



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



CENUR  
Litoral Norte



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



Caracterización bio-estructural de  
inhibidores de catepsinas de *Fasciola hepatica*  
como potenciales fármacos antihelmínticos

Lic. Florencia Ferraro Rey

Co-directores: Dr. Mauricio Cabera<sup>1</sup>, Dra. Ileana Corvo<sup>1</sup>  
y Dra. Alicia Merlino<sup>2</sup>♥

♥En memoria de la Dra. Alicia Merlino 1976-2018

Maestría en Química - Facultad de Química - PEDECIBA

Universidad de la República

<sup>1</sup> Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas - CENUR Litoral Norte - Sede Paysandú

<sup>2</sup> Laboratorio de Química Teórica y Computacional - Facultad de Ciencias -Montevideo

Paysandú- Montevideo -Uruguay

Agosto de 2019

# Índice

Índice.....	2
Resumen .....	3
Agradecimientos.....	5
Abreviaturas .....	7
1 Introducción.....	10
1.1 <i>Fasciola hepatica</i> : problemática productiva y potencial biótico.....	11
1.1.1 Fascioliasis: un problema global emergente y desatendido.....	11
1.1.2 <i>Fasciola hepatica</i> en Uruguay y la región.....	12
1.1.3 Ciclo vital de <i>Fasciola hepatica</i> .....	14
1.1.4 Estrategias actuales para el control de Fascioliasis .....	16
1.1.5 Estadio juvenil: principales características biológicas y potencial biótico .....	17
1.1.6 Estadio adulto: principales características biológicas y potencial biótico.....	19
1.2 Principales efectores parásito-hospedero: una interfaz cambiante.....	20
1.2.1 Funciones de las enzimas de tipo proteasas .....	21
1.2.2 Catepsinas L esenciales para la supervivencia de <i>Fasciola hepatica</i> .....	23
1.2.3 Características estructurales de las catepsinas .....	26
1.2.4 Características estructurales de <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> .....	30
1.3. Inhibidores de Catepsinas como estrategia para el tratamiento de diversas patologías.....	33
1.3.1 Hidroxietilaminas, sulfonas y derivados .....	34
1.3.2 Nitrilos, Aminocianopirimidinas y derivados .....	34
1.3.3 Flavonoides y derivados.....	36
2. Antecedentes propios y definición de la estrategia experimental.....	38
3. Objetivos .....	41
3.1 Objetivo general.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. Materiales y métodos .....	43
4.1. Producción recombinante de <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> en la levadura <i>Hansenula polymorpha</i> ....	44
4.2 <i>Screening</i> de compuestos en <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> .....	44
4.3 Caracterización de los mejores inhibidores. ....	45
4.3.1. IC <sub>50</sub> , dependencia temporal de la inhibición y ensayos con <i>HsCL</i> .....	45
4.3.2 <i>Docking</i> proteína-ligando con ambos blancos moleculares .....	46
4.3.2.1. Preparación de estructuras de proteínas.....	46

4.3.2.2 Preparación de estructuras de ligandos y sus propiedades.....	47
4.3.2.3 <i>Docking</i> ligando-proteína.....	48
4.3.2.4 Simulación de MD de los complejos ligando- proteína a partir de los complejos obtenidos en el <i>docking</i> .....	48
4.4 Evaluación con parásitos <i>in vitro</i> .....	48
4.4.1 Ensayos <i>in vitro</i> con JRD de <i>Fasciola hepatica</i> .....	48
4.4.2 Ensayos <i>in vitro</i> con adultos de <i>Fasciola hepatica</i> .....	49
4.5 Ensayos de citotoxicidad en la línea celular HepG2 y espermatozoides bovinos.....	50
4.5.1 Estudios de citotoxicidad en la línea celular HepG2.....	50
4.5.2 Estudios de citotoxicidad con espermatozoides bovinos.....	51
4.6 Evaluación de distintas condiciones para la cristalización de <i>FhCL3</i> en complejo con un inhibidor.....	51
5. Resultados y discusión.....	53
5.1 Estudio de la capacidad inhibitoria de 1,4-di- <i>N</i> -óxidos de quinoxalina.....	54
5.1.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la inhibición en <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> .....	54
5.1.3 Caracterización <i>in vitro</i> del modo de inhibición de los mejores compuestos.....	61
5.2 Evaluación de la actividad fasciolicida de los compuestos con mayor inhibición.....	64
5.3 Estudio de citotoxicidad en espermatozoides bovinos y células HepG2 de los mejores inhibidores.....	66
5.4 Caracterización <i>in silico</i> del modo de inhibición de los mejores compuestos.....	67
5.4.1 Resultados de <i>docking</i> ligando-proteína.....	67
5.4.2 Resultados de dinámica molecular (MD).....	71
5.4.2.1 Resultados de dinámica molecular con <i>FhCL1</i> .....	72
5.4.2.2 Resultados de dinámica molecular con <i>FhCL3</i> .....	76
5.4.2.3 Resultados obtenidos para C17 tanto en <i>FhCL1</i> como en <i>FhCL3</i> .....	80
5.5 Estudio de selectividad de los mejores inhibidores con respecto a Catepsina-L humana...84	
5.6 Estudio de la capacidad inhibitoria de híbridos flavonoide-quinoxalina.....86	
5.6.1 Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de la inhibición de <i>FhCL1</i> y <i>FhCL3</i> .....85	
5.6.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad fasciolicidad de los mejores inhibidores.....98	
5.6.3 Estudio de selectividad y citotoxicidad de los mejores inhibidores.....99	
5.7 Evaluación de distintas condiciones para la cristalización de <i>FhCL3</i> en complejo con un inhibidor.....101	
6. Consideraciones finales y conclusiones.....	102
7. Referencias.....	107
8. Anexo.....	122

## Resumen

Actualmente existen a nivel mundial un gran número de infecciones parasitarias producidas por helmintos, con gran incidencia tanto en la producción ganadera como en la salud humana. La fascioliasis, cuyo agente etiológico es el trematodo *Fasciola hepatica*, es una parasitosis que afecta a bovinos y ovinos ocasionando pérdidas económicas mundiales estimadas en 3.2 billones de dólares anuales. El único fármaco activo tanto contra el estadio adulto como juvenil del parásito, es el triclabendazol, con la problemática de la aparición de aislamientos resistentes del parásito en varios países.

*Fasciola hepatica* se caracteriza por tener un ciclo de vida complejo que involucra varios estadios y cuyo hospedero definitivo es el ganado y eventualmente el hombre. Dada la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para esta parasitosis, en este trabajo se avanzó en la búsqueda de inhibidores de dos enzimas de la familia de las catepsinas, *FhCL1* y *FhCL3*, que cumplen roles esenciales para la supervivencia del parásito, Se realizó un *screening* con dos series de compuestos, 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y moléculas híbridas flavonoide-quinoxalina, abordando el estudio de la inhibición de los blancos moleculares desde una óptica multidisciplinaria que combinó estudios *in vitro* e *in silico*.

Se identificaron once derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y catorce compuestos híbridos con un porcentaje de inhibición igual o mayor a 50% para al menos una de las enzimas a 10  $\mu\text{M}$ . De ellos, cinco presentaron una inhibición entre 75%-100% para ambos blancos moleculares evaluados (**C17**, **C23**, **C24**, **H4** y **H14**). Describimos comportamientos diferenciales en cuanto a reversibilidad y cinética de unión, y caracterizamos mediante modelado computacional la interacción entre las catepsinas y los compuestos inhibidores, estudiando la contribución de diferentes sustituyentes del *core* 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina a la estructura farmacofórica. Se evaluó además la selectividad de la inhibición utilizando la catepsina L humana, la actividad fasciolicida sobre los parásitos juveniles cultivados *in vitro* y la citotoxicidad sobre células HepG2 y espermatozoides bovinos.

Los compuestos evaluados que presentaron mejor perfil como potenciales fármacos fueron los derivados **C17** y **H4**, los cuales resultaron excelentes inhibidores de ambas catepsinas, mostrando selectividad frente a las enzimas parasitarias. Asimismo, presentaron actividad fasciolicida sobre el estadio juvenil del parásito y citotoxicidad comparable al triclabendazol, sugiriendo que son buenos candidatos para el desarrollo de fármacos para el control de esta parasitosis. Además, los compuestos identificados aportan al conocimiento de farmacóforos inhibidores de catepsinas, las cuales constituyen blancos moleculares que están siendo empleados actualmente en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de diversas patologías, como la osteoporosis, cáncer, enfermedad de Alzheimer, entre otras.

## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer especialmente a mis padres académicos la Dra. Ileana Corvo y el Dr. Mauricio Cabrera por acompañarme y apoyar mis decisiones incondicionalmente en este arduo camino de aprendizaje no solo hacia convertirme en magister sino también hacia una mejor versión de mí misma. Estos 6 años juntos que abarcan tanto mi formación de grado como de posgrado estuvieron plagados de experiencias que jamás olvidaré y quedarán grabadas en mí para siempre. En estos momentos es cuando las palabras quedan escuetas a la hora de describir cuan agradecida estoy (a pesar de estar escribiendo en español) pero espero haberles devuelto con mi trabajo y mi dedicación algo de todo lo que ustedes me brindaron.

Me gustaría agradecer en especial a Alejandro, mi compañero de ruta en estos años que ha sido pilar fundamental en todos los aspectos y que por compartir vocación me entiende mejor que nadie en todos los altibajos que ha tenido este recorrido, soportándome en mis peores momentos. Gracias por existir y por embarcarte conmigo en esta aventura de construir esta vida, juntos.

Un agradecimiento especial sin dudas se lo llevan mis padres por darme la vida e inculcarme valores que me prepararon para afrontar todas las metas que me he propuesto, acompañándome y amándome en el proceso de convertirme en una mejor persona desde que tengo uso de razón.

A mi familia, más que agradecer primero me gustaría pedirles disculpas por mis ausencias a lo largo de este proceso en momentos importantes. Agradecerles infinitamente por todo su apoyo a lo largo de mi vida académica y por su amor incondicional.

A mis amigos de siempre por estar siempre en las buenas, en las malas y a la distancia, sin duda soy lo que soy gracias a ustedes. Nacho, Gabriel, Mechi, Chaski, Camilo, Nico, Hernu y Lau.

Agradecer a todas las personas que conocí durante esta maestría en Paysandú e hicieron que la locura de tener una vida en dos ciudades a 363 Km de distancia fuera tolerable: a todo el grupo de Sanduceros *Outsiders* y a la banda joven Zora, Katy, Inda, Amparo, Nacho y todos los que se sumaron a esas salidas maratónicas y a toda la comunidad de Pokemaniacos Paysandú, gracias por hacerme sentir como en casa.

En particular me gustaría destacar a dos seres de luz que me hizo conocer este camino y fueron un pilar importante para mí: Cami y Lu. Gracias por todas esas horas de convivencia y catarsis compartidas, de conciertos *a capella* a toda voz, desde tangos de Gardel hasta comerciales de Radio Clarín, como a nosotras nos gusta hacerlo. Sin olvidar las innumerables horas de gimnasio juntas que no sólo nos mantuvieron en forma física sino también mental con la inmejorable ayuda de Álvaro Gómez, profesor excepcional si los hay.

Agradecer a mis compañeros del Polo y del Laboratorio de Moléculas Bioactivas del CENUR-Litoral Norte sede Paysandú por todas las horas compartidas y por permitirme ser parte del proceso de descentralización de la Universidad de la República.

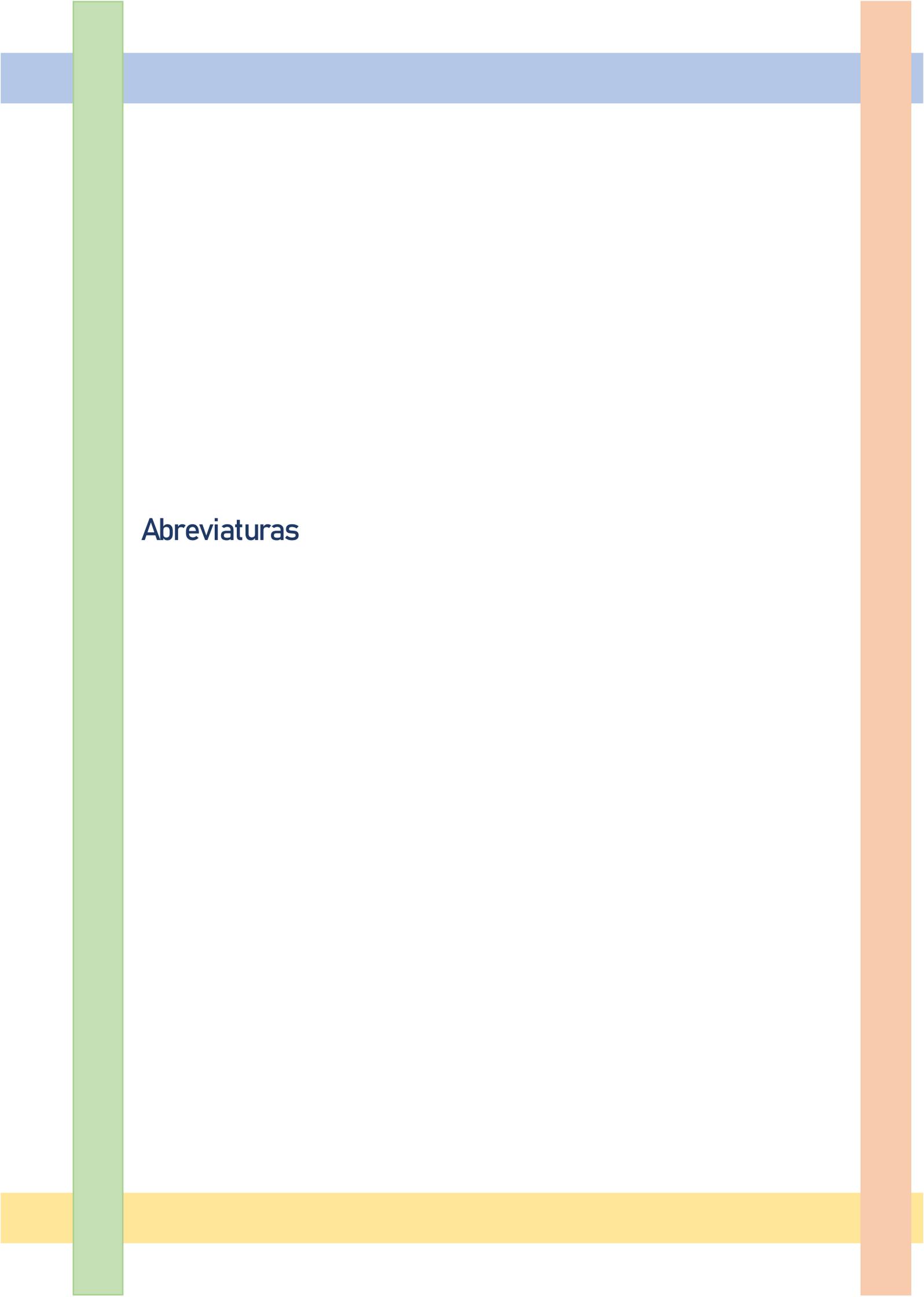
A mis compañeros del Laboratorio de Química Teórica y Computacional de Facultad de Ciencias, a los que se fueron y ya no están y a los que permanecen, gracias por acompañarme en este camino y compartir horas de trabajo, de fiesta y de tristeza, Salú: Sai, Lu, Sastre, Jenner, Steph, Klein y Fede.

En particular me gustaría agradecer a la Dra. Alicia Merlino quien fue mi mentora desde los inicios en mi vida académica en el Laboratorio de Química Teórica y Computacional y que lamentablemente ya no está entre nosotros para poder ver el final del recorrido, pero que fue parte importante en el desarrollo no sólo de este trabajo sino también de quien soy hoy como científica.

Agradecer especialmente a la Dra. Laura Coitiño que como responsable académica del Laboratorio de Química Teórica y Computacional apoyó la continuidad de este posgrado en sus instalaciones y supervisó los resultados presentados en este trabajo a raíz del fallecimiento de la Dra. Alicia Merlino.

Agradecer al Dr. Christophe Guillon por recibirme en su laboratorio, permitirme aprender muchísimo sobre el mundo de la cristalografía, haciéndome partícipe de todo el proceso que obtener una estructura cristalográfica conlleva, con paciencia y mucha dedicación. Desde iniciar los experimentos para generar los cristales, pescarlos, prepararlos para tomar medidas de difracción, colectarlas en uno de los sincrotrones más importantes del mundo en Grenoble y por último aprender a analizar los datos obtenidos y lograr resolver una estructura.

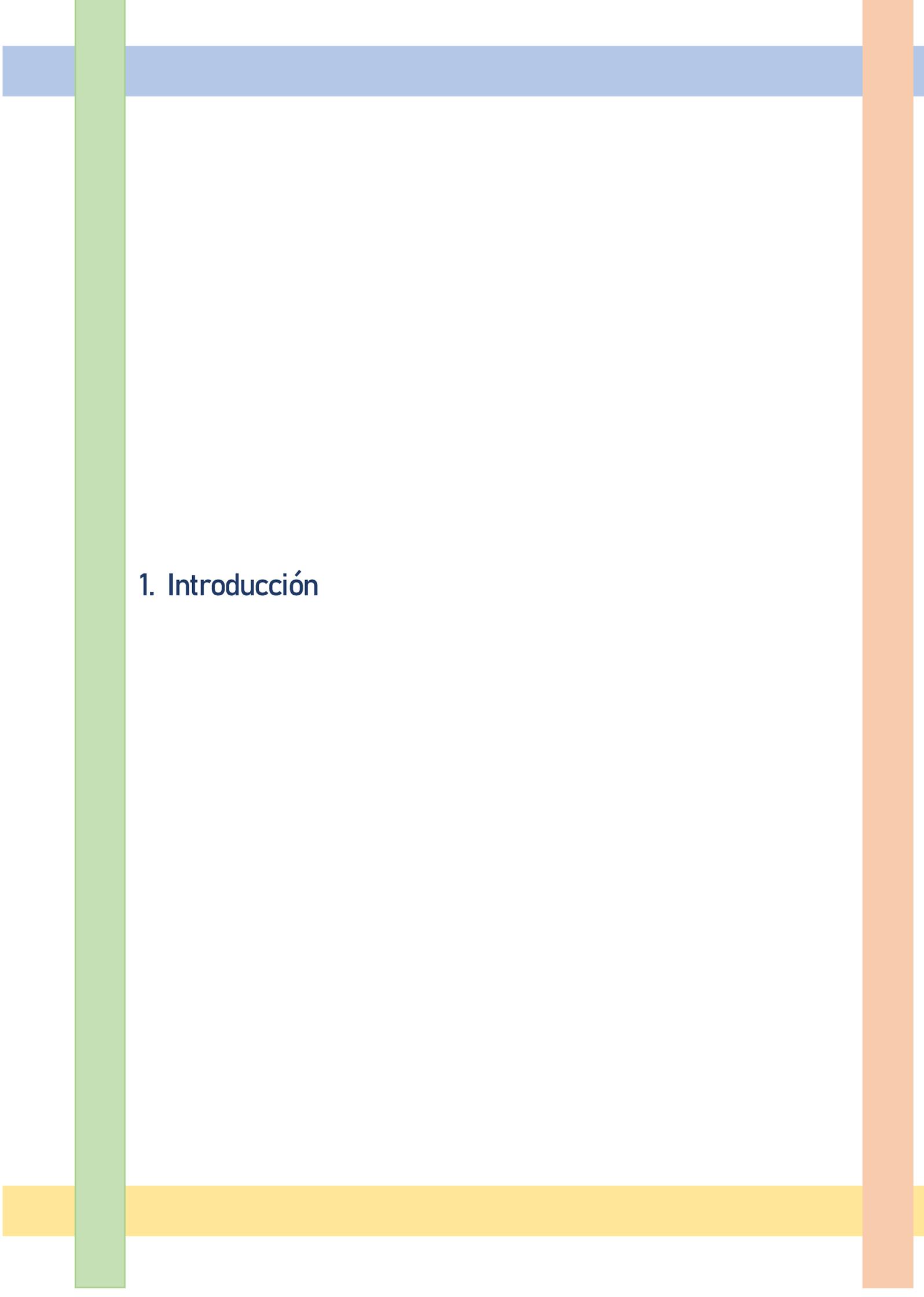
Sin lugar a dudas me gustaría agradecer a todas las instituciones que financiaron de alguna manera el trabajo realizado en esta tesis, a la Comisión Académica de Posgrado por otorgarme la beca de maestría, a PEDECIBA y a la Comisión Coordinadora del Interior por la beca de pasajes y viáticos otorgada por dos años consecutivos.



## Abreviaturas

A	área
AMC	amino metil cumarina
ARN	ácido ribonucleico
B	bacilos
BACE1	<i><math>\beta</math>-siteAPP-cleaving enzyme</i>
CASA	Analizador de Semen Asistido por Computadora
CR	receptores de contacto
Ctrl	control
CY	metacercaria
CYP450	citocromo P450
$\Delta$ Occ	delta de ocurrencia
D	momento dipolar
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DILAVE	División Laboratorios Veterinarios
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
DTT	ditiotreitól
EA	afinidad electrónica
EdH	enlace de hidrógeno
EDTA	ácido entilendiaminotetraacético
EMP	potencial molecular electrostático mapeado
<i>Fh</i> CL1	catepsina L1 de <i>Fasciola hepatica</i>
<i>Fh</i> CL2	catepsina L2 de <i>Fasciola hepatica</i>
<i>Fh</i> CL3	catepsina L3 de <i>Fasciola hepatica</i>
<i>Fh</i> CL4	catepsina L4 de <i>Fasciola hepatica</i>
<i>Fh</i> CL5	catepsina L5 de <i>Fasciola hepatica</i>
<i>Fh</i> AE	asparginil endopeptidasas de <i>Fasciola hepatica</i>
<i>Fh</i> CB	catepsinas B de <i>Fasciola hepatica</i>
FMO	monooxigenasa de flavina
G	gonoporo
GAFF	<i>Generalized Amber Force Field</i>
GC	gradiente conjugado
GST	glutación-S-transferasa
H	huevos
Hep-G2	células de hepatoma humano
<i>Hs</i> CL	catepsina L humana
IC <sub>50</sub>	concentración inhibitoria media
IEF-PCM	<i>Integral Equation Formalism - Polarizable Continuum Model</i>
IP	potencial de ionización
JRD	Juveniles Recientemente Desenquistados
LogP	logaritmo del coeficiente de partición
MD	dinámica molecular
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MW	peso molecular
$\eta$	dureza
OS	ventosa oral
ACP	análisis de componentes principales
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
PES	productos de excreción-secreción
Pol	polarizabilidad
PS	porcentaje de supervivencia celular
RESP	<i>Restrained Electrostatic Potential</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	blandura global
SASA	<i>Solvent Access Surface Area</i>
SD	<i>Steepest descent</i>
SBF	Suero Fetal Bovino
TBZ	triclabendazol
Tc	células del tegumento
TCA	ácido tricloroacético
TPSA	área topológica polar accesible al solvente
Ts	tegumento sincital
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia
V	volumen
VCL	velocidad de línea curva
VS	ventosa ventral
VP	conexión ventral
⊕	electrofilia
YEPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>



## 1. Introducción

## 1.1 *Fasciola hepatica*: problemática productiva y potencial biótico

### 1.1.1 Fascioliasis: un problema global emergente y desatendido

Cerca de un tercio de la población mundial está infectada por parásitos helmintos, quienes en forma creciente y sostenida han aumentado su incidencia sobre la salud tanto humana como animal en países en vías de desarrollo [1][2]. Los últimos estudios epidemiológicos muestran que los principales helmintos implicados en trematodiasis por transmisión alimentaria en humanos son *Schistosoma* y *Fasciola spp.*, entre las que se destacan *F. hepatica* distribuida en todos los continentes y *F. gigantica*, presente principalmente en regiones tropicales de Asia, Europa y África (Figura 1)[3]. La infección del ganado principalmente bovino y ovino con estos parásitos ocasiona importantes pérdidas económicas en todo el mundo que se estiman en más de 3.2 billones de dólares y son producto de la mala calidad que se obtiene en: carne, lana, leche, cueros y otros derivados, sumado a un aumento en la sensibilidad del ganado a contraer infecciones secundarias[4], cuantiosos gastos en tratamientos tanto fasciolicidas como antibióticos en el combate de dichas infecciones y una disminución de su capacidad reproductiva[5].

Si bien la enfermedad incide en salud humana y animal, la alta prevalencia de fascioliasis causada por *Fasciola hepatica* en rumiantes, con el concomitante favorecimiento del desarrollo y propagación del parásito y las pérdidas económicas en el sector ganadero hacen que la última haya cobrado un mayor protagonismo. No obstante, son alarmantes los escasos esfuerzos que se realizan a nivel mundial en la búsqueda de tratamientos más eficientes para esta parasitosis, lo que sumado al hecho de que no se ha priorizado la investigación en la búsqueda de estrategias eficientes para su control y prevención hizo que desde 2008 fuera considerada como una “enfermedad olvidada” [2][6].

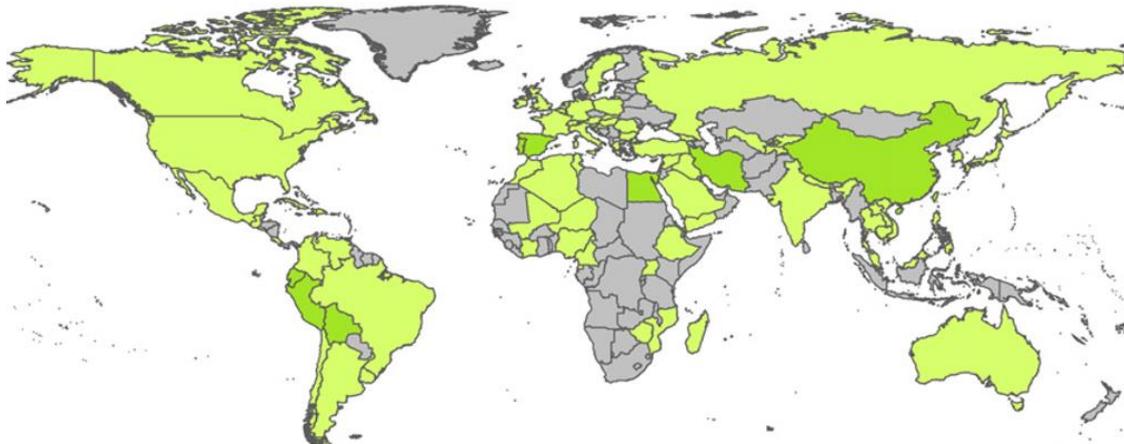


Figura 1.- Mapa de distribución de casos autóctonos de infección por *Fasciola spp* reportados en humanos. El color verde oscuro indica los países en donde las estimaciones son confiables ya que los casos fueron correctamente registrados después de 1980 y fueron incluidas en las estimaciones recientemente realizadas. El verde pálido indica los países en donde la prevalencia nacional no es confiable [7].

### 1.1.2 *Fasciola hepatica* en Uruguay y la región

La fascioliasis causada por *Fasciola hepatica* es endémica en la mayoría de los países a nivel mundial, estimándose que más de 2.4 millones de personas están infectadas y 180 millones en riesgo, entre los países más destacados por tener una mayor prevalencia están: Perú, Bolivia y Ecuador, con casos en humanos más esporádicos en otros países [8].

En Uruguay, *Fasciola hepatica* se encuentra ampliamente distribuida, principalmente en establecimientos ganaderos que alternan pastoreo de bovinos con el de ovinos. Si bien los reportes actuales sobre la prevalencia de esta enfermedad no han abarcado la totalidad del territorio, en un país donde existe un 40% de su superficie destinada a la ganadería y en el que hay 5.4 cabezas de ganado per cápita (según un informe del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) [9], se hace evidente la relevancia de esta parasitosis. A modo de ejemplo se tiene un estudio realizado en el departamento de Salto, en donde pruebas serológicas arrojaron que un 67% del ganado estaba transitando un proceso de infección por “Saguaypé” (nombre común con el que se reconoce a este parásito), destacándose a la raza Angus y ganado menor de 2 años como los principales afectados[10]. Si bien el centro de atención se pone en el ganado ovino y bovino, existen otros animales no domésticos de los que también se han descrito casos, entre los que se destacan liebres, conejos y cabras que también son vectores de esta parasitosis [11][12]. En Uruguay, nuestro grupo realizó una búsqueda exhaustiva en hígados de liebres faenadas provenientes de acopios de todo el litoral norte de nuestro país (principalmente Artigas,

Paysandú, Rivera y Soriano), encontrándose la presencia del parásito en su forma adulta en 3 hígados de 1024 analizados (datos no publicados). Por consiguiente, si bien se realizan tratamientos en el ganado para combatir esta parasitosis, existen otros huéspedes que actúan como reservorio que también la transmiten y contribuyen a la continuidad de su ciclo vital.

La infección es mayor en el ganado (hospedero definitivo) que se alimenta en pasturas más húmedas y bajas, ya que como se analizará a continuación, la presencia de un caracol del género *Lymnaea* (hospedero intermediario) que habita en este tipo de ecosistemas, es imprescindible para la perpetuación del ciclo vital del parásito[13][14].

Fascioliasis es una enfermedad que se caracteriza por presentar dos fases delimitadas por los signos y síntomas que se observan en los mamíferos afectados. En primer lugar la fase aguda, se asocia principalmente con un dolor abdominal persistente, pérdida de peso, anemia, hepatomegalia y fiebre (esta última a veces puede no manifestarse). Esta sintomatología es causada por el proceso de ingreso y migración de los juveniles recientemente desenquistados (JRD) a través de la pared duodenal hacia la cápsula hepática y su parénquima. Por otra parte la fase crónica de la enfermedad comienza una vez que el parásito se aloja en el hígado (principalmente a nivel de los canalículos biliares), provocando hiperplasia del epitelio, fibrosis a nivel de los conductos y colangitis. La forma crónica deviene además en una colonización total de gran parte del hígado (Figura 2) [5] [15][16].



Figura 2.- Fotografías obtenidas a partir de hígados decomisados en frigorífico local durante una faena en la que colectamos *Fasciola hepatica* adulta. A- Hígado con engrosamiento de múltiples canalículos que se extienden por todos sus lóbulos. B- Engrosamiento de canalículos en la proximidad al canal biliar central. C- Disección de quiste situado en el borde de uno de los lóbulos hepáticos, donde se alojaban varias *F. hepatica* adultas.

En colectas realizadas en frigoríficos de la localidad de Paysandú nuestro grupo ha constatado la presencia de engrosamiento de canalículos que conectan con los biliares centrales que llegan hasta todos los lóbulos hepáticos. Asimismo, como se ve en la Figura 2, constatamos

la presencia de quistes en regiones alejadas de los canalículos centrales, que contenían *F. hepatica* adultas en su interior (Figura 2C, información no publicada).

En el informe realizado por el Instituto Nacional de Carnes en 2013, se decomisaron un 34,4% de los hígados faenados. En las categorías evaluadas en auditorías realizadas a establecimientos ganaderos, la que presentó mayor porcentaje de decomiso de hígados fue la vaca (48,9 %), mientras que los novillos (29,6 %) y las vaquillonas (29,9 %) presentaron porcentajes similares, siendo *Fasciola* viva (25%) y las lesiones por *Fasciola hepatica* (53.1%) las principales causantes de estos decomisos. En cuanto a las pérdidas económicas, fueron menores que en años anteriores, lo que puede ser un indicio de una ocupación más responsable por parte de los establecimientos ganaderos, en tratar esta parasitosis ya que en 2002 y 2008 se registraron pérdidas por decomiso de hígados cercanas a los 290 mil y 215 mil dólares respectivamente, mientras que en 2013, las pérdidas bajaron a 150 mil dólares [17].

### 1.1.3 Ciclo vital de *Fasciola hepatica*

*Fasciola hepatica* es un parásito helminto, hematófago, que posee un ciclo heteroxeno que necesita de dos huéspedes. El hospedero definitivo es un mamífero, con mayor frecuencia el ganado ovino y bovino aunque se han reportado casos en cabras, cerdos, liebres y caballos, así como humanos, y el hospedero intermediario es un caracol del género *Lymnaea* (Figura 3). La infección de su hospedero definitivo inicia cuando éste ingiere vegetación o agua contaminada con metacercarias, la forma quística del parásito que resiste hasta 6 meses en adecuadas condiciones climáticas. Una vez que llegan al intestino, cada metacercaria desenquista dando lugar a un JRD, larva móvil que puede alcanzar entre 100 y 170  $\mu\text{m}$  [18], capaz de atravesar la mucosa intestinal a nivel del duodeno y migrar hacia el hígado por la cavidad peritoneal durante más de una semana. Una vez que 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, donde se produce la maduración y crecimiento hacia el estadio adulto, que se alimenta fundamentalmente de sangre. Una vez que se aloja en los conductos biliares es capaz de reproducirse sexualmente, para dar lugar a 20.000-50.000 huevos de tamaño microscópico al día que son excretados junto con la bilis y eliminados por las heces. Los huevos al cabo de un período de maduración de entre 2 y 3 semanas (a veces hasta 8) eclosionan para dar lugar a una forma ciliada del parásito conocida como miracidio [19]. El tiempo de eclosión es altamente dependiente de la temperatura y de la humedad ambiente. Se ha observado que por debajo de los 10 °C los huevos no eclosionan y que el tiempo puede casi triplicarse a temperaturas promedio

de 16 °C [19], siendo necesario que el encuentro con el caracol ocurra en un período máximo de 24 h, de lo contrario, el ciclo se detiene[14]. El miracidio encuentra y penetra los tejidos blandos del caracol gracias a una papila especializada en su reconocimiento y una vez dentro pasa a ser un esporocisto. Este último es una monocapa de células germinativas, que por sucesivas divisiones y transformaciones da lugar a redias. Cada redia dará lugar a cercarias, forma flagelada del parásito que se enquistará en la vegetación circundante para convertirse en la forma quística resistente (metacercaria) y así continuar el ciclo. El número en que se producen cada uno de los intermediarios puede ser variable y depende de múltiples factores tanto bióticos como abióticos [20][21].

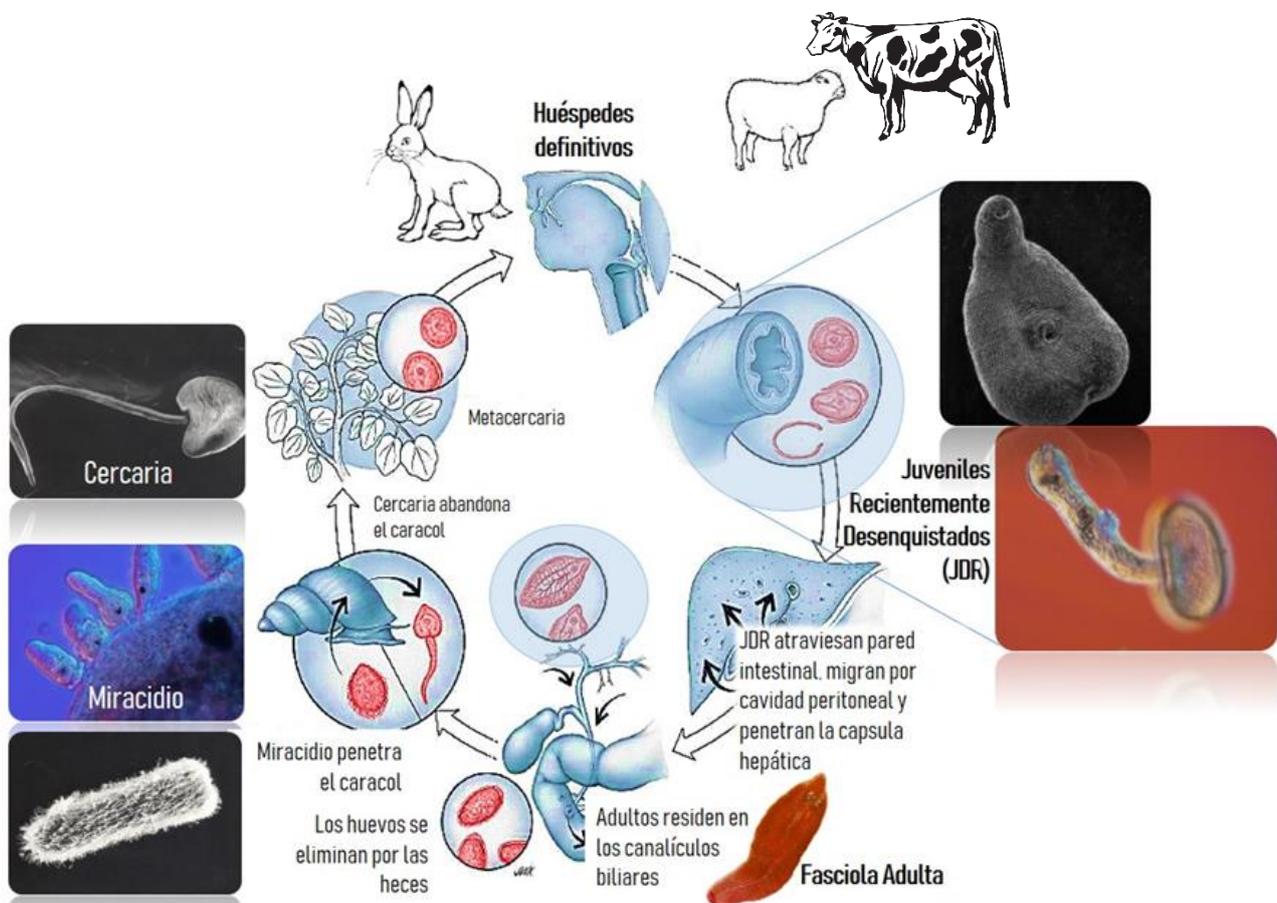


Figura 3.- Esquema del ciclo vital de *Fasciola hepatica* adaptado de Aminian y colaboradores [22].

### 1.1.4 Estrategias actuales para el control de Fascioliasis

Los tratamientos ofrecidos actualmente para combatir esta parasitosis se basan en el uso de fármacos antihelmínticos pertenecientes a la familia de los benzimidazoles, destacándose el triclabendazol (TBZ) como uno de los primeros en emplearse con éxito, siendo el único activo en el estadio juvenil del parásito. Si bien su mecanismo de acción aún no se encuentra completamente dilucidado existen evidencias de que estaría implicado en afectar la polimerización de los microtúbulos por su interacción con la tubulina, mecanismo que se ha observado para otros benzimidazoles. El potencial biótico del parásito, sumado a sus huéspedes definitivos e intermediarios y el uso indiscriminado de este fármaco han favorecido el desarrollo de resistencia a los fármacos comúnmente utilizados, existiendo en la actualidad un gran número de aislamientos resistentes al TBZ [15][23]–[26]. Existen indicios de que esta resistencia podría estar asociada a la capacidad de sobre expresar enzimas detoxificadoras de xenobióticos ya que se ha observado que la coadministración de TBZ con inhibidores de enzimas encargadas de metabolizar xenobióticos como la CYP450 y FMO incrementan la disponibilidad sistémica del TBZ así como un enlentecimiento en su metabolización (tanto a nivel del hospedero como del parásito, la dosis recomendada es de 10 mg/kg en pacientes humanos con infecciones agudas)[27],[28]. En el último tiempo y con la esperanza de poder contrarrestar la resistencia observada al TBZ, se han realizado coadministraciones de dicho fármaco con ivermectina, clorsulón y nitroxinil, así como closantel y albendazol [27][29][30]. Si bien se obtuvieron algunos resultados auspiciosos, estos fármacos son empleados para el combate de otros parásitos helmintos (cestodos y nematodos) por lo que la coadministración podría favorecer el desarrollo de resistencia generalizada a helmintos.

En lugares en donde no hay acceso al triclabendazol el fármaco por excelencia para combatir esta parasitosis es el bitionol, un componente anti-bacterial ampliamente utilizado en jabones y desodorantes. Es de las primeras opciones junto con la nitazoxanida a la que también se le ha atribuido efectos anti-virales y anti-protozoarios. En la actualidad hay pocos reportes sobre la eficacia de este fármaco fundamentalmente por su uso discontinuado [31].

En paralelo se ha estudiado el potencial antigénico para el desarrollo de vacunas de un gran número de enzimas tanto nativas como recombinantes de *Fasciola hepatica*, Se han empleado algunas enzimas proteolíticas, como la catepsina tipo L *Fh*CL3 y B, con una protección entre 65% y 74% en ratas [32]–[34]. En el último tiempo y con los avances en esta área han aparecido vacunas orales basadas en el suministro de lechuga transgénica que expresa ambas

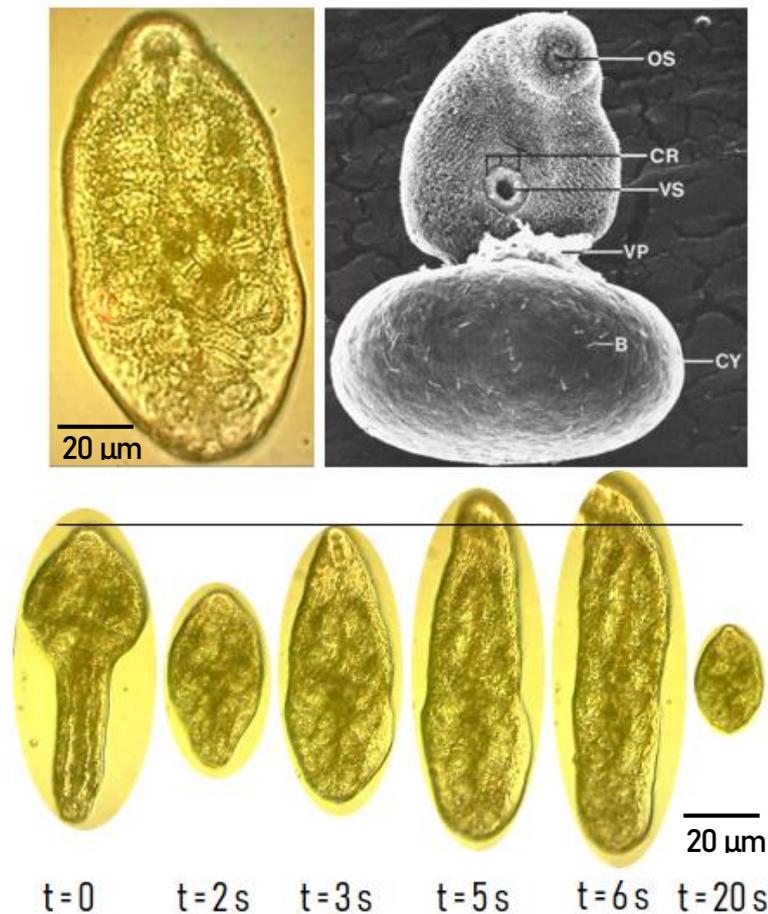
proteasas, ensayándose tanto en bovinos como en ovinos, lográndose disminuir la intensidad de la infección, el daño hepático y la fertilidad del parásito [35]. Por otra parte también se han empleado otras proteínas de *F. hepatica*, por ejemplo la leucina aminopeptidasa M17 en combinación con diferentes adyuvantes alcanzando una protección mayor al 85% en ovejas [36]. Por último, la glutatión-*S*-transferasa (GST) ha sido empleada también con este fin pero sin demasiado éxito alcanzando sólo un 65% de protección [32]. Si bien se han logrado obtener niveles de protección relativamente buenos, fundamentalmente mediante el empleo de proteasas, en la actualidad no se encuentra ninguna vacuna disponible en el mercado [3][37].

Esto hace que sea urgente desarrollar estrategias que permitan no solo combatir la enfermedad, mediante el empleo de nuevos fármacos específicos y efectivos, sino prevenirla, mediante estrategias de pastoreo en las que se eviten sitios con potencial presencia del caracol, principalmente en las estaciones en las que se favorece el desarrollo del parásito [38].

### 1.1.5 Estadio juvenil: principales características biológicas y potencial biótico

Esta forma del parásito es de particular interés ya que es la primera forma móvil que toma contacto con su hospedero definitivo y lo coloniza para continuar con el desarrollo del ciclo vital. El estadio juvenil, si bien es microscópico, es multicelular y muy móvil (Figura 4). Posee una ventosa oral junto a la que está la boca, por la que regurgita permanentemente llevando contenido desde el interior al exterior y viceversa. Las espinas en su superficie, junto con las ventosas llegan a medir cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro cuando están completamente abiertas (oral y ventral) y son imprescindibles tanto en la locomoción como en la invasión a su hospedero. Este estadio del parásito se diferencia significativamente del adulto ya que todo su metabolismo está orientado principalmente a gastar energía y producir los efectores necesarios para la invasión y migración hacia el hígado [18]. Entre los principales efectores se encuentran las cisteína proteasas, en su mayoría pertenecientes a la familia de catepsinas. Estas proteasas son sin duda la componente bioquímica esencial en la invasión a su hospedero, ya que constituyen la artillería

química para disgregar la mucosa intestinal y permitir el ingreso a la capa serosa de la cavidad peritoneal, contribuyendo en la evasión del sistema inmune en su migración [34][39][40].



**Figura 4.- Morfología y características del movimiento de JRD.** Arriba a la izquierda se observa una imagen de aumento 100x de microscopía óptica, se distingue la ventosa oral, así como su interior. Arriba a la derecha se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido, OS: ventosa oral, CR: receptores de contacto, VS: ventosa ventral, VP: conexón ventral, CY: metacercaria, B: bacilos en su superficie [18]. Abajo se observan capturas de un video tomado durante nuestros ensayos *in vitro*. La línea negra marca la posición inicial de la ventosa oral.

Las señales químicas que guían al parásito hacia su órgano final de destino (el hígado) son aún desconocidas. Si bien el tiempo exacto que tarda en migrar no está determinado, pasan cerca de 6 semanas [19] hasta que se detectan huevos en las heces (lo que indica una madurez sexual del adulto que se alojó en el canalículo biliar) y durante su migración es capaz de resistir a las respuestas inmunológicas del hospedero. Algunos estudios detectan un aumento de anticuerpos anti proteínas secretadas por el parásito adulto en las primeras cuatro semanas post infección [11], otro indicio del tiempo que tarda en migrar.

### 1.1.6 Estadio adulto: principales características biológicas y potencial biótico

Las características fisiológicas de este estadio son las principales responsables de la prevalencia de *Fasciola hepatica* en todo el mundo y los problemas que se tienen a la hora de combatirla. El juvenil alcanza este estadio aproximadamente luego de las 4 semanas de infección, convirtiéndose en un gusano plano, que posee un tamaño que oscila entre 2 y 3 cm de longitud por 0,4 a 1,2 cm de ancho (Figura 5). Su coloración puede variar de gris a marrón pálida según el medio en que se encuentre y del contenido intestinal [41].

Cuenta con una motilidad similar al juvenil pero con movimientos que no están orientados mayoritariamente al desplazamiento sino que son de carácter ondulatorio, favoreciendo su permanencia y adherencia a los canalículos biliares. El extremo anterior del cuerpo se distingue en un cono oral triangular también conocido como lóbulo de la cabeza que en su extremo, tiene una boca triangular. Hay dos ventosas musculares, una ventosa oral en el extremo anterior que rodea la boca y una gran ventosa ventral situada a unos 3 o 4 mm detrás de la ventosa oral. La pared del cuerpo de *F. hepatica* consiste en una capa gruesa de cutícula seguida por una membrana basal delgada y capas musculares subyacentes que rodean al mesénquima [41].

La cutícula está constituida por una capa homogénea de escleroproteína, que cubre al parásito y lo protege de las sustancias provenientes del hospedero. Por otra parte cuenta con espinas pequeñas, que son fundamentales para el anclaje al conducto biliar y facilitan la locomoción. La ventosa oral contiene una boca ventral que conduce a una cavidad bucal en forma de embudo, seguida de una faringe muscular redonda con paredes gruesas y un lumen pequeño, que conecta con su sistema digestivo. Su alimentación se produce principalmente por la ingesta de bilis, sangre, linfa y restos celulares. La digestión es extracelular, ocurre en el intestino a expensas de la secreción de proteasas, entre las que se distinguen varias pertenecientes a la sub-familia de Catepsinas L. El alimento digerido se distribuye en divertículos del intestino a todas las partes del cuerpo (Figura 5), ya que no posee un sistema circulatorio, funcionando el sistema digestivo como un sistema gastrovascular. Todo aquello parcialmente digerido es eyectado nuevamente por la boca y vuelto a ingerir de forma cíclica, lo que constituyen los productos de excreción-secreción (PES). No obstante, también cuenta con un sistema excretor, en donde se incluyen células especializadas en la excreción y mantenimiento de la homeostasis del parásito, junto con un poro excretorio. Es un parásito hermafrodita (Figura 5), lo que le

posibilita reproducirse fácilmente tanto mediante auto-fertilización como por fertilización cruzada. Esto sin duda le provee una mayor versatilidad favoreciendo su adaptación al medio [41].

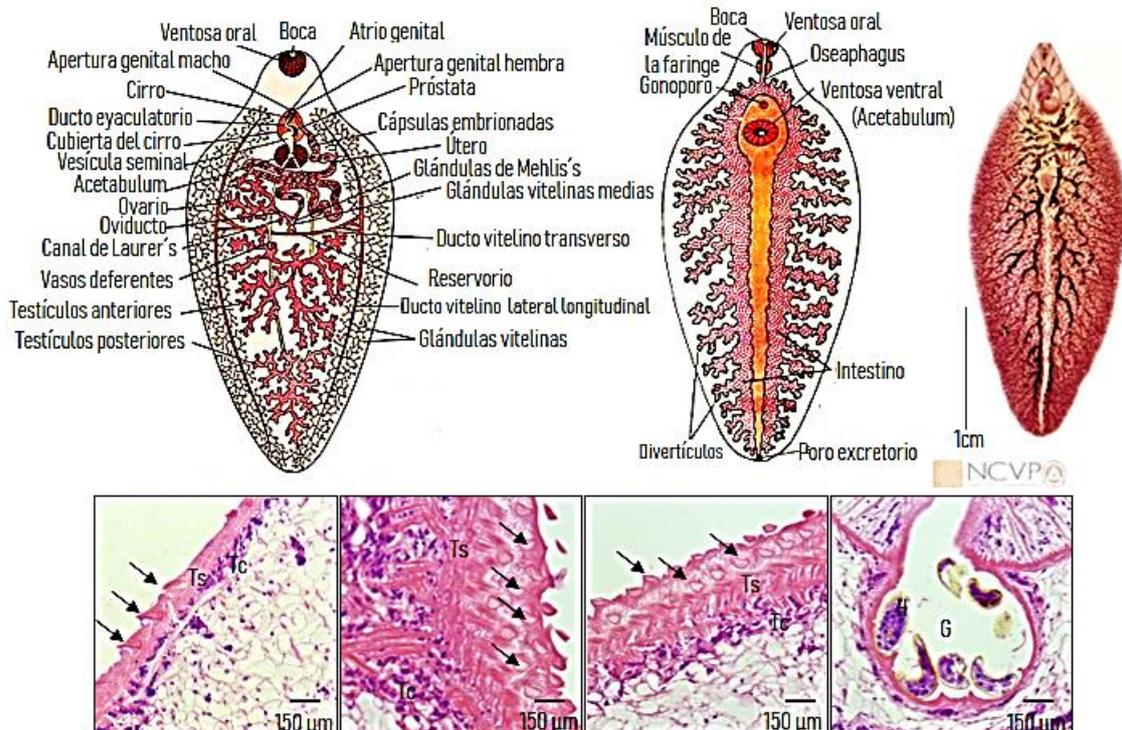


Figura 5.- Morfología de *Fasciola hepatica* adulta. Arriba se observan dos esquemas tomados del trabajo de Shah[41] que representan el aparato reproductor y digestivo del parásito. A la derecha se observa una imagen tomada de la página de *National Center for Veterinary Parasitology* [42] en la que se observan algunos de los órganos internos del gusano mediante una tinción especial con acetocarmina. Abajo se observan cuatro imágenes de cortes histológicos realizados en colaboración con el Dr. J.P. Pacheco (no publicadas): Ts: tegumento sincital, Tc: células del tegumento, H: huevos, G: gonoporo. Las flechas indican las espinas ancladas a la cutícula del tegumento.

## 1.2 Principales efectores parásito-hospedero: una interfaz cambiante

La interfaz parásito-hospedero es sumamente dinámica, en la que se distinguen diferentes tejidos, con microambientes variados y células del sistema inmune que son inicialmente alertadas de la presencia del parásito.

Las condiciones reductoras, las sales biliares, el dióxido de carbono y el pH cercano a la neutralidad en el duodeno inducen a los parásitos a emerger como JRD desde la metacercaria quística ingerida. El cambio del entorno externo al interior del mamífero provoca un aumento de la temperatura y la salinidad. Esto motiva la expresión de genes asociados con la protección UV y la regulación de la temperatura en las metacercarias, mientras que la expresión de genes

asociados con la respuesta al aumento de la temperatura y hormonas se observó en JRD una vez pasadas las 24 horas del desenquiste [43].

Luego del desenquiste, el contacto con las paredes del intestino delgado, su disrupción e invasión por parte de los JRD deben ser casi en simultáneo. En ese sentido se ha observado que el ingreso por la matriz intestinal es rápido, facilitado por el movimiento vigoroso (ver [Figura 4](#)) y por el *pool* enzimático de cisteína proteasas (catepsinas) que secreta, observándose la activación de un gran número de genes que codifican para estas proteínas [43]. Diversos estudios han mostrado que luego del desenquiste y en presencia de anticuerpos del hospedero los juveniles en maduración son capaces de modificar su superficie para intentar camuflarse frente al ataque del sistema inmune [44]–[46].

En el estadio adulto de *Fasciola hepatica* las cisteína proteasas son también los principales efectores, detectados en mamíferos que están infectados. Además, se hallan otras proteínas menos abundantes como proteínas de unión a ácidos grasos, tiorredoxina, peroxirredoxina y glutatión-*S*-transferasa que juegan un rol importante en la protección frente a especies reactivas del oxígeno y nitrógeno provenientes del hospedero [47]–[50].

### 1.2.1 Funciones de las enzimas de tipo proteasas

Sin duda, las proteasas se destacan entre los efectores presentes en varios estadios del parásito. Estas se encargan de catalizar la degradación de polipéptidos mediante la hidrólisis del enlace peptídico. Se pueden clasificar en: endopeptidasas, si hidrolizan los enlaces peptídicos internos o exopeptidasas cuando el clivaje del sustrato se produce en su extremo. Otra clasificación se realiza en función del residuo principal que es empleado en su mecanismo catalítico, distinguiéndose seis clases: cisteína, aspártico, serina, treonina y metalo-proteasas, y una minoritaria, las glutámico proteasas. Otras clasificaciones más complejas se basan en un agrupamiento que tiene en cuenta la similitud de secuencia y estructura tridimensional [51].

Las cisteína proteasas constituyen una familia de enzimas que se hacen presentes en 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 [52]. En la misma se suelen incluir algunas cisteína proteasas de otras plantas y a las catepsinas presentes en animales. Las más estudiadas en mamíferos, con ortólogos presentes en todos los organismos,

son las B, L, K, y S. Las diferencias en su actividad catalítica se correlacionan con secuencias específicas que flanquean a los residuos del sitio activo [50].

Inicialmente se pensaba que la función de estas enzimas se limitaba a su capacidad proteolítica en el interior de los lisosomas, pero actualmente numerosos estudios, principalmente a nivel de modelos animales con deficiencia de las mismas, han demostrado que su rol biológico es mucho más amplio y diverso [53].

En mamíferos, tienen un rol protagónico en diversos procesos: reestructuración de placas de ateroma (catepsinas S) [54] activación de pro-enzimas (catepsinas C y B), maduración de hormonas peptídicas (catepsinas B y L), resorción ósea y homeostasis del calcio (catepsina K) [55][56], presentación de antígenos (catepsinas V, B, S, G, L y F) [57][58][59][60], degradación y recambio de proteínas (catepsinas B, H y L) [61] y homeostasis epidérmica (catepsina L) [62].

En general un 80% de las enzimas secretadas por parásitos helmintos son catepsinas de tipo B y L[63], que se caracterizan por ser usualmente endopeptidasas, con algunas excepciones como es el caso de la catepsina B, que también tiene función carboxipeptidasa [50][52][53]. Son encontradas en forma mayoritaria en los PES de *Fasciola* y trematodos relacionados, en particular aquellos que necesitan atravesar tejidos. Asimismo se han encontrado evidencias de que estarían implicadas en la eclosión y desenquiste de muchos helmintos entre los que se destacan la propia *Fasciola hepatica* y *Paragonimus westermani*, ambos con ciclos que incluyen el ingreso a su hospedero vía el tracto gastrointestinal [64][65].

En parásitos, las catepsinas suelen ser secretadas al medio extracelular para cumplir diversas funciones, lo que hace que ciertas propiedades bioquímicas cambien, por ejemplo su gran estabilidad en un amplio rango de pH (algo que no sucede con sus análogas en el hospedero) [66][67]. Particularmente en *Fasciola*, son las primeras en ser secretadas por los JRD en el duodeno para favorecer la ruptura de los tejidos, requisito indispensable para su ingreso en la cavidad peritoneal y por lo tanto constituyen una herramienta imprescindible para vencer la primera barrera con su hospedero.

La alimentación de muchos parásitos hematófagos, como es el caso de *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*, es posible gracias a la presencia de estas enzimas para digerir los componentes proteicos sanguíneos. En *S. mansoni*, se ubican en la gastrodermis e intestino del parásito y en *F. hepatica* son secretadas a nivel intestinal y hacia el exterior [39][40][48][68][69].

Algo no menor es la implicancia de las catepsinas en la defensa frente al sistema inmunitario de su hospedero. Se observó que las mismas son capaces de degradar *in vitro* la región bisagra de las inmunoglobulinas del hospedero [70][71], lo que limitaría la capacidad de respuesta frente a su invasión. Esta cualidad evasiva se potencia con la facultad de modular la respuesta inmune mediada por linfocitos T, reprimiendo la respuesta de linfocitos Th1, mediada por células protectoras innatas, induciendo apoptosis en eosinófilos [70][72] y favoreciendo la expresión de factores que estimulan la diferenciación hacia células Th2 [73][74]. Estas poseen un rol moderador en la respuesta inmune, lo que además de generar un microambiente inmunológico óptimo para el desarrollo del parásito, propicia las infecciones secundarias [4][74][75] y afecta la eficacia en la inmunización mediante vacunas contra otros patógenos [76].

### 1.2.2 Catepsinas L esenciales para la supervivencia de *Fasciola hepatica*

*Fasciola hepatica* posee una de las familias más numerosas de catepsinas, formando 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* [49][77]–[79]. La expresión diferencial de estas enzimas en los diferentes estadios del parásito está finamente regulada y asociada con diferentes roles en el desenquiste de los JRD, migración de los mismos, maduración hacia la forma adulta a nivel hepático y su posterior reproducción y desarrollo.

Las catepsinas son sintetizadas a nivel de las células epiteliales que recubren su tracto digestivo y están implicadas en funciones de absorción y secreción. Estas enzimas se encuentran como pro-enzimas en el interior celular, distribuidas en forma diferencial en las células secretoras de los JRD (Figura 6) y son activadas luego de su secreción al tubo digestivo del parásito [43][77].

Empleando anticuerpos dirigidos contra el pro-péptido de *FhCL1*, se ha identificado que la pro-catepsina L se empaqueta en vesículas secretoras en el vértice de las células epiteliales intestinales del parásito. Esta modalidad de secreción reduce el riesgo de daño inespecífico por proteólisis, activándose la enzima en el momento óptimo a pH ácido. Si bien se desconoce el pH del intestino del adulto, se estima que está próximo a 5,5 [66], por lo que una vez activadas las catepsinas podrían degradar el tejido circundante externo a pH fisiológico [49][77].

Se ha observado que *FhCL3* se mantiene estable a 37°C por 8 horas, conservando el 50% de su actividad a pH neutro. 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) [78].

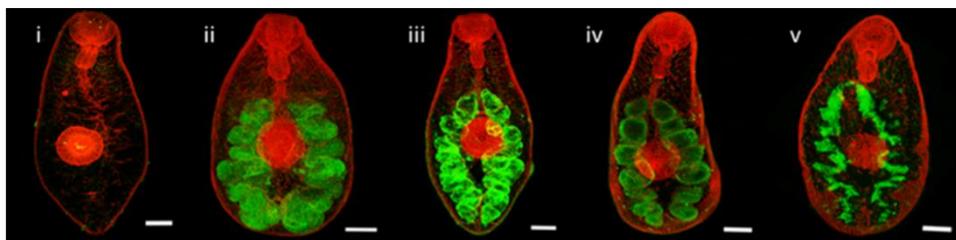


Figura 6.- Distribución de *FhCL3* en JRD. Inmunolocalización de *FhCL3* en el intestino de JRD mediante microscopía laser confocal (fluorescencia verde) a distintos tiempos, barras de escala a 20  $\mu$ m. i- 1 h, ii- 3 h, iii- 6 h., iv- 12h y v- 24h. La tinción roja se corresponde con faloidina que tiñe específicamente el tejido muscular [43].

Estudios bioquímicos y genéticos detallados han permitido elaborar un diagrama de cómo se expresan en forma diferencial estas enzimas. Las primeras caracterizadas son las excretadas por el estadio adulto, al que se puede acceder fácilmente por simple disección de hígados decomisados en las faenas. Se evidenciaron en el PES dos catepsinas L mayoritarias, denominadas catepsina L1 (*FhCL1*) y L2 (*FhCL2*), las que se diferencian fundamentalmente a nivel de especificidad de sustrato y en ciertas propiedades fisicoquímicas [39][80][81].

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, la cual fue clonada posteriormente y recibió el nombre de *FhCL3* [82]–[84]. 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 [39].

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 son representativas del adulto 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% (Figura7) [12][49][85].

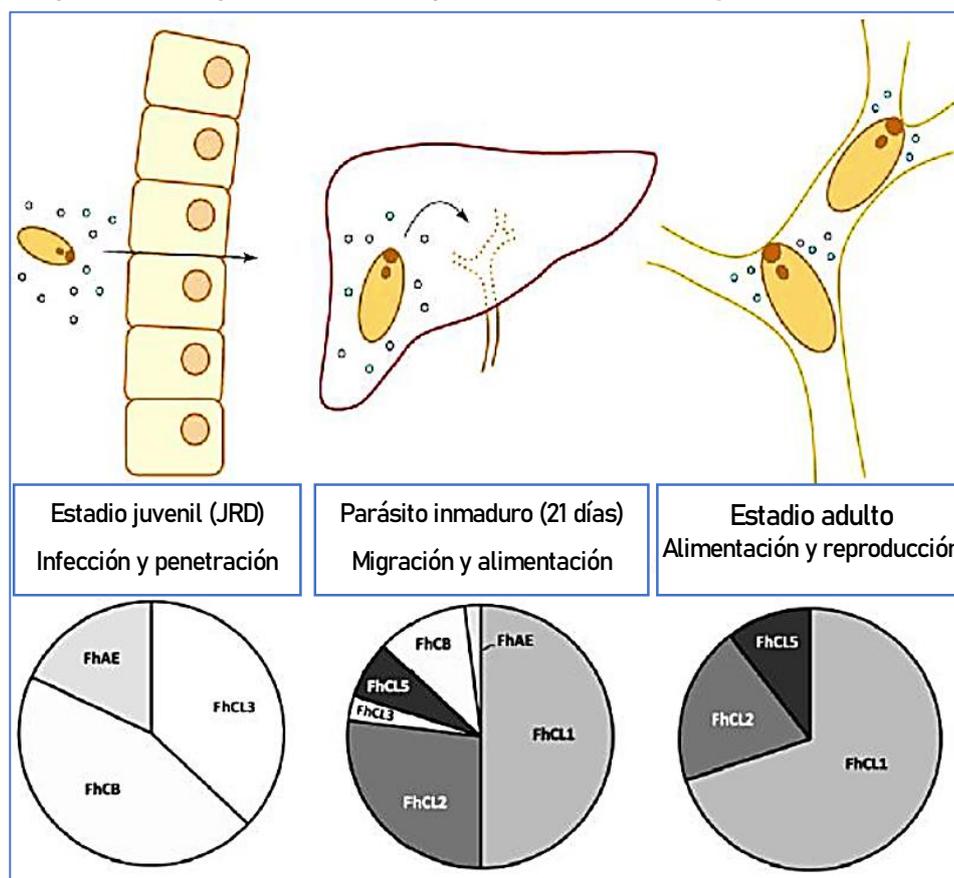


Figura 7.- Expresión de catepsinas en los diferentes estadios de *Fasciola hepatica*. Los gráficos de torta muestran los niveles de expresión de las proteasas determinados por análisis cuantitativo por espectrometría de masas en los diferentes estadios del parásito (adaptado del trabajo de Robinson y colaboradores) [49]. *FhAE*: asparaginil endopeptidasas; *FhCB*: catepsinas B; *FhCL1-5*: catepsinas L1-L5.

Diferentes estudios sugieren que estas enzimas son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de manera exitosa de la infección por *F. hepatica*, y constituyen blancos moleculares interesantes a la hora de combatir esta parasitosis. Empleando catepsinas L nativas o recombinantes de *F. hepatica* se ha demostrado que pueden degradar de manera eficiente una amplia variedad de moléculas de su hospedero, como ya hemos mencionado, participando en la alimentación y migración parasitaria. También se ha descrito que tanto *FhCL1* como *FhCL3* pueden

interaccionar con células dendríticas modulando así el sistema inmune del hospedero para suprimir respuestas pro inflamatorias promoviendo un ambiente adecuado para el establecimiento del parásito [73][86][87]. Algunos estudios de interferencia de ARN donde se bloquea la expresión de catepsinas L en estadios juveniles mostraron una rápida disminución en los niveles del ARNm y una drástica disminución en la motilidad de los JRD y por lo tanto en su capacidad de atravesar la pared del duodeno, proporcionando evidencia empírica del rol clave de esta enzima en la invasión [64]. En estudios posteriores en diferentes cepas de *Fasciola hepatica* se observó que, si bien el silenciamiento a nivel transcripcional se produce rápidamente, la disminución de la cantidad de proteína ocurre recién a los 21 días post-tratamiento y no se evidencian efectos a nivel fenotípico [88]. Se propone que existe una diferencia en la estabilidad de las catepsinas que poseen diferentes cepas, haciendo variar el tiempo necesario para lograr supresión a nivel de proteína. Esta variabilidad destaca la necesidad de una evaluación cuidadosa de la dinámica de supresión antes de realizar e interpretar ensayos fenotípicos.

### 1.2.3 Características estructurales de las catepsinas

Las catepsinas se caracterizan por tener un péptido señal, un propéptido o prodominio y un dominio catalítico que adopta una conformación activa cuando adquiere su madurez catalítica. Los péptidos señal son fundamentales para la translocación al retículo endoplásmico durante la expresión de la proteína 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 falcipaina perteneciente al parásito *Plasmodium falciparum*[89]–[91].

Los prodominios son esenciales para el correcto plegamiento de la pro-enzima, su translocación al compartimento endosomal-lisosomal y la inhibición reversible, siendo esta última fundamental para impedir la activación prematura de la enzima y preservar la integridad celular de los tejidos circundantes [50].

Las formas activas de estas proteasas tienen entre 220 y 260 aminoácidos con una alta conservación tanto en secuencia como en estructura. Poseen un sitio activo con una díada catalítica conformada por una cisteína y una histidina. 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 (cisteína catalítica subrayada). Por otra parte 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. Otro residuo conservado es la asparagina, que se encuentra en un motivo Asn-Ser-Trp.

El plegamiento tridimensional de estas enzimas también se encuentra ampliamente conservado, contando con dos grandes dominios, uno L y otro R de tamaño similar, brindando el contexto estructural óptimo para que el sitio activo se posicione de forma similar en las diferentes catepsinas. El propéptido posee una estructura más variable y suele posicionarse en orientación inversa a través de la hendidura de unión al sustrato (Figura 8).

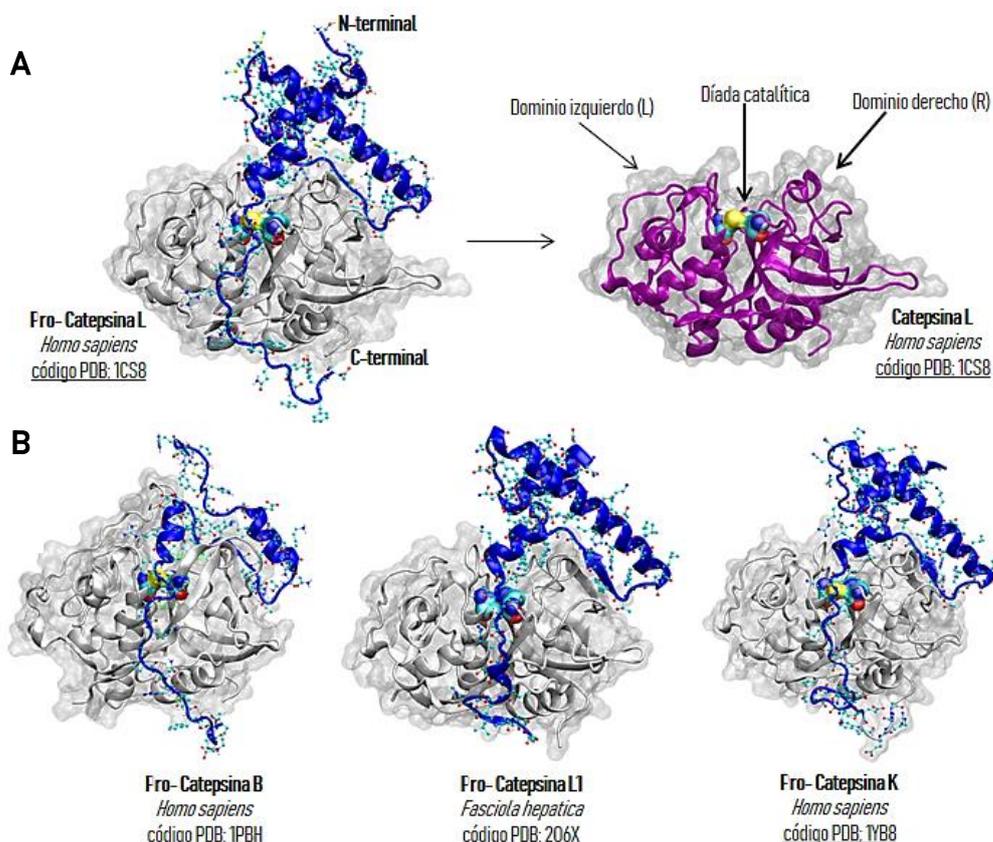


Figura 8.- Estructuras 3D de pro-catepsinas humanas y pro-catepsina L1 de *Fasciola hepatica*. En el panel A se esquematiza la salida del propéptido para la pro-catepsina L resultando en la catepsina L madura. Todas las pro-enzimas poseen el dominio catalítico representado en *New cartoons* y en *Surf* en blanco. El propéptido está representado en *New Cartoons* y *Ball and Sticks* en azul. La diada catalítica está representada en *Surf* y coloreada según átomos. En el panel B con las mismas representaciones se esquematizan pro-catepsinas L con sus propéptidos correspondientes. Códigos PDB Panel A: pro-Catepsina L 1CS8 [92]. Códigos PDB Panel B: pro-Catepsina B 1PBH [93], pro-Catepsina K 1BY8 [94] pro-catepsina L1 206X (única estructura cristalográfica disponible para *F. hepatica*) [81].

En cuanto a los subdominios que forman parte de la proteasa activa, estructuralmente pueden destacarse una hélice  $\alpha$  central ( $\alpha_2$ ) que se extiende verticalmente a través de toda la molécula y dos hélices  $\alpha$  más cortas ( $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ ). Por otra parte el subdominio R contiene una lámina  $\beta$  antiparalela central de cuatro cadenas con una organización similar a la de un barril  $\beta$  (cadenas  $\beta$  1 a 4) y dos hélices  $\alpha$  cortas ( $\alpha_5$  y  $\alpha_6$ ). Ambos subdominios están conectados mediante una hoja  $\beta$  antiparalela de dos cadenas en la parte delantera (cadenas  $\beta$  1 y 2) y el bucle N-terminal en la parte posterior de la molécula que contiene un segmento corto helicoidal  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ) (Figura 9).

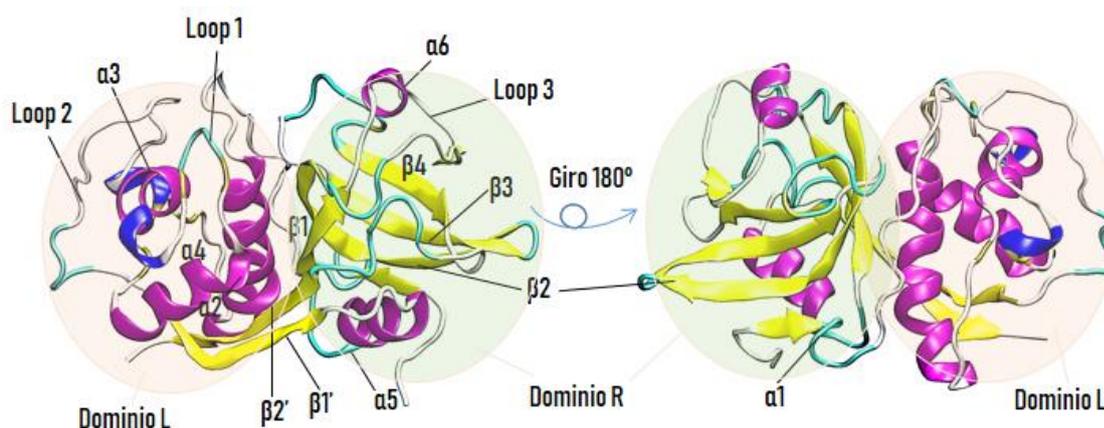


Figura 9.- Características estructurales de catepsinas. En ambos casos se representa a la enzima en su forma activa en *New Cartoons*, coloreadas en función de su estructura secundaria, en donde se distinguen a las  $\alpha$  hélices en rosado y azul, las hojas  $\beta$  en amarillo y los *loops* representados en cian o gris. A la derecha se observa una vista anterior de la proteína mientras que a la izquierda se observa su vista posterior (girada 180°).

Así como la secuencia del sitio activo se encuentra muy conservada en esta familia de enzimas, su mecanismo catalítico también. La hidrólisis del sustrato se lleva a cabo por la díada catalítica habitualmente asistida por un tercer aminoácido que puede variar en algunas catepsinas (principalmente en las de algunos tripanosomátidos [50]), pero que en general está altamente conservado. Las catepsinas presentan varios sub-sitios adyacentes al sitio activo, que son más variables y tienen un rol fundamental a la hora de posicionar el sustrato para favorecer la ruptura catalítica del enlace peptídico. La capacidad catalítica de estas proteasas se ve influenciada por las características fisicoquímicas y estructurales de los residuos que componen estos sub-sitios mediante interacciones no covalentes con el ligando, marcando en gran medida la especificidad de sustrato [80]. Los sub-sitios se denominan  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ... $S_n$  y así sucesivamente a los que interaccionan con la parte *N*-terminal del sustrato, mientras que aquellos que posicionan la parte *C*-terminal, se llaman  $S'_1$ ,  $S'_2$ ,  $S'_3$ ... $S'_n$ . En contraparte, a los residuos del sustrato se les

denomina como  $P_1, P_2, P_3 \dots P_n$  y  $P'_1, P'_2, P'_3 \dots P'_n$  para los residuos N y C-terminal, respectivamente (Figura 10).

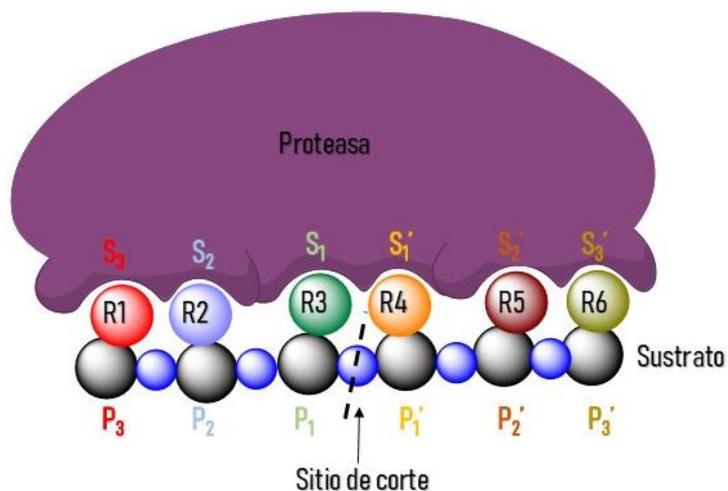


Figura 10.- Esquema en el que se muestran los sub-sitios de una proteasa y su interacción con los residuos correspondientes del sustrato.

El mecanismo catalítico no está completamente elucidado. Está establecida la necesidad de una transferencia protónica desde el tiol de la cisteína catalítica a la histidina (previamente posicionada gracias al residuo de asparagina) formando un par iónico, tiolato-imidazol, que es estabilizado por un enlace de hidrógeno (EdH) con glutamina. Una vez que se logra la transferencia, el tiolato de la cisteína actúa como nucleófilo atacando al carbono del carbonilo correspondiente al enlace peptídico, formando un intermediario tetraédrico que se estabiliza por la presencia de un bolsillo oxianiónico formado principalmente por el triptófano 177 y la glutamina 19 [82][94][175]. El mismo favorece la posterior formación de un tioéster 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 (Figura 11). 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.

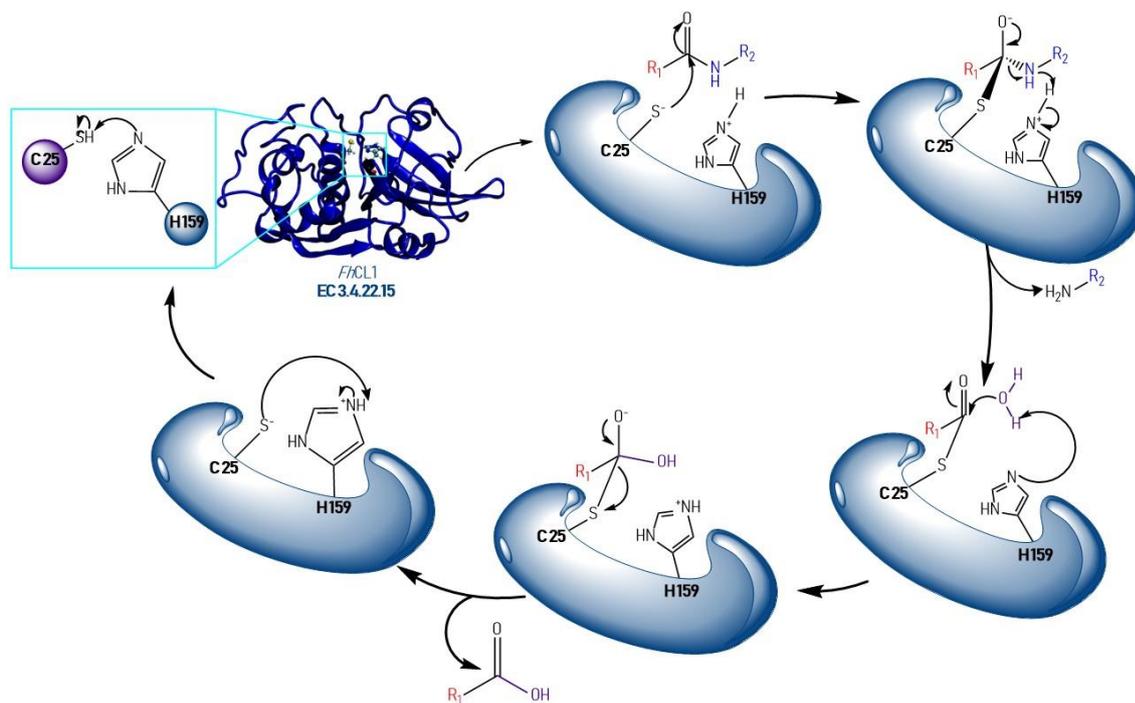


Figura 11.- Esquema del mecanismo catalítico propuesto hasta el momento para las cisteína proteasas [82].

### 1.2.4 Características estructurales de *FhCL1* y *FhCL3*

En la actualidad existen cerca de 274 estructuras de catepsinas reportadas en el *Protein Data Bank (PDB)*, de ellas un 76% se corresponden con catepsinas de *Homo sapiens*, un 4% a *Bos taurus* y el restante 20% a catepsinas de otras especies entre las que se destacan *Trypanosoma brucei*, *Mus musculus* y *Schistosoma mansoni*.

Entre las primeras cristalizadas se encuentra la papaína, la cual se publicó su estructura en 1984 con una resolución de 1.65 Å (código PDB: 9PAP), una verdadera hazaña para la época [95]. Las siguientes fueron dos catepsinas humanas, catepsina D en 1994 y catepsina B en 1995. Luego a lo largo de toda la década del 90 se obtuvieron sólo 28 estructuras de las 274 totales. El pico máximo de obtención de estructuras cristalográficas se ubica entre los años 2005 y 2015 con 146 estructuras resueltas, tendencia que se mantuvo en alza desde entonces sumándose 73 estructuras en los últimos tres años. En el caso de *Fasciola hepatica* sólo una de las proteasas secretadas por el estadio adulto fue cristalizada en forma de zimógeno en 2008, durante este período de prosperidad cristalográfica (Código PDB; 206X) [81].

Este auge en cristalografía trajo consigo la posibilidad de realizar un estudio más detallado de estas enzimas, para tratar de comprender las determinantes estructurales

responsables de la especificidad de sustrato. Varias enzimas han sido cristalizadas con inhibidores en sus sitios activos o con sus propios sustratos. Esto ha posibilitado delimitar con claridad los sub-sitios encargados de posicionar el sustrato para la catálisis así como confirmar la forma extendida que adoptan los residuos P de los sustratos al interactuar con los residuos S de enzima [81][96] [97].

Se ha demostrado que el sub-sitio S2 presenta una mayor superposición con los inhibidores análogos de sustratos en los complejos enzima-inhibidor por lo que se presume que está mayoritariamente implicado en la especificidad de sustrato de las catepsinas, siendo el que se encuentra mejor caracterizado. 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 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 68, alanina 133, asparagina 158, alanina 160 y leucina 205 que se encuentra en el fondo del bolsillo (numeración de aminoácidos corresponde a la papaína código PDB: 9pap). Observando la constitución de este sub-sitio y la similitud entre catepsinas de diferentes especies se visualizan algunas variaciones, que podrían ser determinantes en la especificidad de estas enzimas. Las mutaciones recíprocas del sub-sitio S2 de las catepsinas K (Y67L / L205A) y L (L67Y / A205L) intercambian su especificidad enzimática hacia pequeños inhibidores selectivos y sustratos, confirmando la función clave de estos residuos. Sin embargo, la catepsina L con estas mutaciones en el sub-sitio S2, pero sin modificar los sitios de unión a condroitín sulfato no posee actividad colagenasa tipo K, lo que hace referencia al papel fundamental de la formación de complejos entre glicosaminoglicanos y catepsina K para lograr su actividad colagenolítica [98]. En el caso de las catepsinas de *Fasciola hepatica* se han realizado estudios similares generando mutantes en el sub-sitio S2 de *FhCL1* intentando alcanzar un comportamiento catalítico similar a *FhCL2*. Las sustituciones no produjeron el incremento esperado en la afinidad por prolina en P2. Más bien, disminuyeron la eficacia catalítica de la enzima hacia los péptidos sintéticos. No obstante, un cambio en la especificidad de P3 se asoció con la mutación de leucina 67 a tirosina, un residuo que funcionaría como articulador entre los sub-sitios S2 y S3 que contribuye a posicionar Gly en S3. Asimismo, las simulaciones moleculares mostraron cambios sutiles en la distribución espacial de los sub-sitios, con una tendencia al estrechamiento de la hendidura catalítica, lo que podría implicar una dificultad para que la enzima posicione al sustrato [80]. Al mismo tiempo cambios estructurales fuera de los sub-sitios de interacción con el sustrato en

los diferentes mutantes podrían ser indicios de que otras regiones de la enzima juegan un rol en la catálisis.

Por otra parte, se reconocen en estas enzimas dos sub-sitios más pequeños en extensión: S1 y S3. En el primero se ubican los aminoácidos que pertenecen a la diada catalítica cisteína 25 e histidina 159, mientras que en el segundo se hallan tres glicinas conservadas, 64, 65 y 66 así como asparaginas en las posiciones 60 y 61.[96]

En base al conocimiento cristalográfico de *FhCL1* y de la secuencia aminoacídica de *FhCL3*, fue posible desarrollar un modelo molecular, que fue refinado mediante dinámica molecular, 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 205, lo que estaría modificando el fondo del sub-sitio S2. La asparagina 158, 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 en la posición 67, dónde *FhCL1* posee una leucina y *FhCL3* un triptófano. Residuos aromáticos voluminosos como el triptófano, confieren restricciones estéricas para alojar el sustrato, al mismo tiempo que ofrecen la posibilidad de interactuar con compuestos aromáticos (Figura 12) [96].

Entre las diferencias a nivel del sub-sitio S3, se destaca el residuo 61 el cual cambia de asparagina en *FhCL1* a histidina en *FhCL3*, lo que favorece que en *FhCL3* este sub-sitio tenga cierta preferencia por sustratos con cadenas laterales con grupos químicos poco voluminosos.

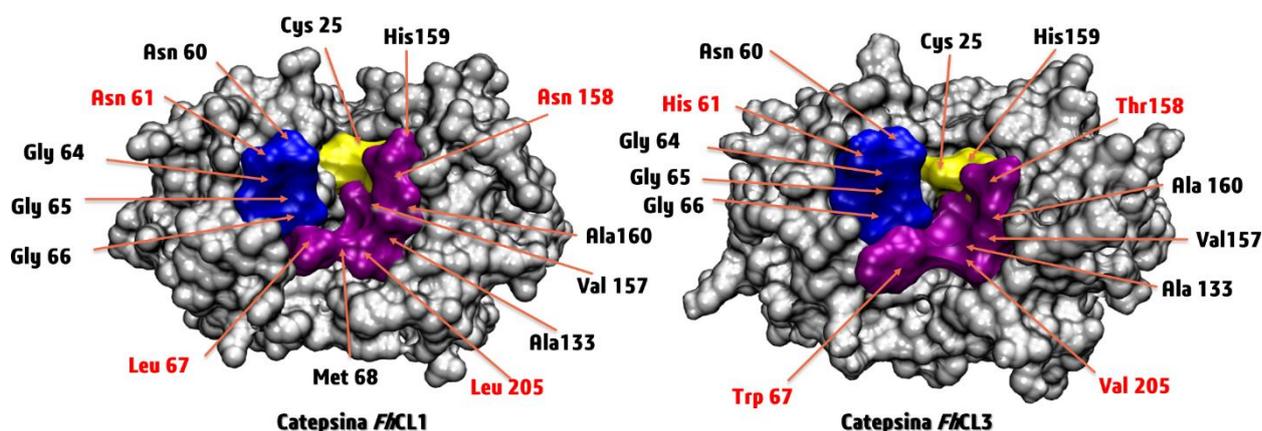


Figura 12.- Representación de los sub-sitios que forman parte del sitio activo, correspondientes a las catepsinas de *Fasciola hepatica*, A la izquierda *FhCL1*, a la derecha *FhCL3*, ambas con representación *Surf*. Se colorea S1 en amarillo, S2 en magenta y S3 en azul. En etiquetas rojas se destacan los residuos variables entre ambas enzimas. Numeración de papáina código PDB: 9PAP.

Además de diferencias estructurales claramente visibles a nivel de secuencia y de los modelos generados, algo a considerar son las diferentes modificaciones postraduccionales que pueden sufrir estas proteasas. *FhCL3* secretada por juveniles presenta un sitio de glicosilación conocido en la asparagina 151 [34] que está ausente en *FhCL1*. Hasta el momento los efectos de la glicosilación en la actividad catalítica no han sido explorados concretamente en estas enzimas, pero se presume que no sean de gran relevancia.

### 1.3. Inhibidores de Catepsinas como estrategia para el tratamiento de diversas patologías

Las cisteína proteasas constituyen blancos moleculares validados para el tratamiento de diferentes patologías como osteoporosis, cáncer, Alzheimer, obesidad, enfermedades autoinmunes y del sistema circulatorio [40][99][100]. Múltiples cisteína proteasas, entre las que se distinguen caspasas [72][101][102], calpaínas [103] y catepsinas [104] son dianas factibles de bloquear a la hora de frenar los avances de estas patologías. Al mismo tiempo se han identificado varios factores de virulencia como blancos para el control parasitario, entre los que se destacan a las cisteína proteasas, que poseen un rol esencial para el desarrollo de protozoarios como *Trypanosoma cruzi* [105][106][107] y *Plasmodium falciparum* [88][108] así como de varios helmintos [109] lo que motivó que se utilizaran como blancos en pos de desarrollar tanto quimioterapias como herramientas para su inmunodiagnóstico. Particularmente en *F. hepatica* la inhibición de las catepsinas L secretadas por juveniles afectaría la capacidad de invasión y migración del parásito desde el tubo digestivo hacia el hígado, al tiempo que el bloqueo de las enzimas en el estadio adulto limitaría su capacidad de evadir la respuesta inmune y alimentarse.

En el marco de mi trabajo final de grado, se realizó una revisión bibliográfica para la identificación de patrones estructurales con actividad inhibitoria sobre los blancos moleculares propuestos. Se encontraron varios agrupamientos farmacofóricos reportados como inhibidores de cisteína proteasas [110].

Con el aislamiento de las cistatinas de *Aspergillus*, primeras proteínas endógenas que se describieron como inhibidores específicos de las catepsinas a principios de la década de los 80,

se inicia la búsqueda de inhibidores proteicos que permitieran modular selectivamente la actividad de estas enzimas.

Las diferencias en la especificidad y selectividad entre las diferentes catepsinas, se han empleado en la búsqueda y diseño de inhibidores selectivos. La estrategia más utilizada involucra el diseño de moléculas que posean un centro preferencial de ataque nucleofílico para la cisteína de la díada catalítica rodeado de grupos químicos que sean capaces de establecer interacciones moleculares débiles y enlaces de hidrógeno con los sub-sitios circundantes, que posicionen la molécula para favorecer la inhibición. Actualmente se han descrito distintos tipos de inhibidores, entre los que se destacan como irreversibles al ácido epoxisuccínico, betalactamas, vinilsulfonas y derivados de acilhidrazona. Por otra parte los inhibidores reversibles incluyen derivados alifáticos, cetonas, aldehídos y nitrilos [111].

A continuación se realiza una breve revisión de los principales agrupamientos químicos descritos como inhibidores de catepsinas.

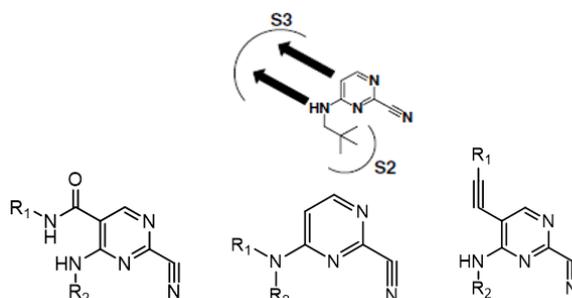
### 1.3.1 Hidroxietilaminas, sulfonas y derivados

Se han asociado diversas proteasas como mediadoras del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, entre las que se destacan la  *$\beta$ -siteAPP-cleaving enzyme* (BACE1),  $\beta$ -secretasa[112] y catepsinas S, L y B [113][114]. Entre los inhibidores selectivos para catepsina B, desarrollados para el tratamiento de esta enfermedad, encontramos productos sintéticos como las ciclohidroxietilaminas y vinil sulfonas, así como derivados con etilaminas y trietilfosfinas[113][115]. Si bien la mayoría de los inhibidores se han generado a partir de series previamente diseñadas para inhibir catepsina L, estos no han tenido el resultado esperado y es en parte porque dicha catepsina no posee residuos voluminosos o aromáticos en los sub-sitios por lo que en general la misma tiende a interactuar mejor con inhibidores más flexibles que los que puede aceptar la catepsina B.

### 1.3.2 Nitrilos, Aminocianopirimidinas y derivados

Las aminocianopirimidinas se encontraron principalmente entre los inhibidores empleados de forma selectiva para catepsina K, un blanco molecular ampliamente caracterizado para el tratamiento de la osteoporosis, ya que su expresión y actividad se ha visto incrementada a nivel lisosomal en osteoclastos de pacientes con esta patología[56][116]. Este hecho se condice con la capacidad de esta enzima de degradar dos de los principales componentes de la matriz

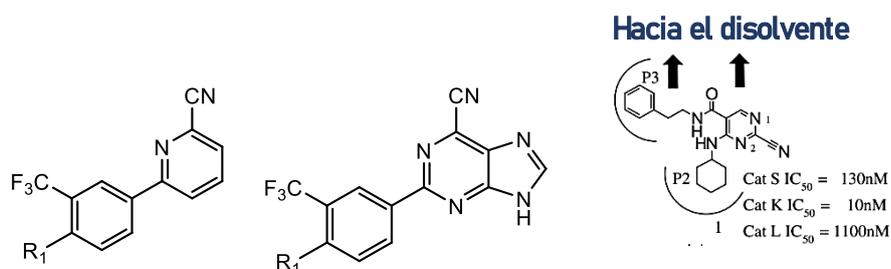
ósea (colágeno tipo I y II) [55]. Se destacan como inhibidores ciano-aminopirimidinas [117][118][119], moléculas que han mostrado cierta interacción diferencial con los sub-sitios de la enzima, fundamentalmente a nivel de S2, lo que podría explicar su selectividad inhibitoria con respecto a otras catepsinas como S y L [120] (Figura 13).



**Figura 13.- Estructuras genéricas de los principales inhibidores selectivos de catepsina K.** Arriba un esquema que representa la forma de interacción con los sub-sitios S2 y S3 de las catepsinas. Abajo agrupamientos típicos de esta familia de inhibidores, con los sitios en donde se ubican algunos sustituyentes descritos.

Uno de los inhibidores que llegó a la fase de desarrollo clínico es el odanacatib, un potente inhibidor de catepsina K que mostró gran eficacia, con una mayor actividad de resorción ósea y selectividad en comparación con otros inhibidores de esta proteasa. No obstante los efectos adversos observados en tratamientos a largo plazo en estudios de fase clínica II impidieron la continuación de su desarrollo clínico.

Los inhibidores de catepsinas cobran relevancia también en patologías autoinmunes como la artritis reumatoidea y la esclerosis múltiple. En ambas, la sobreexpresión de catepsina S a nivel de las células presentadoras de antígeno, altera el nivel de clivado de los péptidos que posteriormente son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad. Se han encontrado inhibidores selectivos para esta proteasa, en cuya estructura presentan purinas y pirimidinas sustituidas por carbonitrilos y fenilos (Figura 14). El sistema arilnitrilo se ha descrito como susceptible de ataque nucleofílico por el tiol reactivo del sitio activo de las catepsinas,



**Figura 14.- Estructuras derivadas de cianopirimidinas.** De izquierda a derecha: 6-fenil-piridina-2-carbonitrilo, 2-fenil-9H-purina-6-carbonitrilo y 2-cianopirimidina mostrando su  $IC_{50}$  para distintas catepsinas [117][119].

### 1.3.3 Flavonoides y derivados

La gran versatilidad farmacológica de esta familia química le otorga múltiples propiedades: antioxidantes, antiproliferativas, anti-cancerígenas, anti-inflamatorias y antibacterianas. Por otra parte, tanto sus amplios 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 diversas patologías.

Entre los primeros hallazgos de flavonoides como inhibidores de estas proteasas se encuentran estudios de finales de la década de los noventa, en los que evalúan diversos flavonoides naturales en extractos de músculo humano, obteniendo la inhibición de catepsinas B, L y S, destacándose varias flavonas y glucósidos de flavonoides (Figura 15 A) [121].

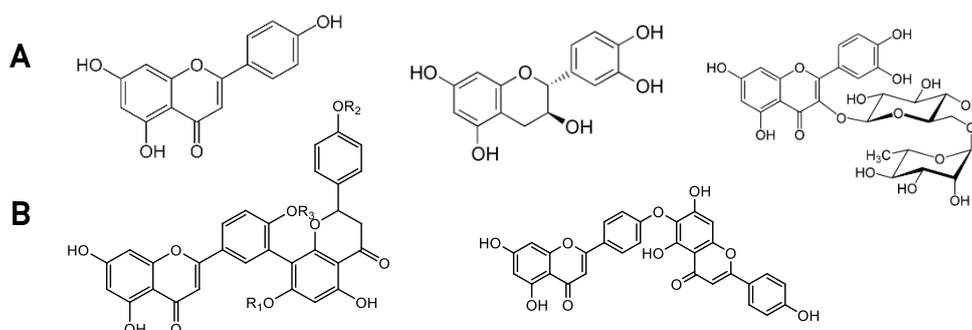


Figura 15.- Flavonoides sintéticos y naturales como inhibidores de catepsinas. **A:** Estructuras de flavonoides naturales evaluadas en extractos de músculo humano, como inhibidores de catepsinas B, L y S: apigenina, catequina y rutina. **B:** Estructuras de biflavonas obtenidas de extractos vegetales.

Las biflavonas obtenidas de extractos de *Taxodium mucronatum* y *Cycas guizhouensis*, se han destacado como inhibidores de la catepsina K, y los compuestos sintéticos panduratin A y nicolaoidesin C, han mostrado inhibición de catepsinas *in vitro* así como actividad citotóxica en células de cáncer de próstata (Figura 15 B)[122] [123].

Se han desarrollado varios flavonoides sintéticos con actividad antitumoral en líneas celulares como inhibidores de catepsinas B, L y K que son sobre expresadas a nivel lisosomal en células malignas, teniendo un rol importante en el proceso de progresión tumoral e invasión de tejidos en el cáncer de páncreas, de mama y de próstata (Figura 16) [123]–[126].

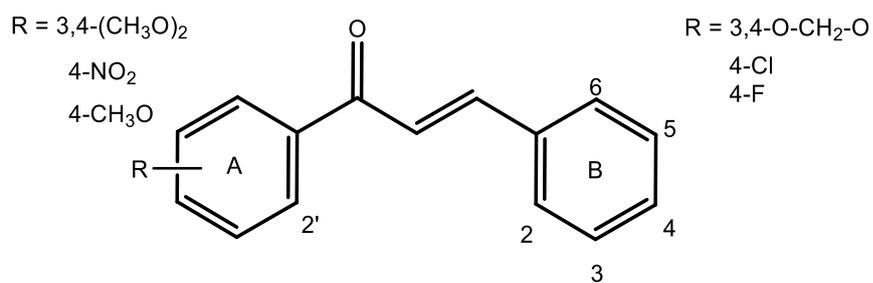


Figura 16. Chalconas evaluadas como antitumorales con actividad inhibitoria de catepsina K. Se indica la numeración de los anillos A y B de las chalconas y estructuras descritas como inhibidores de catepsina K (revisado en [126]).

## 2. Antecedentes propios y definición de la estrategia experimental

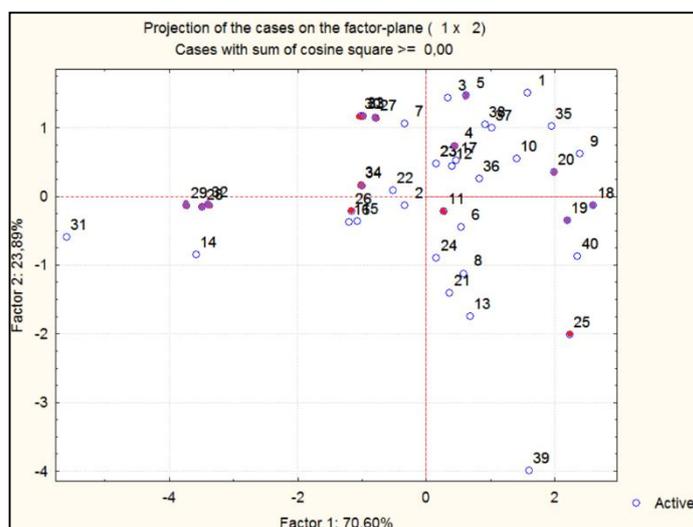
Como parte del trabajo de mi tesina de grado [110] exploramos la capacidad inhibitoria de una serie de flavonoides sintéticos sobre las catepsinas de *Fasciola hepatica*, *FhCL1* y *FhCL3*. Se evaluaron 40 flavonoides, de los cuales una sub-familia de flavonoides de aromaticidad extendida en sus anillos A y B fueron los que ofrecieron mayor inhibición, con un candidato que mostró actividad fasciolicida *in vitro* en parásitos juveniles [127]. Esto motivó la solicitud de una patente nacional que incluye a toda la familia de compuestos [128] y la continuidad del trabajo en esta tesis de maestría.

Como estrategia inicial para obtener nuevos compuestos que sean capaces de inhibir estas enzimas esenciales para *Fasciola hepatica* y buscando optimizar la relación estructura-actividad, se planteó un enfoque orientado a encontrar mediante un análisis de componentes principales (ACP) aquellos patrones estructurales determinantes de la inhibición en la familia de flavonoides previamente evaluados [127][110][129][130]. Se utilizaron descriptores obtenidos teóricamente a partir de las estructuras de los 40 flavonoides (ver Anexo ACP, Tabla 1), optimizadas geométricamente a nivel cuántico DFT (*Density Functional Theory*). Los descriptores calculados se pueden clasificar como de reactividad globales, entre los que se incluyen: el potencial de ionización (IP), afinidad electrónica (EA), electronegatividad ( $\chi$ ), dureza ( $\eta$ ), electrofilia ( $\omega$ ), blandura global (S), momento dipolar (D) y polarizabilidad (Pol); y en otros que no están estrechamente asociados a la reactividad, en donde se incluye: área (A), área topológica polar accesible al solvente (TPSA), volumen (V), LogP (obtenido teóricamente a partir de las estructuras), peso molecular (MW) y las cargas para los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado presente en todos los compuestos.

Con ellos se construyó una matriz en la que se indicó para cada compuesto el valor normalizado obtenido para cada descriptor (ver Anexo ACP, Tabla 1) y se procedió a realizar análisis de componentes principales (ACP) en el programa STATISTICA® [131], utilizando inicialmente todos los descriptores y compuestos. Dado que no se observaron correlaciones, se repitió el análisis variando la matriz de entrada incluyendo solo algunos de los descriptores, pero no se logró obtener una correlación entre los mismos y la inhibición observada en los blancos moleculares (Figura 17). No obstante, en base a un análisis cualitativo de las estructuras, es posible sugerir la importancia para la actividad inhibitoria del volumen que ocupan en el espacio

los sustituyentes de los compuestos que mostraron mayor inhibición, así como la presencia del sistema  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado como conector de sustituyentes hidrofóbicos.

A



Variable	Factor coordinates of the variables, based on correlations (Spreadsheet3)							
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8
IP	0.865485	-0.463482	-0.063790	-0.075620	0.040535	0.157038	-0.005328	0.000291
EA	-0.799789	0.362996	-0.226731	-0.402899	0.029731	-0.118032	-0.004732	0.000210
$\mu$	0.029929	-0.295907	0.625106	-0.407543	-0.588344	-0.092086	0.007925	-0.001553
$\gamma$	0.324558	-0.274848	-0.465933	-0.759856	0.119159	0.100797	-0.016938	0.000850
S	0.872184	-0.435589	0.073426	0.151695	0.008461	0.145197	-0.000715	0.000063
$\omega$	0.739044	-0.345717	-0.240831	0.059570	0.068807	-0.517510	0.013897	0.000691
Vol.	-0.762604	-0.633124	-0.044528	0.055528	0.082299	0.006510	0.039844	-0.064190
Área	-0.769397	-0.616793	-0.037627	0.031358	0.074881	0.027023	0.129470	0.045775
Pol.	-0.748128	-0.626021	-0.033834	0.130380	-0.005841	-0.032011	-0.169751	0.019615
TPSA	0.042348	-0.018738	0.758222	-0.242918	0.599902	-0.062364	-0.013132	0.001481

B

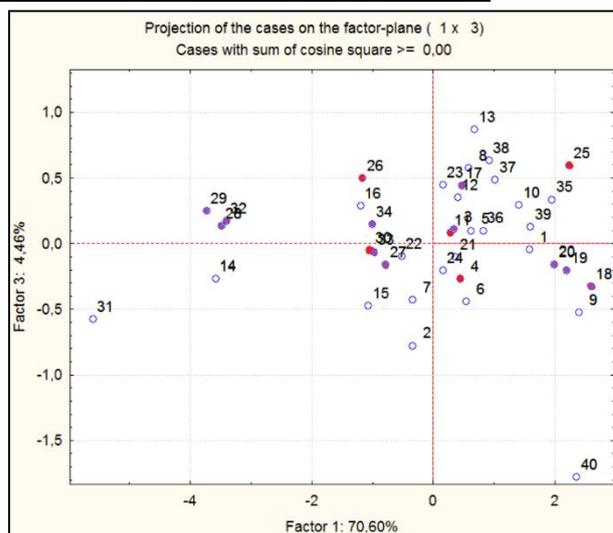
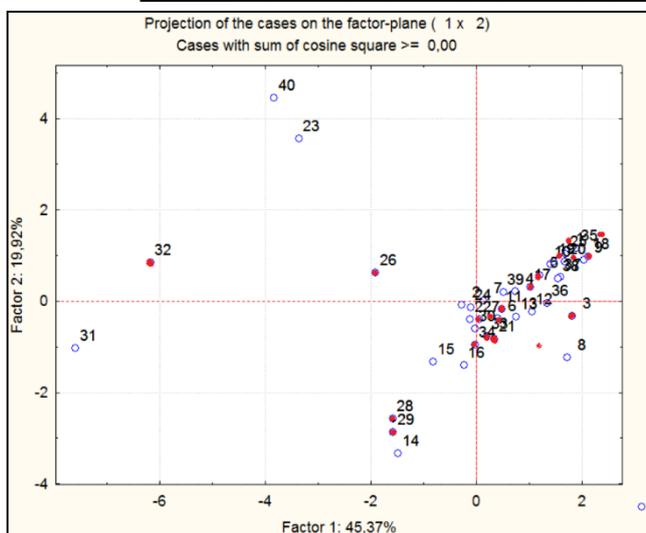
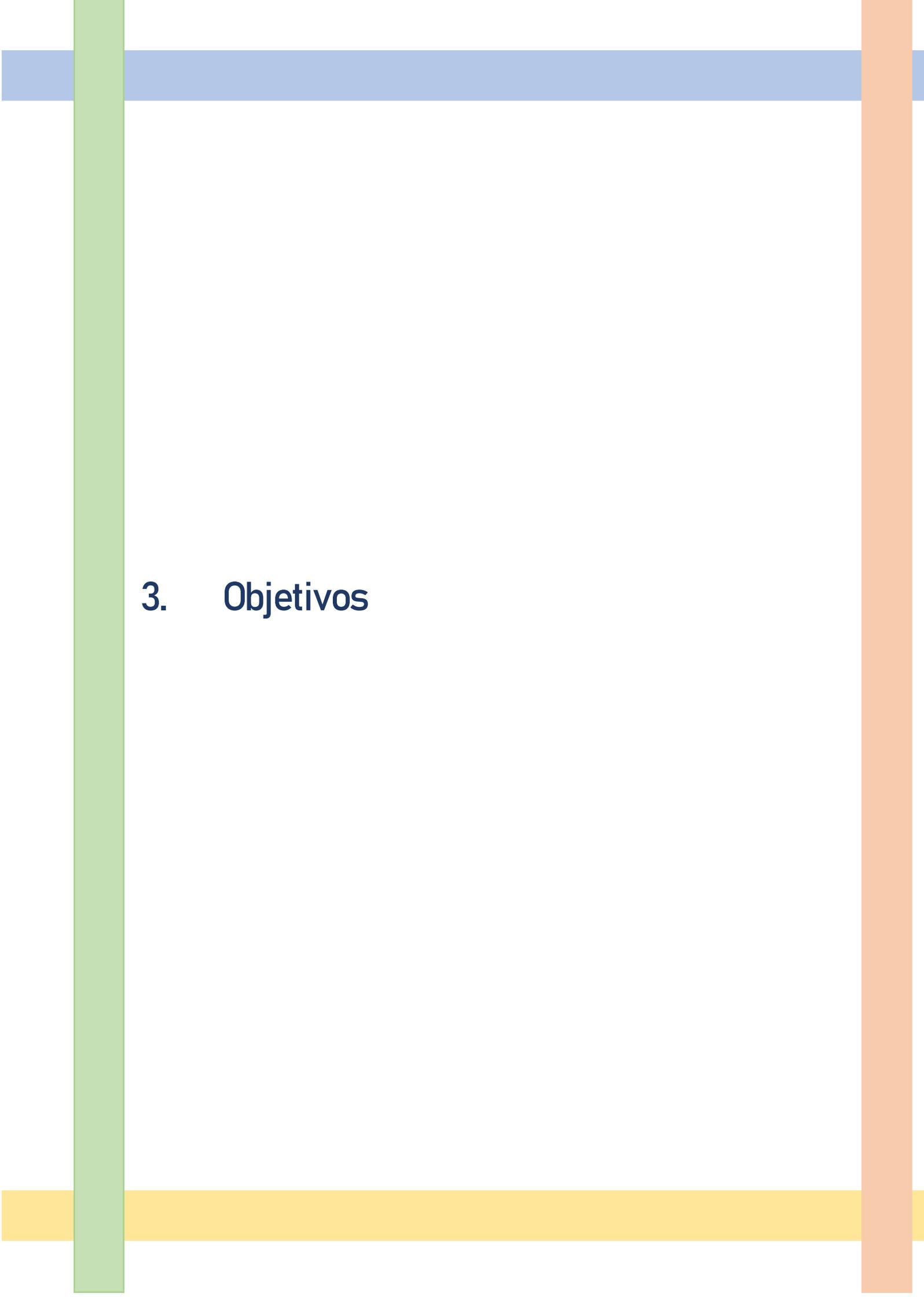


Figura 17.- Resultados obtenidos para el ACP realizado con los flavonoides. A) En rojo y violeta se representan los compuestos con porcentajes de inhibición de ambas enzimas mayor a 40% y 50%, respectivamente. B) Análisis con un menor número de descriptores, IP-EA-Vol-A-LogP. A la izquierda se observa la proyección correspondiente al considerar el Factor 1 y 2, en donde no se obtuvo una separación clara entre los mejores inhibidores. A la derecha se realizó otra proyección entre el Factor 1 y el 3, en donde se ve una distribución diferente pero que no discrimina entre los compuestos activos e inactivos.

Además de las chalconas, en el *screening* realizado en mi tesina de grado encontramos compuestos de tipo 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalinas con un buen porcentaje de inhibición (mayor al 66%). Los 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina son una familia química que ha sido estudiada anteriormente en el marco de otras enfermedades olvidadas como es el caso de la malaria, tuberculosis [132], mal de Chagas [106] y leishmaniasis [133] en la búsqueda de nuevos tratamientos. Estas moléculas también se han destacado por presentar actividad antibiótica, anti-fúngica y anti-neoplásicas [134][135]. El amplio espectro de actividades se debe fundamentalmente a la gran versatilidad del núcleo 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, el cual permite generar diferentes derivados. Este grupo se conforma por la fusión de dos anillos aromáticos, benceno y pirazina, por lo que comúnmente es llamado benzopirazina y se describe como un bioisómero de la quinolina, naftaleno y benzotiofeno. La mayoría de los derivados de quinoxalina son sintéticos y aquellos naturales son poco comunes, como echinomicina y triostina-A [133]. En el último tiempo se han empleado metodologías de química verde tanto para su síntesis como la de sus derivados, incluyéndose catalizadores reciclables, síntesis asistida por microondas y reacciones en agua [132][134], características deseables para el desarrollo de fármacos sintéticos. En esta tesis se abordó el estudio de estas moléculas que no han sido exploradas previamente como inhibidores de catepsinas.

En paralelo, surgió una colaboración con el grupo de la Dra. Silvia Pérez Silanes de la Universidad de Navarra, España [136][132], que gentilmente nos cedió compuestos que reúnen las características de ambos grupos, en una misma estructura. Por un lado poseen el centro  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado como conector entre dos regiones aromáticas que en este caso hacen que el anillo A tenga en lugar de un fenilo sustituido, una 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina. Nos planteamos entonces el estudio de ambas familias de compuestos con el objetivo de encontrar nuevos inhibidores de las catepsinas de *F. hepatica* como potenciales fármacos antihelmínticos.



### 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Búsqueda y caracterización biológica de nuevos inhibidores de *FhCL1* y *FhCL3* como potenciales fármacos fasciolicidas.

### 3.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar una serie de compuestos de la familia de 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina como inhibidores de las enzimas *FhCL1* y *FhCL3*.
- II. Evaluar una serie de compuestos híbridos flavonoides-quinoxalinas como inhibidores de *FhCL1* y *FhCL3*,
- III. Caracterizar mediante estrategias experimentales y computacionales la inhibición de los mejores compuestos, Determinar la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ), estudiar cinética de unión, reversibilidad y selectividad utilizando catepsina L humana,
- IV. Estudiar la citotoxicidad *in vitro* en diferentes modelos celulares de los compuestos que ofrezcan mejor porcentaje de inhibición.
- V. Estudiar la actividad fasciolicida de los compuestos con mayor porcentaje de inhibición.
- VI. Evaluar distintas condiciones para la cristalización de *FhCL3* en complejo con un inhibidor.

## 4. Materiales y métodos

#### 4.1. Producción recombinante de *FhCL1* y *FhCL3* en la levadura *Hansenula polymorpha*.

Las enzimas recombinantes *FhCL1* y *FhCL3* se expresaron en la levadura *Hansenula polymorpha* como está descrito anteriormente [39][137]. Las levaduras transformadas se cultivaron en 500 mL de medio YEPD (1% de glucosa, 1% de triptona, 1% de extracto de levadura) a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 2 - 6, Se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos y se indujeron resuspendiendo las células en 50 mL de medio mínimo (YNB al 0,67 %, *buffer* fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0; metanol al 1%) durante 36 horas a 30 °C y 220 rpm. En este sistema las pro-peptidasas recombinantes se secretan al medio de cultivo y se recuperan concentrando de 20 a 30 veces el sobrenadante de cultivo mediante ultrafiltración con una membrana de corte de 10 kDa, no observándose mediante SDS-PAGE otras proteínas secretadas. Las pro-enzimas se activaron autocatalíticamente a la forma madura mediante incubación durante 2 horas a 37 °C en tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 5,0) con DTT 2 mM y EDTA 2,5 mM, se dializaron con PBS pH 7,3 y se almacenaron en alícuotas a -20 °C hasta su uso. La concentración de enzima activa se determinó en cada producción por titulación mediante el empleo de un inhibidor de la cisteína proteasa E-64c.

#### 4.2 *Screening* de compuestos en *FhCL1* y *FhCL3*

Cada compuesto se disolvió completamente en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración *stock* de 10 mM a partir del cual se preparan las diluciones a ensayar. Para evaluar la inhibición se incubaron *FhCL1* o *FhCL3* a concentraciones nanomolares con los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (**C1-C28**) y los derivados híbridos de flavonoides y 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina/quinolina (**H1-H25**), a 10  $\mu$ M. Cada enzima y compuesto se preincubaron 20 minutos en una placa de 96 pocillos en *buffer* fosfato de sodio 0,1 M, pH 6, DTT 1 mM y EDTA 1 mM a temperatura ambiente. La reacción se inició con la adición de 20  $\mu$ M de sustrato y la velocidad inicial se siguió midiendo el aumento de la fluorescencia de AMC a medida que los sustratos peptídicos son hidrolizados (Z-VLK-AMC para *FhCL1* y Tos-GPR-AMC para *FhCL3*), a una longitud de onda de excitación de 340 nm y emisión de 440 nm usando un espectrofluorímetro (Varioskan, Thermo) con un volumen final de ensayo de 100  $\mu$ L. La actividad de la enzima se expresó como URF / s (unidades relativas de fluorescencia de AMC por segundo). Cada compuesto se ensayó por triplicado. Se incluyó control sin enzima para verificar la ausencia de reacción entre sustratos e inhibidores, y se realizó un espectro de 300 a 450 nm para cada derivado ensayado para

verificar que ningún compuesto absorbe en el rango de medida. El porcentaje de inhibición de la enzima se calculó como:  $100 - (v_i / v_o) \times 100$ , donde  $v_i$  y  $v_o$  corresponden a las pendientes del gráfico de URF vs tiempo (s) para cada una de las condiciones ( $v_i$ ) y para el control ( $v_o$ ).

### 4.3 Caracterización de los mejores inhibidores.

#### 4.3.1. IC<sub>50</sub>, dependencia temporal de la inhibición y ensayos con *HsCL*

Para calcular los valores de IC<sub>50</sub>, los compuestos se incubaron con cada enzima a las siguientes concentraciones: 0, 0.13, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 50 μM o 100 μM dependiendo de la solubilidad de los compuestos. Luego, se llevó a cabo la medición de la actividad enzimática en placa de 96 pocillos como se describió anteriormente en el *screening* (4.2). Se graficaron los porcentajes de actividad remanente (calculados relativo al control) en función del logaritmo en base 10 de la concentración del inhibidor. Se obtuvo el valor de IC<sub>50</sub> ajustando los datos a una curva sigmoide mediante el uso de *GraphPad 5 Prism* dentro del módulo de ajustes no lineales diseñado para respuesta en función del logaritmo de la concentración del inhibidor.

Además, se realizaron ensayos de *slow-binding* para evaluar la dependencia entre el tiempo de incubación y la inhibición alcanzada. Cada compuesto se incubó a 10 μM con la enzima a diferentes tiempos: 3, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. El porcentaje de inhibición en cada punto se calculó como se describió anteriormente. Para evaluar reversibilidad se empleó el ensayo de dilución rápida [138]. Se coloca la enzima 100x respecto a la concentración del *screening* y el inhibidor a una concentración de 10x su IC<sub>50</sub>. Se incuban durante 15 minutos y luego se diluye la mezcla 100 veces con el agregado del sustrato peptídico fluorogénico para llevar la enzima a la concentración empleada para medir actividad. Se mide la actividad remanente de la enzima a velocidades iniciales y se analiza la curva obtenida para cada inhibidor, determinándose si se comporta como inhibidor irreversible, reversible lento o reversible rápido comparando con un control de enzima sin inhibidor.

Con el fin de determinar la selectividad de los inhibidores, se determinó el porcentaje de inhibición de los mejores compuestos a 10 μM sobre *HsCL*. La enzima se preincubó durante 20 minutos con los compuestos y la actividad se determinó en placa de 96 pocillos en acetato de sodio 400 mM, pH 5,5, EDTA 4 mM, DTT 8 mM y 20 μM de sustrato Z-FR-AMC. El porcentaje de inhibición de la enzima se calculó como se describió para *FhCL1* y *FhCL3*. Se determinó el valor de IC<sub>50</sub> para **C17** y *HsCL* incubando la enzima con 4 concentraciones diferentes de compuesto: 0,

10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  y midiendo la actividad como se describió anteriormente. Se graficaron los porcentajes de actividad remanente de la enzima (URF/ s) en función del logaritmo en base 10 de la concentración del inhibidor y se obtuvo el valor de  $\text{IC}_{50}$  ajustando los datos a una curva sigmoide usando el software *GraphPad 5 Prism* como se explicó anteriormente.

### 4.3.2 *Docking* proteína-ligando con ambos blancos moleculares

El *docking* ligando-proteína es una herramienta computacional útil para proponer posibles sitios y modos de interacción entre un ligando y una macromolécula (poses) de cara a explicar resultados experimentales disponibles de actividad biológica. En este caso se empleó un método que se basa en un algoritmo genético lamarckiano para generar las poses, 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. De esta manera describe la interacción ligando-proteína como un conjunto de variables de estado (translación, orientación y conformación), correspondiendo el genotipo al estado del ligando, el fenotipo a sus coordenadas atómicas y la proteína el ambiente. Mediante el *docking* molecular es posible obtener la energía de interacción del ligando con cada una de las enzimas. En la aproximación seleccionada para esta tesis, dicha energía es evaluada mediante una función *score* que fue generada a partir de datos obtenidos en forma experimental de complejos proteína-ligando conocidos [139]. Para ello es imprescindible contar con estructuras tridimensionales de las proteínas (*FhCL1* y *FhCL3*) que pueden provenir de experimentos o modelos, así como de los ligandos a estudiar que se corresponden con las estructuras de los compuestos de ambas series de interés.

#### 4.3.2.1. Preparación de estructuras de proteínas

Se utilizó la estructura de la proenzima *FhCL1* depositada en el PDB (206X) para modelar la enzima madura y la estructura de *FhCL3* obtenida previamente *in silico* mediante modelado por homología[137] [140]. Para poner en pie de igualdad las estructuras proteicas provenientes de distintas fuentes para el *docking* molecular, se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica (MD) utilizando AMBER16[141], con el campo de fuerza ff14SB[142]. Se agregaron átomos de hidrógeno faltantes y contra-iones sodio. Cada sistema se colocó en una caja octaédrica truncada de solvente (aguas explícitas) empleando el modelo TIP3P [143] extendido 12 Å desde el centro de masa del sistema. Las estructuras de *FhCL1* y *FhCL3* en solución se localizaron siguiendo un protocolo de minimización de la energía por etapas: a) Se relajaron agua y contra-

iones durante 2.500 pasos (500 pasos de *steepest descent*, *SD* y 2,000 pasos con un algoritmo de gradiente conjugado, *GC*) con la proteína restringida (constante de fuerza de 500 kcal.mol<sup>-1</sup>Å<sup>-2</sup>) b) Se relaja todo el sistema sin restricciones durante 20,000 pasos (5.000 *SD* y 15,000 *CG*). Las interacciones electrostáticas de largo alcance se consideraron utilizando el método *Particle Mesh Ewald (PME)* [144] con una distancia de corte de 10 Å para las interacciones no enlazantes. Después de la minimización, cada sistema se calentó gradualmente de 0 a 300 K durante 100 ps en un *ensemble* *NVT* [145]. A continuación se corrieron 100 ns de simulaciones *NPT* a 300 K y 1 atm de presión utilizando el termostato de Langevin [146]. Para reducir el costo de la simulación, todos los enlaces que involucran átomos de hidrógeno fueron restringidos usando el algoritmo *SHAKE* [147]. Para resolver las ecuaciones de movimiento se utilizó un paso de 2.0 fs. Las coordenadas de los sistemas se grabaron cada 2 ps. A partir de los tramos estables de las trayectorias simuladas se obtuvieron estructuras representativas de *FhCL1* y *FhCL3* considerando el *Root Mean Square Deviation (RMSD)* de las posiciones de los carbonos  $\alpha$ . Para ello se realizó un análisis de *cluster* utilizando el algoritmo *average-linkage* [148]. El análisis estructural y dinámico del *RMSD*, *Root Mean Square Deviation (RMSF)* y enlaces de hidrógeno se realizó con la utilidad *cpptraj* en *AmberTools* [141]. Para la visualización y análisis de las estructuras 3D se utilizaron el programa *VMD* [149] y *DS Visualizer* [150].

#### 4.3.2.2 Preparación de estructuras de ligandos y sus propiedades.

La estructura de los compuestos de ambas series se determinaron por optimización de geometría sin restricciones al nivel *DFT*  $\omega$ B97XD/6-31G (d, p) con una grilla de integración ultrafina [151], [152] en agua descrita con el modelo continuo *IEF-PCM* [153] (cavidades de formas adaptada a la molécula, generadas con radios atómicos de *Bondi* [154]). Para determinar la naturaleza de los puntos estacionarios (mínimos) se inspeccionaron los valores propios de la matriz analítica *Hessiana*, la cual fue calculada al mismo nivel de teoría. Además se calculó el potencial molecular electrostático mapeado (*EMP*) sobre la densidad electrónica de una selección de inhibidores. El *EMP* se obtiene mediante la evaluación del efecto electrostático total generado por los núcleos y la densidad electrónica de una molécula sobre una carga positiva de prueba colocada en el punto del espacio donde se evalúa. Esta propiedad se mapea sobre la superficie molecular (determinada como iso-superficie de la densidad electrónica con un valor de 0.0004 u.a). Los cálculos se realizaron utilizando el software *Gaussian09* y la representación gráfica con *GaussView05* [155].

### 4.3.2.3 *Docking* ligando-proteína

Para evaluar la interacción ligando proteína se utilizó grilla cúbica de 126 puntos de lado y 0.45 Å de espaciado, centrada en la proteína tras retirar agua y contra-iones cubriendo toda su superficie (*blind docking*), lo que permite evitar sesgos en la ubicación de los ligandos. Aquellas estructuras de complejos ligando-proteína cuyos RMSD difieren en menos de 2.0 Å se integraron al mismo grupo, mediante análisis de *clusters*. Observando estos *clusters* se seleccionaron aquellos con mayor número de conformaciones y energía de unión más baja. Estas estructuras se tomaron posteriormente como punto de partida para las simulaciones de MD llevadas a cabo según se indica en la siguiente sub-sección. Los cálculos se realizaron con el software AutoDock 4.2 [156] utilizando el algoritmo genético lamarckiano para generar las poses [139], con un tamaño de población de 150 individuos y  $2,5 \times 10^6$  evaluaciones de energía y 100 ejecuciones de búsqueda. Este último valor fue determinado en función de lograr el compromiso entre costo de cálculo y beneficio a la hora de obtener *clusters* definidos ensayando 50 a 100 y 300 ejecuciones de búsqueda.

### 4.3.2.4 Simulación de MD de los complejos ligando- proteína a partir de los complejos obtenidos en el *docking*.

Las simulaciones de MD de los complejos ligando-proteína entre una selección de inhibidores y *FhCL1* o *FhCL3*, se realizó para la proteína como se describió anteriormente en la sección 4.3.2.1 describiendo cada ligando con el campo de fuerza GAFF [157]. Se calcularon cargas atómicas parciales RESP [158] para los ligandos con Gaussian09 y se creó la topología con el módulo de *antechamber* [159] de AMBER16 [141]. Se simularon 100 ns de dinámica productiva en las mismas condiciones anteriormente especificadas en el punto 5.3.2.1 y se guardaron las coordenadas de los sistemas cada 100 ps.

## 4.4 Evaluación con parásitos *in vitro*.

### 4.4.1 Ensayos *in vitro* con JRD de *Fasciola hepatica*.

Las metacercarias de *F. hepatica* fueron adquiridas del Instituto Miguel C. Rubino (DILAVE, MGAP, Uruguay). Los JRD se obtuvieron por extracción *in vitro* como se describió anteriormente con modificaciones menores [70]. Las metacercarias se incubaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar la pared exterior del quiste y luego se

lavaron varias veces con PBS. La activación de las metacercarias se llevó a cabo en un medio preparado mezclando volúmenes iguales de solución A (taurocolato de sodio al 0,4%, NaHCO<sub>3</sub> 120 mM, NaCl 140 mM, pH 8,0) y solución B (HCl 50 mM y L-cisteína 33 mM) e incubando a 39 °C hasta que comienza el desenquiste (alrededor de 3-4 horas). Se utilizaron filtros de 100 µm para retener la pared del quiste. Los JRD recolectados se lavaron tres veces con RPMI-1640 suplementado con 200 U/ml de sulfato de penicilina G, 200 mg / ml de sulfato de estreptomicina, 500 ng / ml de anfotericina B, HEPES 10 mM, contados y divididos en grupos de alrededor de 20 parásitos que se transfirieron a placas de 96 pocillos. Los parásitos se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en el medio de Basch modificado [160]. El día 1, cada compuesto probado se añadió a una concentración de 50 µM en DMSO al 0.5%. Además, se añadió un 0,5% de DMSO a los grupos control negativo. Cada condición fue probada por duplicado. El comportamiento de los JRD se monitorizó con un microscopio óptico (Olympus BX41), cada día se registró cada pocillo durante un minuto para evaluar la motilidad del parásito con la siguiente puntuación: 3- motilidad normal; 2- motilidad reducida (movimiento esporádico); 1- inmóvil (muerto, adaptado de [161]). Los parásitos se mantuvieron en cultivo durante 7 días. Para el caso de C17 al cual se le determinó su IC<sub>50</sub> se realizó el mismo procedimiento utilizando diferentes concentraciones (6,25, 12,5, 25 y 50µM).

#### 4.4.2 Ensayos *in vitro* con adultos de *Fasciola hepatica*.

Los parásitos adultos fueron recolectados en un frigorífico local de los conductos biliares de los hígados vacunos infectados recién faenados. El estado de la infección de cada hígado fue confirmado previo a la extracción de los adultos, por el veterinario certificador presente, que es el encargado de identificar la presencia de fascioliasis para decidir el descarte del mismo. Basándonos en información previa existente [162], [163], [164], se utilizó el siguiente protocolo: los adultos se almacenaron durante toda la faena en tubos de 50 mL con medio RPMI-1640 a 37-39° C. Una vez en el laboratorio se lavaron de 2 a 3 veces con PBS estéril a 37°C y se mantuvieron 40 minutos en PBS a 37°C para que expulsen el contenido intestinal. Cada adulto seleccionado para los experimentos es previamente inspeccionado ya que en el proceso de extracción pueden dañarse producto de la calcificación y esclerosis que sufren los canalículos de los animales infectados. Para realizar los experimentos se colocó un adulto por pocillo en placas de 12 pocillos con 2 mL por pocillo de medio RPMI-1640 Glutamax suplementado con glucosa 2%(v/v) y 200 U / ml de sulfato de penicilina G, 200 mg / ml de sulfato de estreptomicina y 500 ng / ml de

anfotericina B. Las diluciones de los compuestos se prepararon en medio a 37°C en el momento de realizar el experimento considerando no superar el 1% de DMSO por condición, Se realizaron observaciones periódicas cada 2 horas de cada placa registrando el movimiento de los parásitos mediante un *score* similar al empleado para los juveniles con un tiempo de observación estándar de 30 segundos por pocillo; 3- motilidad normal; 2- motilidad reducida (movimiento esporádico); 1- inmóvil (muerto, adaptado de [161]). Cada condición se realizó por triplicado. Se lograron mantener vivos los parásitos adultos solo durante 44 horas (considerando el control negativo con idéntico porcentaje de DMSO que los tratados).

## 4.5 Ensayos de citotoxicidad en la línea celular HepG2 y espermatozoides bovinos

### 4.5.1 Estudios de citotoxicidad en la línea celular HepG2.

Se sembraron  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo en placas estériles de 96 pocillos, en 225  $\mu\text{L}$  de medio DMEM, suplementado con L-glutamina (1%), penicilina / estreptomina (1%) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 48 h. Para el tratamiento con los compuestos, las diluciones se prepararon justo antes de la dosificación con medio previamente templado. Las soluciones madre, 1 mM, se prepararon en DMSO al 10% y se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de la dilución adecuada a cada pocillo 24 h después de sembrar las células. Para cada compuesto, se realizó un ensayo dosis-respuesta utilizando las siguientes concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . No se observó ningún efecto sobre el crecimiento celular por la presencia de DMSO al 0,5% en los medios de cultivo. Las células se incubaron con los compuestos **C17, C18, C21, C23 y C24** pertenecientes a la serie de 1,4 di-*N*-óxido de quinoxalina y con **H4 y H12** de la serie correspondiente a los híbridos flavonoides-1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Luego se desechó el medio y se lavaron con PBS para realizar un ensayo de viabilidad con sulforrodamina B [165]. Para ello se fijaron a la placa con 50  $\mu\text{L}$  de TCA (50% m/V) y 200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (sin SFB) durante 1 hora a 4 °C. Luego, las células se lavaron con agua miliQ y se trataron con sulforrodamina B (0,4% m/V en ácido acético al 1% V/V) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con ácido acético al 1% (hasta que se evidenció un enjuague adecuado del colorante de tinción) y se secaron durante la noche. Finalmente, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de tampón Tris (pH = 10.0) y se midió la absorbancia a 540 nm. Los ensayos se realizaron en cuatro repeticiones. Al final del experimento, se calculó el

porcentaje de supervivencia celular (PS) para cada compuesto como  $(T / C) \times 100$ . Para determinar el  $IC_{50}$  en función del logaritmo de la concentración de inhibidor empleada, representamos el PS de las células en cada concentración de compuesto y ajustamos los datos a una curva sigmoide. La desviación estándar no fue superior al 10% para ninguna condición.

#### 4.5.2 Estudios de citotoxicidad con espermatozoides bovinos.

Para evaluar citotoxicidad con espermatozoides bovinos se empleó un ensayo previamente puesto a punto por el grupo [127]. Se utilizaron muestras de un toro Red Angus fértil y sano que se mantuvieron congeladas en pajuelas de 0,5 ml (extendidas en medio *X-Cell*, Minitube, Alemania) en nitrógeno líquido hasta su uso. El semen utilizado pertenecía a un único lote de congelación que se obtuvo durante un programa de recolección regular con una vagina artificial. Las muestras de tres pajuelas se descongelaron y se preparó un grupo de espermatozoides en medio *X-Cell* a una concentración de 80 millones de espermatozoides por mL. Luego se mezclaron 50  $\mu$ L de la suspensión de espermatozoides en medio *X-Cell* con 50  $\mu$ L de cada compuesto a ensayar a una concentración de 50  $\mu$ M no superando el 1% de DMSO también disuelto en *X-Cell* a 37°C (con una dilución fresca cada vez). Se mezcló por retropipeteo y cuidando de no introducir aire en la muestra. Tanto la evaluación de los compuestos como los controles se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, incubándolas a 37 °C durante 1 h. El análisis de la motilidad se llevó a cabo utilizando un sistema CASA (Analizador de Semen Asistido por Computadora) Androvision (*Minitube, Tiefenbach, Alemania*) con un microscopio *Olympus BX 41* (*Olympus, Japón*) equipado con una placa templada a 37 ° C. Cada muestra (10 $\mu$ L) se colocó en una cámara de conteo Makler (10 $\mu$ m de profundidad, *Sefi-Medical Instruments, Israel*) y se evaluaron los siguientes parámetros de vitalidad espermática: porcentaje de espermatozoides móviles totales (motilidad > 5 $\mu$ m / s) y velocidad de línea curva (VCL, > 24 $\mu$ m / s). En cada muestra se analizaron al menos 400 espermatozoides de cuatro campos diferentes.

## 4.6 Evaluación de distintas condiciones para la cristalización de *FhCL3* en complejo con un inhibidor

Buscando profundizar en el análisis de la interacción entre los inhibidores encontrados y las catepsinas de *Fasciola*, se ensayaron diferentes condiciones para la obtención de cristales de la enzima formando complejo con alguno de los inhibidores. Para *FhCL1*, se encuentra disponible en la base de datos PDB la estructura de la pro-enzima obtenida a partir de una enzima inactiva

dónde se sustituyó la cisteína catalítica por una glicina (206X) [81]. En diciembre de 2017 se llevó a cabo una pasantía en el laboratorio del Dr. Christophe Guillon, en el *Institute de Biologie et chimie des Protéines*, dentro de la unidad *Molecular Microbiology and Structural Biochemistry* en donde realizamos una primera aproximación para la obtención de la estructura cristalográfica de *FhCL3*. Se evaluaron 768 condiciones de cristalización empleando la metodología de *sitting drop* por difusión de vapor con los kits: *CrystalScreen*<sup>®</sup>, *Proplex*<sup>®</sup>, *AmSO<sub>4</sub>*<sup>®</sup> y *PEG I*<sup>®</sup> de 0,15 uL de solución precipitante y 0,15 μL de proteína a 6 mg/mL. Luego de la primer semana de trabajo se observaron cristales en algunas de las condiciones presentes en *CrystalScreen*<sup>®</sup> y *AmSO<sub>4</sub>*<sup>®</sup>, lo que motivó que se emplearan estos kits para evaluar la co-cristalización con el inhibidor de tipo chalcona **C34** que caracterizamos previamente [127]. Se probaron 0,15 uL de solución precipitante y 0,15 uL de proteína previamente incubada con nuestro *hit* molecular a 10 μM y la enzima a 4,8 mg/mL sumando otras 192 condiciones. Todas las condiciones de cristalización se realizaron a 19°C.

## 5. Resultados y discusión

## 5.1 Estudio de la capacidad inhibitoria de 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina

### 5.1.2 Evaluación *in vitro* de la inhibición en *Fh*CL1 y *Fh*CL3

Mediante ensayos enzimáticos por medida de fluorescencia fue posible determinar el porcentaje de inhibición para 28 compuestos de la familia de 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina, seleccionados de la quimioteca disponible en nuestro laboratorio (Tabla 1). En la Figura 18 se observa que once de los veintiocho compuestos evaluados presentaron un porcentaje de inhibición igual o mayor a 50% para al menos una de las enzimas (C6, C7, C11, C15, C17, C18, C19, C20, C21, C23 y C24), y 3 de ellos mostraron inhibición superior al 80% en ambas enzimas (C17, C23 y C24). En la Tabla 1, en la que se especifica la estructura de cada uno de los compuestos evaluados, puede observarse que el *core* que caracteriza a la familia en sí mismo no presenta altos porcentajes de inhibición, al igual que los compuestos con sustituyentes pequeños en R1 - R4 (C1 a C3). Este resultado sugiere que los diferentes sustituyentes presentes contribuyen a la estructura farmacofórica, siendo el *core* 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina un buen agrupamiento químico que permite a través de su sustitución, modular la actividad de estas enzimas.

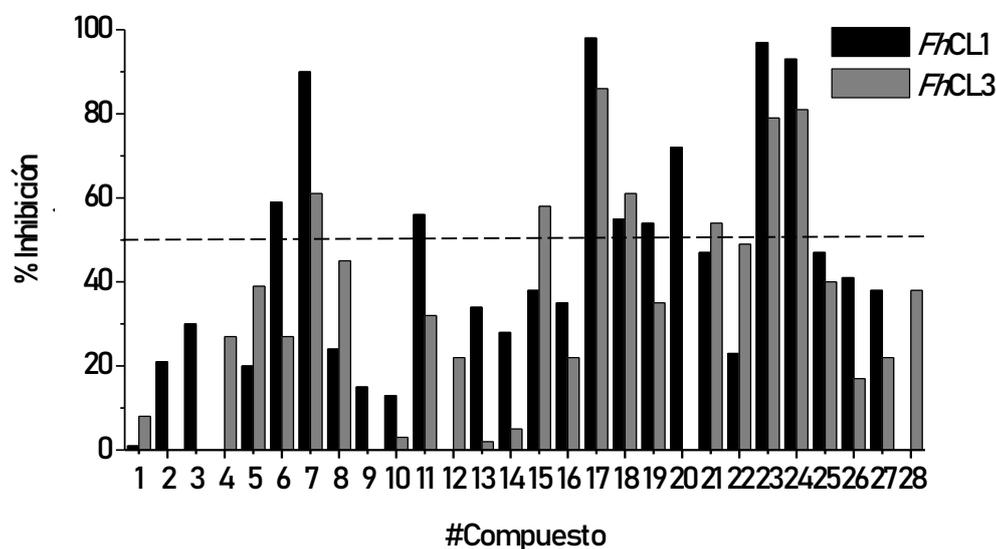
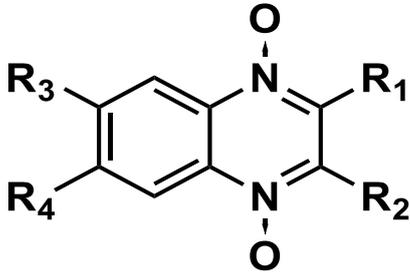
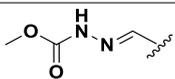
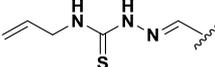
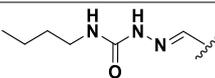
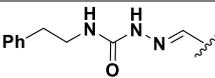
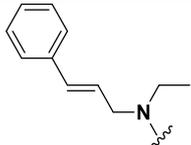
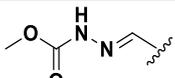
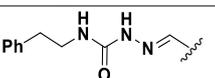
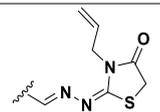
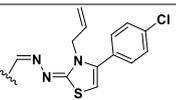
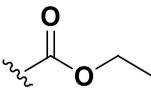


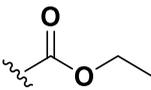
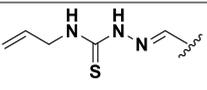
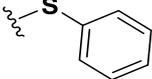
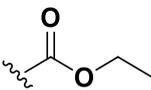
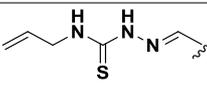
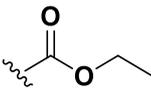
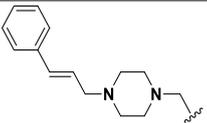
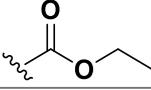
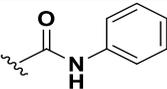
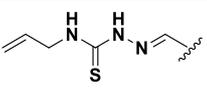
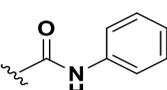
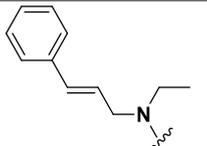
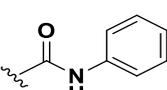
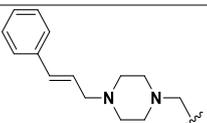
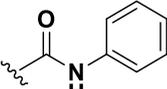
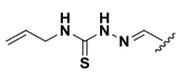
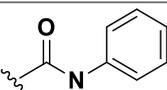
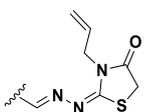
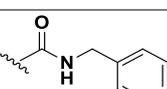
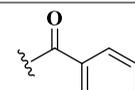
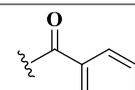
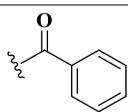
Figura 18.- *Screening* de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (C1-C28) como inhibidores de *Fh*CL1 y *Fh*CL3. Se muestra el porcentaje de inhibición correspondiente a cada compuesto para *Fh*CL1 en negro y para *Fh*CL3 en gris. La línea punteada señala el 50% de inhibición.

Tabla 1.- Estructuras de las 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina evaluadas en el *screening* de inhibición de *Fh*CL1 y *Fh*CL3. En la primera fila se muestra la estructura del *core* y la posición de los sustituyentes R1, R2, R3 y R4. Se detallan las estructuras de los sustituyentes de cada compuesto y el porcentaje de inhibición obtenido para ambos blancos moleculares como un promedio de experimentos realizados por triplicado. En todos los casos el desvío estándar para los porcentajes de inhibición fue menor al 10%.

Estructura general de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina



#Comp.	R1	R2	R3	R4	%Inh. <i>Fh</i> CL1	%Inh. <i>Fh</i> CL3
C1	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	1	8
C2	-H	-CHO	-H	-H	21	0
C3	-CN	-NH <sub>2</sub>	-H	-H	30	0
C4	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	0	27
C5	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	20	39
C6	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	59	27
C7	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	90	61
C8	-CN	-NH <sub>2</sub>		-H	24	45
C9	-CN	-NH <sub>2</sub>	-Cl	-Cl	15	0
C10	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		-H	13	3
C11	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		-H	56	32
C12	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H		0	22
C13	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H		34	2
C14		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	28	5

C15		-CH <sub>3</sub>		-H	38	58
C16	-CH <sub>3</sub>		-Cl	-Cl	35	22
C17		-Ph		-H	98	86
C18		-Ph		-H	55	61
C19		-Ph	-Cl	-Cl	54	35
C20		-CH <sub>3</sub>		-H	72	0
C21		-CH <sub>3</sub>		-H	47	54
C22		-CH <sub>3</sub>		-H	23	49
C23		-Ph	-H		97	79
C24		-Ph	-H		93	81
C25		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	47	40
C26		-CH <sub>3</sub>	-F	-F	41	17
C27		-CF <sub>3</sub>	-H	-H	38	22
C28	-CF <sub>3</sub>		-F	-F	0	38

Todos los derivados de quinoxalina que poseen un sustituyente fenilo en R2 (**C17**, **C18**, **C19**, **C23** y **C24**) mostraron alto porcentaje de inhibición (Tabla 1). La contribución positiva de este sustituyente a la inhibición se puede observar al comparar **C17** y **C15**, donde la presencia de un fenilo en lugar de un grupo metilo en R2 aumenta significativamente la inhibición de ambas enzimas. Esto se condice con nuestro trabajo anterior realizado en el marco de mi tesina de grado, en el que encontramos que chalconas que contenían un grupo naftilo en ambos anillos eran los mejores inhibidores de las catepsinas de *F. hepatica* [127], lo que sugiere que la presencia de sustituyentes voluminosos y estructuras cíclicas aromáticas favorecen la inhibición de estas enzimas.

Por otro lado, en los compuestos que resultaron inhibidores se observa la presencia de un grupo electrófilo hidrolizable en R1, como éster, amida o nitrilo, los cuales son susceptibles de ataque nucleofílico por el tiol reactivo del sitio activo de la catepsina. Asimismo, algo a destacar es la analogía estereoelectrónica que poseen estos grupos con el enlace peptídico, presente en los sustratos naturales de los blancos moleculares. La excepción a esta tendencia es **C11** que posee grupos metilo en R1 y R2, pero su actividad con respecto a **C7** (con el cual sólo se diferencia en estas posiciones) se reduce a la mitad.

Analizando la sustitución en R3, observamos que las quinoxalinas con semicarbazona, tiosemicarbazona y alilamina como sustituyentes mejoran la inhibición principalmente para *FhCL3*. Nótese la mayor actividad inhibitoria de los compuestos **C5**, **C6**, **C7** y **C8** con respecto a **C3**, **C4** y **C9**, que carecen de estas sustituciones. Además, los compuestos **C14** y **C15** ofrecen un comportamiento similar. Se ensayaron pocos compuestos con sustituyentes en R4, sin embargo, la fuerte inhibición de **C23** y **C24** sugiere que la contribución de estos sustituyentes en esta posición es importante en la inhibición. Finalmente, aquellos compuestos con halógenos como sustituyentes en R3 y R4 (**C9**, **C16**, **C19**, **C26** y **C28**) en general no presentaron buenos porcentajes de inhibición, con la excepción de **C19**. Este último sin embargo presenta un éster etílico en R1 y un fenilo en R2, que como ya discutimos, están presentes en los compuestos con mayor actividad inhibitoria (Tabla 1).

Al observar estos resultados vemos que los sustituyentes tienen un rol importante en la capacidad inhibitoria de los *N*-óxidos de quinoxalina. Se calculó el potencial molecular electrostático mapeado (EMP) sobre la densidad electrónica de algunos inhibidores para

comparar con el *core* 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina no sustituido. Esta propiedad es un buen indicador de la forma en que puede ocurrir el reconocimiento molecular y permite explicar orientaciones preferenciales de interacción, ya que las regiones positivas tenderán a acercarse a zonas de potencial negativo, y viceversa.

Lo primero a observar es que el *core* difiere mucho en cuanto a la forma y distribución del EMP con respecto a los demás compuestos analizados, y no posee prácticamente zonas de EMP positivo (Figura 19). Los demás compuestos presentan dos caras, una de potencial positivo y otra de potencial negativo, asociadas a las semicarbazonas y tiosemicarbazonas en R3. El sector en el que se encuentra el azufre (C15 y C17 como ejemplo) es más voluminoso que el oxígeno en C7 y C11 (Figura 19). Además, la presencia de sustituyentes hidrocarbonados confiere mayor longitud a las moléculas, en comparación a los no sustituidos (C1) o aquellos con halógenos (C9 y C19). El hecho de que los compuestos más compactos (C1-C4, C9, C19) no presenten altos porcentajes de inhibición, sobre todo en relación a *Fh*CL3, podría vincularse con la forma extendida en la que se espera ocurra la unión en el sitio activo de la enzima [166]. Así, la interacción en estos compuestos se vería restringida a unos pocos contactos, mientras las moléculas más extensas serían capaces de asociarse a un mayor número de residuos en los diferentes subsitios de la enzima, interfiriendo de esta manera en el reconocimiento del sustrato. Es interesante notar que los dos compuestos que presentan una tiosemicarbazona o una alilamina como sustituyentes en R4 (C23 y C24), mostraron excelentes porcentajes de inhibición enzimática, si bien poseen una forma en “gatillo” diferente a los otros buenos inhibidores de la serie. Sin embargo, presentan las dos caras, negativa y positiva en la orientación observada para los demás inhibidores.



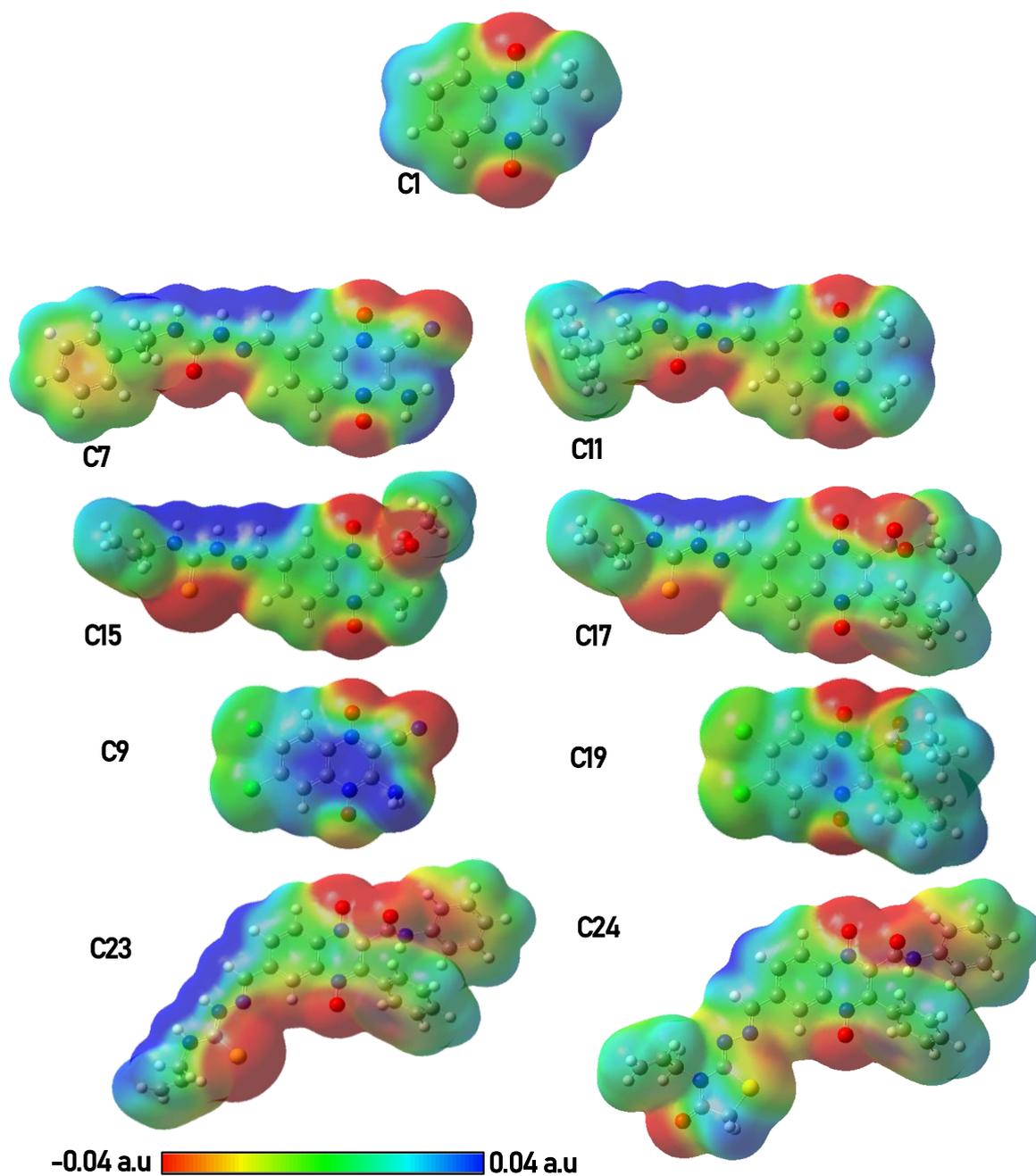
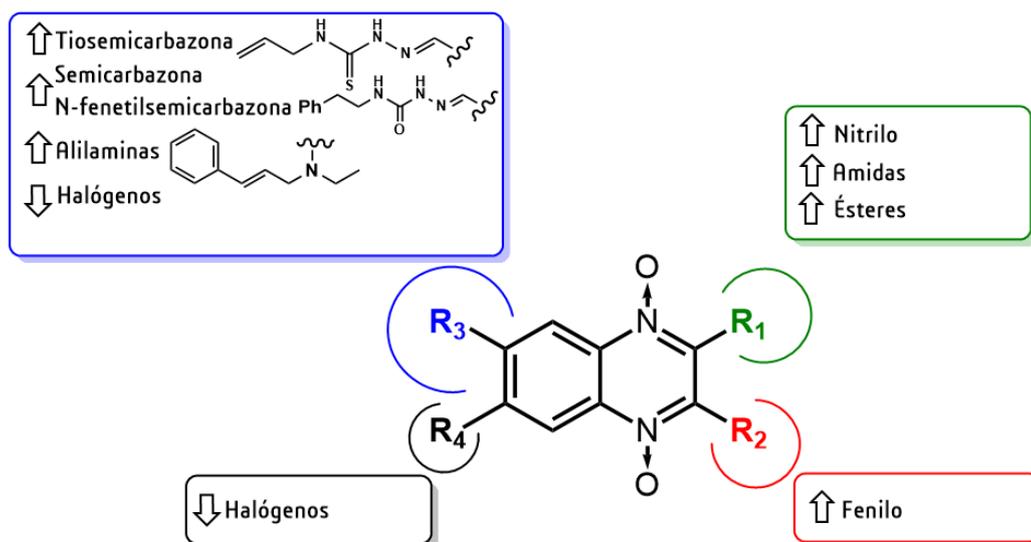


Figura 19.- Potencial Molecular Electrostático (EMP) mapeado sobre la densidad electrónica. Se calculó a nivel DFT  $\omega$ B97XD / 6-31G (d, p) con un isovalor= 0,0004 u.a. Se observa el EMP asociado a cada compuesto. La barra con código de color indica el signo y magnitud del EMP, rojo más negativo y azul más positivo,



En la Figura 20 se resume cómo modulan la actividad de las enzimas los motivos estructurales evaluados. La presencia de un grupo electrofílico hidrolizable en  $R_1$  y de un fenilo en  $R_2$  contribuye de forma positiva a la inhibición de ambas enzimas. Por su parte, los sustituyentes de tipo semicarbazona, tiosemicarbazona o alilaminas en  $R_3$  también favorecen la inhibición, principalmente en presencia de los grupos mencionados anteriormente en  $R_1$  y  $R_2$ .

Figura 20.- Esquema del efecto de los sustituyentes de 1,4-di-N-óxidos de quinoxalina en la inhibición de las enzimas. En el centro se observa la estructura del *core* y en los recuadros se indican los sustituyentes que contribuyen en forma positiva (flecha hacia arriba) o negativa (flecha hacia abajo) a la inhibición de las catepsinas.

### 5.1.3 Caracterización *in vitro* del modo de inhibición de los mejores compuestos

Se calculó el  $IC_{50}$  de los 11 compuestos que ofrecieron un porcentaje de inhibición mayor al 50% para al menos una de las enzimas. En la Figura 21 se muestran los  $IC_{50}$  para los compuestos mencionados, en donde se destacan tres que presentan un  $IC_{50}$  menor a  $10\mu M$  para ambas enzimas **C7**, **C17**, **C18** y **C24**, de los cuales tres poseen fenilo como sustituyente en  $R_2$  (**C18**, **C17** y **C24**).

IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	C6	C7	C11	C15	C17	C18	C19	C20	C21	C23	C24
<i>FhCL1</i>	6,5	3,5	7,1	24	1,7	9,0	5,0	4,6	11	3,5	1,4
<i>FhCL3</i>	11	5,2	12	21	4,9	8,0	>50	21	24	11	0,9

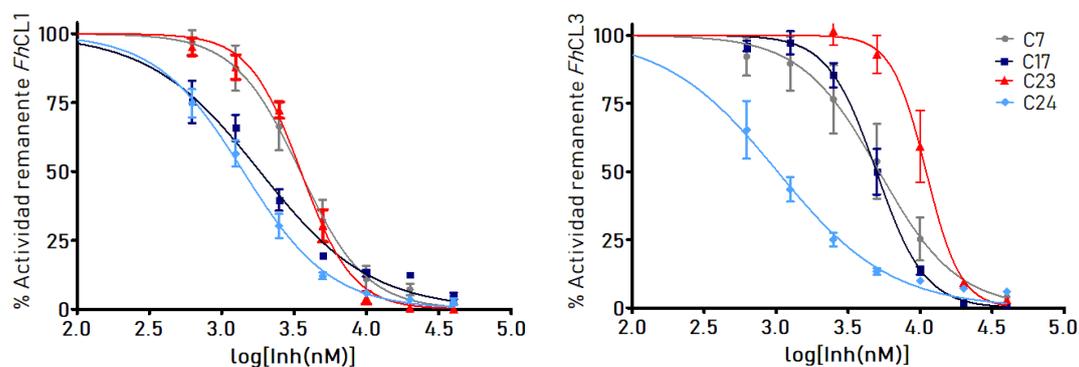


Figura 21- Determinación de IC<sub>50</sub> y curvas concentración-respuesta. En la tabla se presentan los valores de IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) calculados para los once compuestos con mejor inhibición a 10  $\mu$ M y debajo se muestran las curvas de concentración-respuesta para **C7**, **C17**, **C23** y **C24**. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Los compuestos **C7**, **C17**, **C19**, **C20**, **C23** y **C24** tienen un IC<sub>50</sub> de 5  $\mu$ M o menos con *FhCL1*, mientras que tres de ellos tienen valores bajos similares para *FhCL3* (**C7**, **C17** y **C24**) (Figura 21). Estos resultados son consistentes con los observados previamente al estudiar la inhibición de las catepsinas L por compuestos flavonoides, donde *FhCL1* fue inhibida más fácilmente en comparación con *FhCL3* [127]. Esto podría ser consecuencia de la conformación más amplia de la hendidura del sitio activo de *FhCL1* que le permitiría acomodar en mayor medida diferentes moléculas [80], [96].

Un estudio retrospectivo de fármacos que salieron al mercado sugiere que los parámetros cinéticos se correlacionan mejor que la afinidad con la eficacia de las moléculas *in vivo* [167]. En este sentido, realizamos perfiles de inhibición de algunos de los compuestos a diferentes tiempos de incubación con las enzimas (ensayos de *slow-binding*) y analizamos la reversibilidad/irreversibilidad de la unión enzima-inhibidor (Figura 22). Para ambas enzimas se evidenció una dependencia entre el tiempo de incubación enzima-ligando y el porcentaje de inhibición enzimática, mostrando una cinética lenta de unión con los compuestos. En ambos casos a los 30 minutos se supera el 50% de inhibición con la mayoría de los compuestos.

Por otra parte, se realizaron estudios de reversibilidad mediante ensayos de dilución rápida en donde se observó que los compuestos seleccionados interactúan de forma reversible

con las enzimas. Para *FhCL1* la mayoría de los compuestos son reversibles lentos, a excepción de **C24**, mientras que con *FhCL3* la cinética de disociación del complejo enzima-inhibidor es más variable entre los diferentes inhibidores (Figura 22).

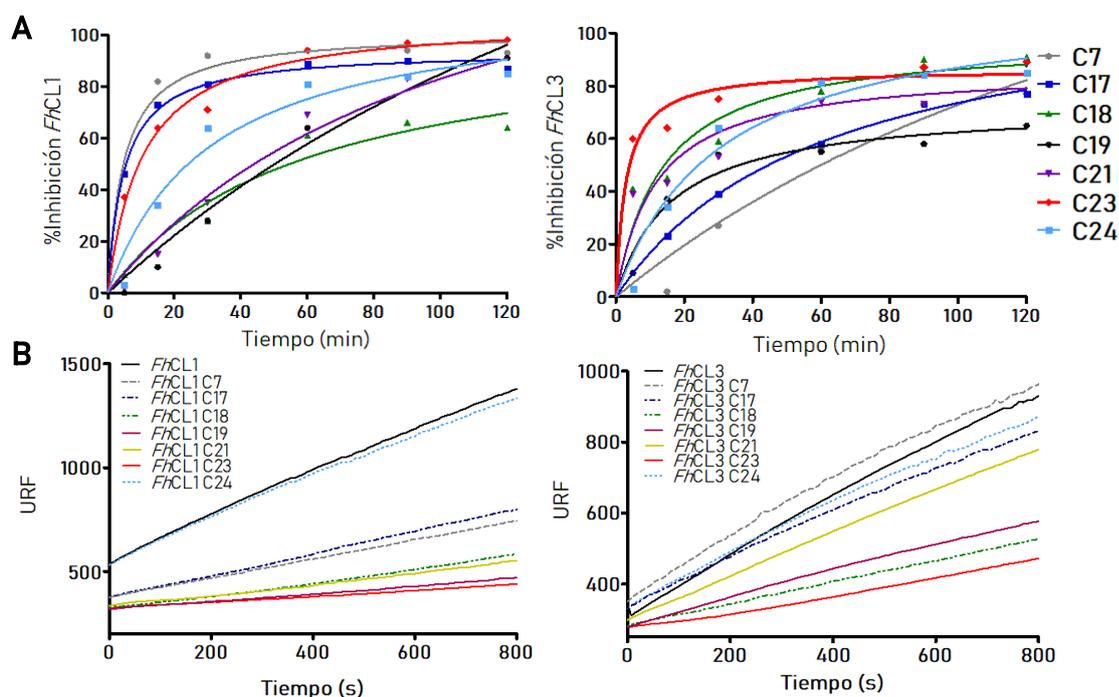


Figura 22.- Ensayos de *slow binding* y reversibilidad. A) Gráfico del promedio del porcentaje de inhibición de cada compuesto para *FhCL1* y *FhCL3* incubados 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos con la enzima. B) Gráficos correspondientes a los experimentos de dilución rápida en donde se mide la actividad en unidades relativas de fluorescencia en función del tiempo para cada enzima.

La ventaja del ensayo de dilución rápida es su sencilla puesta a punto y la posibilidad de evaluar varios compuestos al mismo tiempo. Sería interesante realizar ensayos a partir de cromatografía de afinidad o de exclusión molecular, en los que reteniendo la enzima se busque desplazar el compuesto, para confirmar la reversibilidad de su unión.

## 5.2 Evaluación de la actividad fasciolicida de los compuestos con mayor inhibición

Con el objetivo de evaluar la actividad fasciolicida de los mejores compuestos se realizaron ensayos en cultivo, a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  en 0,5 % de DMSO. Se monitorearon al microscopio los cambios en la motilidad y el fenotipo de los parásitos juveniles a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación con los compuestos (Figura 23). Entre las moléculas que mostraron una alta inhibición de la actividad de las enzimas encontramos que los derivados **C17**, **C18**, **C19**, **C21** y **C24** poseen actividad fasciolicida *in vitro*, con la excepción de **C7** y **C23** que afectaron ligeramente la motilidad parasitaria (Figura 23).

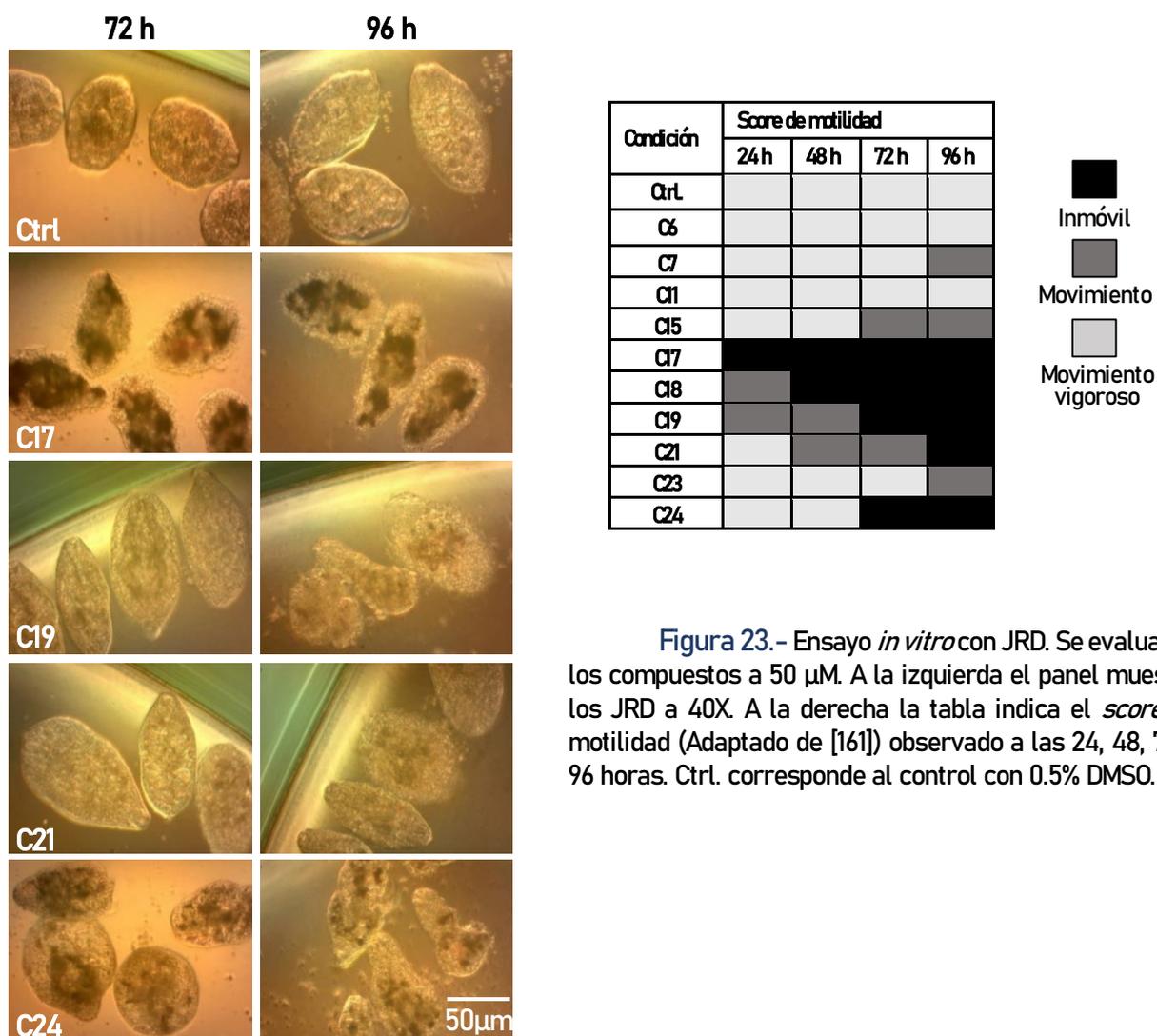


Figura 23.- Ensayo *in vitro* con JRD. Se evaluaron los compuestos a 50  $\mu\text{M}$ . A la izquierda el panel muestra los JRD a 40X. A la derecha la tabla indica el *score* de motilidad (Adaptado de [161]) observado a las 24, 48, 72 y 96 horas. Ctrl. corresponde al control con 0.5% DMSO.

La estructura de los compuestos con actividad biológica comparte la presencia de un grupo fenilo en R2 y sustituyentes voluminosos en R3 / R4, mientras que los buenos inhibidores enzimáticos sustituidos con grupos metilo o amino en estas posiciones (**C6**, **C7**, **C11** y **C15**) no tuvieron actividad sobre los parásitos (ver **Tabla 1** y **Figura 20**). La importancia de sustentar un grupo fenilo en la posición R2 para la actividad fasciolicida se ve claramente si comparamos los derivados **C17** y **C15**. Sin embargo, es inesperada la baja actividad biológica del compuesto **C23**, ya que *a priori* esperábamos que se comportara en forma similar a los demás compuestos con fenilo en R2. Dado que el compuesto **C17** mostró mayor actividad fasciolicida, afectando a los JRD ya a las 24 horas de incubación, se realizó un experimento de dosis respuesta obteniéndose un  $IC_{50}$  de 25  $\mu$ M.

En la incubación con los derivados de quinoxalina **C17**, **C19** y **C24** se formó un precipitado oscuro inicialmente en el interior del intestino, especialmente abundante en **C17** (**Figura 23**). La primera hipótesis que se consideró es que se estuviera formando un complejo metálico con el compuesto, pero el incremento del precipitado en el tiempo sugería que era un producto asociado al metabolismo del parásito. En ese sentido, está descrita una proteína transportadora de iones cobre Ctr1 cuyo clivado por parte de catepsina L es imprescindible para la regulación de la homeostasis celular y de iones metálicos en líneas celulares humanas y en ratones [168]. Experimentos en los que se inhibe la catepsina L (o ratones *knockout* para la misma) se observa la acumulación de esta proteína en endo-lisomas y por lo tanto de cobre, lo que altera la homeostasis induciendo muerte celular [168]. Ctr1 está conservada y presente en toda la escala zoológica [169] y ha sido estudiada en algunos protozoarios parásitos como *Plasmodium falciparum* por su rol como potencial blanco molecular [170][171]. No hay estudios específicos en *Fasciola hepatica*, si bien la proteína está codificada en el genoma (ID seq: THD22007.1). Esto plantea la posibilidad de que los inhibidores estén interfiriendo también con la actividad de las catepsinas lisosomales de *F. hepatica*, impidiéndose por este mecanismo la activación de Ctr1, llevando a la acumulación de precipitados metálicos y al fenotipo observado.

Nuestros resultados previos estudiando compuestos de la familia de las chalconas, mostraron que los mejores inhibidores de las catepsinas (flavonoides **C31**, **C33**, **C34** y **C35** [127]), presentaron actividad fasciolicida *in vitro* sobre JRD, con disminución de la motilidad y dificultad para la migración *ex vivo* a través de la pared del duodeno de rata [127]. Estos resultados concuerdan con un reporte de interferencia de ARN contra Cat-L y B y un tratamiento *in vitro* de

JRD con los inhibidores de la catepsina L y B, E64-d y CA-074Me, donde se describe una pérdida de la motilidad del gusano acompañada por daño estructural de los parásitos [172] y una reducción en la capacidad de migrar a través de la pared del duodeno [64] [172]. *In vivo*, estos resultados podrían traducirse en una incapacidad de los parásitos para migrar a través de la cavidad peritoneal y hacia el hígado, impidiendo así el establecimiento de la infección.

Se realizó también la evaluación de la actividad fasciolicida de los compuestos sobre el estadio adulto. Este experimento presentó la dificultad de que los parásitos colectados en el frigorífico no fue posible mantenerlos viables en condiciones *in vitro* durante más de 48 h. En pos de mejorar este tiempo se probó cultivarlos en presencia de glóbulos rojos bovinos al 20%, comparado con un cultivo estándar con medio RPMI-1640, considerando que el estadio adulto del parásito es hematófago y los antecedentes de degradación de hemoglobina por parte de las catepsinas [173]. No se logró aumentar la sobrevivencia en cultivo y en este tiempo no se observaron cambios en los parásitos ni en presencia de los compuestos ni de TBZ que utilizamos como control positivo,

Recientemente establecimos una colaboración con la Dra. Teresa Freire del Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina para evaluar los compuestos utilizando un modelo *in vivo* de ratones infectados con *Fasciola hepatica* [174]. Este modelo nos permitió evaluar uno de los flavonoides inhibidores hallados durante mi tesina de grado, determinando su acción fasciolicida *in vivo*, reducción del daño hepático e inflamación (ver Anexo, Figura 1). Este ensayo nos muestra la eficacia de uno de los compuestos identificados como líderes para evitar la infección en el modelo murino y nos permitirá evaluar la actividad *in vivo* de nuevos compuestos que han surgido durante el desarrollo de esta tesis.

### 5.3 Estudio de citotoxicidad en espermatozoides bovinos y células HepG2 de los mejores inhibidores

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos, se utilizaron dos modelos de células, analizando la viabilidad de espermatozoides bovinos y la línea celular humana HepG2. Ninguno de los compuestos afectó la motilidad del espermatozoide y todos ellos tienen una  $IC_{50}$  para HepG2 entre 4-50  $\mu$ M, en el mismo orden de magnitud que el triclabendazol, cuyo  $IC_{50}$  fue de 32  $\mu$ M. Esto es importante ya que TBZ es el fármaco de referencia para tratar infecciones humanas y el único eficaz contra los parásitos juveniles [164].

No se observa una correlación entre los compuestos con menor IC<sub>50</sub> en líneas celulares con los resultados obtenidos para la motilidad relativa de los espermatozoides, por ejemplo para **C21** se obtuvo un IC<sub>50</sub> mayor a 100  $\mu$ M (mayor dosis evaluada en células) y es el que presenta menor motilidad relativa al control luego de 60 minutos de incubación a 37°C (Tabla 2). Esto demuestra que es importante utilizar diferentes modelos celulares para evaluar toxicidad ya que cada uno nos brinda información diferente sobre cómo se comportan los compuestos, sin embargo, ambos modelos demuestran su baja toxicidad, comparable a uno de los fármacos más utilizados actualmente.

**Tabla 2.-** Resultados obtenidos para los ensayos de citotoxicidad en la línea celular humana HepG2 y en espermatozoides bovinos.

Compuesto	IC <sub>50</sub> HepG2 ( $\mu$ M)	%Motilidad relativa en espermatozoides (50 $\mu$ M) 30 min	%Motilidad relativa en espermatozoides (50 $\mu$ M) 60 min
C17	48	81 $\pm$ 3	79 $\pm$ 3
C18	<6,25	82 $\pm$ 2	75 $\pm$ 5
C21	>100	75 $\pm$ 3	58 $\pm$ 3
C23	12	82 $\pm$ 1	72 $\pm$ 8
C24	16	82 $\pm$ 1	77 $\pm$ 3
TBZ	32	88 $\pm$ 1	81 $\pm$ 11

## 5.4 Caracterización *in silico* del modo de inhibición de los mejores compuestos

Para obtener información sobre el modo en el que se produce la inhibición de los blancos moleculares por parte de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalinas se realizaron estudios de *docking* y dinámica molecular. Las interacciones enzima-inhibidor están influenciadas no sólo por la conformación que pueda tener una proteína en un momento dado (que el tipo de *docking* empleado en esta tesis, evalúa empleando la estructura proteica rígida, sin posibilidad de adaptación mutua) sino también por la dinámica de la proteína y el ligando en complejo.

### 5.4.1 Resultados de *docking* ligando-proteína

El *docking* molecular es una aproximación que permite explicar semejanzas y diferencias en el modo de unión de una familia de compuestos orgánicos de los que se cuenta con información experimental de su actividad. Se exploró mediante *blind-docking* la naturaleza del sitio y la orientación con que interaccionan las 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalinas con cada proteína. Para

*FhCL3*, se observa que los compuestos interactúan preferentemente en la hendidura catalítica (primer sitio de unión), mientras que en *FhCL1* solo el compuesto **C18** se coloca en un sitio similar. En el caso de *FhCL1* la ubicación es diferente, mostrando una segunda posición, en las inmediaciones del bolsillo oxianiónico, ocluyendo la entrada a la hendidura del sitio activo [94] (Figura 24). En ambos casos, la posición ocupada por los compuestos podría dificultar la entrada y el posicionamiento del sustrato en el sitio activo y, por lo tanto, ejercer la inhibición observada de la actividad enzimática (Figura 24).

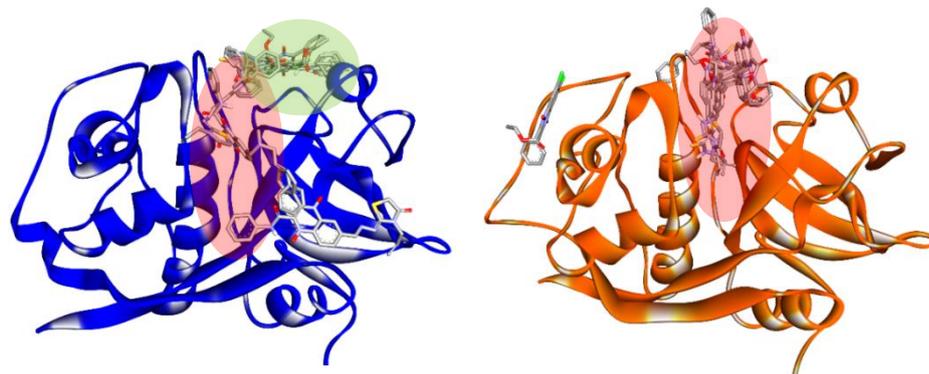


Figura 24.- Sitios de unión obtenidos por *docking* ligando-proteína. Las enzimas están representadas en *new cartoon* (*FhCL1* en azul y *FhCL3* en naranja) mientras que los *clusters* más representativos para cada compuesto están representados en *Sticks*. En ambos casos se observa una distribución general de *clusters* próxima a la hendidura catalítica (marcada en rojo) para *FhCL1* y *FhCL3*, con un segundo sitio para *FhCL1* (marcado en verde) en la entrada de la hendidura próxima al bolsillo oxianiónico.

Al observar los resultados obtenidos para los compuestos que poseen fenilo en R2, que ofrecieron los mayores porcentajes de inhibición, existen ciertas correlaciones que se sustentan con los datos obtenidos experimentalmente. Para *FhCL1* las diferentes poses se agrupan en varios *cluster* con similar número de conformaciones y energía mientras que para *FhCL3* se observa un *cluster* que predomina sobre los demás (Figura 25).

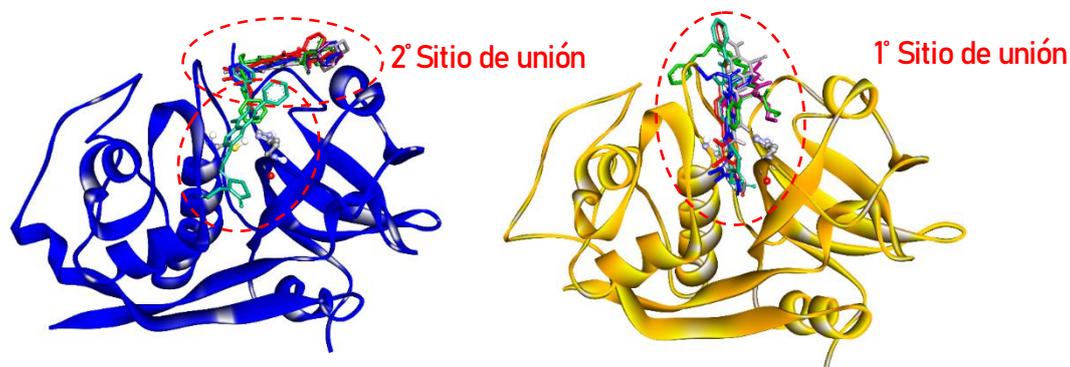


Figura 25.- Sitios de unión para los compuestos que poseen fenilo en R2. Se observa *FhCL1* y *FhCL3* en *New Cartoons* en azul y naranja respectivamente. Los compuestos se observan en *Sticks* en sus correspondientes *clusters* más representativos seleccionados a partir del *docking* molecular.

Si analizamos lo que sucede con estos compuestos en *FhCL1*, si bien la interacción entre la histidina catalítica 159 y el triptófano 177 se mantiene, las regiones próximas al mismo son diferentes en cuanto a la accesibilidad al disolvente. Es posible distinguir para 4 de los 5 compuestos con fenilo en R2, la capacidad de conectar con su interacción dos regiones poco expuestas al disolvente (Figura 26), a excepción de **C24** que presenta una ubicación similar a la observada para *FhCL3* (Figura 26 y 27),

A pesar de las diferencias estructurales en los demás sustituyentes del *core*, algo en común entre estos compuestos es su interacción con el triptófano 177 en *FhCL3* el cual a su vez establece una interacción tipo  $\pi - \pi$  con His 159 que pertenece a la diada catalítica. Esta interacción se produce en general con el propio fenilo o con el *core* sirviendo de anclaje el resto de los sustituyentes (Figura 27). El triptófano 177 es un residuo altamente conservado en las diferentes catepsinas y junto con la glutamina 19 configuran el bolsillo oxianiónico [94], sitio importante para la estabilización del estado de transición durante la catálisis. Por otra parte, es interesante destacar el rol de la tiosemicarbazona y el fenilo, partes constituyentes del ligando que funcionan como anclaje a una región poco expuesta al disolvente próxima a la diada catalítica y entre los sub-sitios S2 y S3. En todos los casos se observan posibles enlaces de hidrógeno entre estos compuestos y los residuos que los rodean.

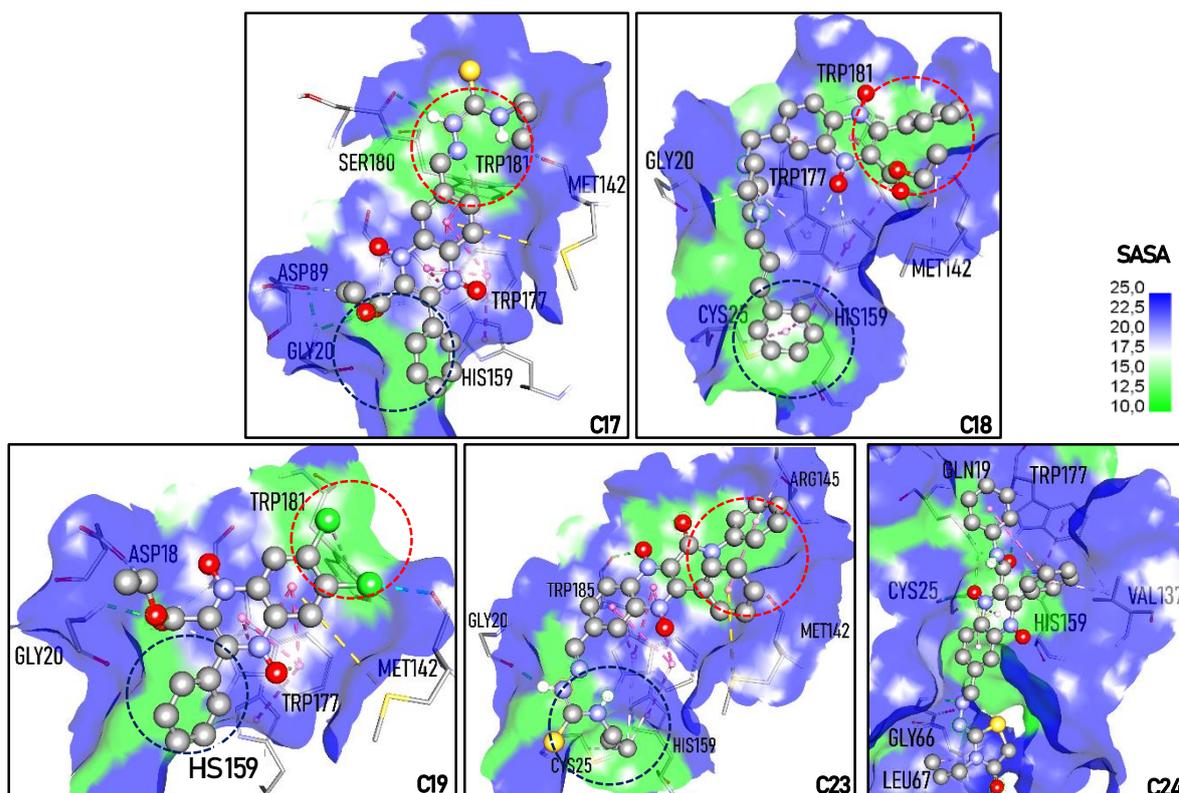


Figura 26.- Accesibilidad al disolvente para *FhCL1* de los sitios en los que se ubican los compuestos con fenilo en *R2*. En *sticks* delgados se representan los aminoácidos que interactúan con los compuestos. Nótese la His159, que forma parte de la diada catalítica, interactuando con el triptófano 177 mediante interacciones hidrofóbicas. La proteína está representada en *surf* coloreada según su accesibilidad al disolvente (SASA), de menor (verde) a mayor (azul) como indica la referencia. En círculos de línea punteada roja y azul (más próxima al sitio activo) se indican las regiones menos expuestas al disolvente que interactúan con los compuestos.

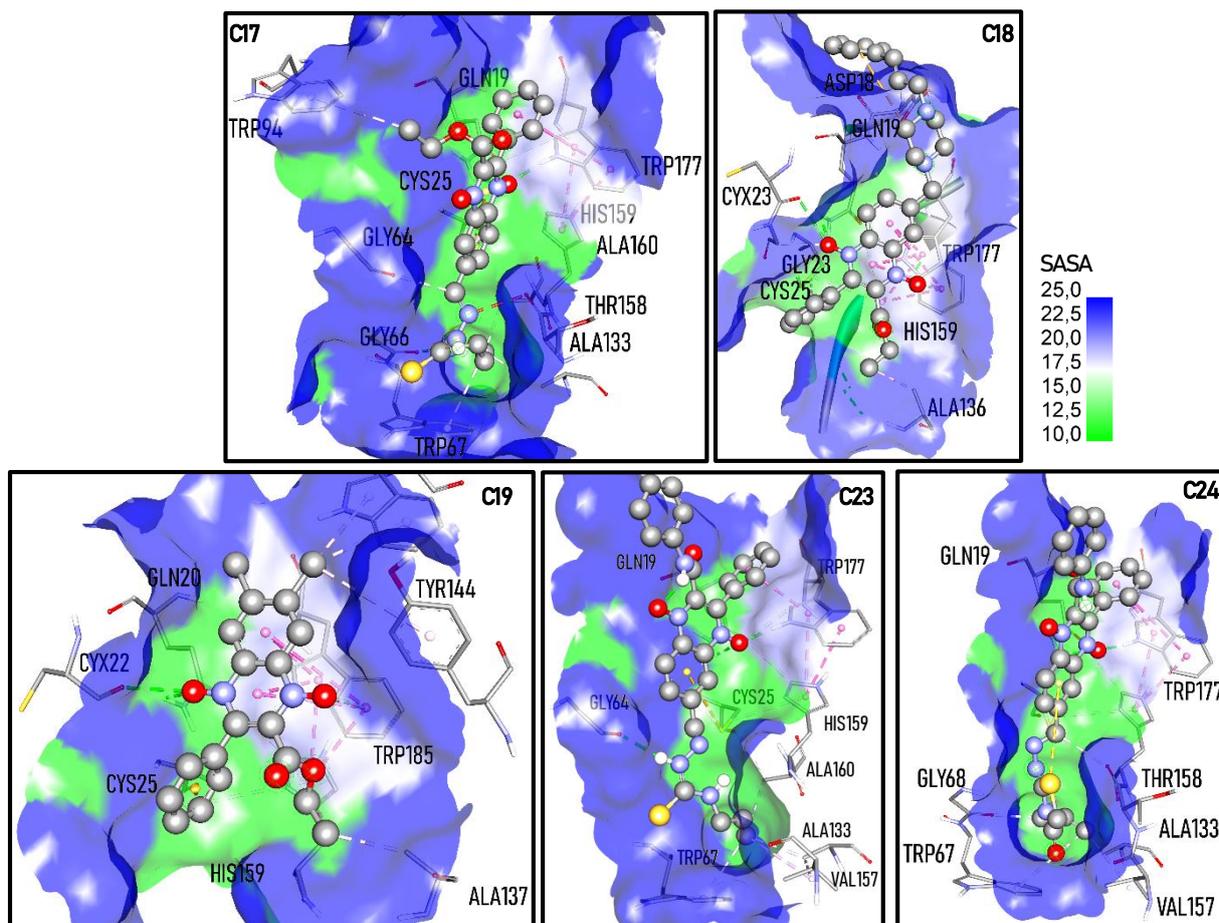


Figura 27.- Accesibilidad al disolvente para *Fh*CL3 de los sitios en los que se ubican los compuestos con fenilo en R2. En *sticks* delgados se representan los aminoácidos que interactúan con los compuestos. Nótese la interacción hidrofóbica entre la His 159, que forma parte de la diada catalítica, y el Trp 177 del bolsillo oxianiónico. La proteína está representada en *surf* coloreada según su accesibilidad al disolvente (SASA), de menor (verde) a mayor (azul) como indica la referencia.

#### 5.4.2 Resultados de dinámica molecular (MD)

Esta técnica de simulación computacional permite obtener una visión más adecuada del modo de interacción de una molécula pequeña (en este caso nuestros compuestos de interés) con una proteína, pero cuando se lleva a cabo empleando un campo de fuerza atómico clásico como el que se aplicó en el trabajo de esta tesis, no podrá dar información sobre una eventual reacción química entre ambos, pero puede sugerir si la reacción tiene chance o no de ocurrir en función de la distancia a la que se encuentran los grupos reaccionantes y el modo en que se aproximan[139]. Se estudiaron por dinámica molecular clásica los complejos ligando-proteína establecidos con los siguientes derivados: **C7**, **C17**, **C18** y **C21**. En particular se profundizó en este análisis con el compuesto **C17**, debido a su bajo  $IC_{50}$  y su eficaz actividad fasciolicida sobre el

estadio juvenil del parásito a las 24 horas de cultivo. Para estos estudios se utilizó como estructura de partida de cada complejo para realizar las simulaciones aquella correspondiente al *cluster* más poblado obtenido para cada compuesto en el *docking* molecular.

#### 5.4.2.1 Resultados de dinámica molecular con *FhCL1*

Uno de los primeros parámetros estructurales a analizar es el RMSD (del inglés *Root-Mean Square Deviation*) calculado a partir de las posiciones de los carbonos  $\alpha$  del esqueleto proteico con respecto a una estructura de referencia, en este caso el resultado de la primera minimización clásica en la que sólo se relajan las moléculas de agua y contra iones, es decir la que corresponde al complejo seleccionado del *docking* molecular (Figura 28),

Se observa que el RMSD de la proteína se mantiene estable en un valor inferior a 1 Å durante los 100 ns de dinámica para los complejos formados con **C7**, **C17** y **C18** lo que señala que la proteína no experimenta una gran adaptación respecto a la estructura del modelo de homología de referencia usada para el *docking*. No obstante, para **C21** a los 40 ns sí se observa un aumento al doble del valor inicial medio que retorna al mismo luego de otros 20 ns de simulación, lo que habla de un cambio conformacional reversible. Indagando sobre qué es lo que produce esta variación estructural en la proteína se observó un cambio drástico a nivel del dominio C-terminal. Al analizar la variación estructural a lo largo de cada trayectoria mediante *clusters*, fue posible obtener una estructura representativa del 70% de las capturas de la trayectoria y una segunda que representa casi el 20% restante de las mismas. Esta última se corresponde con los 20 ns en los que se observa el salto. Entre ambas estructuras es posible observar RMSD altos a nivel de la región próxima al C-terminal, pero no parece haber grandes cambios en el resto de la enzima (Figura 28 arriba e izquierda). Por su parte los ligandos se desplazan respecto a las posiciones señaladas en las estructuras emergentes del *docking*, en particular para el caso de **C21** (Figura 28 arriba, derecha).

En cuanto al RMSF para la proteína en los distintos complejos (del inglés *Root-Mean Square Fluctuation*), esta medida de flexibilidad estructural señala la presencia de una región donde la proteína se rigidiza levemente respecto a la estructura del modelo por homología de referencia. Dicha región abarca aproximadamente del residuo 60 al 110, entre los que se encuentran algunos residuos de los sub-sitios S2 y S3 (ver Introducción, Figura 12). Estas regiones presentan además cambios a nivel de su estructura secundaria con incrementos en el carácter

de hélice  $\alpha_{3-10}$  en presencia de todos los inhibidores y mayor para **C17** y **C18** (Figura 29) y variaciones a nivel del giro de hoja beta, que si bien tienen menor frecuencia, abarcan varias regiones de la proteína. En particular, se pueden destacar dos sitios, uno que incluye algunos residuos de los sub-sitios (100 a 110) y otro en los alrededores de los mismos (125 a 130) (Figura 29).

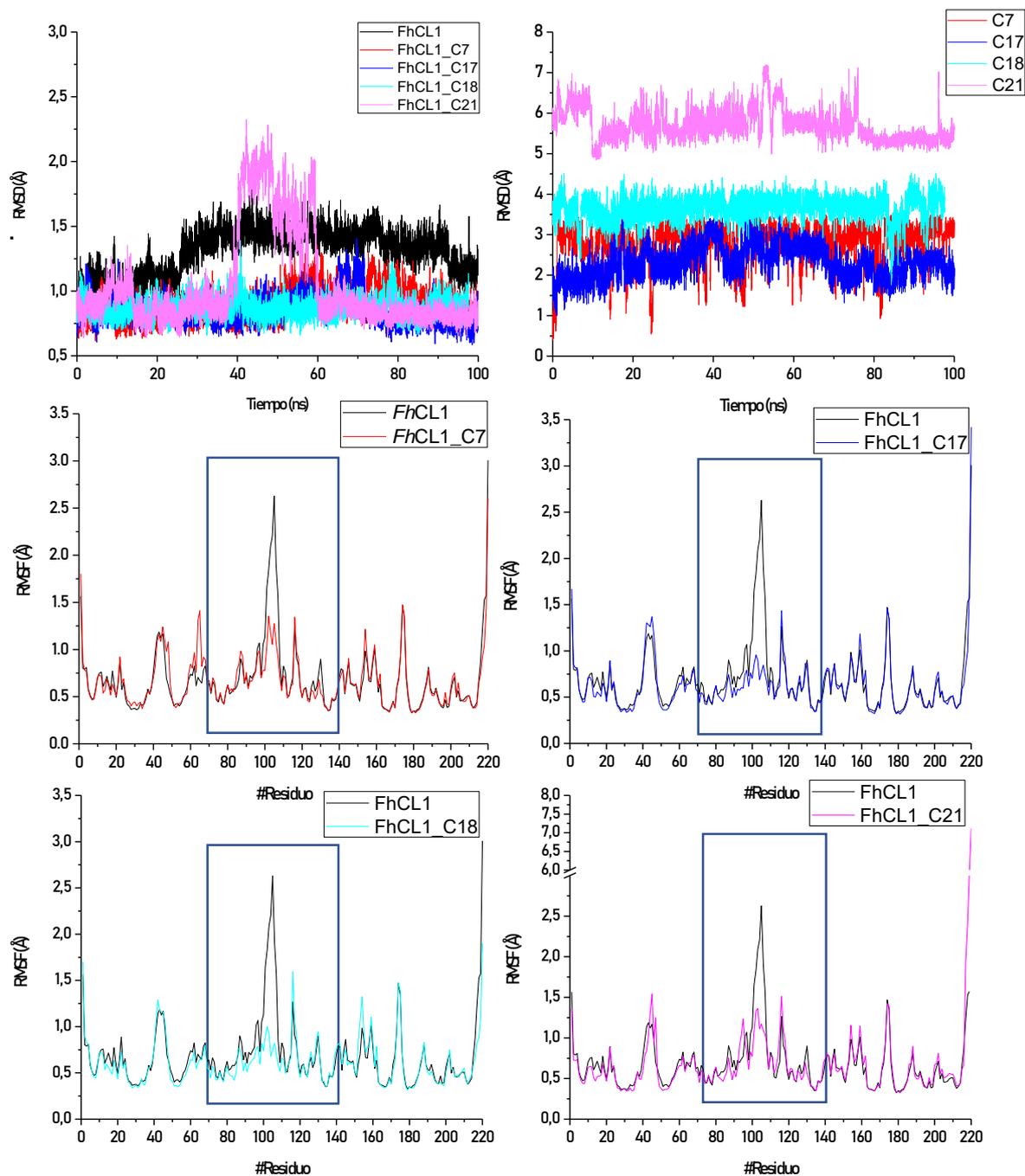


Figura 28.- RMSD y RMSF para los complejos ligando-*FhCL1*. Arriba: RMSD de la proteína considerando los carbonos  $\alpha$  a lo largo de 100 ns de MD (izquierda) y para los compuestos que se indican en la leyenda (derecha). Medio y Abajo; RMSF promedio por residuo considerando 100 ns de dinámica para cada complejo. Los cuadros azules evidencian las regiones en que se encuentran cambios con respecto a la enzima nativa.

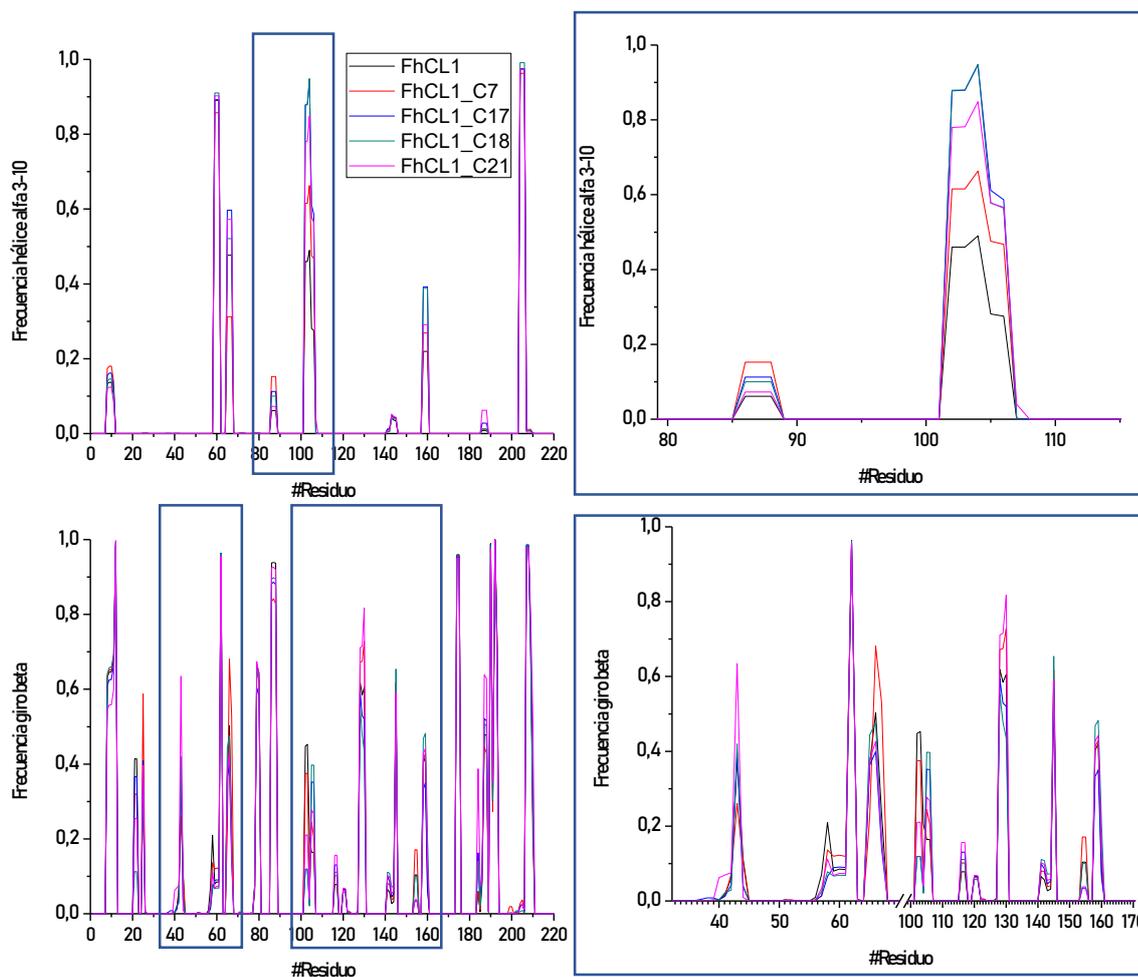


Figura 29.- Análisis de estructura secundaria por residuo de *FhCL1* a lo largo de 100 ns de MD en presencia de los compuestos. Gráficos correspondientes al valor promedio de la frecuencia de hélice  $\alpha_{3-10}$  (arriba) y giro asociado a estructuras  $\beta$  (abajo) para cada residuo. A la derecha para el total de los residuos y a la izquierda una ampliación de las regiones de interés.

Al comparar los complejos obtenidos por *docking* molecular con los respectivos derivados como más representativos de cada simulación de MD que parte de los primeros, se aprecia que los sitios de interacción ligando-proteína se mantienen a grandes rasgos, si bien en los complejos con **C18** y **C21** se aprecian cambios en el posicionamiento de algunas regiones de los compuestos. Por ejemplo, en el caso de **C18**, el sustituyente R3 se desplaza desde la hendidura catalítica hacia el *loop* 1, en tanto se observan cambios a nivel de la región C-terminal con respecto a la estructura inicial de la enzima (Figura 30). Si observamos el complejo obtenido para **C21**, también evidencia un cambio importante en la conformación del compuesto (indicado en el análisis de evolución temporal de su RMSD) que establece interacciones intramoleculares entre los

sustituyentes, aunque permanece en el sitio la mayor parte del tiempo de simulación potencialmente obstaculizando la interacción del sustrato.

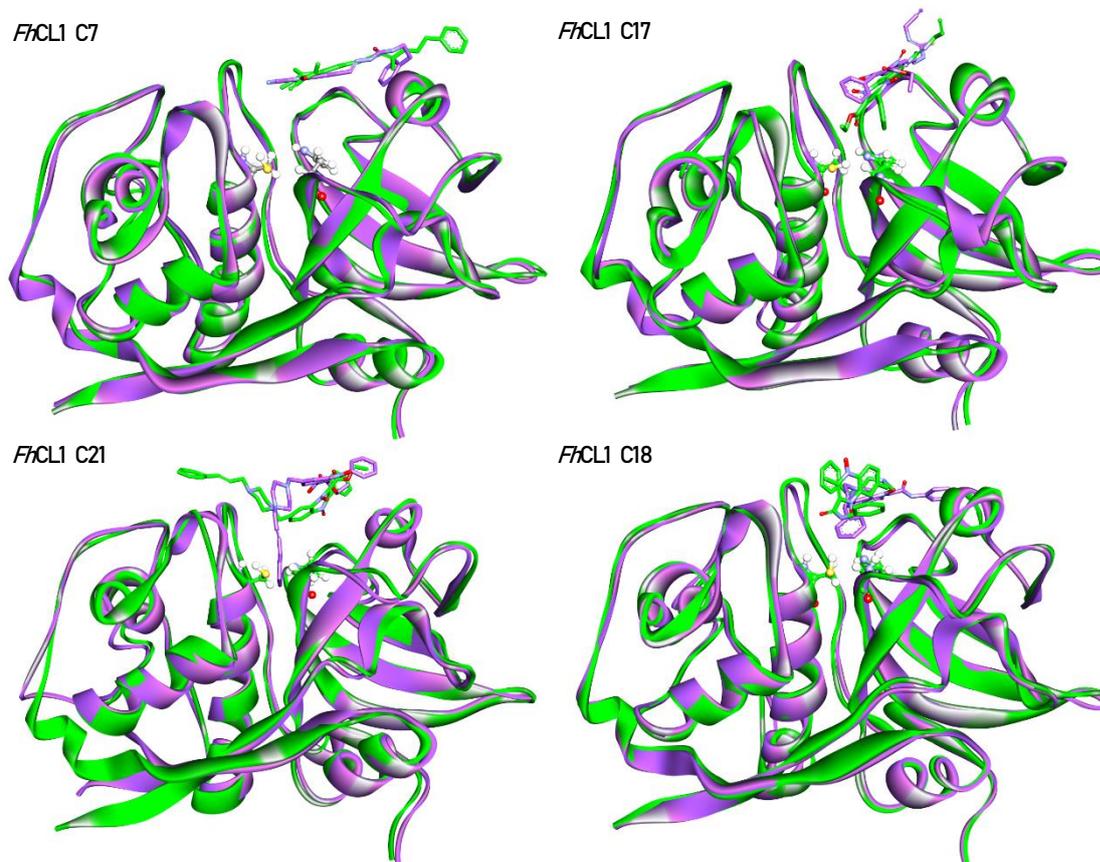


Figura 30.- Posición de los compuestos obtenida en *docking molecular* vs. MD. Las imágenes muestran superpuestos los *clusters* más representativos obtenidos de la dinámica (verde) con los complejos de partida tomados del *docking* (violeta). En *New Cartoons* se representa *FhCL1* y en *sticks* a los ligandos para cada complejo con sus carbonos coloreados igual que la proteína. A modo de referencia se incluyen la cisteína 25 y la histidina 159 de la díada catalítica. Con un óvalo naranja se marca el cambio del *C-terminal* en presencia de **C18**.

#### 5.4.2.2 Resultados de dinámica molecular con *FhCL3*

Se observa un RMSD muy ligeramente inferior para la enzima en complejo con **C7**, **C17**, **C18** y **C21** respecto a la misma sin ligandos, indicando que la presencia del ligando estabiliza la estructura proteica en todos los casos. Los complejos con **C7** y **C17** se comportan en forma similar a la estructura proveniente del *docking*, en tanto **C18** y **C21** muestran mayor variabilidad estructural ante la relajación de la proteína. Al analizar la flexibilidad del esqueleto proteico (RMSF por residuo), se pueden observar cambios en ciertas regiones de la proteína, sutiles en todos los casos excepto para **C21**. Se observan variaciones en el sub-sitio S3 en los residuos 60 al 80 y en la región del sub-sitio S2 que comprende el triptófano 177 del bolsillo oxianiónico. En el caso de

**C21** se observa un cambio en la flexibilidad de toda la proteína en presencia del inhibidor con respecto a la proteína nativa (Figura 31).

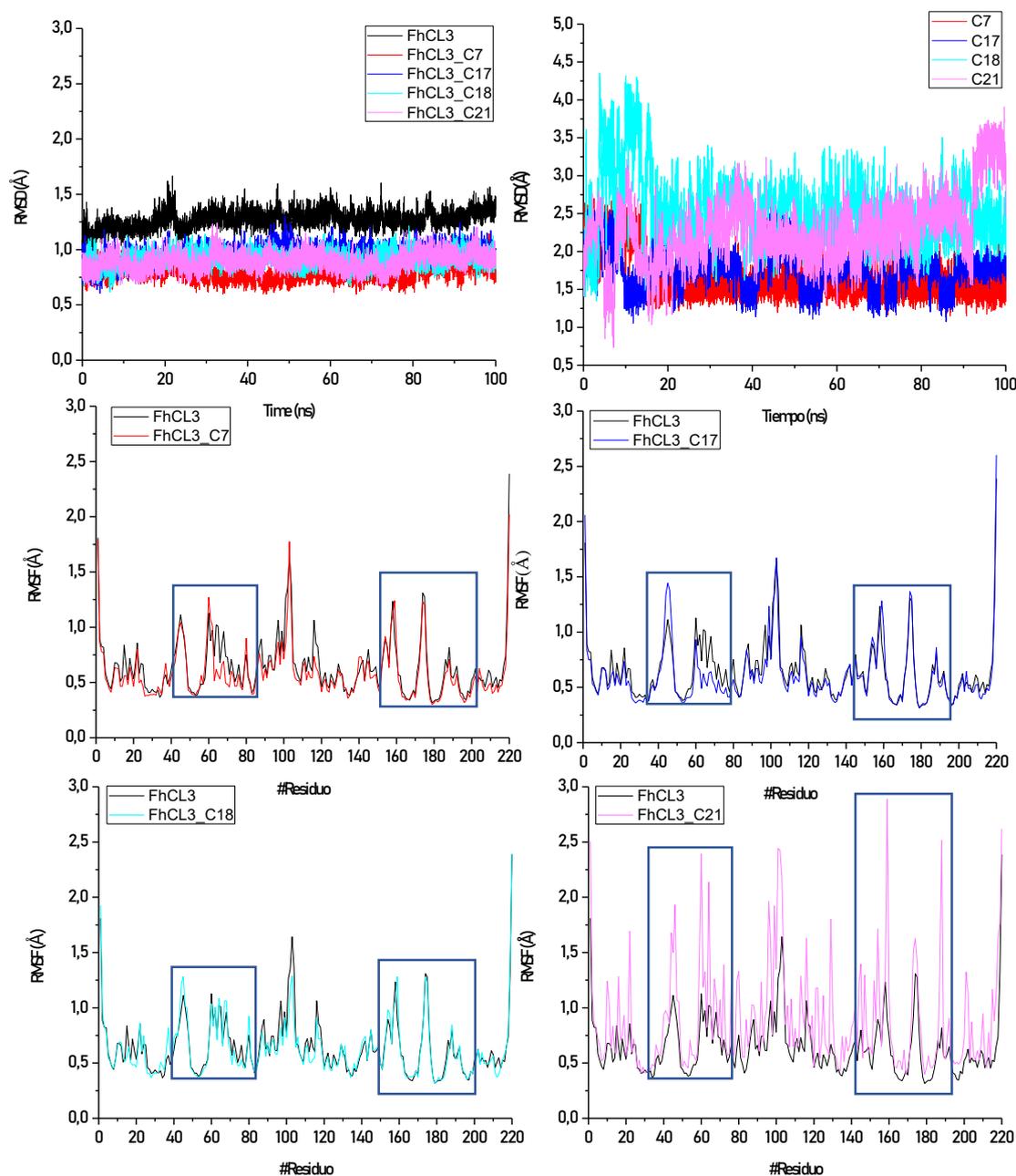


Figura 31.- RMSD y RMSF para los complejos ligando-*FhCL3*. Arriba: RMSD de la proteína considerando los carbonos  $\alpha$  a lo largo de 100 ns de MD (izquierda) y para los compuestos que se indican en la leyenda (derecha). Medio y Abajo; RMSF promedio por residuo considerando 100 ns de dinámica para cada complejo. Los cuadros azules evidencian las regiones en que se encuentran cambios con respecto a la enzima nativa.

Del análisis de estructura secundaria surge que las regiones con mayor variación están en las inmediaciones del bolsillo S3 (residuos entre 60 y 80) y en residuos cercanos al S2 correspondientes al *loop*1. Por otra parte, al observar la frecuencia de las hojas  $\beta$  se observa un leve cambio en las inmediaciones del sub-sitio S3 (residuos entre 60 y 70), más notorio en glicina 68, que parece adoptar esta estructura secundaria con mayor frecuencia en presencia de **C7** y menor frecuencia en presencia de **C17** (Figura 32).

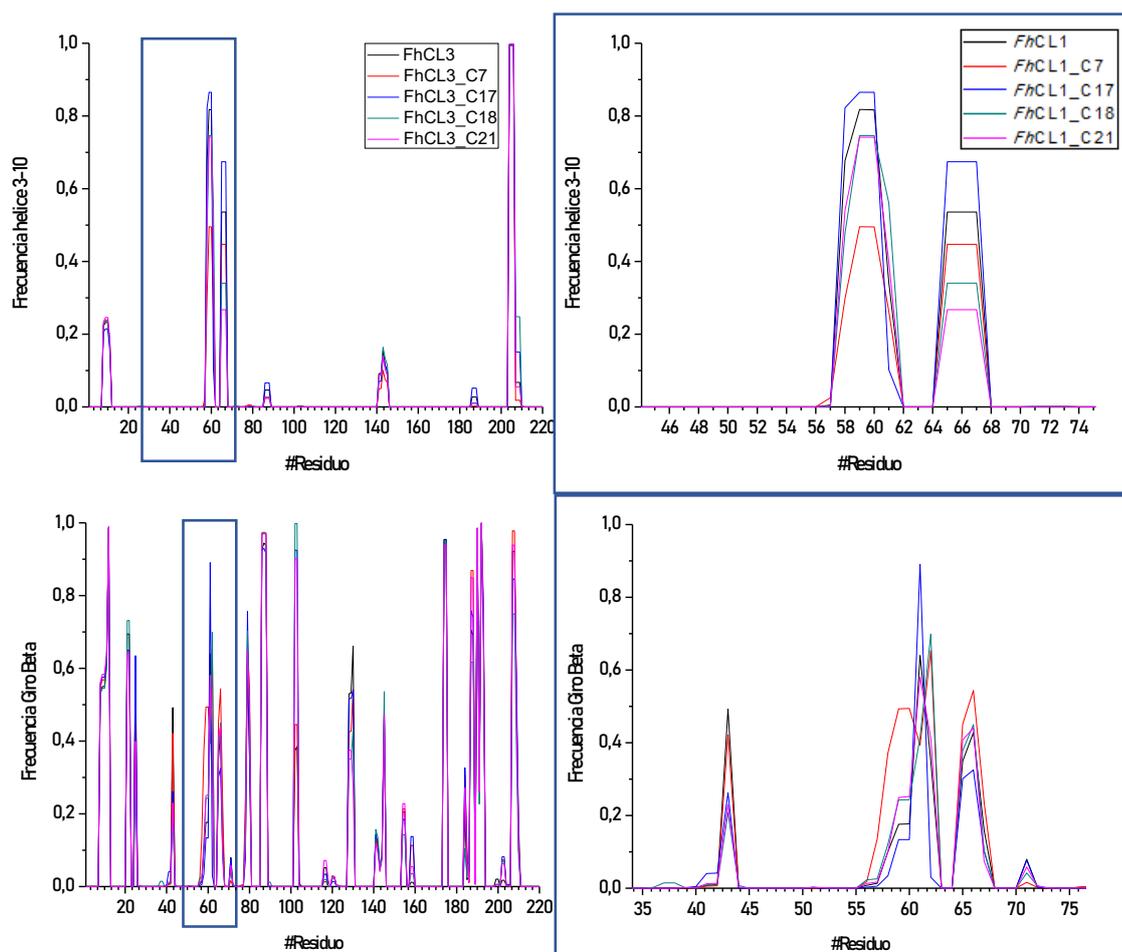


Figura 32.- Resultados del análisis de estructura secundaria promedio a lo largo de los 100 ns de MD para cada residuo en *FhCL3* en presencia de los compuestos. Gráficos correspondientes al valor promedio de la frecuencia de hélice  $\alpha_{3-10}$  (arriba) y giro asociado a estructuras  $\beta$  (abajo) para cada residuo, a la derecha el total de los residuos y a la izquierda una ampliación de las regiones de interés.

Regresando sobre los cambios detectados sobre la estructura del ligando a lo largo del tiempo de simulación, tras el análisis de RMSD sobre las simulaciones de 100 ns de cada uno de los ligandos se generaron 5 *clusters* a partir de las estructuras extraídas del curso temporal de la MD agrupadas por semejanza en las posiciones del esqueleto peptídico (carbonos  $\alpha$ ), obteniéndose en cada caso una estructura promedio representativa por *cluster*. Al igual que se señaló para los complejos formados con *FhCL1*, si bien se aprecian diferencias en la disposición

de cada ligando que afectan las interacciones específicas de cada compuesto con *FhCL3* (en particular para **C21**) la predicción de los sitios donde se alojarían los compuestos por MD se mantiene similar a la obtenida por *docking* molecular que dio el punto de partida para la simulación (Figura 33). Esto indicaría que, excepto para **C21**, la relajación de la proteína no induce cambios mayores sobre el posicionamiento del ligando respecto a cómo se lo localiza por *docking* sobre estructuras extraídas de dinámicas de las proteínas sin ligandos.

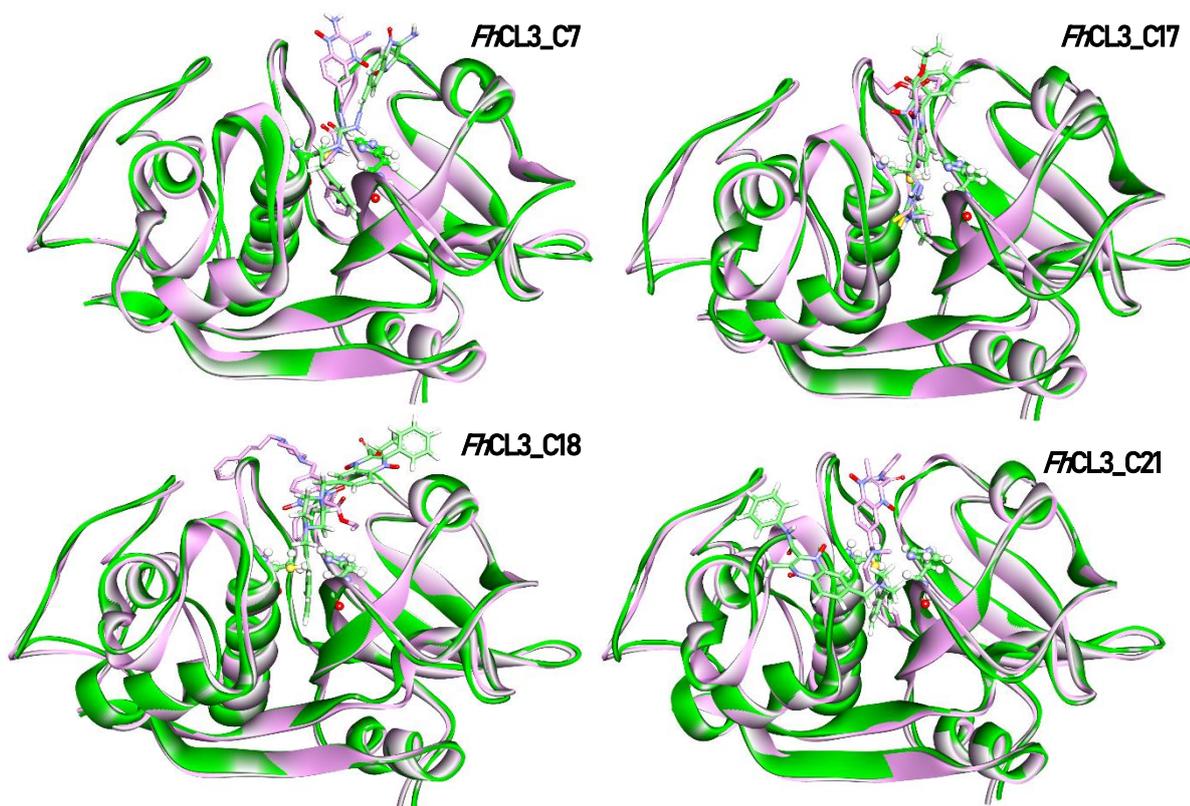


Figura 33.- Posición de los compuestos obtenidas en *docking* molecular vs. MD. Las imágenes muestran superpuestos los *clusters* más representativos obtenidos de la dinámica molecular (verde) con los complejos de partida tomados del *docking* (violeta). En *New cartoons* se representa *FhCL3* en cada caso y en *sticks* a los ligandos para cada complejo con sus carbonos coloreados igual que la proteína. A modo de referencia se evidencian la cisteína 25 y la histidina 159 de la díada catalítica.

Al analizar el RMSD para los ligandos es posible ver que en los primeros 20 ns varía considerablemente en todos los compuestos que están interaccionando con *FhCL3* (Figura 31), Este resultado en sí mismo es un indicio de cambios en la estructura del ligando asociados a su interacción con la enzima en la MD. Luego de ello se observa la estabilización del RMSD, en valores del entorno de los 3 Å. Al igual que lo observado para *FhCL1* los sitios en los que se alojan los compuestos son similares a los encontrados en el *docking* molecular (Figura 33), apoyando los resultados obtenidos mediante ambos métodos.

### 5.4.2.3 Resultados obtenidos para C17 tanto en *FhCL1* como en *FhCL3*

El compuesto **C17** es el más prometedor considerando su alta inhibición de los blancos moleculares *in vitro*, su actividad fasciolicida en cultivos con JRD y su selectividad similar a TBZ (fármaco de uso terapéutico) tanto en esperma como en HepG2. Para obtener información detallada de las interacciones que se establecen entre este compuesto y ambos blancos moleculares se realizó un análisis más profundo de los resultados que surgen de la dinámica molecular.

En primer lugar, para *FhCL3* se puede ver una ubicación más profunda del compuesto en la hendidura catalítica, con respecto al sitio obtenido para *FhCL1*. En ese sentido se produce una interacción estrecha con la Cys 25 de la díada catalítica y con los bolsillos S2 y S3, que están involucrados en el posicionamiento del sustrato y la catálisis. Se observan varias interacciones hidrofóbicas entre la tiosemicarbazona y Gly 66, Met 68, Ala 133, Val 157 y Ala 160 de los bolsillos S2 y S3. Otra interacción a destacar es el enlace de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo del éster y el NH del grupo indol del Trp 177, con un ángulo de 165 ° y una distancia O-N de 3,0 Å, identificado en la estructura más representativa y una interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el core *N*-óxido con Trp 177, junto con una interacción electrostática ( $\pi$ -catión) con Trp 67 (Figura 34). En particular, se ha observado que este último residuo sería crucial para la actividad enzimática [137].

En cuanto a los resultados obtenidos para la interacción de **C17** con *FhCL1*, se ve un posicionamiento más cercano a la díada catalítica con respecto al *docking* molecular. Se observa una movilidad mayor para este compuesto durante la MD que en promedio adopta una orientación diferente en comparación con *FhCL3*, por lo que los grupos éster y fenilo en R1 y R2 se posicionan cerca de la díada catalítica y no la tiosemicarbazona. Se producen interacciones hidrofóbicas entre el compuesto y Val 137, ubicada cerca del bolsillo S2, además de contactos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno con residuos que pertenecen al bolsillo oxianiónico: Gln 19 (entre el oxígeno del carbonilo del backbone y el NH de la tiosemicarbazona ángulo: 130 ° y distancia: 2,85 Å) y Trp 177 (O de *N*-óxido y NH del backbone, ángulo: 148 ° y distancia: 2,97 Å) (Figura 34), sitio en donde se estabiliza el estado de transición [175]

Estos resultados sugieren que la oclusión del bolsillo oxianiónico observada en ambos casos dificultaría el posicionamiento adecuado del sustrato para la catálisis. Es de destacar que

las interacciones de  $\pi$ - $\pi$  que se producen entre las secciones hidrofóbicas del compuesto con cada enzima contribuyen significativamente en la unión y están presentes en el caso de los compuestos con mejores porcentajes de inhibición.

Por otra parte, si analizamos la red de enlaces de hidrógeno intramolecular en la proteína tras su unión al compuesto, aparecen cambios en los aminoácidos que forman parte de los subsitios o sus inmediaciones en presencia de **C17** en ambas enzimas. Muchos enlaces de hidrógeno cambian su ocurrencia en presencia del compuesto, para *FhCL3* esto se ve particularmente en los residuos alrededor de los bolsillos del sitio activo (Figura 35). En *FhCL1*, la configuración del *loop1* rico en glicinas (residuos 52-67) que bordea el bolsillo S3 se modifica considerablemente, aunque **C17** no hace contacto directamente con esta región. Estos cambios en la estructura de las proteínas evidencian modificaciones conformacionales inducidas por la presencia del compuesto,

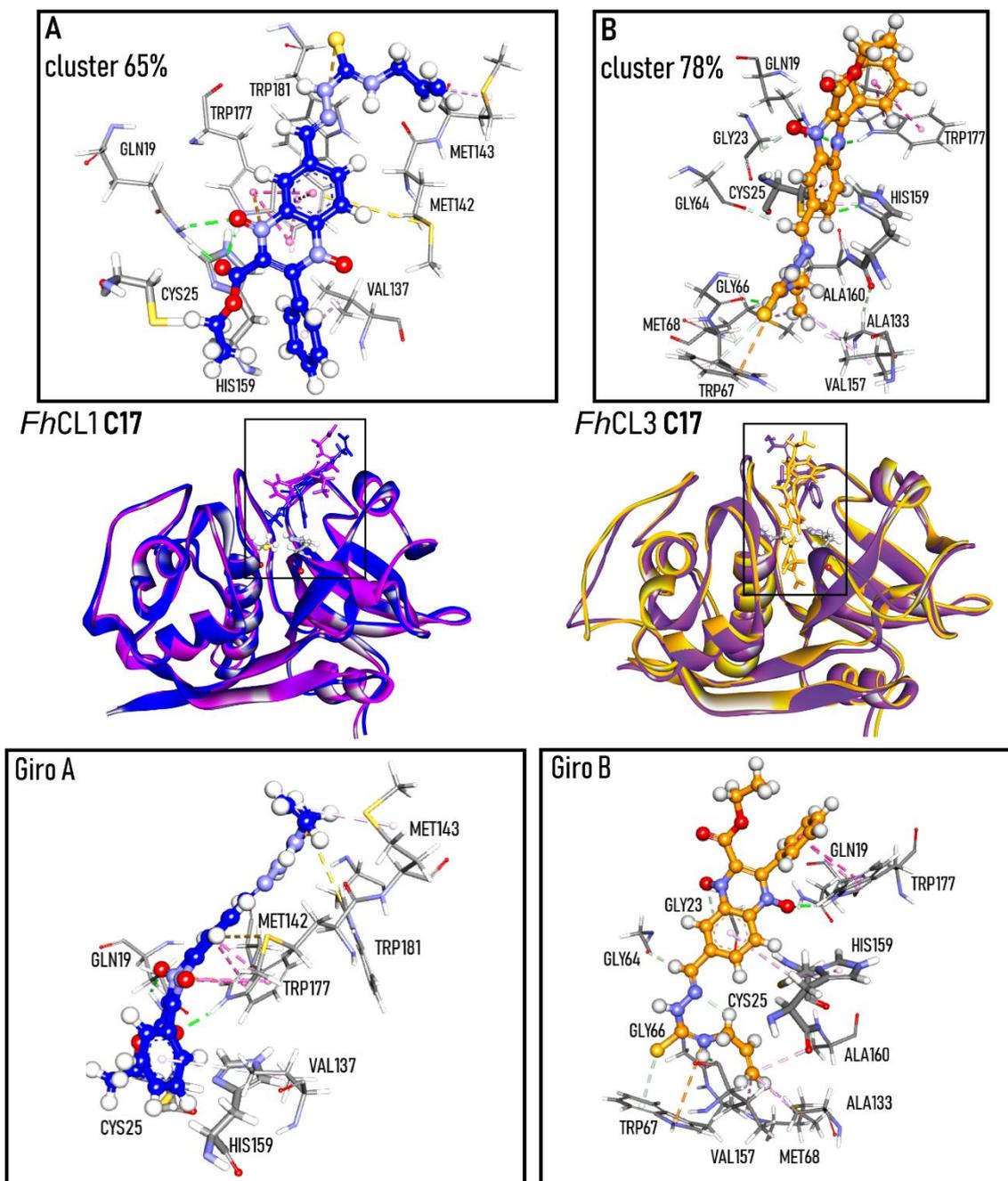


Figura 34.- Sitios de interacción de C17 con ambas enzimas en los complejos representativos de mayor peso extraídos de las MD. Al centro se representa la estructura del *cluster* de mayor peso para *FhCL1* (azul) y para *FhCL3* (naranja) en representación *new cartoon*, superpuesta a la estructura del complejo en el *cluster* más poblado del *docking* (violeta). Arriba se muestran acercamientos a la región de interacción de C17 con cada enzima, representando en *lines* los residuos con los que C17 interactúa y en *ball and sticks* su estructura, con los átomos de C coloreados en azul o naranja según corresponda a la interacción con *FhCL1* o con *FhCL3*. Las interacciones se evidencian con los siguientes colores: enlaces de hidrógeno en verde; interacciones hidrofóbicas en rosa;  $\pi$ -azufre en amarillo y  $\pi$ -catión en anaranjado. El panel inferior muestra el acercamiento desde un punto de observación rotado 90° hacia la izquierda.

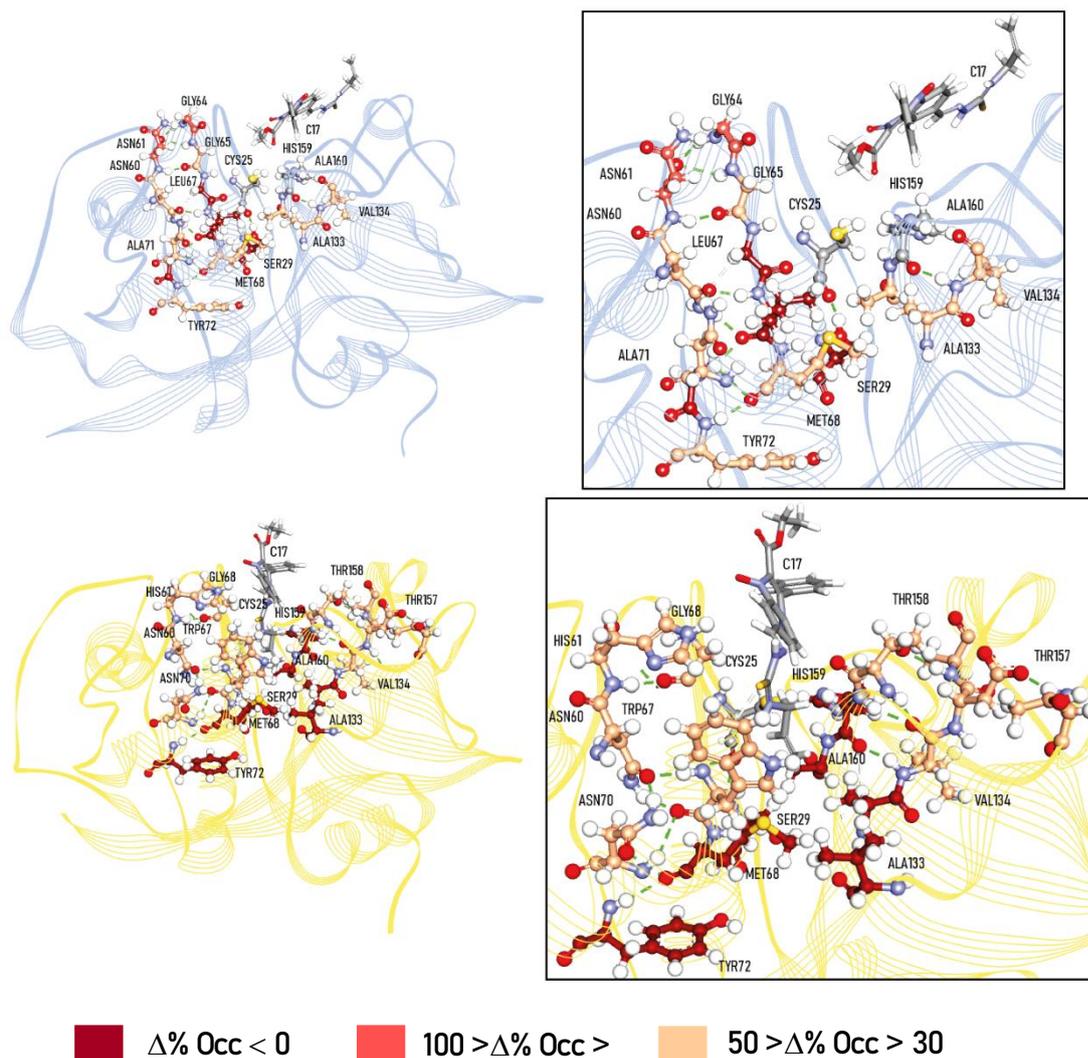


Figura 35.- Variación de la red de enlaces de hidrógeno (EdH) en presencia y ausencia de **C17** unido a *FhCL1* (arriba, en celeste) y *FhCL3* (abajo, en naranja). Los residuos involucrados en los EdH se representan en *ball and sticks*, coloreados por  $\Delta\% \text{ Occ}$  (variación en ocupación de EdH calculada con la fórmula  $\Delta\% \text{ Occ} = \% \text{ Occ}_{FhCL\_C17} - \% \text{ Occ}_{FhCL}$ ) mientras la díada catalítica Cys-His está coloreada por átomo y **C17** se representa en *sticks*. Los EdH se representan por líneas discontinuas verdes.

## 5.5 Estudio de selectividad de los mejores inhibidores con respecto a Catepsina-L humana

Los ensayos de selectividad con catepsina L humana (*HsCL*) fueron realizados a concentración fija, utilizando la concentración del *screening* inicial evaluando los mejores inhibidores de las enzimas parasitarias. Se obtuvo el  $IC_{50}$  para el compuesto líder **C17**, con un valor de 13  $\mu$ M, que es mayor al observado para las catepsinas de *F. hepatica*, Esto representa un índice de selectividad para *FhCL1* cercano a 10 (Figura 36). Además, los compuestos evaluados presentaron inhibición de la enzima humana menor al 40%, a excepción de **C23** que alcanzó cerca de un 60% (Figura 36). Si bien era esperable que los compuestos inhiban la *HsCL*, dada la similitud estructural con las enzimas del parásito, lo hacen con menor eficiencia. Por consiguiente, las concentraciones de compuesto necesarias para alcanzar el efecto antiparasitario serían menores, lo que minimizaría los efectos *off-target* no deseados.

Comp. (10 $\mu$ M)	<i>HsCL</i> %inh.	<i>FhCL1</i> %inh.	<i>FhCL3</i> %inh.
<b>C7</b>	41	90	61
<b>C17</b>	37	98	86
<b>C18</b>	25	55	61
<b>C19</b>	0	54	35
<b>C23</b>	57	97	79
	<i>HsCL</i>	<i>FhCL1</i>	<i>FhCL3</i>
$IC_{50}$ <b>C17</b> ( $\mu$ M)	13	1,4	4,9
Índice de selectividad		9,3	2,6

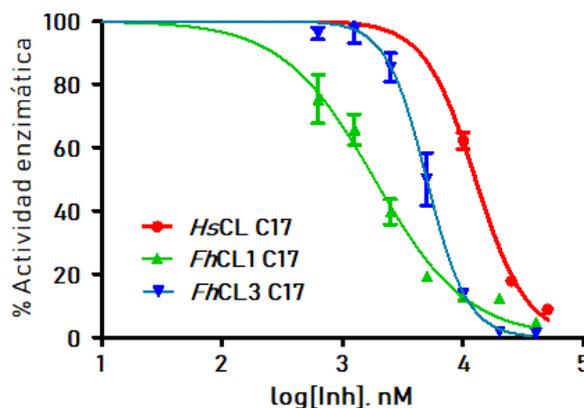


Figura36.- Ensayos de selectividad con Catepsina L humana (*HsCL*). A la izquierda se observa el porcentaje de inhibición a dosis fija 10  $\mu$ M y 30 minutos de incubación. Abajo se observa el  $IC_{50}$  de **C17**, calculado para las enzimas de *F. hepatica* y la catepsina L humana. A la derecha se muestra el gráfico concentración-respuesta para **C17** en ambas enzimas, empleando el desvío estándar para cada punto como valor para el error.

Si comparamos la configuración de los sub-sitios de las tres enzimas, hay muchos residuos que difieren entre ellas, particularmente en los bolsillos que forman parte de S2 y S3 (Tabla 3), que podrían explicar las diferencias observadas en la inhibición. Muchos residuos involucrados en las interacciones entre *FhCL3* y **C17** (64, 67, 157 y 160), varían entre las enzimas y principalmente si comparamos la catepsina humana con las de *F. hepatica*. Además, el residuo 205 ubicado en la parte inferior de S2 es Ala para *HsCL*, mientras que es Val y Leu en las catepsinas de *Fasciola*, lo que hace que este sub-sitio sea más profundo en la enzima humana

que en las análogas del parásito. El residuo 205 ha mostrado ser determinante en la especificidad de la catepsina L y K humanas para sustratos peptídicos cortos y moléculas pequeñas inhibitoras [50][98]. En cuanto a *FhCL1*, aunque la configuración del oxianión se conserva entre las tres enzimas, los otros residuos que interactúan con *FhCL1* son variables en *HsCL*. Mientras que *FhCL1* tiene Val en el residuo 137 y Met en los residuos 142 y 143, *HsCL* tiene Gly, Leu y Phe, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 3.- Análisis comparativo de los residuos de las enzimas de *F. hepatica* y *HsCL* (código PDB: 1MHM) que interactúan con el compuesto **C17** (en naranja los residuos que interactúan con *FhCL3* y en azul con *FhCL1*). Los residuos se numeran de acuerdo con la papaína (código PDB: 9PAP) como aparecen en la Figura 12 en la Introducción y el número correspondiente a cada enzima se muestra en los superíndices. Se indican los residuos pertenecientes a los sub-sitios.

Enzima	S3			S2/S3				S2		
Papaina#	61	64	66	67	137	142	143	157	160	205
<i>FhCL1</i>	Asn <sup>64</sup>	Gly <sup>67</sup>	Gly <sup>69</sup>	Leu <sup>70</sup>	Val <sup>139</sup>	Met <sup>144</sup>	Met <sup>145</sup>	Val <sup>161</sup>	Ala <sup>164</sup>	Leu <sup>210</sup>
<i>FhCL3</i>	His <sup>64</sup>	Gly <sup>67</sup>	Gly <sup>69</sup>	Trp <sup>70</sup>	Ala <sup>139</sup>	Tyr <sup>144</sup>	Met <sup>145</sup>	Thr <sup>161</sup>	Ala <sup>164</sup>	Val <sup>210</sup>
<i>HsCL</i>	Glu <sup>63</sup>	Asn <sup>66</sup>	Gly <sup>68</sup>	Leu <sup>69</sup>	Gly <sup>139</sup>	Leu <sup>144</sup>	Phe <sup>145</sup>	Met <sup>161</sup>	Gly <sup>164</sup>	Ala <sup>214</sup>

## 5.6 Estudio de la capacidad inhibitoria de híbridos flavonoide-quinoxalina

### 5.6.1 Evaluación *in vitro* e *in silico* de la inhibición de *FhCL1* y *FhCL3*

Gracias a la gentileza de la Dra. Pérez-Silanes fue posible evaluar 25 compuestos que conjugan en una misma estructura el heterociclo quinoxalina y un anillo aromático unidos mediante una cetona  $\alpha,\beta$  insaturada como es característico en las chalconas (**H1-H25**, Tabla 4). Dentro de estos 25 compuestos, 20 poseen un *core* de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (**H1-H20**, Tabla 4) y 5 derivados presentan el sistema quinoxalina reducido (**H21-H25**, Tabla 4). Hallamos 4 compuestos que inhiben ambas enzimas por encima del 50% (**H4**, **H13**, **H14** y **H17**) pero de los 25 derivados evaluados, 24 mostraron ser mejores inhibidores para *FhCL3* con respecto a *FhCL1* (Figura 37 y Tabla 4). Esto es interesante, ya que nuestros resultados previos mostraron una tendencia inversa para chalconas, flavonas, flavanonas, quinoxalinas, y varios otros compuestos con diversidad química, que inhibieron en mayor medida a *FhCL1* [110][127][176].

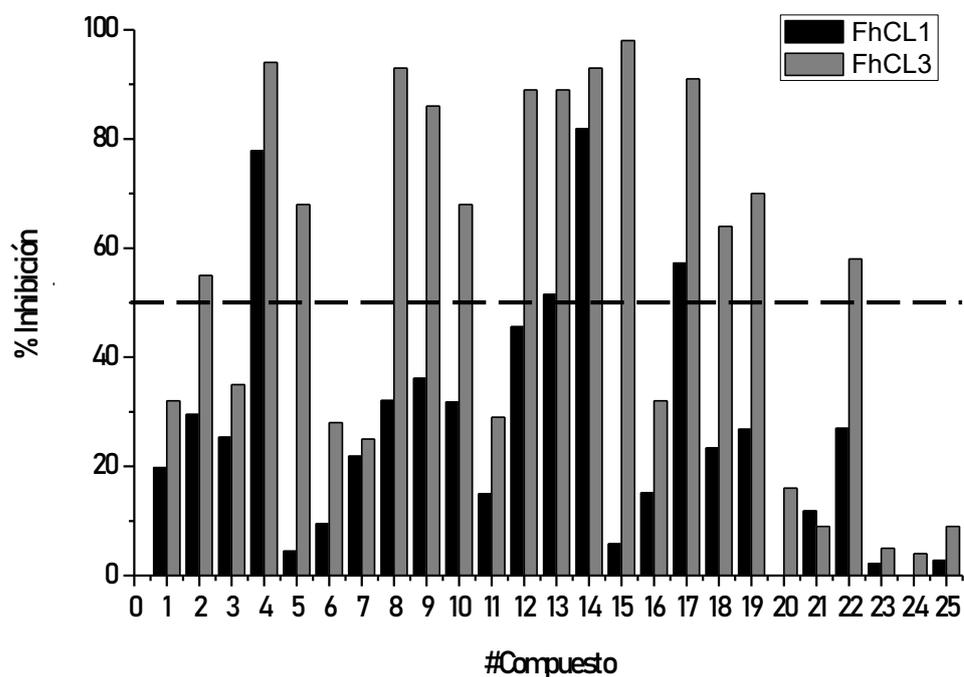
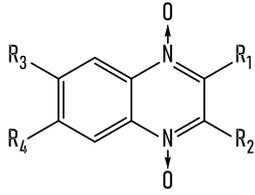
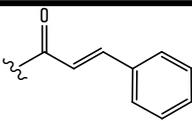
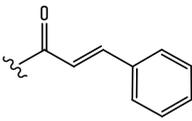
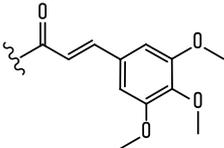
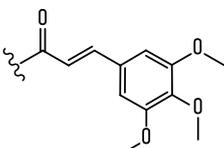
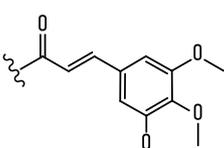
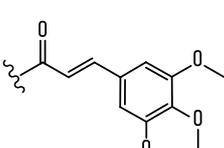
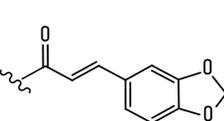
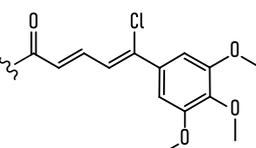
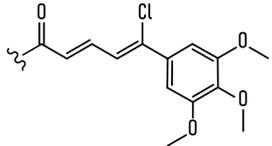
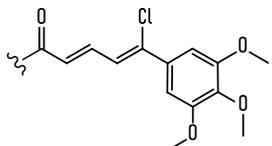
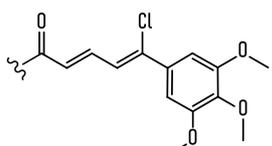
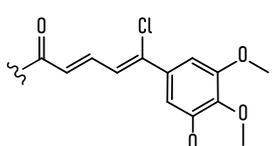
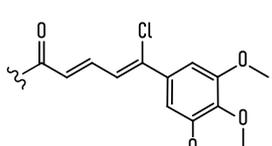
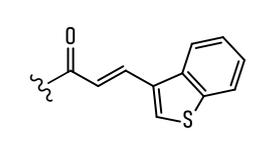
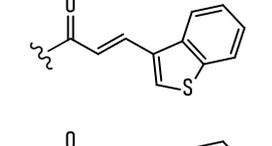
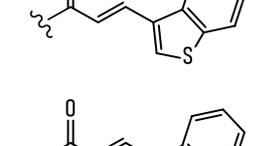
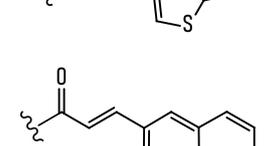
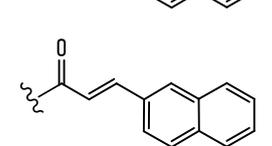
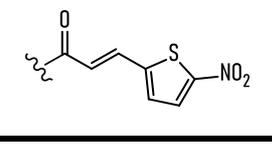


Figura 37.- *Screening* de compuestos flavonoide-quinoxalina como inhibidores de *FhCL1* y *FhCL3* evaluados a 10  $\mu\text{M}$ . En negro se muestra el porcentaje de inhibición correspondiente a cada compuesto para *FhCL1* y en gris el porcentaje correspondiente a *FhCL3*. La línea punteada determina el 50% de inhibición.

Tabla 4.- Porcentaje de inhibición para híbridos derivados de flavonoides y quinoxalinas.

						
Compuesto	R1	R2	R3	R4	<i>Fh</i> CL1	<i>Fh</i> CL3
H1		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	20	32
H2		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	30	55
H3		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	25	35
H4		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	78	94
H5		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	4	68
H6		-CH <sub>3</sub>	-F	-H	10	28
H7		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	22	25
H8		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	32	93

H9		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	36	86
H10		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	32	68
H11		-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	15	29
H12		-CH <sub>3</sub>	-F	-H	46	89
H13		-CH <sub>3</sub>	-Cl	-H	51	89
H14		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	82	93
H15		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	6	98
H16		-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	15	32
H17		-CH <sub>3</sub>	-F	-H	57	91
H18		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	23	64
H19		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	27	70
H20		-CH <sub>3</sub>	-Cl	-Cl	3	9

Compuesto	R1	R2	R3	R4	<i>Fh</i> CL1	<i>Fh</i> CL3
H21		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	8	16
H22		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	7	9
H23		-CH <sub>3</sub>	-H	-H	38	58
H24		-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	1	5
H25		-CH <sub>3</sub>	-F	-H	14	4

Para aproximarnos al modo de interacción de esta nueva serie de compuestos se realizó *docking* molecular con la misma metodología empleada para la serie de 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalinas. Al analizar los resultados para *Fh*CL1 se obtuvieron diversos sitios de unión y algunos de ellos muy lejanos al sitio activo. Para *Fh*CL3, se observa un sitio preferencial de unión para esta serie de híbridos (Figura 38), lo que podría explicar que en general los compuestos de esta serie ofrecieron un mayor porcentaje de inhibición para dicha enzima.

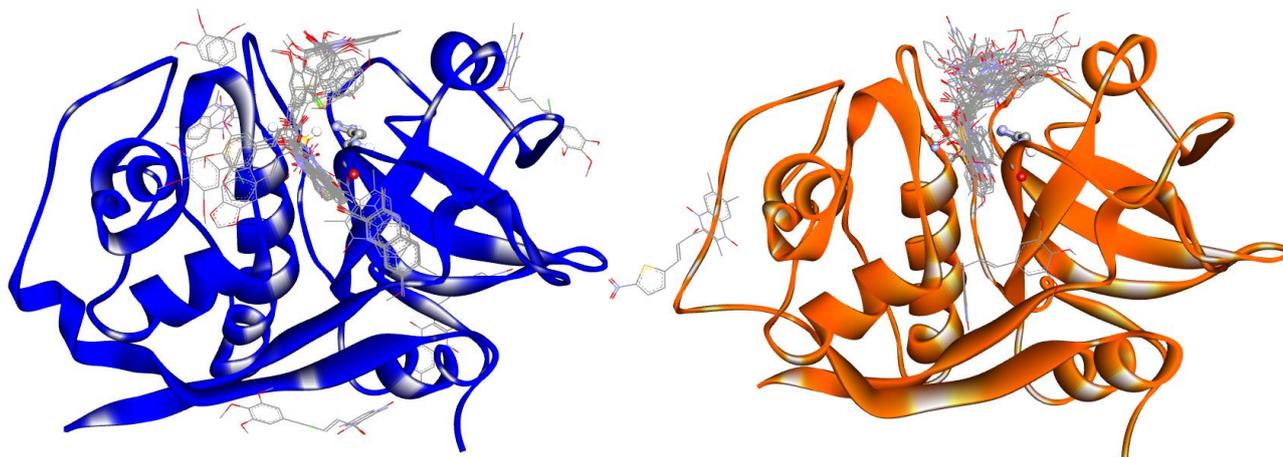


Figura 38.- Sitios de unión obtenidos por *docking* ligando–proteína. Las enzimas están representadas en *New Cartoon* (*FhCL1* en azul y *FhCL3* en naranja) mientras que los *clusters* más representativos para cada compuesto están representados en *lines*. En ambos casos se observa una distribución general de *clusters* próxima a la hendidura catalítica (marcada en rojo) para *FhCL1* y *FhCL3*. No obstante para *FhCL1* es posible observar una ubicación errática de los compuestos que podría explicar la tendencia a la menor inhibición de esta enzima.

Si analizamos los porcentajes de inhibición obtenidos para los diferentes compuestos, es posible observar tendencias asociadas a los sustituyentes del *core*1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina. La sustitución de metilos en R3 tiene una influencia positiva en la inhibición de ambas enzimas cuando se compara H1 con H2, H3 con H4, H9 con H10, y H18 con H19. Sin embargo, cuando comparamos la sub-familia con la quinoxalina reducida (H21–H25) la presencia de metilo en R3 en el heterociclo de quinoxalina no oxidado (H23 y H22) ofrece un comportamiento opuesto, siendo H23 el único derivado con moderada actividad de la sub-familia (Figura 37 y Tabla 4). Al observar el sitio en el que se ubica H22 al interactuar con *FhCL3* en el *docking* molecular, el metilo en R3 establece interacciones con la enzima que anclan al compuesto en una posición que no obstaculiza a la diada catalítica, mientras que en H23 la ausencia del mismo favorece una ubicación que abarca a la diada y alcanza el bolsillo oxianiónico (Figura 39).

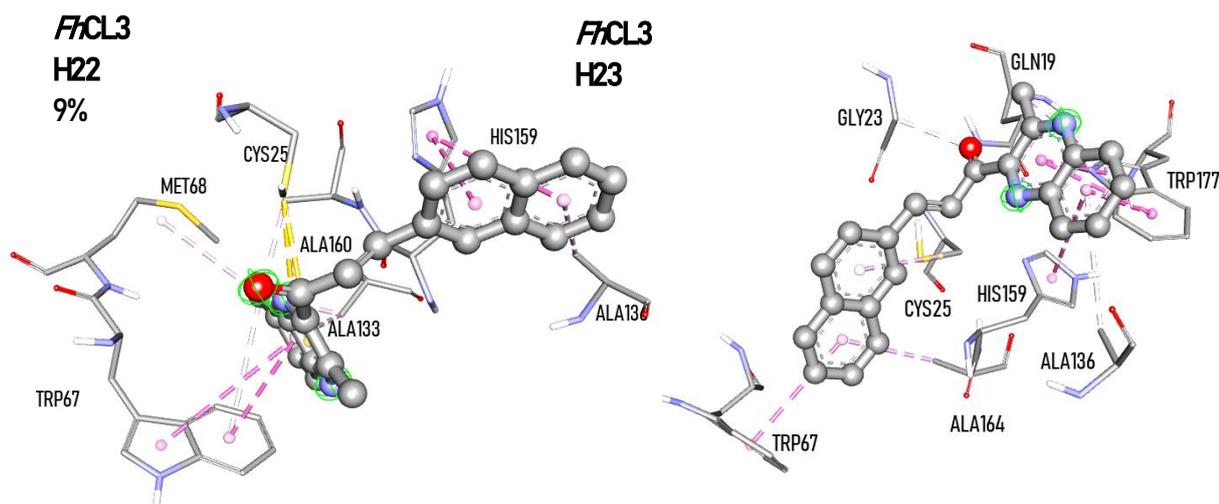


Figura 39.- Sitios de unión obtenidos mediante *docking molecular* para H22 y H23 con FtCL3. En *ball and sticks* se representan los compuestos; mientras que los residuos que interactúan en *sticks*. En líneas punteadas en rosado las interacciones hidrofóbicas de tipo  $\pi$ - $\pi$  y en amarillo interacciones  $\pi$ -azufre.

La inclusión de un metilo en R4 provoca un marcado descenso en la inhibición de FtCL1 cuando comparamos H4 con H5 y H14 con H15. Este comportamiento no se observa cuando analizamos la subfamilia H8-H13, caracterizada por una extensión del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado como espaciador entre el heterociclo quinoxalina y un fenilo trisustituido por metoxilos. En este caso se observa una tendencia al aumento de la inhibición a medida que aumenta la sustitución por metilos en las posiciones de R2 a R4 para FtCL3, sin modificar la actividad considerablemente en FtCL1 lo que se puede observar comparando los porcentajes de inhibición de H8, H9 y H10. Como se observa en la Figura 40 se aprecia una interacción cercana con los Trp 177 y 181 presentes en el bolsillo oxianiónico de FtCL3 y potenciales enlaces de hidrógeno con el loop 1, en el que se encuentran glicinas ampliamente conservadas en estas catepsinas [50]. El compuesto que presenta mayor inhibición (H8), con metilos en R2, R3 y R4, se posiciona de manera diferencial a H9 y H10. Se puede observar que en este caso el fenilo interactúa con el sub-sitio S2 mientras el anillo quinoxalina bloquea el bolsillo oxianiónico.

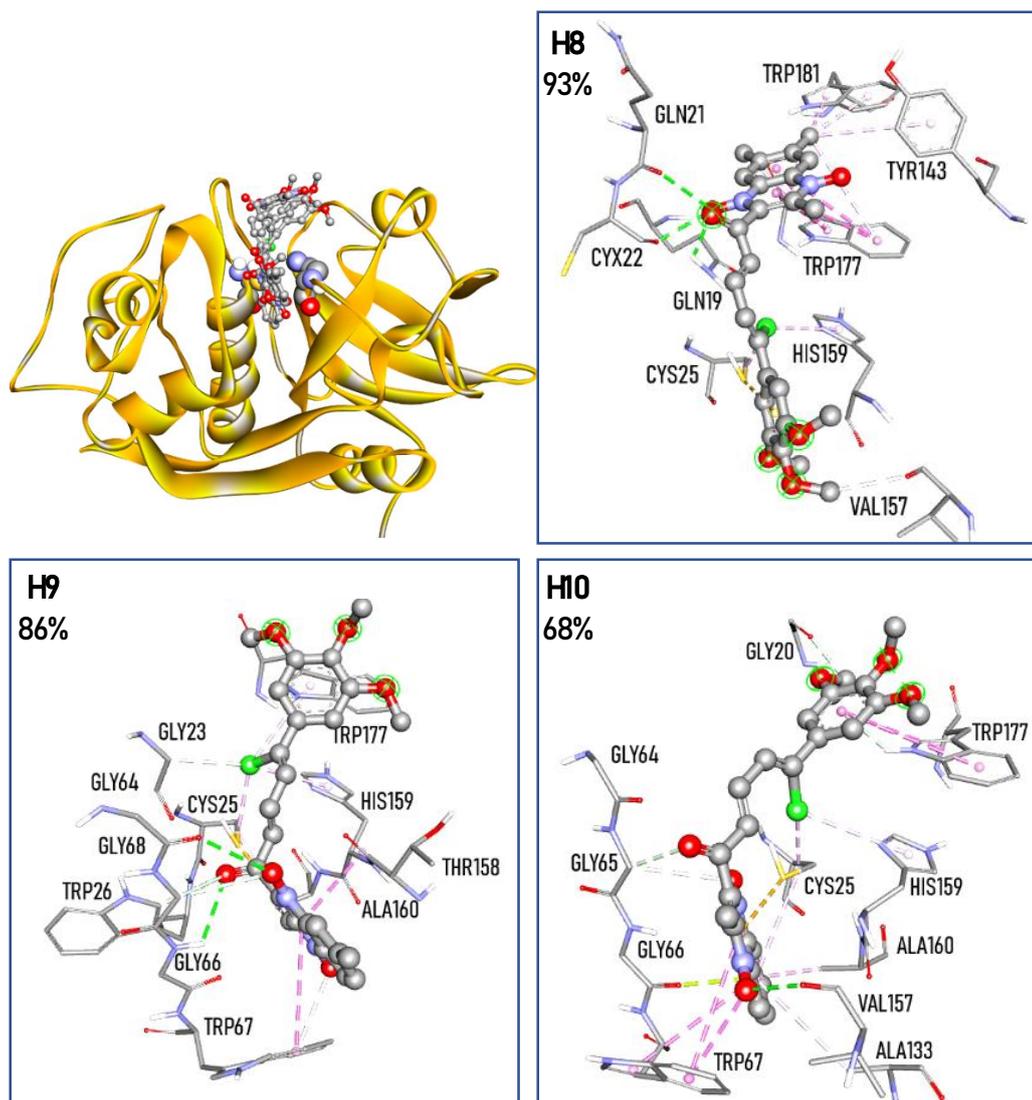


Figura 40.- Sitios de unión obtenidos mediante *docking* molecular para los compuestos **H8**, **H9** y **H10**, con *FhCL3*. Arriba representada en *new cartoon* y en color naranja se observa la enzima, con la diada catalítica en CPK y los compuestos en *ball and sticks*. Los residuos que interactúan se presentan en *sticks*. En líneas punteadas verdes y grises se observan los posibles enlaces de hidrógeno, en rosado las interacciones hidrofóbicas de tipo  $\pi$ - $\pi$  y en amarillo interacciones  $\pi$ -azufre. Las esferas huecas que rodean a los átomos en verde indican su exposición al solvente.

Los dos compuestos más activos de la serie, **H4** y **H14**, con porcentajes de inhibición mayores a 75 % en ambas enzimas poseen un metilo en R3. Para **H4** la quinoxalina ancla el compuesto a nivel del bolsillo oxaniónico para *FhCL3* estableciendo múltiples interacciones hidrofóbicas con Trp 177 y posicionando el carbonilo del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado con la orientación y distancia adecuadas para formar dos enlaces de hidrógeno con la Cys 25 de la diada catalítica y uno con la Gln 19 del bolsillo oxaniónico. Si analizamos lo que sucede para **H4** con *FhCL1*, la interacción de mayor relevancia observada son los enlaces de hidrógeno entre la Cys 25 y el metoxilo y otros

enlaces de hidrógeno que se forman por un posicionamiento de la quinoxalina hacia las profundidades del S2. Este cambio en la orientación relativa de la quinoxalina interaccionando con el bolsillo oxianiónico (hacia afuera de la hendidura) provoca un mayor porcentaje de inhibición, algo que también observamos para los compuestos **H8**, **H9** y **H10** con *Fh*CL3 (Figura 40) y para el compuesto **C17** de la serie de 1,4 Di-*N*-óxidos de quinoxalinas que inhibió un 98% a *Fh*CL1 y 86% a *Fh*CL3 (Figura 34).

Es interesante notar que cuando se adiciona un metilo en R4 (**H4** y **H5**, **H14** y **H15**) la actividad en *Fh*CL1 se vuelve despreciable. Si comparamos estos últimos en la Figura 41, se observa un cambio en el sitio de unión para **H15**, en donde el *core* quinoxalina queda más expuesto al disolvente y el compuesto sólo interacciona con S2 dejando expuesta la diada catalítica. En cuanto al modo de interacción de **H14**, es interesante destacar que el doble enlace del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado se posiciona muy próximo a la cisteína de la diada catalítica (a menos de 4 Å) favorecido por enlaces de hidrógeno, lo que podría propiciar un ataque nucleofílico.

La adición de grupos +M, -I como metoxilo o halógenos en la posición 7 del anillo de quinoxalina (R3) provocan una disminución en la actividad. Esta afirmación se puede extraer observando los porcentajes de inhibición de **H3** y **H6**, **H14**, **H16** y **H17** y **H23** y **H24** (principalmente para *Fh*CL1). Esta tendencia no se observa en la subfamilia de compuestos con el sistema  $\pi$  extendido (**H8**-**H13**). Aquí, la adición de F o Cl en R3 aumentan la actividad (comparar **H10** con **H12** y **H13**) y la sustitución con metoxilo disminuye la inhibición en ambas enzimas (**H10** y **H11**). En este caso no se evidenció una correlación directa entre los sitios y los modos de interacción observados en el *docking*, probablemente debido a las limitaciones que tiene este modelo en cuestiones electrónicas.

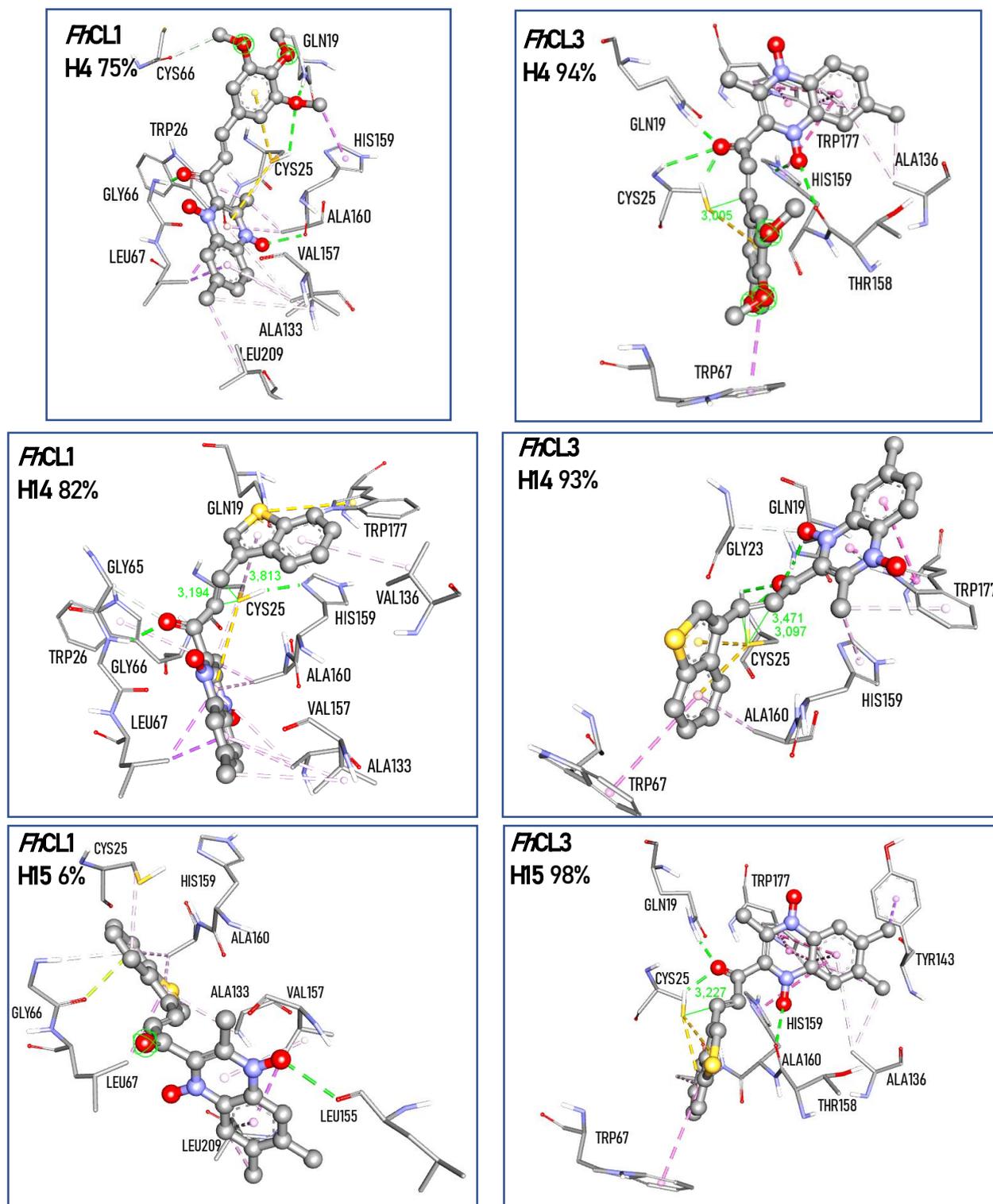


Figura 41.- Sitios de unión obtenidos mediante *docking molecular* para los compuestos con ambas enzimas. En *ball and sticks* se representan los compuestos mientras que los residuos que interactúan se presentan en *sticks*. Las líneas punteadas verdes y grises predicen posibles enlaces de hidrógeno, en rosado las interacciones hidrofóbicas de tipo  $\pi$ - $\pi$  y en amarillo interacciones  $\pi$ -azufre. En línea continua verde se indica la distancia entre el azufre de la Cys 25 y los carbonos del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado.

Todos los compuestos híbridos que poseen el heterociclo no oxidado de quinoxalina como anillo A de la estructura chalcona (**H21-H25**) constituyen la familia menos activa de la serie, mostrando el rol farmacofórico del núcleo de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina. A nivel de *docking* este comportamiento se explica en parte por la pérdida de interacciones debido a la ausencia del *N*-óxido, principalmente de enlaces de hidrógeno, lo que se puede ver claramente cuando comparamos para *Fh*CL3 **H17** con **H25** (Figura 42). No se observa este comportamiento si se analizan los porcentajes de inhibición de **H18** y **H23** pero las diferencias en las actividades entre los dos derivados son mucho más atenuadas y además **H23** resultó ser el único compuesto con actividad moderada en su familia (Tabla 4). Al comparar con **H25** es posible observar que dicho compuesto interacciona diferente con *Fh*CL3 (Figura 42), mostrando una ubicación similar a la serie *N*-oxidada e interaccionando con Trp 177 del bolsillo oxaniónico, el Trp 67 del sub-sitio S2 y la diada catalítica (Figura 42),

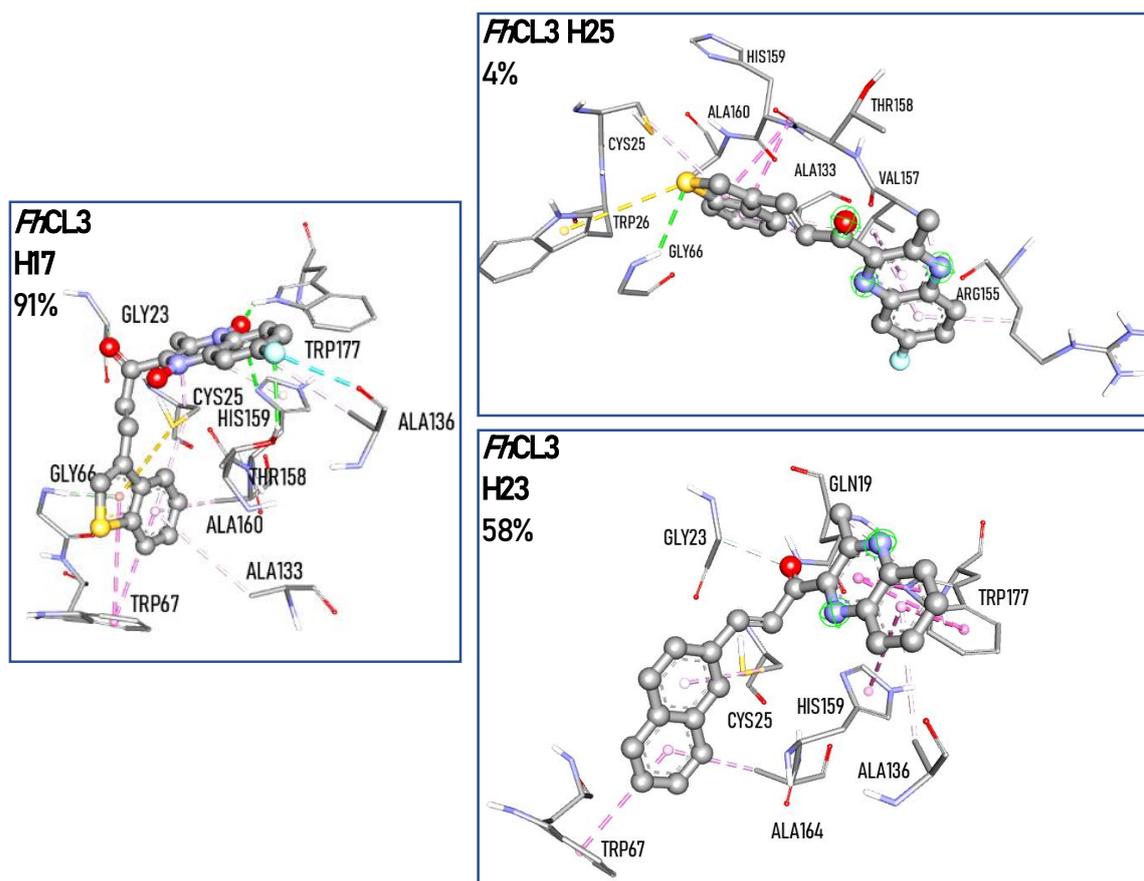
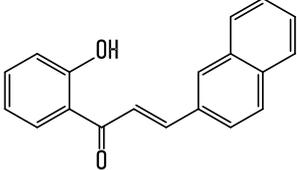
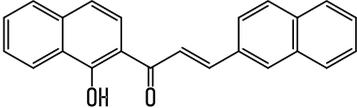
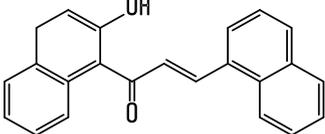
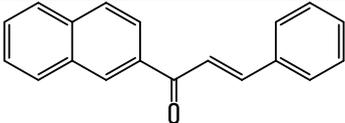
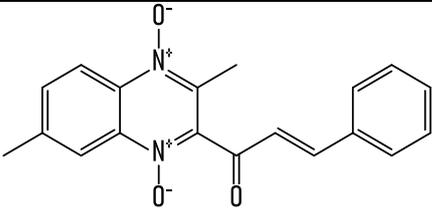
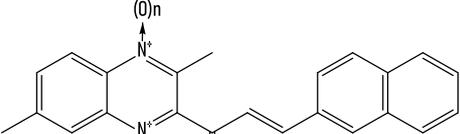
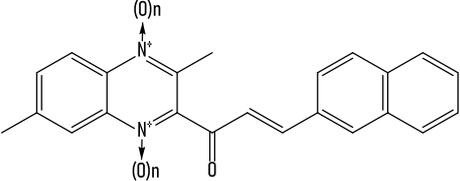
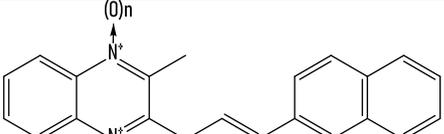
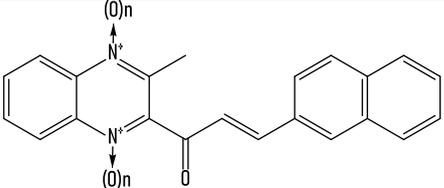


Figura 42.- Sitios de unión obtenidos mediante *docking molecular* para los compuestos **H17**, **H23** y **H25** con *Fh*CL3. En *ball and sticks* se representa el compuesto mientras que los residuos que interaccionan se presentan en *sticks*. En líneas punteadas verdes y grises se observan los enlaces de hidrógeno, en rosado las interacciones hidrofóbicas de tipo  $\pi$ - $\pi$  y en amarillo interacciones  $\pi$ -azufre.

El análisis de esta serie de compuestos nos permite también analizar el rol farmacofórico del *core* 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y comparar cómo influye el cambio bioisostérico naftaleno-quinoxalina en la actividad de estructuras tipo chalcona (Tabla 5). Los compuestos **H18** y **H19** presentan similitud estructural con compuestos *hit* previamente identificados por nosotros[127], ambos son chalconas con un naftilo como anillo A. Mantienen o aumentan la actividad frente a *Fh*CL3 con respecto a los compuestos padre y disminuyen la actividad en *Fh*CL1, característica típica como ya se discutió de la serie híbrida quinoxalina-chalcona.

Si analizamos los sitios en los que se ubican los flavonoides con la aromaticidad extendida previamente evaluados en mi tesina y los híbridos flavonoide-quinoxalina (Tabla 5), es interesante observar que el posicionamiento modelado por *docking* en ambas enzimas varía en correlación con la inhibición observada (Figura 43). Para *Fh*CL1 se observa un sitio de unión similar para los flavonoides que presentaron mayor inhibición **C31** y **C34** que coincide con el de los mejores compuestos de la serie híbrida **H4** y **H14** (Figura 43). Los mismos se posicionan de forma extendida a lo largo de la hendidura del sitio activo centrados en la díada catalítica y contactando residuos del bolsillo oxianiónico y del S2. En cambio, los compuestos con menor actividad inhibitoria (**H18**, **H19**, **H22** y **H23**), se posicionan en dos sitios más alejados de la díada Cys-His, Por su parte, en *Fh*CL3 se evidencian correlaciones similares, donde los compuestos con menor porcentaje de inhibición, **C31** y **H22** se colocan en sitios alejados de la díada catalítica, mientras los derivados más activos se alojan en la hendidura de forma semejante a lo observado para *Fh*CL1. Es interesante notar que los flavonoides se posicionan desde la díada catalítica hacia el bolsillo oxianiónico mientras los híbridos que mostraron buena inhibición se ubican además abarcando parte del S3 (interaccionando con el *loop* 3 rico en glicinas) y del S2 que está próximo a la His159.

Tabla 5.- Algunas de las chalconas con aromaticidad extendida por naftaleno previamente evaluadas en ambos blancos moleculares en comparativa con quinoxalinas como bioisómeros.

Compuesto	Estructura	% Inh. <i>Fh</i> CL1	% Inh. <i>Fh</i> CL3	
C31*		63	41	
C33*		65	29	
C34*		75	65	
C27*		65	13	
H2		30	55	
H19		$n=1$	27	70
H22		$n=0$	7	9
H18		$n=1$	23	64
H23		$n=0$	38	58

\*Chalconas descritas previamente como inhibidores de *Fh*CL1 y *Fh*CL3[127]

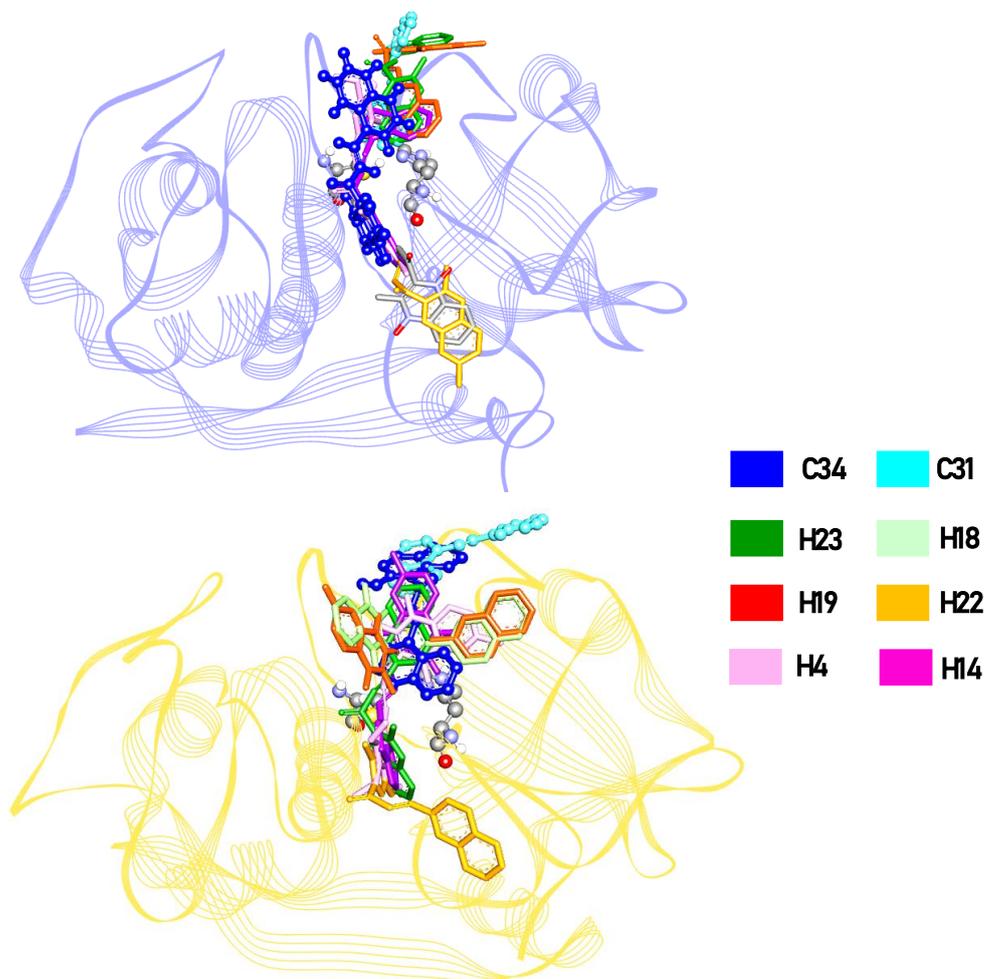


Figura 43.- Superposición de las poses principales obtenidas por *docking molecular* para los compuestos presentes en la Tabla 5 con ambas enzimas. En *line ribbon* se representan FtCL1 (azul) y FtCL3 (naranja). En *ball and sticks* se representan dos compuestos pertenecientes a la serie de flavonoides con aromaticidad extendida evaluados en mi tesina (C31 y C34), En *sticks* se representan compuestos híbridos de la Tabla 5, en diferentes colores y se incluyen H4 y H14 que son los más activos de la serie. En *scaled ball and sticks* se muestra la diada catalítica Cys 25 e His 159.

## 5.6.2 Evaluación *in vitro* de la capacidad fasciolicida de los mejores inhibidores

Se evaluaron en JRD únicamente **H4** y **H12**. Para los dos compuestos se observó una marcada disminución de la motilidad incluso antes de las 16 horas de exposición a ambos derivados. En cuanto al fenotipo observado en los JRD en presencia de estos compuestos, ya a las 24 hrs fue posible evidenciar un cambio en los mismos, con un aspecto alargado, opaco y con la integridad del tegumento visiblemente afectada para **H4**. Este fenotipo es diferente a los observados en los otros compuestos evaluados, sugiriendo que además de la inhibición de las catepsinas podría haber otros mecanismos involucrados. En el caso de **H12** los JRD quedan inmóviles y con una forma redondeada sin alteraciones visibles en el tegumento, con cierta opacidad en su interior que aparece luego de las 24 hrs de incubación **Figura 44**.

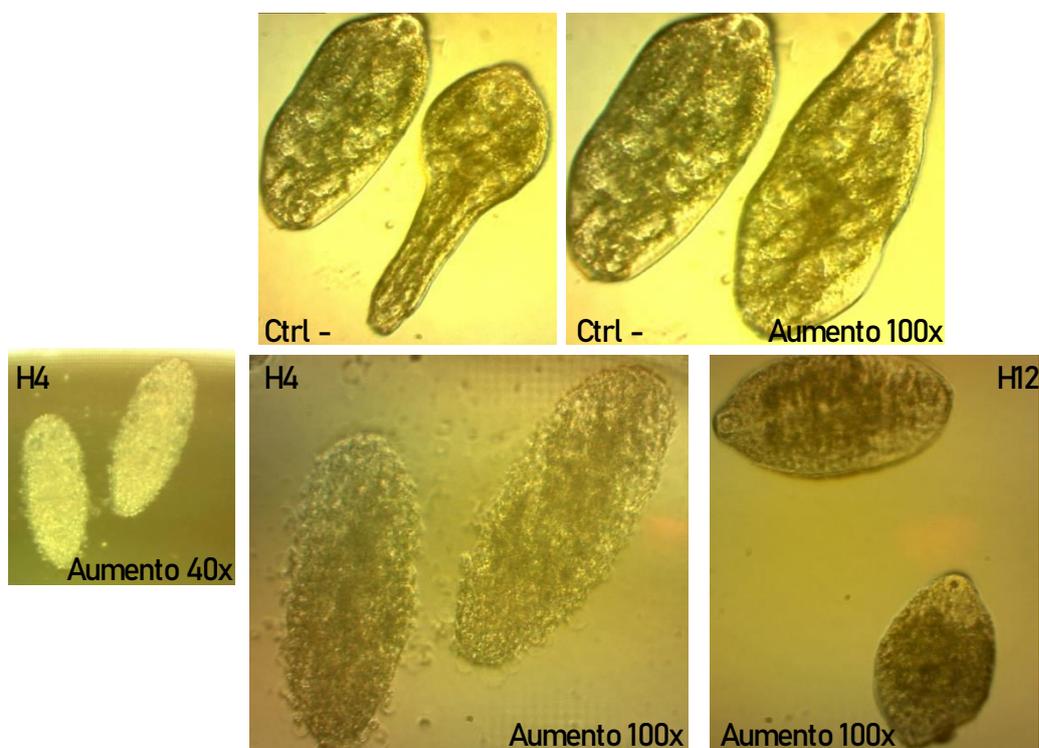


Figura 44.- Ensayo *in vitro* de incubación de **H4** y **H12** con JRD. Ctrl: controles negativos con 1% de DMSO. Los tratados con **H4** se muestran a diferente aumento para visualizar la opacidad de los JRD.

### 5.6.3 Estudio de selectividad y citotoxicidad de los mejores inhibidores

Se ensayaron cuatro derivados híbridos elegidos por sus porcentajes de inhibición a concentración fija: **H4**, **H12**, **H13** y **H15**. A pesar de la similitud estructural que poseen estas enzimas es de destacar que ninguno de los compuestos evaluados logró inhibición a 10  $\mu\text{M}$  de la catepsina L humana, lo que se traduce en altos índices de selectividad. Sería algo interesante a investigar en futuros estudios *in silico*.

Se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando espermatozoides bovinos y células HepG2 empleando la misma metodología que en los experimentos anteriores. Cuando empleamos el modelo de citotoxicidad utilizando espermatozoides bovinos no se registra citotoxicidad a los tiempos evaluados para ninguno de los compuestos (Tabla 6). Sin embargo, en células HepG2 los derivados ofrecieron un  $\text{IC}_{50}$  menor que el TBZ, lo que indica una toxicidad moderada. Esto demuestra la necesidad de evaluar estos compuestos en otros modelos biológicos de citotoxicidad y determinar dosis letal 50. A pesar de que los resultados en HepG2 sugieren una ventana terapéutica acotada, su posible uso como fármacos dependerá de la dosis necesaria para observar eficacia *in vivo*. Dada su buena actividad se podría evaluar realizar modificaciones en su estructura para disminuir la toxicidad.

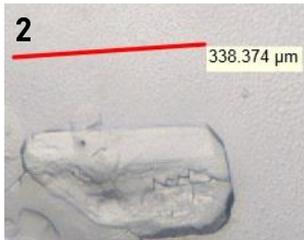
Tabla 6.- Resultados de citotoxicidad para HepG2 y espermatozoides bovinos.

Compuesto	$\text{IC}_{50}$ HepG2 ( $\mu\text{M}$ )	%Motilidad relativa en espermatozoides (50 $\mu\text{M}$ ) 30 min	%Motilidad relativa en espermatozoides (50 $\mu\text{M}$ ) 60 min
H4	4	82 $\pm$ 6	84 $\pm$ 7
H12	8	85 $\pm$ 4	87 $\pm$ 15
H13	13	97 $\pm$ 11	87 $\pm$ 16
H15	10	101 $\pm$ 10	97 $\pm$ 12
TBZ	32	88 $\pm$ 1	81 $\pm$ 11

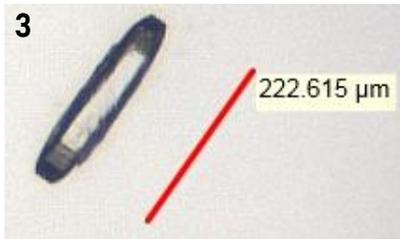
## 5.7 Evaluación de distintas condiciones para la cristalización de *FhCL3* en complejo con un inhibidor

Estos experimentos se realizaron durante una pasantía en *Institute de Biologie et chimie des Protéines*, dentro de la unidad *Molecular Microbiology and Structural Biochemistry*. Se probaron diferentes condiciones para promover la cristalización de la enzima, con la limitante de que la cantidad de enzima producida por las levaduras es baja. Se evidenció la presencia de cristales en algunas de las condiciones empleadas, destacándose tres condiciones presentes en el kit AmSO<sub>4</sub><sup>®</sup>, dos de ellas consisten en amortiguador Tris pH 8.5 0,1 M con (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M y 1.5 M, glicerol 15% (Figura 45) y una tercera es un tanto diferente ya que el amortiguador es Bicina a pH 9 y 0.8 M de (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Algo que sorprendió es el pH básico en estas condiciones, ya que en reportes previos de cristalización de catepsinas se habían observado condiciones en las que primaba un pH cercano a la neutralidad o ácido. Además, se observaron cristales en una condición similar a 4 en otro kit (Figura 45), en la que sólo cambia levemente el porcentaje de glicerol. Se enviaron los cristales obtenidos a analizar al sincrotrón y pudo constatarse que en todos los casos se trataba de sal. En cuanto al *screening* de condiciones para el complejo enzima-chalcona no se han obtenido cristales en ninguno de los casos. Creemos que una de las limitantes en estos experimentos fue la concentración de enzima empleada, por lo que nos planteamos como perspectiva utilizar otros sistemas de expresión para obtener mayor cantidad de proteína.

Condición	Composición	Kit
1	Tris 0.1 M pH 8.5 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 1 M	AmSO <sub>4</sub> <sup>®</sup>
2	Tris 0.1 M pH 8.5 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 1.5 M Glicerol 15%	
3	Bicina 0.1 M pH 9 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 0.8 M	
4	Tris 0.1 M pH 8.5 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 1.5 M Glicerol 12%	Crystal Screen <sup>®</sup>
5	Tris 0.1 M pH 8.5 MgCl <sub>2</sub> 0.2 M 1,6-Hexanediol 3.4 M	
6	(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 0.2 M PEG 3350 20%	PEG I <sup>®</sup>

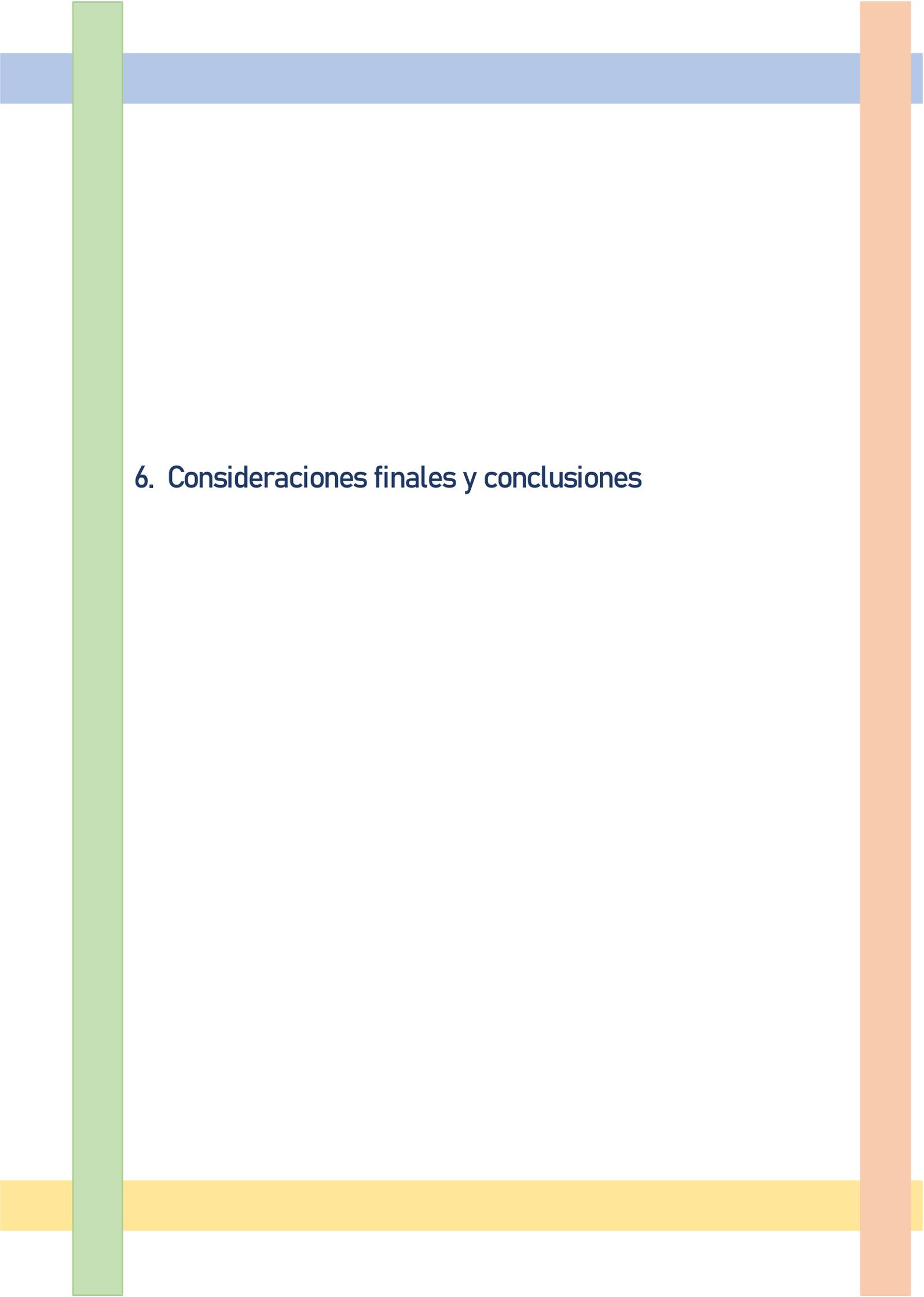


2



3

Figura 45.- Condiciones de cristalización evaluadas en las que aparecieron cristales y fotos de los cristales obtenidos.



## 6. Consideraciones finales y conclusiones

En esta tesis, que surgió como continuación de mi trabajo final de carrera de la Licenciatura en Bioquímica, se abordó el estudio de *Fasciola hepatica*, un trematodo cuya patología asociada es la fascioliasis, desde una óptica multidisciplinaria con el objetivo de contribuir al desarrollo de nuevos fármacos para el control de esta parasitosis, tanto en humanos como en el ganado.

Esta línea de investigación permitió identificar por primera vez varias familias de compuestos inhibidores de dos catepsinas tipo L, que por su rol esencial en el desarrollo y supervivencia de *Fasciola hepatica* constituyen interesantes blancos moleculares, *FhCL1* y *FhCL3*. En mi tesina de grado se describió una familia de flavonoides con aromaticidad extendida que ofrecieron buenos porcentajes de inhibición de estas enzimas y actividad fasciolicida *in vitro* lo que motivó a continuar estudiándolos. Se han realizado ensayos *ex vivo* para evaluar capacidad de los JRD de migrar a través del duodeno e *in vivo* con modelos de ratones infectados con *Fasciola hepatica*, que han confirmado la eficacia de estos compuestos para disminuir la capacidad de invasión por parte de los JRD [127] así como promover una reducción significativa de la infección y el daño hepático (ver Anexo, Figura 1).

Además de esta familia de compuestos, en nuestros resultados previos observamos una inhibición interesante de las enzimas por parte de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina. Por tanto, decidimos ampliar esta serie de compuestos para estudiar nuevos inhibidores y los patrones moleculares asociados a la actividad inhibitoria. Esto nos llevó a identificar en este trabajo once derivados de quinoxalina con un porcentaje de inhibición igual o mayor a 50% para al menos una de las enzimas y tres de ellos con una inhibición superior al 80% para los dos blancos moleculares evaluados (Figura 18 y Tabla 1). Describimos comportamientos diferenciales en cuanto a reversibilidad y cinética de unión, y caracterizamos mediante modelado computacional características estructurales de la interacción entre las catepsinas y los compuestos inhibidores. Estudiamos, *in vitro* e *in silico*, la contribución de diferentes sustituyentes del *core* 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina a la estructura farmacofórica. La presencia de un grupo hidrolizable en R1 y de un fenilo en R2 contribuye de forma positiva a la inhibición de ambas enzimas, mientras en R3 los sustituyentes de tipo semicarbazona, tiosemicarbazona o alilaminas también favorecen la inhibición principalmente para *FhCL3* (Figura 20) [176]. Se evaluó además una segunda serie de veinticinco compuestos de tipo flavonoide-quinoxalina, para estudiar el efecto de conjugar en una misma estructura híbrida los mejores agrupamientos

químicos identificados hasta el momento como buenos inhibidores de catepsinas. Así, se encontraron catorce derivados con inhibición superior al 50% en al menos una de las enzimas, y dos de ellos con inhibición de ambas catepsinas mayor al 75% (Figura 37 y Tabla 4). En esta serie de compuestos se observa la relevancia para la inhibición del heterociclo quinoxalina dioxidado. Además, explicamos mediante *docking* molecular cómo las sustituciones en las posiciones R2-R4 modulan la actividad enzimática de forma dependiente de la orientación e interacción con diferentes residuos en la hendidura catalítica de las enzimas. En la evaluación de la serie híbrida, se encuentra por primera vez que compuestos de una misma familia son mejores inhibidores de *FhCL3*, con respecto a *FhCL1*. Se realizaron estudios de *docking* molecular buscando explicar estas diferencias en base a la interacción enzima-ligando. Nuestros análisis muestran que los compuestos en general se ubican en las proximidades de la hendidura catalítica, pero los resultados para *FhCL1* arrojan diversos sitios de unión, algunos de ellos muy lejanos al sitio activo. En cambio, para *FhCL3*, se observa un sitio de unión preferencial, lo que podría explicar la tendencia de esta serie de compuestos de inhibir mejor esta enzima (Figura 38). Este resultado nos alienta a profundizar en este tipo de estructuras buscando potenciales fármacos con actividad biológica sobre el estadio juvenil del parásito.

Las correlaciones entre el porcentaje de inhibición obtenido experimentalmente para las enzimas y la interacción modelada por *docking* molecular sugiere que las moléculas que se ubican ocluyendo el bolsillo oxianónico y la díada catalítica son mejores inhibidoras que aquellas que interaccionan con ésta, pero se extienden hacia el bolsillo S2. Se analizaron mediante simulaciones de MD, los complejos formados con ambas enzimas para los compuestos **C7**, **C17**, **C18** y **C21**. Comparando los sitios obtenidos en estos resultados con los del *docking* molecular, es posible destacar que este último logra describir de manera acertada el modo de unión para estos compuestos. En particular, para el sitio obtenido por MD y *docking* molecular para **C17** que es nuestro mejor compuesto, lo que es un indicador de su mayor inhibición con respecto a los demás derivados de la serie. Como perspectiva sería interesante ampliar los estudios computacionales realizando simulaciones moleculares para confirmar las observaciones del *docking* en la serie de compuestos híbridos, así como estudios *in vitro* que permitan obtener más información sobre el modo de inhibición de estos derivados con ambas enzimas.

Por otro lado, los estudios de selectividad de la inhibición con respecto a una enzima homóloga, la catepsina L humana, mostraron que los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalinas

de la primera serie inhiben a las enzimas parasitarias a concentraciones más bajas que la humana, mientras que los compuestos híbridos no la inhiben a la concentración usada en el *screening*. Si bien la díada catalítica y varios residuos del sitio activo y el bolsillo oxianiónico se encuentran conservados en las catepsinas, los compuestos contactan otros residuos en la hendidura catalítica y sus alrededores, que son variables entre los diferentes miembros de la familia de las catepsinas. En este sentido, los compuestos evaluados poseen buenos índices de selectividad, mostrando que es posible desarrollar inhibidores selectivos con respecto a las enzimas del hospedero.

De los mejores inhibidores caracterizados identificamos siete nuevos compuestos con buena actividad fasciolicida. Dentro de ellos, tres derivados **C17**, **H4** y **H12** mataron *in vitro* al parásito juvenil antes de las 24 horas. De los inhibidores de la primera serie, solo los que comparten un sustituyente fenilo en R2 mostraron actividad biológica *in vitro* sobre el estadio juvenil. En cuanto a los híbridos, los dos derivados evaluados mostraron excelente actividad fasciolicida, similar al compuesto **C17** de la primera serie. Sería interesante evaluar los otros compuestos híbridos que resultaron buenos inhibidores de las enzimas. Es interesante mencionar que se encontraron diferentes fenotipos en los parásitos afectados, como la presencia de precipitados marrones en el interior de los JRD tratados con **C17**, **C19** y **C24** (Figura 23), y la opacidad en presencia de **H4** y **H12** (Figura 44). Esto sugiere que los parásitos están siendo afectados mediante diferentes mecanismos, lo que nos motivó a investigar cuál es el posible rol de las catepsinas en la aparición de estos fenotipos. La apariencia de los precipitados sugiere que podrían estar formados por complejos metálicos. En este sentido, se encontró en la bibliografía un vínculo entre la acumulación de cobre y la inhibición de catepsinas endolisosomales en mamíferos [168], lo que llevó a plantearnos las siguientes preguntas. ¿Qué sucede con las catepsinas presentes en los endo-lisosomas? ¿Están nuestros compuestos inhibiendo a estas enzimas?

Dado a que no fue posible ajustar las condiciones del ensayo *in vitro* con el estadio adulto, nos planteamos como perspectiva optimizar las condiciones de cultivo de los parásitos colectados en el frigorífico para también poder evaluar los compuestos sobre este estadio. De nuestra experiencia se desprende que se debería cultivar un único adulto por pocillo para evitar que la muerte de uno afecte la del otro y emplear agar sangre para estudiar si la sobrevivida mejora con la adherencia a un sustrato más similar al natural. Los gusanos utilizan su ventosa oral para

adherirse a las paredes del pocillo o a sí mismos, y están también adheridos a los canalículos hepáticos dificultando su extracción durante la colecta, por lo que promover la mejora de la interacción con el sustrato podría incrementar su tiempo de sobrevivencia en cultivo.

La evaluación de citotoxicidad *in vitro* se realizó con dos modelos, utilizando células HepG2 y espermatozoides bovinos, los que mostraron resultados complementarios. Si bien los inhibidores evaluados mostraron moderada citotoxicidad en la línea celular HepG2, esta es comparable a la del fármaco de referencia TBZ. Ninguno de los compuestos mostró ser tóxico para los espermatozoides en las condiciones ensayadas (Figura 36 y Tabla 6). Nos planteamos profundizar en este aspecto realizando estudios de toxicidad *in vivo*.

Como perspectiva final nos proponemos estudiar eficacia *in vivo*. En este sentido, disponemos de un modelo murino de fascioliasis que ya empleamos con éxito para evaluar uno de nuestros flavonoides. Asimismo, para poder continuar con ensayos *in vivo* con animales de producción, es necesario avanzar en el desarrollo preclínico y contemplar las propiedades ADME-Tox de los compuestos. Nuestros resultados sugieren que las moléculas evaluadas son prometedoras, alentándonos a profundizar su estudio para contribuir al desarrollo de nuevos fármacos para el control de la fascioliasis.

## 7. Referencias

- [1] Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., & Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(4), 1311-1321.
- [2] Cwiklinski, K., O'Neill, S. M., Donnelly, S., & Dalton, J. P. (2016). A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunology*, *38*(9), 558-568.
- [3] Spithill, T. W., Carmona, C., Piedrafita, D., & Smooker, P. M. (2012). Prospects for immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* (liver fluke). *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, 465-484.
- [4] Howell, A. K., Tongue, S. C., Currie, C., Evans, J., Williams, D. J., & McNeilly, T. N. (2018). Co-infection with *Fasciola hepatica* may increase the risk of *Escherichia coli* O157 shedding in British cattle destined for the food chain. *Preventive Veterinary Medicine*, *150*, 70-76.
- [5] Charlier, J., Vercruyse, J., Morgan, E., Van Dijk, J., & Williams, D. J. L. (2014). Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology*, *141*(3), 326-335.
- [6] Keiser, J., & Utzinger, J. (2009). Food-borne trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(3), 466-483.
- [7] Fürst, T., Duthaler, U., Sripa, B., Utzinger, J., & Keiser, J. (2012). Trematode infections: liver and lung flukes. *Infectious Disease Clinics*, *26*(2), 399-419.
- [8] Mas-Coma, S., Bargues, M. D., & Valero, M. A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, *35*(11-12), 1255-1278.
- [9] Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, "5º CONGRESO DE PRODUCCIÓN, INDUSTRIALIZACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE CARNE "DEL CAMPO AL PLATO", 2016, pp. 1-65.
- [10] Sanchís, J., Miguélez, S., Solari, M. A., Piñeiro, P., Macchi, M. I., Maldini, G., ... & Paz-Silva, A. (2011). Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay). *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, *70*, 163-171.
- [11] Reddington, J. J. (1985). Immunological and biochemical studies of fascioliasis in goats and cattle.
- [12] Robinson, M. W., Tort, J. F., Lowther, J., Donnelly, S. M., Wong, E., Xu, W., ... & Dalton, J. P. (2008). Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the

- helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(6), 1111-1123.
- [13] Carrada-Bravo, T. (2007). *Fasciola hepatica*. Biological cycle and biotic potential. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 54(1), 21-27.
- [14] César, D. (2004). Fasciolosis en Bovinos y Ovinos. *Revista INIA*, 359, 25-32.
- [15] Moll, L., Gaasenbeek, C. P., Vellema, P., & Borgsteede, F. H. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 97(1-2), 153-158.
- [16] Robinson, M. W., & Dalton, J. P. (2009). Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2763-2776.
- [17] Robaina, R. M., Borca, A., Toyos, G., Ablin, F., Acosta, J., Gutierrez, F., ... & Brascesco, R. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria- Instituto Nacional de Carnes, "Auditoría de calidad de la cadena cárnica vacuna del Uruguay 2013 - 2015, Disponible online: "https://www.inac.uy/innovaportal/file/13085/1/auditoria-bovina\_web.pdf. Último acceso: 15-nov-2018.
- [18] Bennett, C. E. (1975) Surface features, sensory structures and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica*, *Journal of Parasitology*. 61, (5). 886-891,
- [19] Thomas, A. P. (1883). Memoirs: the life history of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). *Journal of Cell Science*, 2(89), 99-133.
- [20] Lee, C. G., Cho, S. H., & Lee, C. Y. (1995). Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 58(4), 313-318.
- [21] Walker, S. M., Hoey, E., Fletcher, H., Brennan, G., Fairweather, I., & Trudgett, A. (2006). Stage-specific differences in fecundity over the life-cycle of two characterized isolates of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 133(2), 209-216.
- [22] Aminian, K., Rezayat, K. A., Shafaghi, A., & Tanhaeevash, R. (2012). Living *Fasciola hepatica* in biliary tree: a case report. *Annals of Hepatology*, 11(3), 395-398.
- [23] Brockwell, Y. M., Elliott, T. P., Anderson, G. R., Stanton, R., Spithill, T. W., & Sangster, N. C. (2014). Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(1), 48-54.
- [24] Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., ... & Solana, H. (2013). Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Veterinary parasitology*, 195(1-2), 118-121.
- [25] Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., & Cabrera, R. (2011). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary*

- Parasitology*, 178(3-4), 364-366.
- [26] McVeigh, P., McCammick, E., McCusker, P., Wells, D., Hodgkinson, J., Paterson, S., ... & Maule, A. G. (2018). Profiling G protein-coupled receptors of *Fasciola hepatica* identifies orphan rhodopsins unique to phylum Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(1), 87-103.
- [27] Lifschitz, A., Lanusse, C., & Alvarez, L. (2017). Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants. *New Zealand Veterinary Journal*, 65(4), 176-184.
- [28] Terashima, A., & Marcos, L. A. (2016). Fracaso de dosis única de triclabendazole para el tratamiento de fasciolosis humana. *Acta Médica Peruana*, 33(3), 228-231.
- [29] Kaplan, R. M. (2001). *Fasciola hepatica*. a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Veterinary Therapeutics*, 2(1), 40-50.
- [30] Giorgi, M., Salvatori, A. P., Soldani, G., Giusiani, M., Longo, V., Gervasi, P. G., & Mengozzi, G. (2001). Pharmacokinetics and microsomal oxidation of praziquantel and its effects on the P450 system in three-month-old lambs infested by *Fasciola hepatica*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24(4), 251-259.
- [31] Keiser, J., & Utzinger, J. (2010). The drugs we have and the drugs we need against major helminth infections. In *Advances in parasitology* (Vol. 73, pp. 197-230). Academic Press. Basel, Suiza. Ed. Keiser, J., & Utzinger, J.
- [32] McManus, D. P., & Dalton, J. P. (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, 133(S2), S43-S61.
- [33] Wesotowska, A., Basataj, K., Norbury, L. J., Sielicka, A., Wędrychowicz, H., & Zawistowska-Deniziak, A. (2018). Vaccination against *Fasciola hepatica* using cathepsin L3 and B3 proteases delivered alone or in combination. *Veterinary Parasitology*, 250, 15-21.
- [34] Harmsen, M. M., Cornelissen, J. B., Buijs, H. E., Boersma, W. J., Jeurissen, S. H., & van Milligen, F. J. (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *International Journal for Parasitology*, 34(6), 675-682.
- [35] Wesotowska, A., Basataj, K., Kozak Ljunggren, M., Jedlina, L., Legocki, A., Wędrychowicz, H., & Kęsik-Brodacka, M. (2018). A preliminary study of a lettuce-based edible vaccine expressing the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* for fasciolosis control in livestock. *Frontiers in Immunology*, 9, 2592.
- [36] Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., ... & Carmona, C. (2011). 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*, 29(48), 9057-9063.
- [37] Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., Donnelly, S., O'Neill, S.

- M., ... & Cwiklinski, K. (2015). *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary parasitology*, 208(1-2), 101-111.
- [38] Graczyk, T. K., & Fried, B. (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. *Fasciolosis. CABI International, Wallingford, UK pp*, 31-46. Ed. Dalton J. P.
- [39] Corvo, I., Cancela, M., Cappetta, M., Pi-Denis, N., Tort, J. F., & Roche, L. (2009). The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 41-47.
- [40] Wilson, L. R., Good, R. T., Panaccio, M., Wijffels, G. L., Sandeman, R. M., & Spithill, T. W. (1998). *Fasciola hepatica*. characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology*, 88(2), 85-94.
- [41] Richa Shah, "Fasciola Hepatica. Habitat, Structure and Life History," *Biology Discussion*, 2016. Disponible online: <http://www.biologydiscussion.com/invertebrate-zoology/phylum-platyhelminthes/fasciola-hepatica-habitat-structure-and-life-history/28888>. Último acceso: 20-nov-2018.
- [42] NCVP, "National Center of Veterinarian Parasitology," *Parasite Images Data Base*, 2019. Disponible online : <http://www.ncvetp.org/trematodes.html>. Último acceso: 29-oct-2018.
- [43] Cwiklinski, K., Jewhurst, H., McVeigh, P., Barbour, T., Maule, A. G., Tort, J., ... & Dalton, J. P. (2018). Infection by the helminth parasite *Fasciola hepatica* requires rapid regulation of metabolic, virulence, and invasive factors to adjust to its mammalian host. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(4), 792-809.
- [44] Hanna, R. E. B. (1980). *Fasciola hepatica*. glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology*, 50(1), 103-114.
- [45] Dalton, J. P., & Joyce, P. (1987). Characterization of surface glycoproteins and proteins of different developmental stages of *Fasciola hepatica* by surface radiolabeling. *The Journal of Parasitology*, 73(6), 1281-1284.
- [46] Siju, S. J., Sengupta, P. P., Chamuah, J. K., Raina, O. K., Sankar, M., Sumithra, T. G., & Prajapati, A. (2018). Exploitation of adaptations of animal parasites-A key towards designing effective control strategies against parasitic diseases of animals. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(5). 3355-3362.
- [47] Piedrafita, D., Spithill, T. W., Dalton, J. P., Brindley, P. J., Sandeman, M. R., Wood, P. R., & Parsons, J. C. (2000). Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing *in vitro* by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, 22(6), 287-295.
- [48] Dowd, A. J., Smith, A. M., McGonigle, S., & Dalton, J. P. (1994). Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *European Journal of Biochemistry*, 223(1), 91-98.
- [49] Robinson, M. W., & Dalton, J. P. (Eds.). (2011). *Cysteine proteases of pathogenic organisms*

- (Vol. 712). Springer Science & Business Media.
- [50] Lecaille, F., Kaleta, J., & Brömme, D. (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical Reviews*, *102*(12), 4459–4488.
- [51] Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Science*, *2*(1), 12–18.
- [52] Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1824*(1), 68–88.
- [53] Vizovišek, M., Fonović, M., & Turk, B. (2018). Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond. *Matrix Biology*.
- [54] Rodgers, K. J., Watkins, D. J., Miller, A. L., Chan, P. Y., Karanam, S., Brissette, W. H., ... & Jackson, C. L. (2006). Destabilizing role of cathepsin S in murine atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(4), 851–856.
- [55] Xie, L., Moroi, Y., Hayashida, S., Tsuji, G., Takeuchi, S., Shan, B., ... & Furue, M. (2011). Cathepsin K-upregulation in fibroblasts promotes matrigel invasive ability of squamous cell carcinoma cells via tumor-derived IL-1 $\alpha$ . *Journal of Dermatological Science*, *61*(1), 45–50.
- [56] Gentile, M. A., Soung, D. Y., Horrell, C., Samadfam, R., Drissi, H., & Duong, L. T. (2014). Increased fracture callus mineralization and strength in cathepsin K knockout mice. *Bone*, *66*, 72–81.
- [57] Elie, B. T., Gocheva, V., Shree, T., Dalrymple, S. A., Holsinger, L. J., & Joyce, J. A. (2010). Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model. *Biochimie*, *92*(11), 1618–1624.
- [58] Riese, R. J., Mitchell, R. N., Villadangos, J. A., Shi, G. P., Palmer, J. T., Karp, E. R., ... & Chapman, H. A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *The Journal of clinical investigation*, *101*(11), 2351–2363.
- [59] Burster, T., Macmillan, H., Hou, T., Boehm, B. O., & Mellins, E. D. (2010). Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Molecular immunology*, *47*(4), 658–665.
- [60] Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H. L., & Villadangos, J. A. (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(8), 4516–4521.
- [61] Brömme, D., & Wilson, S. (2011). Role of cysteine cathepsins in extracellular proteolysis. In *Extracellular matrix degradation* (pp. 23–51). Springer, Berlin, Heidelberg. Ed. Brömme, D., & Wilson, S.

- [62] Tholen, S., Biniossek, M. L., Gansz, M., Gomez-Auli, A., Bengsch, F., Noel, A., ... & Schilling, O. (2013). Deletion of cysteine cathepsins B or L yields differential impacts on murine skin proteome and degradome. *Molecular & Cellular Proteomics*, *12*(3), 611-625.
- [63] Dzik, J. M. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*, *53*(1), 33-64.
- [64] McGonigle, L., Mousley, A., Marks, N. J., Brennan, G. P., Dalton, J. P., Spithill, T. W., ... & Maule, A. G. (2008). The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *International journal for Parasitology*, *38*(2), 149-155.
- [65] Na, B. K., Kim, S. H., Lee, E. G., Kim, T. S., Bae, Y. A., Kang, I., ... & Kong, Y. (2006). Critical roles for excretory-secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cellular microbiology*, *8*(6), 1034-1046.
- [66] Dowd, A. J., Dooley, M., Fágáin, C., & Dalton, J. P. (2000). Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. *Enzyme and Microbial Technology*, *27*(8), 599-604.
- [67] Delaisse, J. M., Ledent, P., & Vaes, G. (1991). Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue. Cathepsin B,(pro) cathepsin L and a cathepsin L-like 70 kDa proteinase. *Biochemical Journal*, *279*(1), 167-174.
- [68] Skelly, P. J., Da'dara, A. A., Li, X. H., Castro-Borges, W., & Wilson, R. A. (2014). *Schistosoma* feeding and regurgitation. *PLoS Pathogens*, *10*(8), e1004246.
- [69] Caffrey, C. R., Goupil, L., Rebello, K. M., Dalton, J. P., & Smith, D. (2018). Cysteine proteases as digestive enzymes in parasitic helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(8), e0005840.
- [70] Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M., & Dalton, J. P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* *in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *62*(1), 9-17.
- [71] Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P., & Goñi, F. (2000). *Fasciola hepatica* parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental Parasitology*, *94*(2), 99-110.
- [72] Escamilla, A., Bautista, M. J., Zafra, R., Pacheco, I. L., Ruiz, M. T., Martinez-Cruz, S., ... & Perez, J. (2016). *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, *216*, 84-88.
- [73] Dowling, D. J., Hamilton, C. M., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P. M., Dalton, J., & O'Neill, S. M. (2010). Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infection and Immunity*, *78*(2), 793-801.
- [74] Rodriguez, E., Noya, V., Cervi, L., Chiribao, M. L., Brossard, N., Chiale, C., ... & Freire, T.

- (2015). Glycans from *Fasciola hepatica* modulate the host immune response and TLR-induced maturation of dendritic cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), e0004234.
- [75] Gause, W. C., Urban Jr, J. F., & Stadecker, M. J. (2003). The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends in Immunology*, 24(5), 269-277.
- [76] Brady, M. T., O'Neill, S. M., Dalton, J. P., & Mills, K. H. (1999). *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5372-5378.
- [77] Halton, D. W. (1997). Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*, 27(6), 693-704.
- [78] Morphew, R. M., Wright, H. A., LaCourse, E. J., Porter, J., Barrett, J., Woods, D. J., & Brophy, P. M. (2011). Towards delineating functions within the *Fasciola* secreted cathepsin l protease family by integrating *in vivo* based sub-proteomics and phylogenetics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1), e937.
- [79] Irving, J. A., Spithill, T. W., Pike, R. N., Whisstock, J. C., & Smooker, P. M. (2003). The evolution of enzyme specificity in *Fasciola spp.* *Journal of Molecular Evolution*, 57(1), 1-15.
- [80] Corvo, I., Ferraro, F., Merlino, A., Zuberbühler, K., O'Donoghue, A. J., Pastro, L., ... & Tort, J.F. (2018). Substrate specificity of cysteine proteases beyond the S2 Pocket: mutagenesis and molecular dynamics investigation of *Fasciola hepatica* Cathepsins L. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 40.
- [81] Stack, C. M., Caffrey, C. R., Donnelly, S. M., Seshadri, A., Lowther, J., Tort, J. F., ... & Craik, C. S. (2008). Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9896-9908.
- [82] McKerrow, J. H. (1995). Cysteine proteases of parasites: A remarkable diversity of function. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 2(3), 437-444.
- [83] Tkalcevic, J., Ashman, K., & Meeusen, E. (1995). *Fasciola hepatica*-Rapid identification of newly excysted juvenile proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213(1), 169-174.
- [84] Zawistowska-Deniziak, A., Wasyl, K., Norbury, L. J., Wesolowska, A., Bień, J., Grodzik, M., ... & Wędrychowicz, H. (2013). Characterization and differential expression of cathepsin L3 alleles from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 190(1), 27-37.
- [85] Young, N. D., Hall, R. S., Jex, A. R., Cantacessi, C., & Gasser, R. B. (2010). Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica*—a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnology Advances*, 28(2), 222-231.
- [86] Dowling, D. J., Hamilton, C. M., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P. M., Dalton, J., & O'Neill, S. M. (2010). Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infection and Immunity*, 78(2), 793-801.

- [87] Celas, D. P., Corvo, I., Silvano, L., Tort, J. F., Chiapello, L. S., Fresno, M., ... & Cervi, L. (2019). Cathepsin L3 From *Fasciola hepatica* Induces NLRP3 Inflammasome Alternative Activation in Murine Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, *10*, 552.
- [88] McVeigh, P., McCammick, E. M., McCusker, P., Morphew, R. M., Mousley, A., Abidi, A., ... & Dalton, J. P. (2014). RNAi dynamics in juvenile *Fasciola spp.* liver flukes reveals the persistence of gene silencing *in vitro*. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(9), e3185.
- [89] Sijwali, P. S., & Rosenthal, P. J. (2004). Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(13), 4384-4389.
- [90] Rosenthal, P. J. (2011). Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. In *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms* (pp. 30-48). Springer, Boston, MA. Ed. Rosenthal, P. J.
- [91] Wang, S. X., Pandey, K. C., Somoza, J. R., Sijwali, P. S., Kortemme, T., Brinen, L. S., ... & McKerrow, J. H. (2006). Structural basis for unique mechanisms of folding and hemoglobin binding by a malarial protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(31), 11503-11508.
- [92] Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Menard, R., Mort, J. S., & Cygler, M. (1996). Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *The EMBO Journal*, *15*(20), 5492-5503.
- [93] Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M., & Turk, V. (1996). Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Letters*, *384*(3), 211-214.
- [94] LaLonde, J. M., Zhao, B., Janson, C. A., D'Alessio, K. J., McQueney, M. S., Orsini, M. J., ... & Smith, W. W. (1999). The crystal structure of human procathepsin K. *Biochemistry*, *38*(3), 862-869.
- [95] Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A., & Drenth, J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *179*(2), 233-256.
- [96] Corvo, I. (2013). "Especificidad de sustrato de la catepsina L3 secretada por el estadio juvenil de *Fasciola hepatica*," Tesis doctoral, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- [97] Turk, V., & Turk, B. (2008). Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors: Recent Developments. *Acta Chimica Slovenica*, *55*(4), 727-738.
- [98] Lecaille, F., Chowdhury, S., Purisima, E., Brömme, D., & Lalmanach, G. (2007). The S2 subsites of cathepsins K and L and their contribution to collagen degradation. *Protein science*, *16*(4), 662-670.
- [99] Palermo, C., & Joyce, J. A. (2008). Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, *29*(1), 22-28.

- [100] Eatemadi, A, Aiyelabegan, H. T., Negahdari, B., Mazlomi, M. A., Daraee, H., Daraee, N, ... & Sadroddiny, E. (2017). Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *86*, 221-231.
- [101] Bulat, N., & Widmann, C. (2009). Caspase substrates and neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*, *80*(4-5), 251-267.
- [102] Minini, L, Ferraro, F., Cancela, S., & Merlino, A. (2017). Insight into the mechanism of action and selectivity of caspase-3 reversible inhibitors through *in silico* studies. *Journal of Molecular Structure*, *1147*, 558-568.
- [103] Mahaman, Y. A. R., Huang, F., Kessete Afewerky, H, Maibouge, T. M. S., Ghose, B., & Wang, X. (2019). Involvement of calpain in the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, *39*(2), 608-630.
- [104] Wang, C., Telpoukhovskaia, M. A., Bahr, B. A., Chen, X., & Gan, L. (2018). Endo-lysosomal dysfunction: a converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Current Opinion In Neurobiology*, *48*, 52-58.
- [105] Engel, J. C., Doyle, P. S., Hsieh, I., & McKerrow, J. H. (1998). Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(4), 725-734.
- [106] Ancizu, S., Moreno, E, Torres, E, Burguete, A, Pérez-Silanes, S., Benítez, D., ... & Cerecetto, H. (2009). Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1, 4-di-*N*-oxidequinoxalin-2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. *Molecules*, *14*(6), 2256-2272.
- [107] Aguilera, E, Varela, J., Birriel, E, Serna, E, Torres, S., Yaluff, G., ... & Álvarez, G. (2016). Potent and selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: inhibition of parasite growth through multitarget activity. *ChemMedChem*, *11*(12), 1328-1338.
- [108] Liu, J., Istvan, E. S., Gluzman, I. Y., Gross, J., & Goldberg, D. E. (2006). *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(23), 8840-8845.
- [109] Sajid, M., & McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *120*(1), 1-21.
- [110] Ferraro, F. (2015) Búsqueda de inhibidores de cisteína proteasas esenciales del parásito *Fasciola hepatica* como potenciales fármacos Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Facultad de Medicina, Udelar. Montevideo, Uruguay.
- [111] Li, Y. Y., Fang, J., & Ao, G. Z. (2017). Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *27*(6), 643-656.
- [112] Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, *13*(3), 319-329.

- [113] Kortum, S. W., Benson, T. E., Bienkowski, M. J., Emmons, T. L., Prince, D. B., Paddock, D. J., ... & TenBrink, R. E. (2007). Potent and selective isophthalamide S2 hydroxyethylamine inhibitors of BACE1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *17*(12), 3378-3383.
- [114] Hook, V. Y., Kindy, M., & Hook, G. (2008). 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. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(12), 7745-7753.
- [115] Raevsky, A. V., Sharifi, M., Pinchuk, V., & Klegeris, A. (2018). *In silico* design of novel gold-phosphate containing compounds as selective inhibitors of cathepsin B in neuroinflammation.
- [116] Zhao, Q., Jia, Y., & Xiao, Y. (2009). Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *380*(4), 721-723.
- [117] Altmann, E., Aichholz, R., Betschart, C., Buhl, T., Green, J., Irie, O., ... & Missbach, M. (2007). 2-Cyano-pyrimidines: a new chemotype for inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(4), 591-594.
- [118] Rankovic, Z., Cai, J., Kerr, J., Fradera, X., Robinson, J., Mistry, A., ... & Cumming, I. (2010). Design and optimization of a series of novel 2-cyano-pyrimidines as cathepsin K inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *20*(5), 1524-1527.
- [119] Irie, O., Yokokawa, F., Ehara, T., Iwasaki, A., Iwaki, Y., Hitomi, Y., ... & Gunji, H. (2008). 4-Amino-2-cyanopyrimidines: Novel scaffold for nonpeptidic cathepsin S inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *18*(16), 4642-4646.
- [120] Stroup, G. B., Lark, M. W., Veber, D. F., Bhattacharyya, A., Blake, S., Dare, L. C., ... & Ru, Y. (2001). Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption *in vivo* in a nonhuman primate. *Journal of Bone and Mineral Research*, *16*(10), 1739-1746.
- [121] Mantle, D., Falkous, G., & Perry, E. K. (1999). Effect of flavonoids on protease activities in human skeletal muscle tissue *in vitro*. *Clinica Chimica Acta*, *285*(1-2), 13-20.
- [122] Zeng, G. Z., Pan, X. L., Tan, N. H., Xiong, J., & Zhang, Y. M. (2006). Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *41*(11), 1247-1252.
- [123] Majumdar, I. D., Devanabanda, A., Fox, B., Schwartzman, J., Cong, H., Porco Jr, J. A., & Weber, H. C. (2011). Synthetic cyclohexenyl chalcone natural products possess cytotoxic activities against prostate cancer cells and inhibit cysteine cathepsins *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *416*(3-4), 397-402.
- [124] Reinheckel, T., Peters, C., Krüger, A., Turk, B., & Vasiljeva, O. (2012). Differential impact of cysteine cathepsins on genetic mouse models of *de novo* carcinogenesis: cathepsin B as emerging therapeutic target. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 133.

- [125] Mahapatra, D. K, Bharti, S. K, & Asati, V. (2015). Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *98*, 69-114.
- [126] Mahapatra, D. K, Bharti, S. K, & Asati, V. (2015). Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *101*, 496-524.
- [127] Ferraro, F., Merlino, A., Gil, J., Tort, J. F., Gonzalez, M., Cerecetto, H, ... & Corvo, I. (2016). Identification of chalcones as *Fasciola hepatica* cathepsin L inhibitors using a comprehensive experimental and computational approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(7), e0004834.
- [128] Cabrera, M., Cerecetto, H., Corvo, I., Ferraro, F., González, M., Merlino A., Tort, J.F. (2018) Nro. 037045. Montevideo, Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial – Uruguay.
- [129] Merlino, A., Otero, L., Gambino, D., & Coitiño, E. L. (2011). In search of patterns over physicochemical properties and pharmacological activities for a set of [MCl<sub>2</sub> (thiosemicarbazone)] complexes (M= Pt/Pd): Support for multiple mechanisms of antichagasic action excluding DNA-bonding *in vivo*?. *European journal of medicinal chemistry*, *46*(7), 2639-2651.
- [130] Ríos, N, Varela, J., Birriel, E, González, M., Cerecetto, H, Merlino, A., & Porcal, W. (2013). Identification of novel benzimidazole derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents: solid-phase synthesis, structure-activity relationships and molecular docking studies. *Future medicinal chemistry*, *5*(15), 1719-1732.
- [131] StatSoft, I. (2001). STATISTICA (data analysis software system). StatSoft. Inc., Tulsa, OK
- [132] Vicente, E, Villar, R., Burguete, A, Solano, B., Pérez-Silanes, S., Aldana, I., ... & Monge, A. (2008). Efficacy of quinoxaline-2-carboxylate 1, 4-di-*N*-oxide derivatives in experimental tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*(9), 3321-3326.
- [133] Pereira, J. A, Pessoa, A. M., Cordeiro, M. N. D., Fernandes, R., Prudêncio, C., Noronha, J. P., & Vieira, M. (2015). Quinoxaline, its derivatives and applications: a state of the art review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 664-672.
- [134] Zarranz, B., Jaso, A., Aldana, I., & Monge, A. (2004). Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethyl-quinoxaline 1, 4-di-*N*-oxide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *12*(13), 3711-3721.
- [135] Cheng, G., Sa, W., Cao, C., Guo, L., Hao, H., Liu, Z., ... & Yuan, Z. (2016). Quinoxaline 1, 4-di-*N*-oxides: biological activities and mechanisms of actions. *Frontiers in Pharmacology*, *7*, 64.
- [136] Pérez-Silanes, S., Torres, E., Arbillaga, L., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., ... & Moreno-Viguri, E. (2016). Synthesis and biological evaluation of quinoxaline di-*N*-oxide derivatives with *in vitro* trypanocidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *26*(3), 903-906.

- [137] Corvo, I., O'Donoghue, A. J., Pastro, L., Pi-Denis, N., Eroy-Reveles, A., Roche, L., ... & Tort, J. F. (2013). Dissecting the active site of the collagenolytic cathepsin L3 protease of the invasive stage of *Fasciola hepatica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(7), e2269.
- [138] Copeland, R. A. (2013). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. John Wiley & Sons. 141-177.
- [139] Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, *19*(14), 1639-1662.
- [140] Robinson, M. W., Corvo, I., Jones, P. M., George, A. M., Padula, M. P., To, J., ... & Dalton, J. P. (2011). Collagenolytic activities of the major secreted cathepsin L peptidases involved in the virulence of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(4), e1012.
- [141] Case, D. A., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., III, Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., Gohlke, H., Goetz, A. W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Merz, K. M., Monard, G., Needham, P., Nguyen, H., Nguyen, H. T., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D. R., Roitberg, A., Salomon-Ferrer, R., Simmerling, C. L., Smith, W., Swails, J., Walker, R. C., Wang, J., Wolf, R. M., Wu, X., York, D. M., & Kollman, P. A. Amber 2015; University of California: San Francisco, 2015.
- [142] Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(8), 3696-3713.
- [143] Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926-935.
- [144] Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, *103*(19), 8577-8593.
- [145] Berendsen, H. J., Postma, J. V., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, *81*(8), 3684-3690.
- [146] Pastor, R. W., Brooks, B. R., & Szabo, A. (1988). An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Molecular Physics*, *65*(6), 1409-1419.
- [147] Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, *23*(3), 327-341.
- [149] Shao, J., Tanner, S. W., Thompson, N., & Cheatham, T. E. (2007). Clustering molecular dynamics trajectories: 1. Characterizing the performance of different clustering algorithms. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *3*(6), 2312-2334.

- [149] Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38.
- [150] BIOVIA, D. S. (2017). Discovery studio visualizer, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. *to be found under <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php> (accessed Dec 12, 2017).*
- [151] Chai, J. D., & Head-Gordon, M. (2008). Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(44), 6615–6620.
- [152] Krishnan, R. B. J. S., Binkley, J. S., Seeger, R., & Pople, J. A. (1980). Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *The Journal of Chemical Physics*, 72(1), 650–654
- [153] Cancès, E., Mennucci, B., & Tomasi, J. (1997). A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. *The Journal of Chemical Physics*, 107(8), 3032–3041.
- [154] Bondi, A. (1964). Van der Waals volumes and radii. *The Journal of Physical Chemistry*, 68(3), 441–451.
- [155] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J. Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery J.A., Jr., Peralta, J.E, Ogliaro, F., Bearpark, M. Heyd, J.J. Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N, Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K. Rendell, A. Burant, J.C, Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E, Cross, J.B, Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E, Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L, Morokuma, K, Zakrzewski, V.G, Voth, G.A, Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, Ö., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.
- [156] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- [157] Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174.
- [158] Breneman, C. M., & Wiberg, K. B. (1990). Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 11(3), 361–373.
- [159] Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25(2), 247–260.

- [160] Basch, P. F. (1981). Cultivation of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of Parasitology*, 67(2), 179-185..
- [161] Paveley, R. A., & Bickle, Q. D. (2013). Automated Imaging and other developments in whole-organism anthelmintic screening. *Parasite Immunology*, 35(9-10), 302-313.
- [162] Bennett, J. L., & Köhler, P. (1987). *Fasciola hepatica*. action *in vitro* of triclabendazole on immature and adult stages. *Experimental Parasitology*, 63(1), 49-57.
- [163] Robinson, M. W., Lawson, J., Trudgett, A., Hoey, E. M., & Fairweather, I. (2004). The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 92(3), 205-210.
- [164] Kelley, J. M., Elliott, T. P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., & Spithill, T. W. (2016). Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology*, 32(6), 458-469.
- [165] Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112.
- [166] Tyndall, J. D., Nall, T., & Fairlie, D. P. (2005). Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chemical Reviews*, 105(3), 973-1000.
- [167] Ganotra, G. K., & Wade, R. C. (2018). Prediction of Drug-Target Binding Kinetics by Comparative Binding Energy Analysis. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(11), 1134-1139.
- [168] Öhrvik, H., Logeman, B., Turk, B., Reinheckel, T., & Thiele, D. J. (2016). Cathepsin protease controls copper and cisplatin accumulation via cleavage of the Ctr1 metal-binding ectodomain. *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 13905-13916.
- [169] Dumay, Q. C., Debut, A. J., Mansour, N. M., & Saier Jr, M. H. (2006). The copper transporter (Ctr) family of Cu<sup>+</sup> uptake systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 11(1-2), 10-19.
- [170] Choveaux, D. L., Przyborski, J. M., & Goldring, J. D. (2012). A *Plasmodium falciparum* copper-binding membrane protein with copper transport motifs. *Malaria Journal*, 11(1), 397.
- [171] Weiner, J., & Kooij, T. W. (2016). Phylogenetic profiles of all membrane transport proteins of the malaria parasite highlight new drug targets. *Microbial Cell*, 3(10), 511.
- [172] Dell'Oca, N., Basika, T., Corvo, I., Castillo, E., Brindley, P. J., Rinaldi, G., & Tort, J. F. (2014). RNA interference in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles: Long dsRNA induces more persistent silencing than siRNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 197(1-2), 28-35.
- [173] Basika Cabrera, T. (2012). Contribución a la dilucidación de los mecanismos proteolíticos que operan en la digestión intestinal del trematodo parásito *Fasciola hepatica*. Tesis de maestría, Facultad de Medicina, Udelar. Montevideo, Uruguay.

- [174] Carasi, P., Rodríguez, E., Da Costa, V., Frigerio, S., Brossard, N., Noya, V., ... & Freire, T. (2017). Heme-oxygenase-1 expression contributes to the immunoregulation induced by *Fasciola hepatica* and promotes infection. *Frontiers in Immunology*, *8*, 883.
- [175] Ma, S., Devi-Kesavan, L. S., & Gao, J. (2007). Molecular dynamics simulations of the catalytic pathway of a cysteine protease: a combined QM/MM study of human cathepsin K. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(44), 13633-13645.
- [176] Ferraro, F., Merlino, A., Gil, J., Cerecetto, H., Corvo, I., & Cabrera, M. (2019). Cathepsin L Inhibitors with Activity against the Liver Fluke Identified From a Focus Library of Quinoxaline 1, 4-di-*N*-Oxide Derivatives. *Molecules*, *24*(13), 2348.

## 8. Anexo

### Análisis de Componentes Principales (ACP)

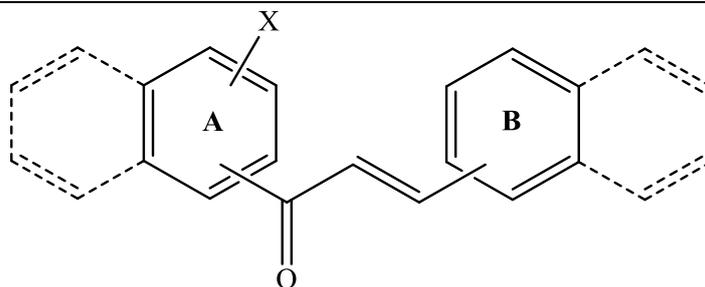
Para obtener las estructuras de los 40 flavonoides (Tabla 1) previamente evaluados en mi tesina de grado[110] se llevó a cabo la optimización de geometría en solución acuosa sin restricciones usando el funcional *range-separated* híbrido  $\omega$ B97X-D[2] que incluye dispersión electrónica -requerida para describir interacciones con sistemas aromáticos- con una grilla de integración ultrafina, el conjunto de base 6-31G(d,p)[3] y el modelo continuo IEF-PCM[4] usando cavidades ajustadas a la forma molecular, construidas a partir de radios atómicos de Bondi[5]. La naturaleza de las estructuras obtenidas como mínimos representantes de especies estables se evaluó verificando que todos los valores propios de la matriz Hessiana obtenida al mismo nivel de cálculo fueran positivos. Por otra parte, para la obtención de algunos descriptores empleados (IP, EA) fue necesario obtener la energía de cada molécula tras ganar o perder un electrón mediante cálculos *single point* al mismo nivel, en todos los casos utilizando el programa Gaussian09 [6].

Tabla 1.- Estructuras y porcentajes de inhibición de los 40 flavonoides para ambos blancos moleculares.

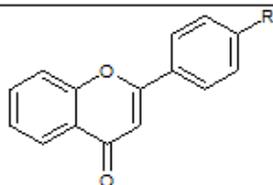
Cpd.	X	R	% inh. <i>FtCL1</i>	% inh. <i>FtCL3</i>
C1	H	-Ph	33 ± 8	4 ± 4
C2	H	-Ph-4-Cl	25 ± 12	6 ± 5
C3	H	-Ph-4-Br	52 ± 5	12 ± 14
C4	H	-Ph-4-OCH <sub>3</sub>	48 ± 8	4 ± 5
C5	H	-Ph-3,4-di-OCH <sub>3</sub>	35 ± 5	2 ± 7
C6	H	-Ph-4-SCH <sub>3</sub>	8 ± 9	26 ± 1
C7	H	-Ph-4-NHCOCH <sub>3</sub>	14 ± 34	12 ± 6

<b>C8</b>	H	-Ph-4-NH <sub>2</sub> .HCl	4 ± 19	2 ± 6
<b>C9</b>	OH	-Ph	16 ± 6	0 ± 8
<b>C10</b>	OH	-Ph-4-Cl	63 ± 10	23 ± 3
<b>C11</b>	OH	-Ph-4-Br	19 ± 2	12 ± 7
<b>C12</b>	OH	-Ph-2-Br	29 ± 3	33 ± 7
<b>C13</b>	OH	-Ph-4-OCH <sub>3</sub>	48 ± 9	3 ± 5
<b>C14</b>	OH	-Ph-3-l,4-OCH <sub>3</sub>	0 ± 9	19 ± 1
<b>C15</b>	OH	-Ph-4-SCH <sub>3</sub>	6 ± 11	32 ± 1
<b>C16</b>	OH	-Ph-4-NHCOCH <sub>3</sub>	0 ± 10	13 ± 1
<b>C17</b>	OH	-Ph-4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	34 ± 12	20 ± 4
<b>C18</b>	OH	-Ph-4-OBn	8 ± 13	16 ± 1
<b>C19</b>	OH	-Ph-3-NO <sub>2</sub>	26 ± 6	37 ± 1
<b>C20</b>	H	-2-pyridinyl	8 ± 16	4 ± 1
<b>C21</b>	H	-5-benzofuroxanyl	21 ± 9	26 ± 1
<b>C22</b>	OH	-2-pyridinyl	54 ± 7	0 ± 10
<b>C23</b>	OH	-2-furyl	57 ± 8	4 ± 10
<b>C24</b>	OH	-2-thienyl	52 ± 5	9 ± 11
<b>C25</b>	OH	-4-furoxanyl	48 ± 6	14 ± 12
<b>C26</b>	OH	-5-benzodioxolyl	11 ± 14	19 ± 6

---



Cpd.	X	A ring	-C=O position	R	% inh. <i>Ft</i> CL1	% inh. <i>Ft</i> CL3
C27	H	naphthyl	2	phenyl	65 ± 3	13 ± 4
C28	H	phenyl	-	1-naphthyl	38 ± 3	39 ± 5
C29	H	phenyl	*	1-naphthyl	17 ± 9	27 ± 2
C30	H	phenyl	-	2-naphthyl	62 ± 2	38 ± 7
C31	OH	phenyl	-	2-naphthyl	61 ± 2	41 ± 5
C32	OH	phenyl	-	1-naphthyl	42 ± 6	32 ± 8
C33	1-OH	naphthyl	2	2-naphthyl	65 ± 6	29 ± 5
C34	2-OH	naphthyl	1	1-naphthyl	75 ± 4	65 ± 6
C35	2-OH	naphthyl	1	2-naphthyl	67 ± 3	44 ± 6



Cpd.	-R	% inh. <i>Ft</i> CL1	% inh. <i>Ft</i> CL3
C36	H	5±4	8±3
C37	F	0±5	17±8
C38	<u>Cl</u>	19±6	11±4
C39	Br	20±4	0±6
C40	<u>OMe</u>	5±3	8±4

Los descriptores calculados para los compuestos (Tabla 2) fueron el potencial de ionización (IP), afinidad electrónica (EA), dureza ( $\eta$ ), electrofilia ( $\omega$ ), nucleofilia (S), momento dipolar (D) y polarizabilidad (Pol), área (A), área topológica polar accesible al solvente (TPSA),

volumen (V), LogP (obtenido teóricamente a partir de las estructuras), peso molecular (MM) y las cargas atómicas para los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  del sistema  $\alpha,\beta$  insaturado presente en todos los compuestos obtenidas mediante un análisis poblacional natural (NPA) de la densidad electrónica empleando el método NBO (*Natural Bond Orbital*) de Weinhold.

El potencial de ionización corresponde a la mínima energía necesaria para quitar un electrón a la molécula. En aproximación de orden cero se puede calcular a partir de la energía del orbital de Kohn-Sham (KS) ocupado de mayor energía (HOMO) y en aproximación de primer orden, en forma vertical, a partir de la diferencia entre la energía electrónica total de la molécula en el estado de referencia (para el que se optimizó la estructura) y la que corresponde a la misma geometría adicionando un electrón. La afinidad electrónica corresponde a la energía liberada al aceptar el sistema un electrón. En aproximación de orden cero se puede determinar a partir de la energía del orbital de KS desocupado de menor energía (LUMO). En aproximación de primer orden se calcula verticalmente como la diferencia de energía electrónica total del sistema tras sumar un electrón y la correspondiente del sistema de referencia (para el que se optimizó la geometría en el estado fundamental).

Al obtener los descriptores anteriores, en el marco de la teoría identificada como DFT conceptual o químico, es posible obtener una serie de propiedades moleculares globales tales como la dureza ( $\eta$ ), electronegatividad ( $\chi$ , el opuesto del potencial químico  $\mu$ ), blandura (S) y electrofilia ( $\omega$ ) que ofician como descriptores de reactividad intrínseca general ( $\eta$ , S y  $\chi$ ) y específica ( $\omega$ ) de la siguiente manera [7]:

$$\eta = \frac{1}{2}(IP - EA) \quad \chi = -\mu = \frac{1}{2}(IP + EA) \quad S = \frac{1}{2\eta} \quad \omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

**Tabla 2- Matriz de partida con todos los descriptores calculados y normalizados para los 40 flavonoides a nivel DFT empleando el funcional híbrido cub97xd, que se encuentra bien parametrizado para sistemas aromáticos como poseen los compuestos de interés, con un conjunto de base 6-31G (d,p) y agua como solvente, empleando el modelo IEF-PCM y cavidades ajustadas a la forma molecular, construidas con radios de Bondi**

Compuesto	IP (eV)	EA (eV)	Mom Dipolar (D)	Dureza (eV)	Electroneg. (eV)	Blandura (eV)	Electrofilia (eV)	Volumen (Å <sup>3</sup> )	Área sup. (Å <sup>2</sup> )	Polarizability	NPA Carga (u.a)	NPA Coeta (u.a)	mltlogP	TPSA (Å <sup>2</sup> )	MW (g/mol)
1	6.34	-2.38	4.52	4.36	1.98	2.18	0.45	2.39	2.61	2.32	-0.35	-0.13	3.81	1.71	2.08
2	5.41	-2.58	2.22	3.99	1.42	2.00	0.25	2.97	3.23	2.78	-0.35	-0.13	3.46	3.55	2.68
3	6.37	0.00	3.63	3.19	3.19	1.59	1.59	2.63	2.84	2.63	-0.34	-0.13	4.62	1.71	2.86
4	6.08	-2.49	4.59	4.28	1.79	2.14	0.38	2.68	2.92	2.65	-0.37	-0.12	3.87	2.63	2.38
5	6.39	-2.44	3.61	4.42	1.98	2.21	0.44	2.58	2.80	2.52	-0.34	-0.13	4.49	1.71	2.42
6	5.74	-2.56	9.14	4.15	1.59	2.08	0.30	2.75	2.98	2.77	-0.36	-0.13	3.05	4.62	2.51
7	5.75	-2.57	3.26	4.16	1.59	2.08	0.30	2.81	3.03	2.91	-0.35	-0.13	4.25	1.71	2.54
8	8.26	-3.19	8.99	5.73	2.53	2.86	0.56	2.70	2.92	2.76	-0.36	-0.11	3.71	6.86	2.66
9	6.65	-2.51	7.38	4.58	2.07	2.29	0.47	2.34	2.55	2.22	-0.33	-0.16	2.46	3.00	2.09
10	6.17	-2.51	5.73	4.34	1.83	2.17	0.38	2.46	2.65	2.47	-0.34	-0.12	3.75	3.73	2.24
11	5.89	-2.43	6.54	4.16	1.73	2.08	0.36	2.74	2.95	2.82	-0.36	-0.11	3.81	4.65	2.54
12	6.57	-2.56	7.31	2.28	2.00	2.28	0.44	2.68	2.85	2.69	-0.32	-0.13	4.33	3.77	3.02
13	6.19	-2.89	8.47	4.54	1.65	2.27	0.30	2.73	2.93	2.68	-0.32	-0.13	3.69	8.31	2.69
14	6.47	-2.21	6.84	4.34	2.13	2.17	0.52	3.61	3.84	3.64	-0.39	-0.12	5.40	4.65	3.30
15	5.02	-2.35	10.15	3.68	1.34	1.84	0.24	3.00	3.23	3.35	-0.39	-0.11	3.85	4.05	2.67
16	6.00	-2.49	8.56	4.24	1.75	2.12	0.36	3.07	3.26	3.04	-0.35	-0.12	4.82	4.85	3.80
17	6.42	-2.57	3.78	2.25	1.92	2.25	0.41	2.64	2.83	2.66	-0.33	-0.13	4.43	3.73	2.58
18	6.74	-2.56	6.73	4.65	2.09	2.33	0.47	2.39	2.61	2.01	-0.36	-0.12	2.29	4.65	2.18
19	5.97	-2.90	8.20	2.22	1.54	2.22	0.27	2.41	2.60	2.36	-0.32	-0.15	2.40	5.02	2.25
20	6.41	-2.81	6.57	4.61	1.80	2.31	0.35	2.36	2.56	2.49	-0.34	-0.15	2.83	3.73	2.30
21	5.97	-2.50	9.76	4.23	1.74	2.12	0.36	2.81	3.02	2.93	-0.35	-0.12	2.99	6.64	2.67
22	5.63	-2.74	5.09	4.19	1.45	2.09	0.25	2.88	3.07	3.07	-0.35	-0.12	4.18	3.73	2.70
23	-2.44	0.25	3.87	-1.34	-1.10	-0.67	-0.45	2.69	2.88	2.78	-0.33	-0.13	4.56	3.73	3.02
24	5.22	-2.75	6.16	3.99	1.23	1.99	0.19	2.87	3.03	2.89	-0.34	-0.12	3.26	5.58	2.80
25	6.66	-2.88	2.65	4.77	1.89	2.39	0.37	2.46	2.70	2.31	-0.27	-0.19	2.45	8.88	2.46
26	0.00	-2.54	5.89	1.27	1.27	0.63	0.63	2.96	3.12	3.31	-0.34	-0.12	4.93	4.73	2.74
27	5.88	-2.38	4.33	4.13	1.75	2.06	0.37	2.90	3.06	3.00	-0.34	-0.14	4.79	1.71	2.58
28	5.92	-2.45	5.00	4.18	1.74	2.09	0.36	3.48	3.58	3.86	-0.34	-0.14	5.89	3.73	3.24
29	6.10	-2.23	5.30	4.17	1.93	2.08	0.45	3.48	3.59	4.02	-0.35	-0.13	6.09	3.73	3.24
30	5.95	-2.40	4.52	4.18	1.77	2.09	0.38	2.90	3.08	3.14	-0.35	-0.13	5.00	1.71	2.58
31	-1.70	5.85	6.47	-3.78	2.08	-1.89	-0.57	3.90	4.22	4.34	-0.57	-0.27	6.24	3.41	3.78
32	-2.27	5.84	5.92	-4.06	1.78	-2.03	-0.39	3.46	3.56	3.83	-0.34	-0.15	5.89	3.73	3.24
33	6.34	-2.39	4.94	4.37	1.97	2.18	0.45	2.90	3.09	3.15	-0.33	-0.13	5.00	1.71	2.58
34	6.18	-2.52	5.50	4.35	1.83	2.17	0.38	2.97	3.12	3.15	-0.34	-0.13	4.73	3.73	2.74
35	6.30	-2.25	6.20	4.28	2.02	2.14	0.48	2.35	2.50	2.27	-0.41	-0.41	3.79	3.94	2.22
36	6.74	-2.13	6.14	4.43	2.30	2.22	0.60	2.64	2.83	2.55	-0.42	-0.42	3.79	3.94	2.52
37	6.58	-2.02	4.95	4.30	2.28	2.15	0.60	2.52	2.69	2.44	-0.41	-0.41	4.42	3.02	2.56
38	6.57	-2.03	4.99	4.30	2.27	2.15	0.60	2.58	2.58	2.57	-0.40	-0.41	4.55	3.02	3.00
39	5.64	-1.97	3.47	3.80	1.84	1.90	0.44	2.78	2.92	2.73	0.20	0.33	1.32	11.82	3.02
40	-2.52	6.70	4.47	-4.61	2.09	-2.30	-0.47	2.56	2.80	2.35	-0.33	-0.14	0.55	4.47	2.24

## Ensayos de infección *in vivo* con *Fasciola hepatica*

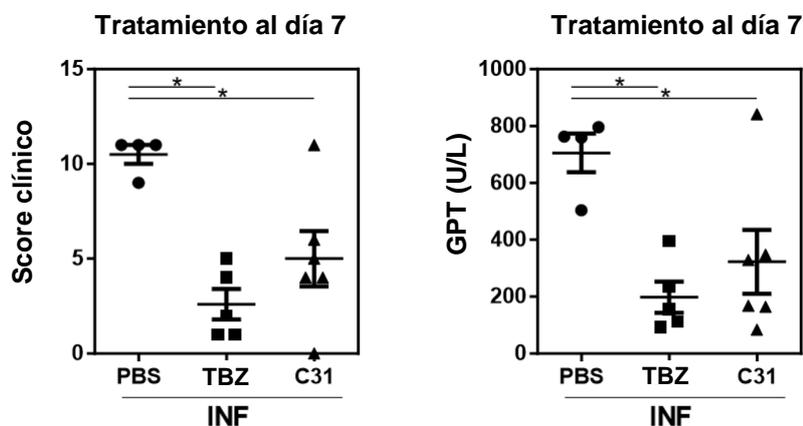


Figura 1.- Tratamiento farmacológico de ratones infectados con *Fasciola hepatica*. Ratones BALB/c fueron infectados con 10 metacercarias por ratón, al día 7 se les administró por vía oral PBS (control), triclabendazol (TBZ, 100 mg/Kg) o C31 (100 mg/Kg). El daño hepático provocado por la infección fue monitoreado mediante un *score* clínico (según referencia [8]) y por medición de actividad transaminasa glutámico-pirúvica (GPT, U/L). Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ).

## Referencias

- [1] Ferraro, F., Merlino, A., Gil, J., Tort, J. F., Gonzalez, M., Cerecetto, H., ... & Corvo, I. (2016). Identification of chalcones as *Fasciola hepatica* cathepsin L inhibitors using a comprehensive experimental and computational approach. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(7), e0004834.
- [2] Chai, J. D., & Head-Gordon, M. (2008). Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *10*(44), 6615-6620.
- [3] Krishnan, R. B. J. S., Binkley, J. S., Seeger, R., & Pople, J. A. (1980). Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *The Journal of Chemical Physics*, *72*(1), 650-654.
- [4] Cancès, E., Mennucci, B., & Tomasi, J. (1997). A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. *The Journal of chemical physics*, *107*(8), 3032-3041.
- [5] Bondi, A. (1964). van der Waals volumes and radii. *The Journal of physical chemistry*, *68*(3), 441-451.
- [6] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ort, "Gaussian 09." Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [7] De Proft, F., & Geerlings, P. (2001). Conceptual and computational DFT in the study of aromaticity. *Chemical reviews*, *101*(5), 1451-1464.
- [8] Rodriguez, E., Noya, V., Cervi, L., Chiribao, M. L., Brossard, N., Chiale, C., ... & Freire, T. (2015). Glycans from *Fasciola hepatica* modulate the host immune response and TLR-induced maturation of dendritic cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(12), e0004234.

