence* se adicionan más funciones de base a dichos orbitales, además de incluir funciones difusas para los átomos pesados (indicado por el signo de +) y polarizadas, agregándose funciones *d* para los átomos pesados y *p* para los átomos de hidrógeno. Todos los cálculos se realizaron en agua, empleando el modelo continuo *IEF-PCM*<sup>76</sup> y cavidades ajustadas a la forma molecular, construidas con radios de Bondi. Esta metodología se ha desarrollado a partir de cálculos teóricos, con cierto respaldo empírico, y ofrece en general mejores resultados que otras metodologías utilizadas para modelar la solución acuosa con moléculas orgánicas. La naturaleza estable de las estructuras obtenidas se verificó analizando el signo de los valores propios de la matriz *Hessiana* obtenida al mismo nivel de cálculo, siendo positivos en todos los casos. Todos los cálculos mencionados se llevaron a cabo en el programa *Gaussian09*<sup>77</sup>.

<sup>70</sup> J.P. Ryckaert *et al.* *Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of N-alkanes.* *J. Comput. Chem.* Vol. 23 pp. 327-341. 1997.

<sup>71</sup> H.J.C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F Van Gunsteren, A. R. H. J. & J. R. Haak. *Molecular dynamics with coupling to an external bath.* *J. Chem. Phys.* Vol. 81 pp. 3584-3690. 1984.

<sup>72</sup> U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee & L. Pedersen. *A smooth particle mesh Ewald method.* *J. Chem. Phys.* Vol. 103 pp. 8577-8593. 1995.

<sup>73</sup> W. Humphrey A. Dalke, K. Schulten, *VMD - Visual Molecular Dynamics.* *J. Mol. Graph.* Vol. 14, pp. 33-38. 1996.

<sup>74</sup> J. D Chai, M. Head-Gordon. *Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections.* *J. Chem. Phys.* Vol. 10, pp. 6615-6620, 2008.

<sup>75</sup> R. B. J. S. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger & J. A. Pople *et al.* *Self-Consistent Molecular Orbital Methods. Basis set for correlated wave-functions.* *J. Chem. Phys.* Vol. 72, pp. 650-654, 1980.

<sup>76</sup> J. Tomasi. B. Mennucci & E. Cancès. *The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level.* *J. Molec. Struc.* Vol. 464 pp. 211-226. 1999.

<sup>77</sup> M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman *et al.* *Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT.* 2009

### 5.3 *Docking* molecular ligando-proteína

Para establecer el modo de unión de los flavonoides previamente optimizados se realizaron cálculos de *docking* molecular entre éstos y las estructuras proteicas promedio obtenidas a partir de las simulaciones de dinámica molecular. Se utilizó una grilla de 126x94x116 Å con un espaciado de 0.6 Å a fin de cubrir toda la superficie proteica. La grilla se centró en la macromolécula. Las conformaciones con una diferencia menor a 2.0 Å se agruparon en el mismo *cluster*. Para obtener los complejos ligando-proteína en cada caso se seleccionó la conformación con menor energía de unión correspondiente al *cluster* más poblado. Los cálculos se realizaron con el programa *Autodock 4.2* utilizando el algoritmo Genético Lamarckiano<sup>78</sup>. Se realizaron 50 corridas con una población inicial de 150 individuos y 2.5x10<sup>6</sup> evaluaciones de energía.

---

<sup>78</sup> GM. Morris, R. Huey, MF. Lindstrom, RK. Sanner, DS. Belew, AJ. Goodsell, *et al.* *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function.* *J. Comput. Chem.* Vol. 30, pp. 2785-2791, 2009.

## **IV. Resultados y discusión**

## 1. *Screening* de compuestos seleccionados: ensayos de inhibición

Se evaluaron en total 80 compuestos pertenecientes a los siguientes quimiotipos: 49% de flavonoides (chalconas y flavonas), 21% de benzofuroxanos y análogos, 12% de furoxanos, 7% de quinoxalinas y 11% de compuestos químicamente diversos. Se calculó un porcentaje de inhibición promedio para cada compuesto a 10  $\mu$ M con cada una de las enzimas, *FhCL1* y *FhCL3*.

### 1.1 *Flavonoides*

Es pertinente destacar la variedad de actividades ofrecidas por los flavonoides en el *screening* primario (ver Materiales y Métodos). Su disponibilidad y la experiencia que se tiene en la síntesis de estos derivados fue determinante para considerar analizar un mayor número de los mismos. En este sentido contar con una serie homogénea de varios flavonoides permite identificar cualitativamente aquellas características moleculares responsables de algunos patrones de inhibición observados. A modo general, es posible visualizar una tendencia de estos compuestos de inhibir mejor a *FhCL1* que a *FhCL3*.

Esta diferencia general en la inhibición al comparar ambas enzimas podría explicarse teniendo presente la estructura enzimática y los residuos aminoacídicos que constituyen los sub-sitios de estas proteasas. La comparación de modelos moleculares de estas enzimas muestra que *FhCL1* presenta un sub-sitio  $S_2$  más amplio que *FhCL3*<sup>44</sup>. A nivel del residuo 69, la primera posee una leucina y *FhCL3* un triptófano, un cambio considerable del volumen de la cadena lateral para ese residuo, que eventualmente podría contribuir u obstaculizar la unión de inhibidores que interaccionen con el sitio activo. Algo a tener en cuenta, es que no solo se modifica la arquitectura de este sub-sitio sino que al estar presente el triptófano se proporciona un sistema aromático, que podría establecer interacciones hidrofóbicas y de *stacking* con los anillos de este grupo de compuestos. Otro cambio significativo es la presencia de una leucina en el residuo 209 en *FhCL1*, lo que hace menos profundo el sub-sitio  $S_2$  en la misma (ya que ambos aminoácidos solo se diferencian en un carbono). Finalmente, la posición 161 es ocupada por una asparagina en *FhCL1* y una treonina en *FhCL3*, lo que supone un aumento en el número de átomos dadores de enlaces de hidrógeno, que podría ser determinante en la interacción con algunos compuestos de este grupo. Es por lo tanto interesante poder evidenciar patrones estructurales particulares, cuya inhibición pueda ser explicada por la estructura del blanco molecular elegido.

Dentro de esta familia de compuestos se distinguen 4 sub-grupos bien característicos: chalconas sin sustituyente en posición 2' del anillo A (Tabla 1), chalconas hidroxiladas en dicha posición (Tabla 2), chalconas con la aromaticidad extendida (Tabla 3) y por último flavonas sintéticas y un flavonoide natural, el flavonol quercetina (Tabla 4).

En una aproximación global para los resultados obtenidos en los cuatro casos, se visualiza en esta familia un rango amplio de porcentajes de inhibición desde 0 a 75%, en concordancia a la gran variedad química que ofrecen a nivel estructural, presentando un gran número de sustituyentes. Las chalconas no hidroxiladas y flavonas mostraron en general menores porcentajes de inhibición en comparación con las chalconas hidroxiladas, y aquellas que presentan aromaticidad extendida ofrecieron los porcentajes de inhibición más elevados. En ese sentido se destacan el compuesto **12** que posee un cloro en posición 4 del **anillo B** con un 63% de inhibición en *FhCL1* y un 75% en *FhCL3* (Tabla 2) y el compuesto **34** cuya aromaticidad se encuentra extendida en ambos anillos, presentando dos naftilos, estando

sustituido el naffilo en A por un hidroxilo en 2, con un 57% de inhibición para CL1 y un 70% para *FhCL3* (Tabla 3).

Si analizamos aquellos **flavonoides sustituidos** por un **halógeno** en su **anillo B**, hay dos efectos interesantes a considerar: la variación en el **halógeno** que lo sustituye y los cambios en la **posición de sustitución**. Se evaluaron chalconas hidroxiladas y no hidroxiladas en 2', además de su correspondiente flavona, variando el sustituyente en la posición 4 del anillo B, con el objetivo de analizar el efecto de distintos sustituyentes en la inhibición y ponderar la relevancia estructural del esqueleto carbonado. En cuanto a la **naturaleza del sustituyente**, para aquellos compuestos sustituidos por **bromo (3,13)** y **metoxilo (4,14)** ambos grupos electrón atrayentes por efecto inductivo (-I) y electron dadores por efecto mesomérico (+M) en *FhCL3* prácticamente no se observa inhibición, evidenciándose un comportamiento similar en las dos situaciones. En el caso de *FhCL1* se observa una tendencia similar, si bien los porcentajes de inhibición fueron un poco mayores. Con este resultado contrastan los altos porcentajes de inhibición encontrados para ambas enzimas con la chalcona hidroxilada *para cloro* sustituida (**12**), sugiriendo que cuando el cloro se ubica en esa posición la presencia o ausencia del hidroxilo 2' en el **anillo A** es crítica para su inhibición (compárese actividad **2** y **12**, Gráfico 1).

En cuanto a la **posición de sustitución** se evaluaron chalconas hidroxiladas sustituidas por bromo en 2 (**19**) y en 4 (**13**), visualizándose un porcentaje de inhibición levemente mayor para el primer caso. Por otra parte al comparar chalcona (**3**), chalcona hidroxilada (**13**) y flavona (**38**) sustituida en 4 por **bromo**, no se visualizaron diferencias importantes entre la chalcona hidroxilada y la flavona mientras que para la primera se obtuvieron porcentajes de inhibición un poco mayores. De acuerdo a estas observaciones, el **bromo** a este nivel no parece tener mayor relevancia en la capacidad inhibitoria. Sería interesante discernir la chalcona sin hidroxilar sustituida en 2, tanto por **bromo** como por **cloro**, para evaluar claramente la influencia de la posición de sustitución en la capacidad inhibitoria de los compuestos.

Al comparar al bromo y al cloro como sustituyentes, en el caso de las chalconas sin hidroxilar se visualiza un leve aumento del porcentaje de inhibición entre la **4-Cl** sustituida (**2**) y la **4-Br** (**3**). No obstante un efecto opuesto se visualiza para las chalconas hidroxiladas, en donde el porcentaje de inhibición es mayor para la sustituida en **4-Cl** (**12**) que para la **4-Br** (**13**). Este fenómeno, sumado al anterior (en el que tanto chalcona hidroxilada como flavona, sustituidas por bromo ofrecen porcentajes de inhibición similares) podría ser evidencia de que para el cloro como sustituyente, el hidroxilo en 2' juega un rol más importante en la inhibición que para el **bromo**.

Al analizar los derivados **4** y **14** con sus respectivos bioisómeros **8** y **15** ambos con propiedades electrónicas **-I +M**, no se observaron porcentajes de inhibición que superaran el 50%, en ninguna de las enzimas. Por otra parte no parece determinante la presencia o ausencia del hidroxilo en 2' del **anillo A**, en ninguno de los dos casos, obteniéndose porcentajes similares para cada enzima entre el hidroxilado y su correspondiente sin hidroxilar. Al comparar entre bioisómeros concretamente, se visualiza un cambio en la inhibición con respecto al **metoxilo** y el **tiometilo**, disminuyendo en *FhCL1* cuando está presente el segundo, mientras que en *FhCL3* sucede lo contrario (Gráfico 1 y Tabla 1 y 2).

Por otra parte al agregar un segundo metoxilo como sustituyente en posición 3 no se visualizan cambios significativos en los porcentajes de inhibición obtenidos para el

correspondiente derivado con solo un metoxilo en posición 4 (**4**, **5** y **14**). Del mismo modo la adición de un iodo **-I +M** en posición 3 (**21**), tampoco ofrece un incremento significativo en la inhibición de ninguna de las dos enzimas, de hecho disminuye para *FhCL1*. Suponiendo que en el caso del iodo el efecto **-I** sería predominante, podría pensarse que un grupo aceptor de electrones por efecto inductivo y mesomérico **-M y -I** como el grupo **Nitro (20)** mejorara la actividad, quitando densidad electrónica del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado. Esto lo volvería más susceptible de sufrir adición nucleofílica, (adición 1,4 de Michael) en caso de que un nucleófilo proteico sea el blanco molecular, como por ejemplo el tiolato de la cisteína que forma parte de la díada catalítica. No obstante si bien se observa una leve mejora, la misma no es tan pronunciada, no alcanzando en ninguno de los casos un 50% al compararla con **21**. Sería pertinente a modo de enriquecer el análisis evaluar compuestos con distintos sustituyentes electrón dadores en posición 3 (Gráfico 1).

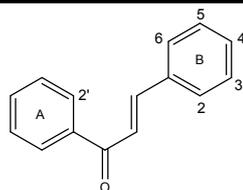
Para la flavona *p-Ome* correspondiente a los compuestos **4** y **14 (39)**, prácticamente no se visualiza inhibición, por lo que estos grupos sumados al esqueleto carbonado de los flavonoides no serían buenos inhibidores, algo que también se visualiza para aquellas flavonas sustituidas por **halógenos (37 y 38)**, aunque el porcentaje de inhibición para estos casos es levemente mayor. Esto es interesante, ya que desde el punto de vista químico si comparamos con los halógenos ambos grupos sustituyentes tienen carácter electrón aceptor por efecto inductivo **-I** y dador por efecto mesomérico **+M**. No obstante es evidente que otras propiedades únicas de cada sustituyente están siendo determinantes en la inhibición, como las pequeñas diferencias en el tamaño y electronegatividad de los átomos implicados.

Por otra parte, es interesante notar que aquellas **chalconas hidroxiladas en 2'** que poseen un **heterociclo** en el **anillo B (22-26)**, ofrecieron en general con la excepción de **26** mayores porcentajes de inhibición para *FhCL1*. Este comportamiento no se visualiza para la chalcona **9** con piridina en **B**, no superando en este caso el 8% de inhibición en ninguna de las dos enzimas, mientras que su correspondiente hidroxilado (**23**) cumple con esa tendencia general de ser mejor inhibidor para *FhCL1*.

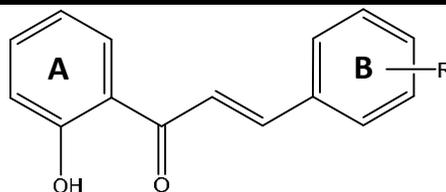
Esta observación vuelve a los compuestos **22**, **23** y **24**, interesantes como punto de partida para el desarrollo de inhibidores selectivos de *FhCL1*. En este caso hay dos consideraciones que son pertinentes de ponderar, que podrían explicar parte de las diferencias observadas. Una es la presencia de un heteroátomo o de un benzoheterociclo a nivel del **anillo B** (presencia de azufre, oxígeno y nitrógeno), y la otra es la diferencia existente en los sub-sitios de ambas enzimas, que podrían contribuir al comportamiento observado en caso de que estos compuestos interaccionaran en las proximidades de los mismos. Como se mencionó anteriormente el sub-sitio  $S_2$  en *FhCL1* (Fig. 13), es más espacioso que su análogo en *FhCL3* y por lo tanto tiene la capacidad de acomodar moléculas con grupos más voluminosos. Por otra parte el hecho de que las hidroxiladas tengan mejores porcentajes de inhibición, podría explicarse porque la presencia del heterociclo o el benzoheterociclo, favorece el posicionamiento del hidroxilo para establecer algún tipo de enlace de hidrógeno con aceptores de las cadenas laterales de los residuos de los sub-sitios. En ese sentido *FhCL1* tiene la ventaja de presentar una asparagina en la posición 161 (en lugar de una treonina como sucede en *FhCL3*), lo que posibilita que se establezcan más enlaces de hidrógeno en el primer caso.

Es interesante discutir la actividad de los compuestos **6** y **16** que incluyen la agrupación **amida** a la estructura típica de las chalconas, a nivel del **anillo B**. En particular, por las características de este sustituyente, podría esperarse que estas proteasas lo reconocieran en forma similar que su sustrato (enlace peptídico). Por otro lado las **amidas** en medios biológicos suelen hidrolizarse (aunque en menor medida que los ésteres) para dar su correspondiente **amina**, por lo que es interesante analizar que sucede con los productos de hidrólisis correspondientes. Así comparando en primera instancia **6** y **16**, no se visualizan porcentajes de inhibición considerablemente altos, ni tampoco en la **amina** en forma de  $\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$  (**7**) (Gráfico 1). Sería interesante por lo tanto evaluar la amina correspondiente con la chalcona hidroxilada para valorar si el hidroxilo mejora la inhibición para alguna de las enzimas. Observando estos resultados es posible hipotetizar que el agrupamiento amida no está siendo reconocido por el sitio activo, por no adoptar una posición adecuada para el ataque nucleofílico del tiolato. Por último la amina terciaria sustituida en 4 (**17**), ofreció un porcentaje de inhibición de intermedio a bajo.



**Tabla 1.-** Porcentajes de inhibición de las chalconas (compuestos 1–10) evaluadas en *FhCL1* y *FhCL3* con su error correspondiente.


Compuesto	-R	% Inhibición <i>FhCL1</i>	% Inhibición <i>FhCL3</i>
1	4-H	33 ± 8	4 ± 4
2	4-Cl	25 ± 12	6 ± 5
3	4-Br	52 ± 5	12 ± 14
4	4-OCH <sub>3</sub>	48 ± 8	4 ± 5
5	3,4-OCH <sub>3</sub>	35 ± 5	2 ± 7
6	4-NH <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>	14 ± 34	12 ± 6
7	4-NH <sub>2</sub> HCl	4 ± 19	2 ± 6
8	4-SCH <sub>3</sub>	8 ± 9	26 ± 1
9	Piridina	8 ± 16	4 ± 1
10	Benzofuroxano	21 ± 9	26 ± 1

**Tabla 2.-** Porcentajes de inhibición de las chalconas hidroxiladas a nivel del anillo A (compuestos 11–26) evaluadas en *FhCL1* y *FhCL3* con su error correspondiente.


Comp.	-R	% Inhibición <i>FhCL1</i>	% Inhibición <i>FhCL3</i>
11	4-H	16 ± 6	0 ± 8
12	4-Cl	63 ± 10	75 ± 3
13	4-Br	19 ± 2	12 ± 7
14	4-OCH <sub>3</sub>	48 ± 9	3 ± 5
15	4-SCH <sub>3</sub>	6 ± 11	32 ± 1
16	4-NH <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>	0 ± 10	13 ± 1
17	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	34 ± 12	20 ± 4
18	4-O-bencilo	8 ± 13	16 ± 1
19	2-Br	29 ± 3	33 ± 7
20	3-NO <sub>2</sub>	26 ± 6	37 ± 1
21	3-I, 4-OCH <sub>3</sub>	0 ± 9	19 ± 1

22	Furano	57 ± 8	4 ± 10
23	Piridina	54 ± 7	0 ± 10
24	Tiofeno	52 ± 5	9 ± 11
25	Furoxano	48 ± 6	14 ± 12
26	Benzodioxol	11 ± 14	19 ± 6

**Tabla 3.-** Porcentajes de inhibición de las chalconas con aromaticidad extendida a nivel del anillo A (compuestos 27–35) evaluadas en *FhCL1* y *FhCL3* con su error correspondiente.

Comp.	Anillo A	-X	Pos. C=O	-R	% Inh. <i>FhCL1</i>	% Inh. <i>FhCL3</i>
27	Fenilo	H	2	Fenilo	65 ± 3	13 ± 4
28	Fenilo	H	-	1-Naftil	38 ± 3	39 ± 5
29	Fenilo	H	D. A.*	-	17 ± 9	27 ± 2
30	Fenilo	H	-	2-Naftil	62 ± 2	38 ± 7
31	Fenilo	OH	-	2-Naftil	61 ± 2	41 ± 5
32	Fenilo	OH	-	1-Naftil	42 ± 6	32 ± 8
33	Naftilo	1-OH	2	2-Naftil	65 ± 6	29 ± 5
34	Naftilo	2-OH	1	1-Naftil	57 ± 16	70 ± 6
35	Naftilo	2-OH	1	2-Naftil	67 ± 3	44 ± 6

\* Adición de un segundo equivalente del enolato de acetofenona al sistema 1,4 de Michael

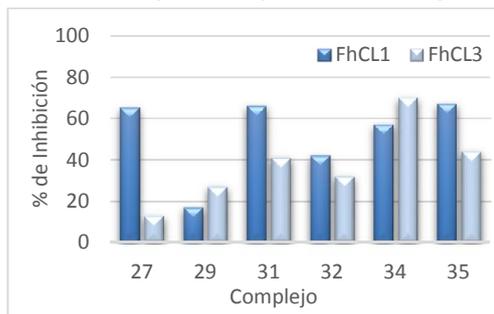
**Tabla 4.-** Porcentajes de inhibición para flavonas evaluadas en *FhCL1* y *FhCL3*, con su correspondiente error (36-40).

Comp.	-R	% Inhibición <i>FhCL1</i>	% Inhibición <i>FhCL3</i>
36	4-H	5 ± 1	8 ± 4
37	4-Cl	0 ± 11	17 ± 1
38	4-Br	21 ± 10	19 ± 3
39	4-OMe	20 ± 7	0 ± 3

Comp.	Estructura	% Inhibición <i>FhCL1</i>	% Inhibición <i>FhCL3</i>
40		15 ± 8	8 ± 1

Para el caso de las **chalconas** con **aromaticidad extendida**, se visualiza una gama de porcentajes de inhibición por encima de las chalconas anteriormente presentadas, si bien siguen la misma tendencia siendo claramente mejores inhibidoras de *FhCL1* que de *FhCL3*, con excepción del compuesto (**34**). Esta observación hace pensar que estos compuestos estén interaccionando a nivel del sitio activo de la catepsina, donde la conformación de *FhCL1* favorece la unión de residuos aromáticos y más voluminosos, mientras *FhCL3* tiene un sitio más estrecho con mayor dificultad para acomodar estas entidades. En cuanto a los patrones de sustitución de los diferentes compuestos de esta categoría, es difícil encontrar una tendencia, o identificar un modo de sustitución preferencial. Lo más evidente es que aquellos sustituidos con naftilo en el **anillo B** tanto en 1 como en 2 ofrecen porcentajes de inhibición levemente mejores, que los que poseen un fenilo (**27**) o el producto de doble adición (**29**) (Gráfico 2).



**Gráfico 2.-** Porcentajes de inhibición correspondientes a chalconas con aromaticidad extendida.

Algo interesante es que si comparamos los compuestos **34** y **35** que sólo se diferencian en la posición que está sustituido el naftilo, vemos cómo el porcentaje de inhibición disminuye considerablemente para *FhCL3*. Sin embargo cuando en el anillo A se encuentra un fenilo la posición de sustitución del naftilo en B no parece tan relevante (**31,32**) obteniéndose porcentajes más similares. Sin dudas para poder obtener evidencias más contundentes acerca de las implicancias de las diferentes estructuras en extensión de la aromaticidad de las chalconas, sería pertinente evaluar un mayor número de compuestos así como realizar análisis de la relación estructura-actividad. Además, alguno de estos compuestos, como por ejemplo el **27**, muestran una inhibición considerablemente mayor frente a *FhCL1*, por lo que sería interesante continuar estudiando este subgrupo, para desarrollar un inhibidor selectivo para esta enzima (Gráfico 2).

Por último se evaluó un flavanol natural, que se obtiene del extracto de *Achyrocline satureioides*, ampliamente conocido por su actividad antioxidante y antiinflamatoria. No se obtuvieron resultados prometedores para este compuesto, en la concentración empleada en el *screening*. No obstante numerosos compuestos de ésta índole han sido evaluados con el fin de detectar su capacidad inhibitoria en algunas proteasas relacionadas con diversas patologías<sup>79,80,81</sup>.

<sup>79</sup> L. Bachmetov, M. Gal-Tanamy, A. Shapira, M. Vorobeychik, T. Giterman-Galam, P. Sathiyamoorthy, *et al.* *Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity.* *J. Viral Hepat.* Vol. 19, pp e81-e88, 2011.

<sup>80</sup> M. Polydoroa, K. C. B. De Souza, M. E. Andrades, E. G. Da Silva, F. Bonatto, J. Heydrich, *et al.* *Antioxidant and pro-oxidant and cytotoxic effects of Achyrocline satureioides extracts.* *Life science.* Vol. 74, pp. 2815-2826

<sup>81</sup> J. Alvim, R. P. Severino, E. F. Marques, A. M. Martinelli, P. C. Vieira, J. B. Fernandes, *et al.* *Solution Phase Synthesis of a Combinatorial Library of Chalcones and Flavones as Potent Cathepsin V Inhibitors.* *ACS Comb. Sci.* Vol. 12, pp. 687-695, 2010.

### 1.2 Benzofuroxanos y análogos

En el caso de los benzofuroxanos y análogos, los porcentajes de inhibición obtenidos fueron en general bajos, con la excepción de tres compuestos (Tabla 5). En primer lugar se destaca un benzofuroxano portador de un agrupamiento aldehído (**44**), el cual ofreció un alto porcentaje de inhibición para *FhCL3* (64%). Este compuesto al contener un grupo aldehído altamente reactivo, se vuelve un mal punto de partida a la hora de buscar un nuevo fármaco. Sin embargo, sería interesante evaluarlo más adelante pues la diferencia en la inhibición de una y otra enzima lo convierte en un posible inhibidor selectivo para *FhCL3*. Otro hecho interesante es el valor de inhibición obtenido para su homólogo correspondiente (**49**), dónde se produce una dramática disminución para *FhCL3* de 64% a 16%. Posiblemente este mínimo aumento en el volumen y distancia entre los grupos aromáticos, no sea favorable para la interacción con la enzima. Sería interesante ampliar la serie homóloga para sacar conclusiones en este sentido (Gráfico 3).

Luego se destacan otros dos compuestos **45** y **46**, que ofrecieron buenos porcentajes de inhibición para ambas enzimas. En el caso del compuesto **45** el sustituyente del benzofuroxano es una vinilsulfona, sustituyendo a un benceno que a su vez está sustituido en *para* con respecto a la sulfona por un fluor y una amida unida a una cola carbonada en el caso del compuesto **46** (Tabla 5). En el último caso sería interesante evaluar la correspondiente amina para verificar si se mantiene la actividad (Gráfico 3).

Por otra parte en esta familia, más que en otras, se observaron errores considerablemente altos, los que podrían deberse a que en las condiciones del ensayo algunos de estos compuestos en presencia de DTT (un potente agente reductor) no sean estables químicamente, siendo algún subproducto de su reacción quien verdaderamente está interaccionando con la enzima. Queda pendiente realizar alguna prueba de estabilidad para los compuestos en las condiciones del ensayo, al menos para aquellos que ofrecieron buenos porcentajes de inhibición.

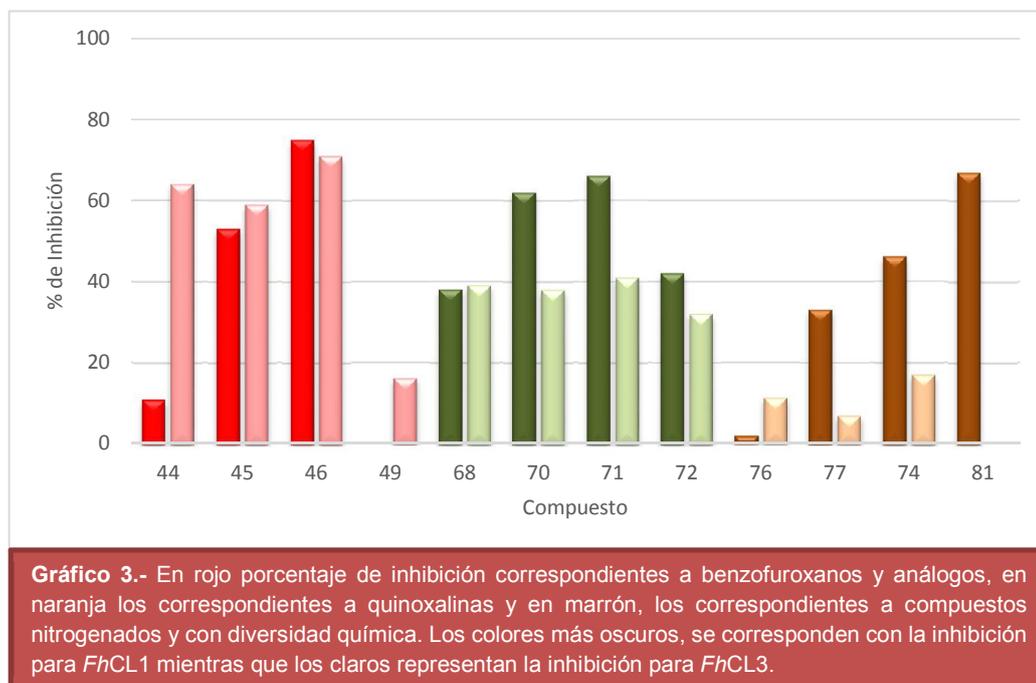
### 1.3 Quinoxalinas, furoxanos, compuestos nitrogenados y químicamente diversos

En estas familias, tampoco se obtuvieron porcentajes de inhibición considerablemente altos, con la excepción de los compuestos **70** y **71** en el caso de las quinoxalinas, **74** en el caso de los nitrogenados y **81** agrupado con los compuestos químicamente diversos.

Algo a destacar de las quinoxalinas que presentaron los mejores porcentajes de inhibición, es la presencia de un agrupamiento amida en su estructura, sustituyendo al esqueleto. En particular los homólogos en R1 **68** y **71**, ofrecen un caso opuesto al visualizado anteriormente, en dónde al agregar un carbono en el sustituyente amida, se aprecia un incremento en el porcentaje de inhibición para *FhCL1*, que no se observa en *FhCL3*. Si partimos de las características del grupo sustituyente es probable que la inhibición mediada por estos compuestos se deba a su ubicación a nivel del sitio activo, lo que en cierto modo podría explicar ese incremento en la inhibición de *FhCL1* al agregar un carbono en la agrupación amida y no así en *FhCL3*, donde el sitio activo es más estrecho.

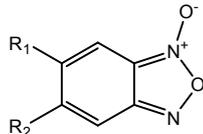
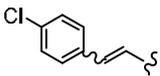
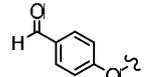
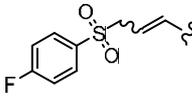
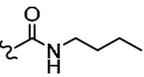
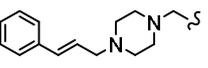
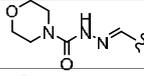
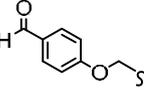
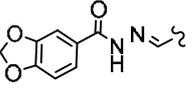
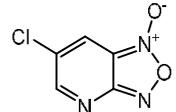
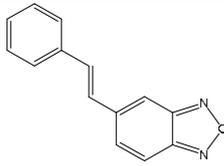
Por otra parte, muestran una tendencia interesante también los compuestos **67**, **69** y **70** que tienen la particularidad de estar sustituidos de igual manera, con la excepción de su sustituyente en R3, en donde la tiosemicarbazida se destaca como mejor sustituyente en esta posición, seguido por el cloro y en menor medida el metilenhidrazina carboxilato. Por último, la inhibición intermedia a alta observada para el compuesto **72** puede deberse a la

presencia del agrupamiento trifluormetilo como sustituyente, que generan centros electrofílicos en el heterociclo haciéndolo susceptible de ataques nucleofílicos, por nucleófilos reactivos de la enzima como por ejemplo el tiolato del sitio activo. Sin lugar a dudas las quinoxalinas merecen una mención especial dentro de los compuestos evaluados, siendo junto con los flavonoides y benzofuroxanos uno de los quimiotipos que ofreció algunos compuestos con porcentajes de inhibición mayores al 50%. Sería pertinente evaluar un mayor número de las mismas, con sustituyentes variados, que permitan dilucidar los patrones estructurales que potencian las propiedades de estas moléculas (Gráfico 3).



El compuesto **74** presenta en su estructura un heterociclo nitrogenado de seis miembros con cierta similitud estructural con las piridinas, inhibidores clásicos de catepsinas anteriormente mencionados, lo cual podría explicar el porcentaje de inhibición obtenido para *FhCL1* (47%). Por otra parte en el caso del compuesto **81**, se observan tres bloques estructurales importantes que son un tiazol disustituido y un tiofurano, separados por un *linker* intermedio de metilhidrazina, lográndose porcentajes de inhibición de *FhCL1* 67% y *FhCL3* 0 % (Gráfico 3). Esta inhibición selectiva para *FhCL1* podría explicarse por interacciones específicas con la enzima, entre los aminoácidos de los sub-sitios implicados en la catálisis, que podrían aceptar con facilidad aquellos compuestos con grupos voluminosos y aromáticos por interacciones Pi-Pi, sin olvidar que aquellos que sean heterociclos podrían formar enlaces de hidrógeno que favorecieran aún más la interacción.

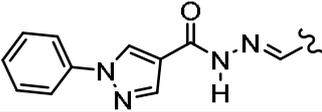
**Tabla 5-** Porcentajes de inhibición de benzofuroxanos y análogos con su correspondiente error, para *FhCL1* y *FhCL3* (41-57).

					
Comp.	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	% Inhibición <i>FhCL1</i>	% Inhibición <i>FhCL3</i>	
41	F	F	20 ± 7	44 ± 1	
42		H	24 ± 14	50 ± 1	
43	CH <sub>2</sub> Br	H	4 ± 9	26 ± 1	
44		H	11 ± 11	64 ± 1	
45		H	53 ± 19	59 ± 3	
46		H	75 ± 2	71 ± 3	
47		H	0 ± 11	27 ± 1	
48		H	0 ± 11	6 ± 1	
49		H	0 ± 11	16 ± 1	
50		H	12 ± 29	9 ± 4	
51		H	0 ± 29	13 ± 2	
52			0 ± 12	6 ± 1	
53			6 ± 5	20 ± 5	

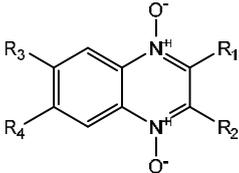
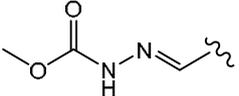
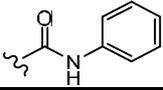
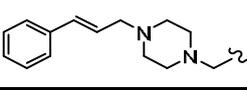
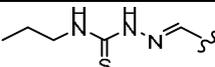
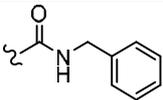
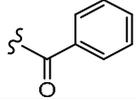
54		29 ± 11	6 ± 5
55		6 ± 18	0 ± 2
56		24 ± 6	29 ± 3
57		0 ± 11	46 ± 2

**Tabla 6.-** Porcentajes de inhibición de furoxanos para *Fh*CL1 y *Fh*CL3 (58-66).

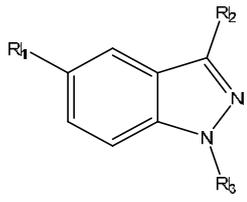
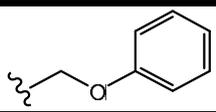
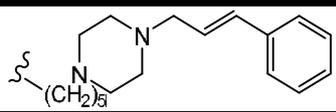
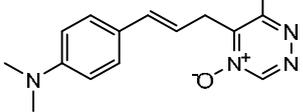
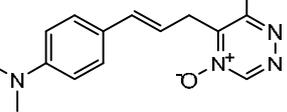
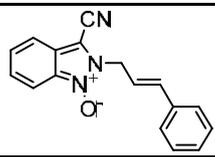
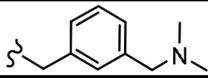
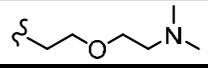
Comp.	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	% Inhibición <i>Fh</i> CL1	% Inhibición <i>Fh</i> CL3
58		-Ph	0 ± 13	0 ± 13
59		-Ph	0 ± 13	0 ± 5
60	-CH <sub>3</sub>		0 ± 9	0 ± 5
61	-CH <sub>3</sub>		16 ± 6	17 ± 5
62		-Ph	15 ± 13	4 ± 2
63	-CH <sub>3</sub>		14 ± 17	11 ± 2
64	-CH <sub>3</sub>		11 ± 5	13 ± 3
65		-Ph	0 ± 6	0 ± 9

66	CH <sub>3</sub>		1 ± 13	0 ± 7
----	-----------------	---	--------	-------

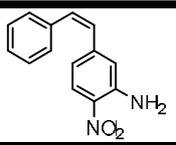
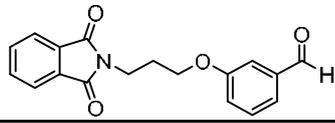
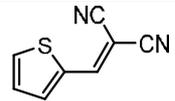
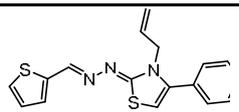
**Tabla 7.-** Porcentajes de inhibición de quinoxalinas para *Fh*CL1 y *Fh*CL3 con su correspondiente error (67-72).

						
Comp.	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>	-R <sub>4</sub>	% Inh. <i>Fh</i> CL1	% Inh. <i>Fh</i> CL3
67	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	0 ± 6	28 ± 16
68		-CH <sub>3</sub>		-H	38 ± 5	39 ± 10
69	-CN	-NH <sub>2</sub>	-Cl	-Cl	15 ± 6	27 ± 11
70	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	62 ± 6	38 ± 6
71		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	66 ± 6	41 ± 5
72	-CF <sub>3</sub>		-F	-F	42 ± 1	32 ± 10

**Tabla 8.-** Porcentajes de inhibición de compuestos nitrogenados para *Fh*CL1 y *Fh*CL3 con su correspondiente error (73-77).

Comp.	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>	% Inh.	
				<i>Fh</i> CL1	<i>Fh</i> CL3
					
73	-NO <sub>2</sub>			2 ± 10	0 ± 5
74				47 ± 5	17 ± 6
75				16 ± 9	0 ± 6
76	-NO <sub>2</sub>	-OH		2 ± 10	0 ± 5
77	-NO <sub>2</sub>	-OCH <sub>3</sub>		33 ± 3	7 ± 5

**Tabla 9.-** Porcentajes de inhibición de compuestos con diversidad química para *Fh*CL1 y *Fh*CL3 con su correspondiente error (78-81).

Compuest o	Estructura	% Inhibición <i>Fh</i> CL1	% Inhibición <i>Fh</i> CL3
78		19 ± 14	0 ± 6
79		3 ± 6	0 ± 10
80		9 ± 15	0 ± 7
81		67 ± 8	0 ± 7

## 2. Caracterización de los compuestos con mejor porcentaje de inhibición para ambas enzimas.

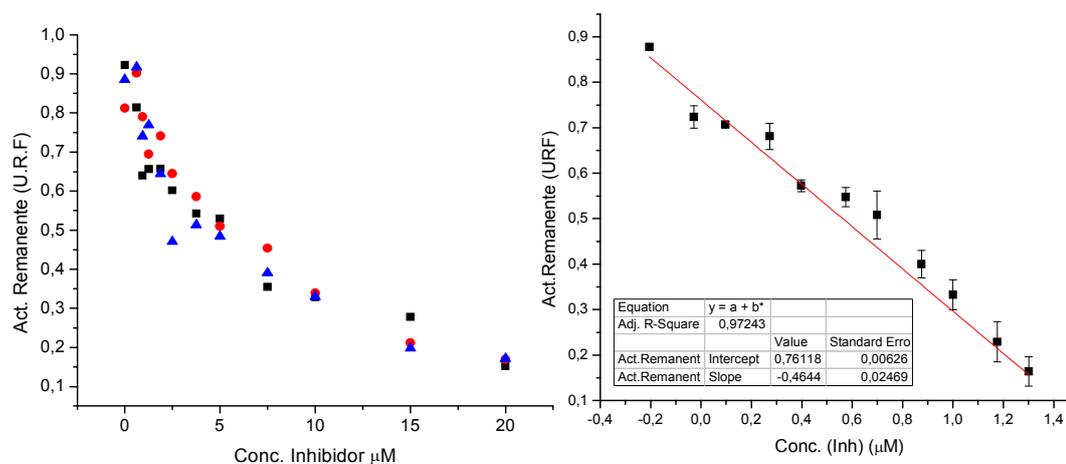
### 2.1 Cálculo de IC<sub>50</sub>

En base a los resultados obtenidos y a la proporción de compuestos evaluados de cada familia, se seleccionaron 3 compuestos para proseguir avanzando en la caracterización de su modo de inhibición, determinando su IC<sub>50</sub>.

**Tabla 10.-** Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para los compuestos **34**, **45** y **46** en ambas enzimas a partir de linealización Log [Inhibidor] vs. URF con su correspondiente error.

Enzima / IC <sub>50</sub> (μM)	Compuesto 34	Compuesto 45	Compuesto 46
<i>FhCL1</i>	23.0 ± 0.4	9.0 ± 0.1	27.1 ± 0.1
<i>FhCL3</i>	5.6 ± 0.1	6.5 ± 0.1	27.0 ± 0.2

Lo primero a destacar es que a excepción del compuesto **34** en el que el IC<sub>50</sub> para *FhCL3* es aproximadamente 4 veces menor que para *FhCL1*, los dos restantes presentan un IC<sub>50</sub> similar para ambas enzimas. El compuesto **45** que pertenece a la familia de los benzofuroxanos, es el que mostró menor concentración inhibitoria al 50%, siendo incluso en el caso de *FhCL3*, casi 5 veces menor que el IC<sub>50</sub> para el compuesto **46** que pertenece a la misma familia. Para el cálculo del IC<sub>50</sub> se procedió a linealizar los valores obtenidos por mínimos cuadrados, realizando el gráfico de actividad remanente vs. logaritmo de la concentración del inhibidor, el cual se evaluó en concentraciones de 0 a 20 μM (Fig. 15).



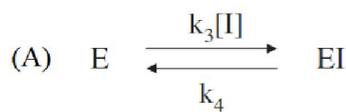
**Figura 15.-** A la izquierda se visualiza el gráfico correspondiente a actividad remanente de la enzima *FhCL3* en U.R.F en función de la concentración del inhibidor en μM para el compuesto **34**. A la derecha se visualiza la linealización de los datos que están en el gráfico anterior.

## 2.2 Ensayos de *slow-binding*

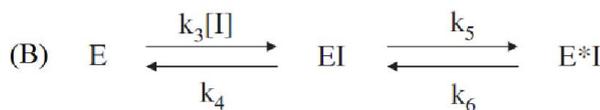
Existen inhibidores en los que su capacidad como tal es dependiente del tiempo que transcurre mientras están en contacto con su blanco molecular. Es por ello que en estudios de *screening* de un alto número de compuestos, puede subestimarse la capacidad de los mismos como inhibidores de las enzimas de interés. Por ende es pertinente determinar si los inhibidores que ofrecieron un buen porcentaje de inhibición, efectivamente estaban en equilibrio con la enzima, es decir si habían alcanzado su máxima inhibición en el tiempo que transcurre el ensayo.

Los resultados de este experimento fueron extremadamente reveladores, ya que la mayoría de los compuestos evaluados ofrecieron comportamiento de tipo *slow-binding*, en el cual a iguales concentraciones de inhibidor y diferentes tiempos de incubación, mostraron porcentajes crecientes de inhibición (a excepción del compuesto **34** para *FhCL1*, Tabla 11).

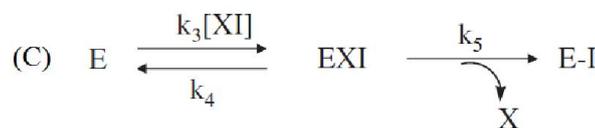
Varios mecanismos podrían explicar el comportamiento *slow-binding* observado, estos se resumen a continuación:



Mecanismo reversible simple



Mecanismo de isomerización enzimática posterior a la unión del inhibidor



Mecanismo en el que se une a la enzima el inhibidor previamente unido a un marcador, para posteriormente dar lugar al complejo EI.

Por lo tanto, alguno de estos mecanismos podría darse para los inhibidores de interés. En el caso del mecanismo A, las constantes tanto de unión como de disociación del inhibidor son extremadamente pequeñas, lo que provoca que la inhibición se lleve a cabo en tiempos mayores. Esto sucede cuando por ejemplo es necesario expulsar una molécula de agua del sitio activo para la interacción con el inhibidor y que esa asociación produzca un análogo del estado de transición, que permanece unido con gran afinidad.

En el mecanismo B, se visualiza un paso inicial que es similar a un inhibidor reversible, con una modesta unión a la enzima, siendo el segundo paso el determinante en la inhibición, ya que implica una lenta isomerización de la enzima. Esto resulta en una conformación enzimática que favorece una unión más estrecha entre la enzima y el inhibidor. Estando limitado el paso de disociación del inhibidor del complejo E\*I, esto hace que si se pretende estudiar la afinidad de un inhibidor que actúa por este mecanismo, la misma dependerá de  $k_5$  y  $k_6$ .

Por otra parte puede suceder que el inhibidor adopte dos conformaciones en solución y una de ellas sea la que interacciona preferencialmente con la enzima, por lo que la inhibición

estaría dependiendo de ese paso inicial en la que el inhibidor cambie de conformación. También puede suceder que la enzima en solución adopte dos conformaciones posibles y una de ellas tenga mayor afinidad por su sustrato, siendo esto similar a lo que se ilustra en el mecanismo C. El último mecanismo expresado en el esquema se diferencia bastante de lo antes expuesto, ya que implica una marca de afinidad covalente en la enzima como resultado de la interacción con el inhibidor.

En base a los resultados obtenidos en este simple ensayo, es pertinente tener en cuenta que en el *screening* inicial se puede haber subestimado la inhibición de algunos compuestos, que no habían alcanzado su máxima capacidad inhibitoria a los 5 minutos, ya que de los evaluados su mayoría alcanzan un máximo a tiempos mayores. Cabe destacar también que el porcentaje de inhibición de algunos compuestos aumenta hasta alcanzar más del 90%, valores significativamente más altos que los obtenidos en el *screening* inicial.

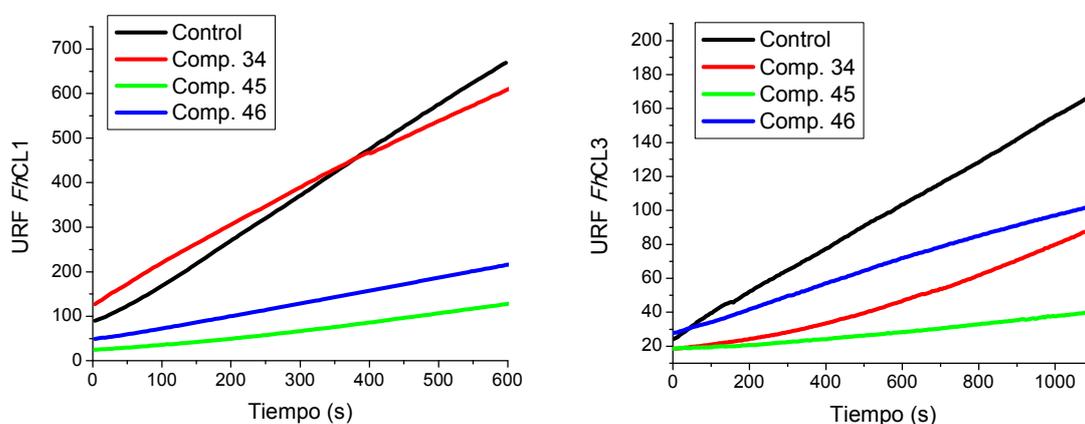
**Tabla 11.-** Porcentajes de inhibición obtenidos en el ensayo de *slow-binding* para ambas enzimas a 120, 90, 60, 30 y 3 minutos, para los compuestos **34**, **45** y **46**.

<b>% inhibición CL1</b>	<b>Tiempo (min.)</b>	<b>120</b>	<b>90</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
	Comp. <b>34</b>	-	67	75	81	73
	Comp. <b>45</b>	96	97	97	91	44
	Comp. <b>46</b>	60	65	67	66	45
<b>% inhibición CL3</b>	<b>Tiempo (min.)</b>	<b>120</b>	<b>90</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
	Comp. <b>34</b>	93	96	96	-	53
	Comp. <b>45</b>	83	85	78	61	59
	Comp. <b>46</b>	83	86	86	-	27

### 2.3 Ensayos de Reversibilidad

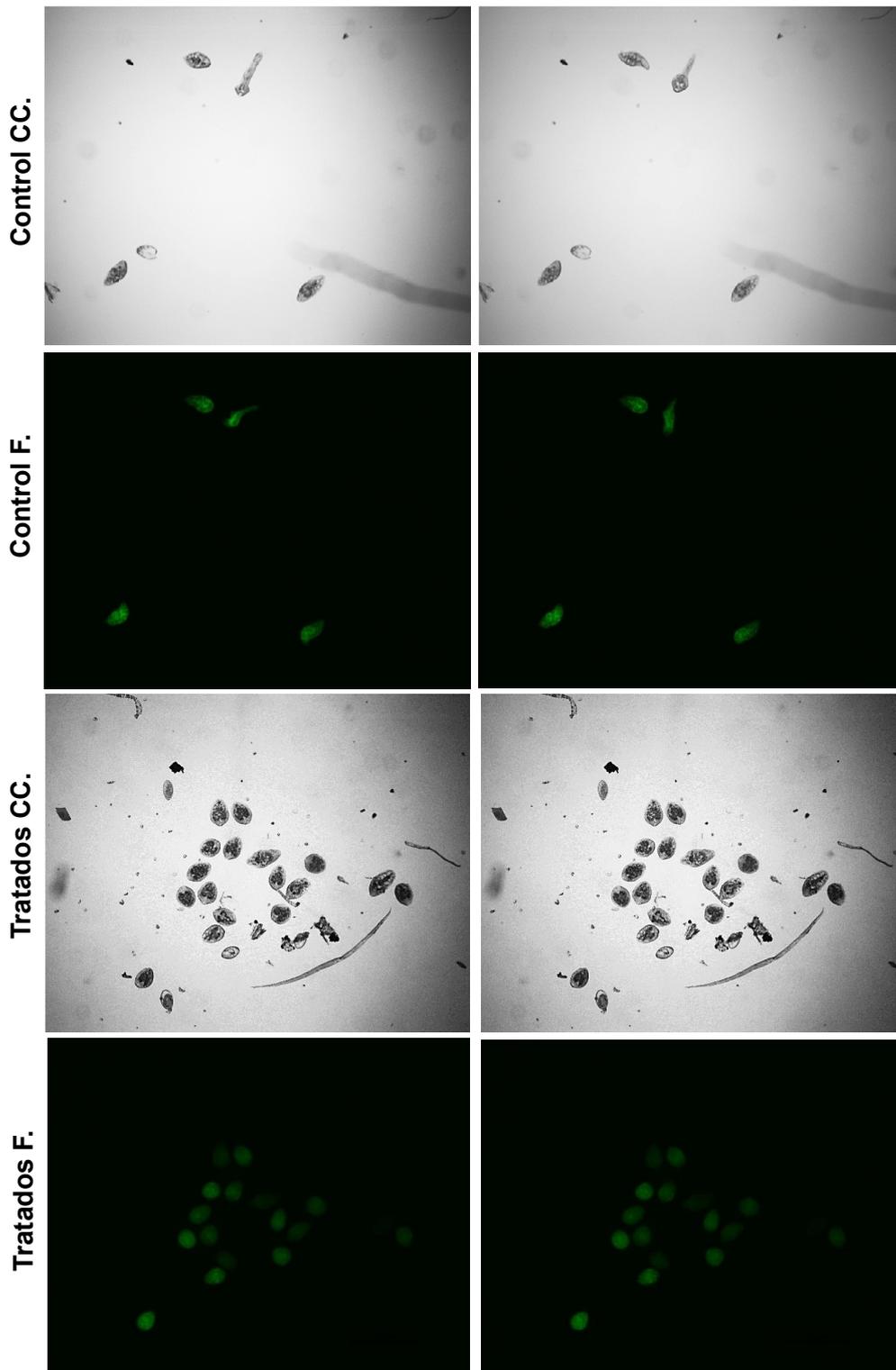
Para tener información acerca de la reversibilidad o irreversibilidad de los compuestos, se empleó el método de dilución rápida para **34**, **45** y **46**. Si el inhibidor es rápidamente reversible, deberá visualizarse una tendencia lineal clara al graficar actividad remanente de la enzima en función del tiempo, lo que indica una rápida recuperación de la actividad de la enzima por liberación del inhibidor, con una pendiente igual al control o del orden del 91% de la misma. Si la inhibición es irreversible o muy lentamente reversible (*tight-binding*), la curva obtenida tendrá una clara tendencia lineal, con una pendiente del orden del 9% correspondiente al control. Sin embargo, en los casos donde la reversibilidad es lenta la tendencia no será lineal, sino que tendrá una primer fase curvilínea y posteriormente tenderá a una línea cuando se alcance el equilibrio entre la disociación del inhibidor de la enzima y la enzima libre.

En base a las tendencias obtenidas, nuevamente el compuesto **34** mostró un comportamiento diferencial para ambas enzimas, siendo completamente reversible para *FhCL1* y reversible lento para *FhCL3*. En el caso del compuesto **45** se visualiza una clara irreversibilidad, en donde no se recupera la actividad de ninguna de las dos enzimas. Por otra parte, el compuesto **46** muestra ser irreversible para *FhCL1*, pero su comportamiento no es claro en el caso de *FhCL3* ya que se observa que se recupera alrededor del 50% de la actividad enzimática, pero la pendiente no sigue la tendencia típica de los inhibidores lentamente reversibles (Fig.16). Dado que prácticamente todos los inhibidores de tipo *tight-binding* e irreversibles muestran un comportamiento *slow-binding*<sup>64</sup> estos resultados son coherentes con el ensayo anterior. Por su parte, el compuesto **34** resultó ser un inhibidor reversible de *FhCL1* y no mostró cinética lenta con esta enzima. En posteriores resultados de *docking* podrían explicarse algunas cuestiones en cuanto a la interacción de los compuestos con ambas enzimas, fundamentalmente en lo que refiere al compuesto **34** (Fig. 16).



**Figura 16.-** A la izquierda se observan los resultados del ensayo de dilución rápida para los compuestos **34**, **45** y **46** en *FhCL1*. A la derecha se observan los correspondientes a los mismos compuestos pero en *FhCL3*.

### 3. Estudios *in vitro* con JRD



**Figura 17.-** Tratamiento de *Fasciola hepatica* en su estadio de larvas juveniles recién desenquistadas (JRD) por 48 hr con el compuesto **34** a 20  $\mu$ M. Se visualizaron por Microscopía Óptica de campo claro (CC) y de fluorescencia (F), empleando tinción vital con diacetato de fluoresceína.

A modo de tener información acerca del efecto que provoca en la forma invasora del parásito la presencia de estos inhibidores, se procedió a evaluar uno de ellos *in vitro* en JRD. Se registraron datos acerca de la movilidad y vitalidad de los parásitos, empleando en el segundo caso, tinción vital con diacetato de fluoresceína (Fig. 17).

Al comparar los JRD correspondientes al control con aquellos tratados con el compuesto **34**, fue posible evidenciar una disminución considerable tanto en la movilidad como en la vitalidad de los juveniles. Al visualizarlos al microscopio, en su mayoría permanecían inmóviles o con movimientos apenas perceptibles (Tabla 12), lo que *in vivo* se traduciría en una reducción considerable de su capacidad invasora en su hospedero. Este mismo fenotipo se obtuvo al bloquear la expresión de las catepsinas de JRD mediante ensayos de interferencia de ARN, reportándose consecuentemente una capacidad disminuida de los parásitos interferidos de atravesar la pared del duodeno<sup>29</sup>. En base a estos resultados parecería que la disminución de la actividad de las catepsinas de alguna forma afecta la motilidad del parásito, tal vez la falta de esta enzima interfiera con el correcto metabolismo del parásito promoviendo su inactividad. Sin embargo no podemos descartar que actúe también sobre otros blancos moleculares. Otro hecho interesante, es que se acentúa la coloración oscura del intestino en los parásitos tratados, con respecto al control. Esto podría estar asociado a la inactividad del parásito que lleve a que el proceso de excreción/ secreción se enlentezca o no se expulse el contenido del tubo digestivo con la frecuencia habitual. En cuanto a la vitalidad, todos presentan tinción, no obstante en algunos JRD tratados la misma no es tan intensa como en otros, esto puede deberse a que efectivamente algunas de las células que componen al parásito no están vivas.

No fue posible emplear otras concentraciones ni evaluar otros compuestos debido a que no se disponía de metacercarias en el laboratorio, pero se prevé repetir el ensayo y evaluar los benzofuroxanos más adelante.

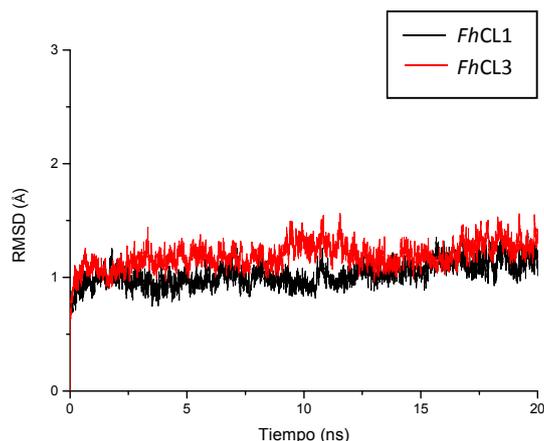
**Tabla 12.-** Registro del movimiento observado en los JRD a las 48 h de cultivo *in vitro*, en el control y tratados con el compuesto **34**.

<b>Movilidad</b>	<b>N°JRD Control</b>	<b>N°JRD Tratados</b>
<b>Mov. Vigoroso</b>	<b>11</b>	<b>0</b>
<b>Movimiento lento</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Inmóviles</b>	<b>1</b>	<b>27</b>
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>30</b>

## 4. Estudios de *docking* molecular ligando-proteína para flavonoides en *FhCL1* y *FhCL3*

### 4.1 Preparación de las estructuras proteicas

Al partir de estructuras proteicas, que fueron generadas en el caso de *FhCL1*, a partir de una estructura cristalográfica de su correspondiente pro-enzima y de *FhCL3* por modelado por homología, se procedió a mejorar las estructuras por simulaciones de dinámica molecular. Se obtuvo como resultado de ello dos estructuras estabilizadas a partir de los 12 ns de simulación, como se puede visualizar en la Fig. 18, a partir del *RMSD* (*root-mean-square deviation*). Para realizar el *docking* molecular, se tomaron las estructuras más representativas, obtenidas mediante un análisis de *clusters* de los últimos 7 ns de simulación.



**Figura 18.-** RMSD, correspondiente a ambas enzimas, *FhCL1* y *FhCL3* durante los 20 ns. de simulación.

### 4.2 *Docking* molecular ligando-proteína

El *docking* molecular ligando-proteína es una herramienta computacional extremadamente útil a la hora de tener una primera aproximación predictiva acerca del sitio y modo de interacción entre un ligando y una biomolécula cuyas estructuras son conocidas así como las conformaciones que estas son capaces de adoptar. Este recurso, emplea un algoritmo genético Lamarckiano, en el cual adaptaciones ambientales en el fenotipo de un individuo se traducen en un cambio en su genotipo y se convierten en rasgos hereditarios. Dicho de otro modo, describe la interacción ligando-proteína como un conjunto de variables de estado (translación, orientación y conformación), siendo el estado del ligando, el genotipo mientras que las coordenadas atómicas son el fenotipo y la proteína el ambiente. Por lo tanto mediante el *docking* molecular es posible obtener la energía total de interacción del ligando con la proteína. Dicha energía es evaluada mediante una función *score* a partir de datos obtenidos en forma experimental de complejos proteína-ligando conocidos.

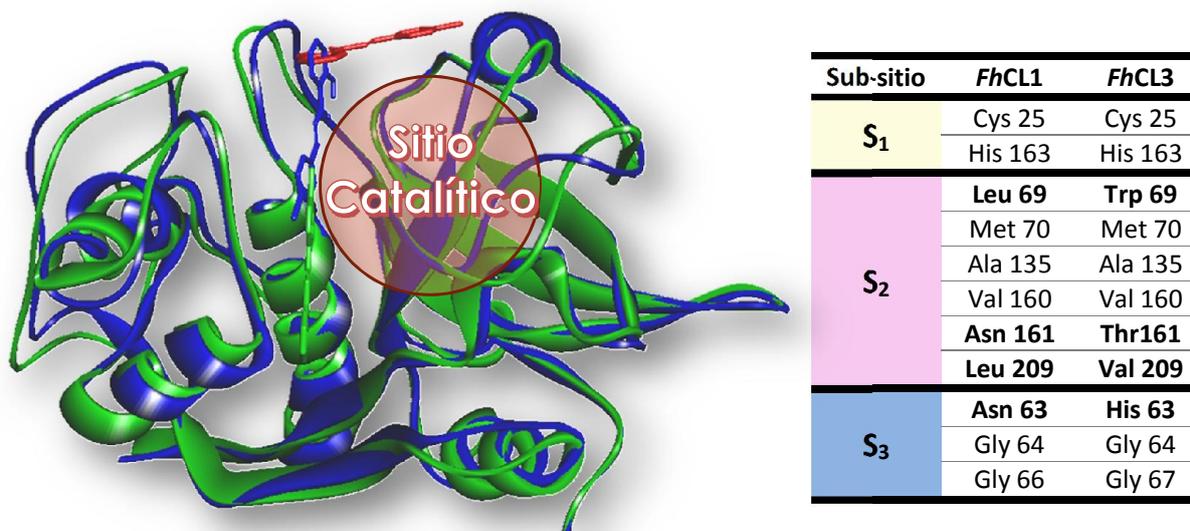
Técnicamente, lo que el programa realiza es la predicción, a partir de una exploración a nivel de la proteína, de los sitios viables para la interacción con el ligando de interés. Para esto se emplea una grilla de puntos determinada a partir de la topología de la biomolécula de interés, (en este caso una enzima). Finalmente, al realizar el *docking*, no solo se obtienen los sitios posibles en los que puede interaccionar el ligando de interés (el inhibidor) sino también las conformaciones que puede adoptar, basándose en criterios geométricos y estéricos. Estas

conformaciones y sitios son agrupados en *clusters* en base al RMSD entre conformaciones, siendo 2 Å la diferencia máxima para incluir conformaciones en un mismo *cluster*.

Dado que la familia mayoritaria de compuestos evaluados se corresponde con los flavonoides, se procedió a realizar *docking* molecular con dichos compuestos en ambas enzimas. Analizando globalmente los resultados, se distinguen claramente tres sitios posibles en los que se unen los compuestos estudiados, destacándose fundamentalmente los que se observan en azul para *FhCL1*, verde y rojo para *FhCL3* en representación de varillas, siendo esta última posición adoptada por menos compuestos e incluso con un número de conformaciones a nivel de dicho *cluster* sensiblemente menor (Fig. 19). Se eligió a modo representativo el compuesto **12** ya que presenta la particularidad de ofrecer como posibles sitios los tres más representativos de la totalidad de compuestos a los que se realizó el *docking*, uno característico de *FhCL1* y otros dos típicos para *FhCL3*.

No se encontraron diferencias apreciables en las variaciones de energías libres de unión obtenidas (Tabla 13). Esto puede suceder porque la función *score* que utiliza el programa empleado no está parametrizada en forma óptima para este caso particular. De todos modos, las diferencias en los porcentajes de inhibición pueden explicarse por la interacción con algunos residuos que forman parte del sitio activo y que varían entre una enzima y otra (Tabla 13), lo que no solo brinda información de la afinidad de la unión sino también de la capacidad de cada uno para obstaculizar la catálisis y efectivizar la inhibición.

Se seleccionaron algunos ejemplos que ilustran el modo en que las diferencias antes mencionadas podrían incidir en algunos casos de inhibición observados experimentalmente.



**Figura 19.-** A la derecha en azul se destaca la estructura correspondiente a *FhCL1* y en verde la estructura de *FhCL3*, ambas en representación *New Cartoon*. En bastones, se observan en verde, azul y rojo posiciones que adopta el compuesto **12**, las ubicaciones mayoritariamente preferidas por los diferentes flavonoides con los que se realizó el *docking* molecular. A la derecha se observan en una tabla los aminoácidos correspondientes a cada sitio, destacados en negrita aquellos que varían entre ambas enzimas.

**Tabla 13.-** Resultados de variación en la energía libre de unión y conformaciones del *cluster* más poblado seleccionado.

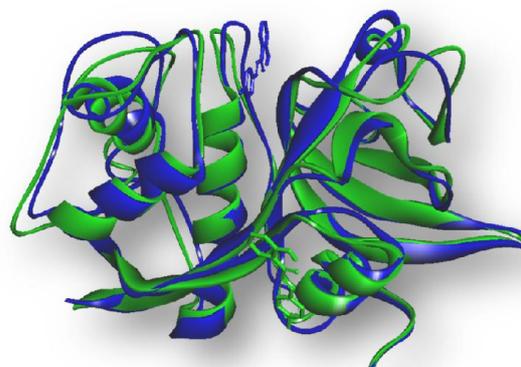
Compuesto	<i>FhCL1</i>			<i>FhCL3</i>		
	$\Delta G$ unión (kcal/mol)	%Inh	N° Conf.	$\Delta G$ unión (kcal/mol)	%Inh	N° Conf.
<b>12</b>	$-6,6 \pm 2$	$63 \pm 10$	35	$-5.0 \pm 2$	$75 \pm 3$	13
<b>13</b>	$-6.8 \pm 2$	$19 \pm 2$	48	$-5.2 \pm 2$	$12 \pm 7$	19
<b>34</b>	$-7.4 \pm 2$	$57 \pm 16$	28	$-6.3 \pm 2$	$70 \pm 6$	29
<b>TCBZ</b>	<b><math>-8.2 \pm 2</math></b>	-	<b>9</b>	<b><math>-6.8 \pm 2</math></b>	-	<b>15</b>

#### 4.2.1 Compuesto **12** vs. **13**.

Al analizar la inhibición por parte de los flavonoides sustituidos por diferentes halógenos se vieron leves diferencias en los porcentajes ofrecidos. En ese sentido, los resultados obtenidos en el *docking* molecular ligando-proteína fueron extremadamente reveladores, ya que no sólo afianzan esa diferencia en los porcentajes de inhibición considerando una misma enzima, sino que además se corresponde con lo observado entre ambos blancos moleculares.

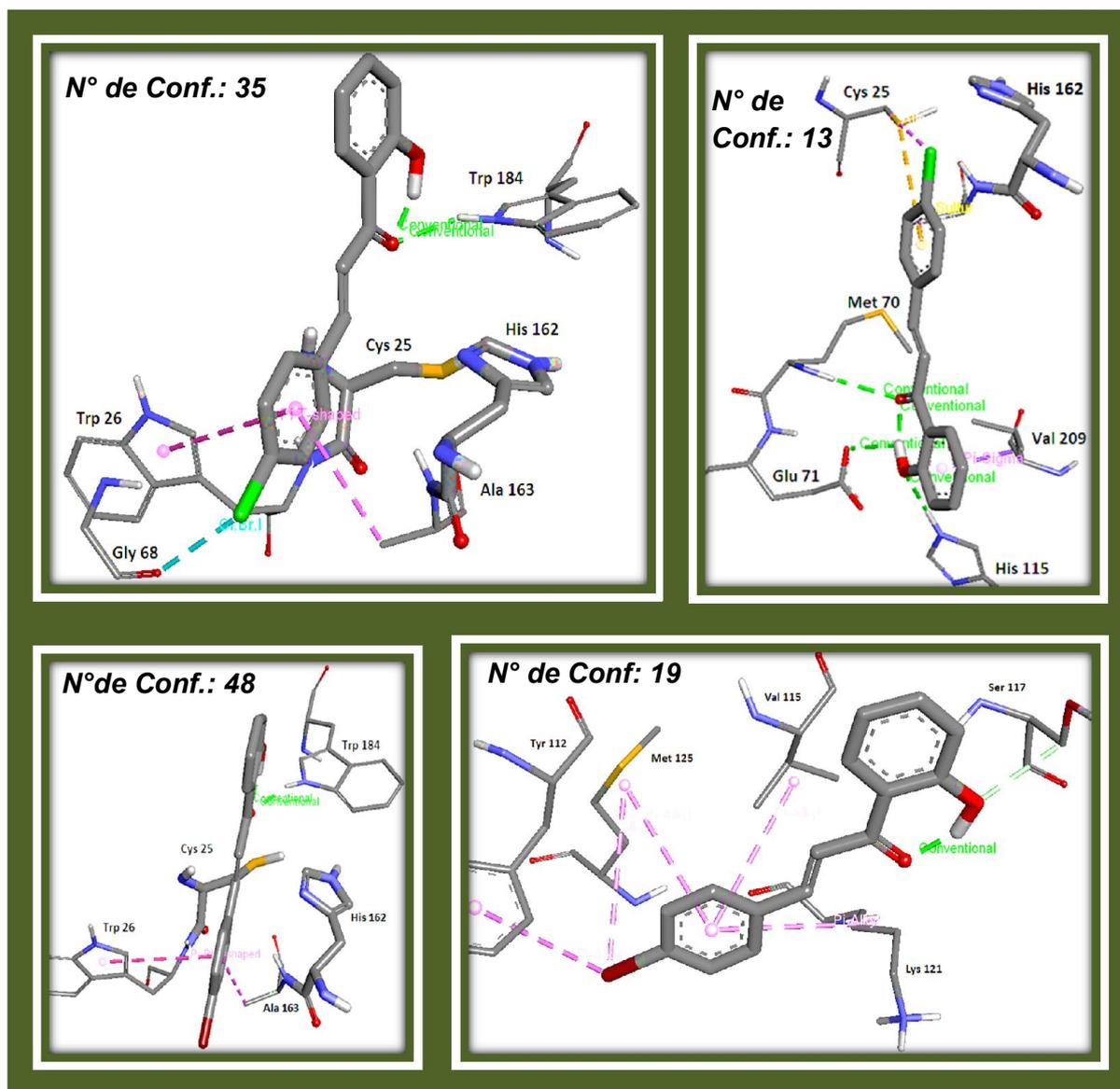
En *FhCL1* el compuesto **12** se ubica en las proximidades del sitio activo, particularmente similar al *cluster* preferido por estos compuestos, representado anteriormente en azul (Fig. 19). A pesar de su ubicación no se producen interacciones visibles con los aminoácidos pertenecientes a la diada catalítica, ni con aminoácidos de los sub-sitios. No obstante, quizás su posición altera el acceso del sustrato a la enzima, lo que podría explicar el 63% de inhibición observado experimentalmente.

Por otra parte, al comparar el resultado obtenido en *FhCL3*, se visualiza un mayor número de interacciones por enlaces de hidrógeno o tipo pi-sigma tanto con los aminoácidos de la diada catalítica así como los de diferentes sub-sitios, (por ej. Met 70 y Val 209 pertenecientes a  $S_2$ ). Fundamentalmente, la interacción con Val 209 es la que despierta más interés ya que este residuo es una leucina en *FhCL1* y por lo tanto constituye una interacción extra para *FhCL3*. Este hecho podría explicar el leve aumento en el porcentaje de inhibición para esta enzima con respecto a *FhCL1* (75%), además de su ubicación preferencial más interna representada por el sitio en verde (Fig. 19). En cuanto a la variación en las energías libres de unión obtenidas, no es posible correlacionar su valor con la capacidad inhibitoria ya que ambas son muy similares como puede observarse en la Tabla 13.



**Figura 20.-** En azul se destaca la estructura correspondiente a *FhCL1* y en verde la estructura de *FhCL3*, ambas en representación *New Cartoon*. En bastones, se observan en azul y verde, posiciones que adopta el compuesto **13** en ambas enzimas respectivamente.

Al visualizar el resultado del *docking* molecular para el compuesto **13**, cuya única modificación con respecto al **12** es un bromo en la posición 4 del anillo B, claramente disminuyen las interacciones con respecto a **12** destacándose únicamente interacciones débiles de tipo hidrofóbico (con Ala 163 y Trp 26) y un único enlace de hidrógeno (con Trp 184), además de ubicarse en un sitio similar para *FhCL1*. La situación es considerablemente diferente para **13** y *FhCL3*, en donde la escasa inhibición observada se condice con su ubicación superficial, lejana del sitio activo, que no se corresponde con ninguna de las posiciones representadas en la Fig. 19 (Fig. 20). Esta evidencia estructural que se obtiene de ambos complejos explicaría los bajos porcentajes de inhibición presentados por **13** para ambas enzimas 19% (*FhCL1*) y 12% (*FhCL3*) (Fig. 21).



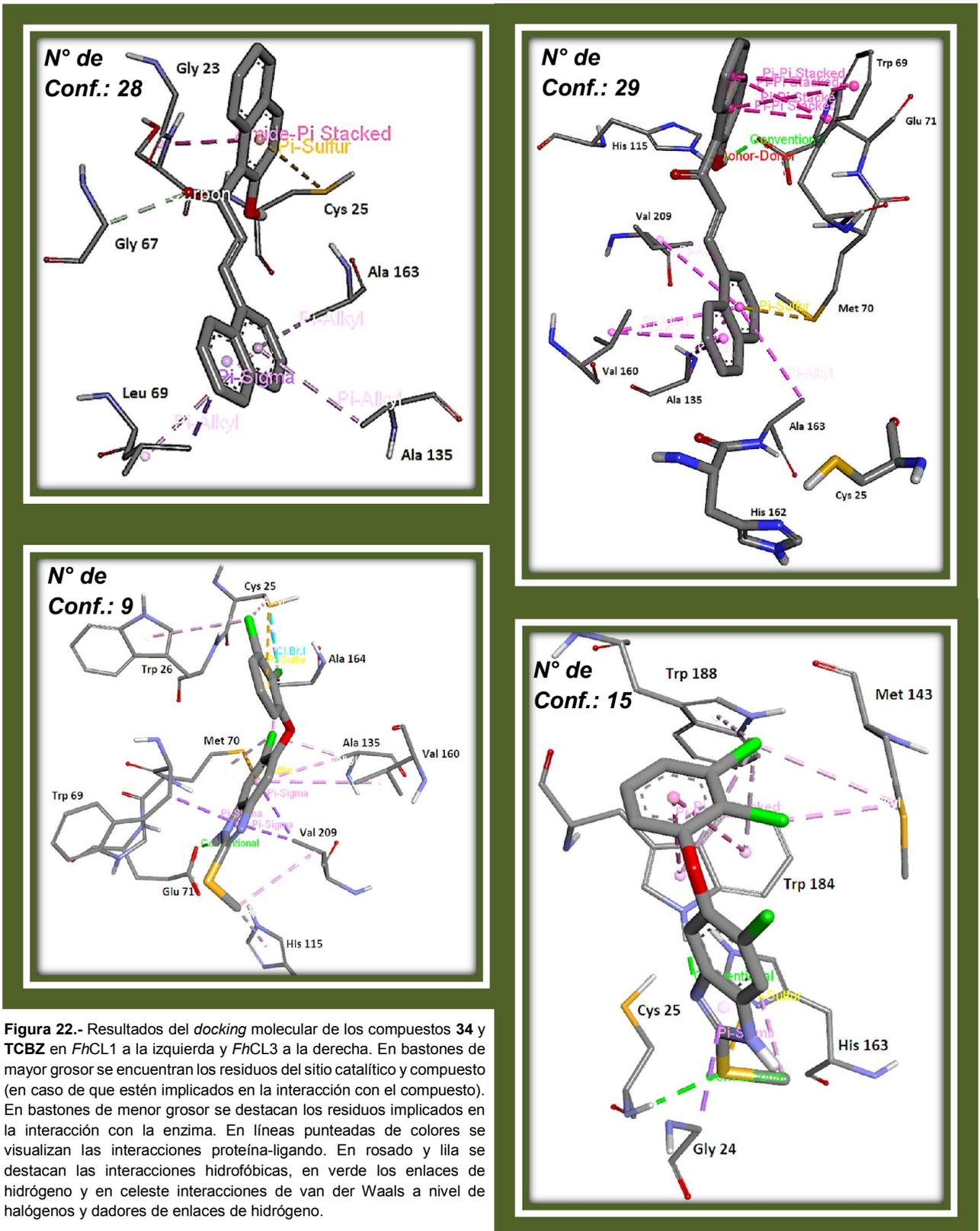
**Figura 21.-** Resultados del *docking* molecular de los compuestos **12** (arriba) y **13** (abajo) en *FhCL1* a la izquierda y *FhCL3* a la derecha. En bastones de menor grosor se destacan los residuos implicados en la interacción con la enzima y que están a 4 Å de cada compuesto. En rosado y lila se destacan las interacciones hidrofóbicas (*Pi-Pi*, *Pi-Sigma*, *Pi-Alquili*) y en amarillo interacciones *Pi-Azufre*, en verde los enlaces de hidrógeno y en celeste interacciones de Van der Waals a nivel de halógenos y dadores de enlaces de hidrógeno.

#### 4.2.2 Compuesto **34** y TCBZ

Si analizamos el flavonoide que ofreció mejores porcentajes de inhibición para ambas enzimas (**34**) se visualiza un incremento notorio, no solo en el número de interacciones establecidas con ambos blancos moleculares sino también en el número de aminoácidos pertenecientes a los sub-sitios implicados en la catálisis. En el caso de su interacción con *FhCL1* los residuos destacados son los pertenecientes a S<sub>2</sub>: Ala 135 y Leu 69, siendo esta última un triptófano en *FhCL3*. Para *FhCL3* aumenta considerablemente el número de interacciones y de aminoácidos pertenecientes a los sub-sitios que interaccionan con el compuesto, como se visualiza claramente en la Fig. 22, en donde se destacan tanto enlaces de hidrógeno, como interacciones hidrofóbicas. El compuesto **34** interacciona además con Val209 (que es una leucina en *FhCL1*), Met70 y Val160 todos pertenecientes a S<sub>2</sub>.

Comparando con los resultados experimentales obtenidos para este compuesto, es asombrosa la correlación que puede evidenciarse entre el resultado teórico y experimental. En *FhCL1*, el compuesto **34** presenta un 57% de inhibición mientras que dicho porcentaje asciende a 70% para *FhCL3*. Esto podría explicarse por el hecho de que **34** establece un mayor número de interacciones con *FhCL3*, lo cual provocaría una unión más estrecha. Por lo tanto, los resultados obtenidos del *docking* no solo explicarían un mayor porcentaje de inhibición sino su comportamiento lentamente reversible para *FhCL3*, a diferencia de la total reversibilidad ofrecida con *FhCL1*. Por otra parte, esto también se condice con los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento de unión a la enzima con respecto al tiempo, en donde dicho compuesto mostró ser de *slow-binding* únicamente con *FhCL3*, no así con *FhCL1*. En base a los resultados de *docking*, esto podría explicarse por el hecho de que requiera de un tiempo mayor para poder unirse con la enzima y establecer ese gran número de interacciones que se observan, alcanzando su máximo poder inhibitorio.

Por último, dado que aún está en discusión el modo de acción del triclabendazol, se consideró interesante evaluar *in silico* su interacción con las catepsinas, como posibles blancos de este fármaco. Si bien experimentalmente no se tienen evaluados compuestos que sean de esta familia, los resultados obtenidos en el *docking* molecular fueron muy interesantes. Se visualiza que su ubicación es similar a la que se obtuvo para los flavonoides y que incluso las interacciones establecidas son similares en número y tipo a las que se producen con **34** fundamentalmente para *FhCL3* pero no para *FhCL1*. Sin lugar a dudas, evaluar experimentalmente dicho benzimidazol en ambas enzimas es una de las perspectivas fundamentales que se desprende de este resultado, ya que la inhibición de estos blancos moleculares podría formar parte de su mecanismo de acción, desconocido hasta el momento.



**Figura 22.-** Resultados del *docking* molecular de los compuestos **34** y **TCBZ** en *FhCL1* a la izquierda y *FhCL3* a la derecha. En bastones de mayor grosor se encuentran los residuos del sitio catalítico y compuesto (en caso de que estén implicados en la interacción con el compuesto). En bastones de menor grosor se destacan los residuos implicados en la interacción con la enzima. En líneas punteadas de colores se visualizan las interacciones proteína-ligando. En rosado y lila se destacan las interacciones hidrofóbicas, en verde los enlaces de hidrógeno y en celeste interacciones de van der Waals a nivel de halógenos y dadores de enlaces de hidrógeno.

## **IV. Conclusiones y perspectivas**

A partir del *screening* de un número considerable de compuestos de la quimioteca del Grupo de Química Medicinal, fue posible obtener un esquema general acerca de familias y estructuras químicas que son favorables para la inhibición de dos blancos moleculares esenciales para el desarrollo vital del parásito *Fasciola hepatica*, las catepsinas *FhCL1* y *FhCL3*.

En primer lugar, los **flavonoides** merecen una mención especial por presentar la mayor variedad no solo a nivel estructural sino en los porcentajes de inhibición, que abarcan un rango de 0 a 75%, pudiéndose distinguir buenos, intermedios y malos inhibidores. En particular dentro de esta familia, dos sub-grupos, resultaron tener un mayor número de compuestos con altos porcentajes de inhibición: **chalconas hidroxiladas** y **chalconas con aromaticidad extendida**. Por presentar muy buena inhibición con ambas enzimas se seleccionó el compuesto **34** del segundo sub-grupo para realizar estudios más exhaustivos que permitieran caracterizar su modo de inhibición.

En cuanto a tendencias generales, los flavonoides evaluados presentan mayores porcentajes de inhibición para *FhCL1* que para *FhCL3*. Por otra parte, aquellas chalconas hidroxiladas sustituidas por halógenos en la posición 4 de su anillo B ofrecen un comportamiento diferencial interesante, en donde el cloro aparece como mejor sustituyente que el bromo en dicha posición. No se observó una tendencia clara en cuanto a un patrón de sustitución diferencial de aromaticidad extendida que estuviera especialmente favorecido, con la excepción de que aquellas chalconas que presentan un naftilo en su anillo B, sin importar en qué posición, ofrecieron mejores porcentajes de inhibición. Esto plantea en perspectiva evaluar más chalconas con aromaticidad extendida que permitan obtener ese patrón óptimo para la inhibición. El único flavonoide natural evaluado, la quercetina, no mostró una inhibición notoria.

Si bien a nivel estructural los benzofuroxanos evaluados presentan un variado número de sustituyentes, eso no se tradujo a nivel del rango de porcentajes de inhibición, que en general fueron bajos. No obstante de los 81 compuestos evaluados dos de los mejores pertenecen a esta familia; **45** que posee un grupo amida y **46** cuya estructura es levemente más compleja presentando un agrupamiento de vinilsulfona característico de inhibidores de catepsinas.

En cuanto a las otras familias de compuestos, no se visualizaron porcentajes de inhibición superiores al 50%, con excepciones en el caso de las quinoxalinas **70** y **71**, lo que amerita, continuar indagando la capacidad inhibitoria de un mayor número de compuestos pertenecientes a este quimiotipo. Cabe destacar que en el caso de **71** está sustituido por el agrupamiento amida, que podría estar siendo en este caso determinante en la inhibición.

Al profundizar en la caracterización de la inhibición de los tres compuestos seleccionados se obtuvieron resultados interesantes que permiten optimizar futuros *screening* que involucren compuestos con las características de los evaluados. En primer lugar, se visualiza en general una clara dependencia del tiempo para la unión a la enzima de los inhibidores mostrando todos (a excepción de **34** para *FhCL1*) un comportamiento de tipo *slow-binding*. Por otra parte los ensayos de reversibilidad permitieron establecer que la chalcona **34** inhibe de forma diferencial a ambas enzimas, siendo su inhibición reversible lenta para *FhCL3* y totalmente reversible para *FhCL1*. Este resultado concuerda con los obtenidos a partir del *docking* molecular de este compuesto en ambas enzimas, donde se visualiza un mayor número de interacciones para *FhCL3*. Varios residuos que participan en estas interacciones pertenecen a los sub-sitios involucrados en el posicionamiento del sustrato, lo que no solo explicaría su

mayor porcentaje de inhibición sino también el comportamiento inhibitorio lentamente reversible observado.

Por su parte, los benzofuroxanos **45** y **46** se comportan de forma similar en ambas enzimas, siendo **45** un inhibidor reversible lento o irreversible, mientras que **46** presenta una inhibición irreversible, lo que se condice con su cinética lenta de unión a la enzima. Realizar un *docking* empleando la misma metodología que para los flavonoides, en estos casos en donde la irreversibilidad puede estar acompañada de una reacción covalente con la enzima, puede arrojar resultados que no se asemejan a lo que sucede en la realidad, ya que el *docking* no es un buen método para establecer la formación de enlaces covalentes. El camino correcto en estos casos sería tratar de plantear un mecanismo posible de inhibición mediante una reacción covalente y emplear métodos cuánticos que permitan describir con detalle electrónico la misma y por ende caracterizar el complejo enzima-inhibidor unido covalentemente. Un camino experimental y que podría resultar más adecuado en este caso, sería intentar obtener el complejo enzima-inhibidor unido covalentemente, empleando técnicas conocidas como espectrometría de masas, cristalografía de rayos X y Resonancia Magnética nuclear.

Los IC<sub>50</sub> obtenidos para los tres compuestos son relativamente buenos, siendo en general similares entre ambas enzimas, con la excepción del compuesto **34**, en donde el IC<sub>50</sub> para *FhCL1* es casi cuatro veces mayor que para *FhCL3*, lo que puede estar relacionado con la mayor afinidad de la chalcona por *FhCL3*. Esto en cierto modo se muestra por opuesto en el ensayo de reversibilidad, donde **34** tarda más en desprenderse de la enzima y permitirle recobrar su actividad. No obstante el compuesto **45** fue el que presentó el mejor IC<sub>50</sub> 8,7 µM para *FhCL1* y 6.1 µM para *FhCL3*.

Con respecto al ensayo con parásitos *in vitro*, la presencia de la chalcona **34** provocó una marcada reducción en la movilidad y vitalidad de los JRD en cultivo. Estas evidencias sugieren que posiblemente *in vivo*, este compuesto podría afectar la capacidad de los juveniles de atravesar la pared del duodeno. Queda pendiente analizar su efecto en el estadio adulto del parásito, así como también evaluar *in vitro* en ambos estadios los benzofuroxanos que ofrecieron buenos porcentajes de inhibición.

Dado el amplio rango de porcentajes de inhibición obtenido para los flavonoides, se plantea como perspectiva realizar un estudio de relación estructura-función, a modo de obtener información aún más detallada acerca de dichos compuestos y los determinantes estructurales responsables en la inhibición.

A modo de contribuir a la elucidación de cuales son aquellos agrupamientos farmacofóricos determinantes en la inhibición se podrían evaluar una veintena de compuestos más que permitan afianzar los resultados obtenidos. Podría realizarse un diseño racional *in silico* asistido por computadoras de una nueva serie de compuestos que exploten los patrones estructurales más destacados en la inhibición, para su posterior síntesis y evaluación biológica. Sería importante también indagar la selectividad de los inhibidores para los blancos moleculares de interés, así como también frente a otras cisteína proteasas presentes en su hospedero definitivo, con las cuales comparten un alto grado de similitud.

