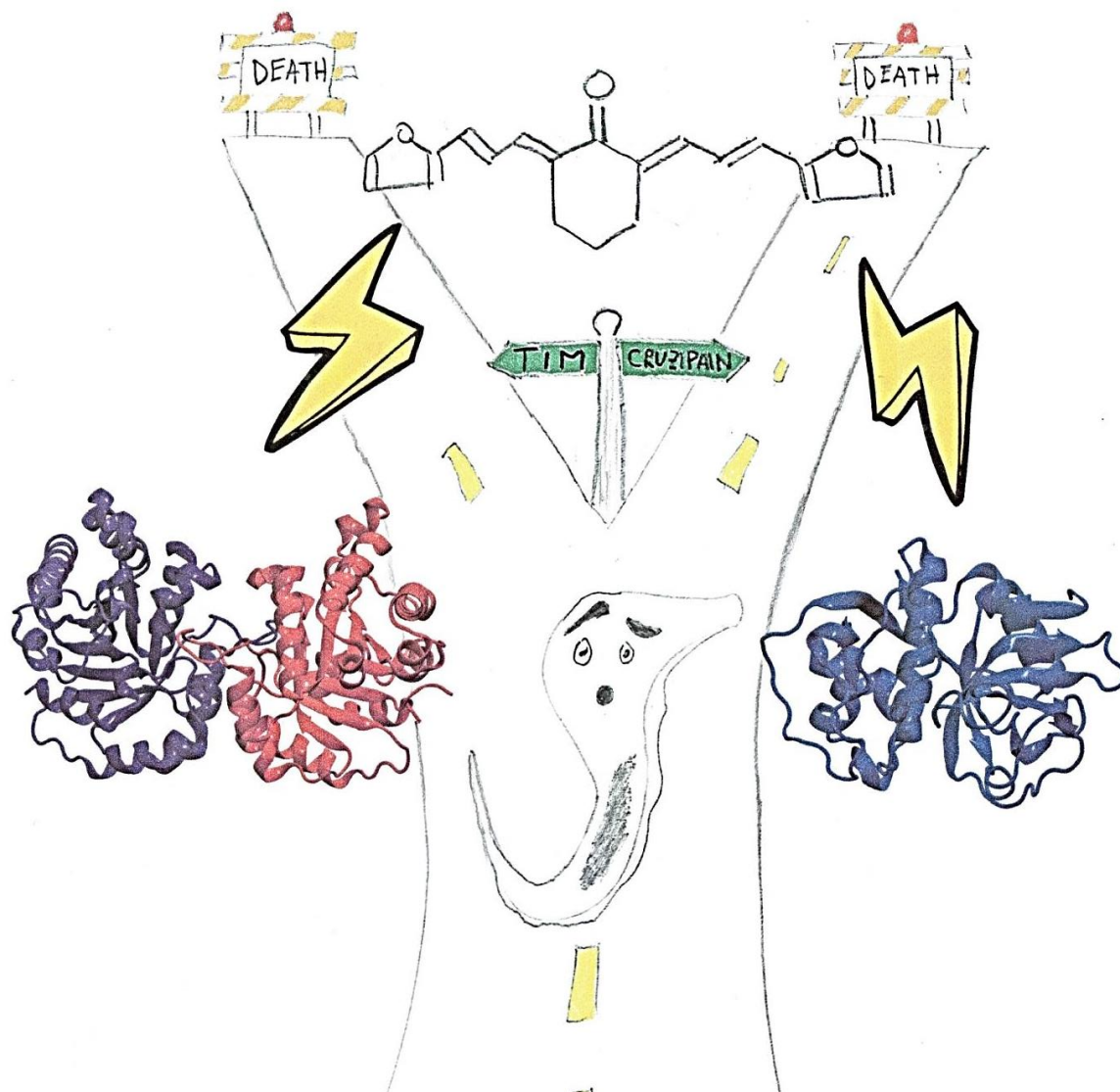


DESARROLLO PRECLÍNICO DE COMPUESTOS TRIPANOSOMICIDAS SIN EFECTOS TÓXICOS NI MUTAGÉNICOS: OPTIMIZACIÓN DE SU ACTIVIDAD *IN VIVO*.



Lic. Elena Aguilera

Tutores: Dr. Guzmán Álvarez y Dra. Mercedes González

Grupo de Química Orgánica Medicinal/Facultad de Ciencias y Laboratorio de Moléculas Bioactivas/CenUR Litoral Norte

Facultad de Química/PEDECIBA  
Universidad de la República  
2020

# Índice

Agradecimientos

Resumen

Abreviaturas

1. Introducción
  - 1.1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas
  - 1.2. Generalidades del parásito
  - 1.3. Terapia actual para la enfermedad
  - 1.4. Blancos Terapéuticos
    - 1.4.1. Triosafofato isomerasa de *T. cruzi* (*TcTIM*)
    - 1.4.2. Cruzipaína
    - 1.4.3. Biosíntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi*
  - 1.5. Mecanismo de muerte celular
  - 1.6. Polifarmacología de la enfermedad de Chagas
  - 1.7. Desarrollo y descubrimiento de fármacos
2. Antecedentes
3. Objetivos generales
  - 3.1. Objetivos específicos
4. Propuesta de Trabajo
5. Materiales y métodos
  - 5.1. Química
    - 5.1.1. Generalidades
    - 5.1.2. Procedimiento general de síntesis para la **Familia A**
  - 5.2. Biología
    - 5.2.1. Ensayo de actividad de los compuestos frente a *T. cruzi*
    - 5.2.2. Ensayo para la combinación de los compuestos y formación de los isobogramas
    - 5.2.3. Actividad frente a la forma tripomastigote de *T. cruzi*
    - 5.2.4. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos
    - 5.2.5. Ensayo de mutagenicidad (Test de Ames)
    - 5.2.6. Toxicidad oral aguda *in vivo* en ratón

- 5.2.7. Genotoxicidad evaluada mediante el test de micronúcleos *in vivo* en ratón
- 5.2.8. Teratogenicidad- FET Preparación de los embriones
- 5.2.9. Estudios *in vivo* en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas en ratón
- 5.2.10. Histopatología de corazón, bazo, intestino, riñones e hígado de los ratones al finalizar los ensayos *in vivo*
- 5.3. Estudio de mecanismo de acción
  - 5.3.1. Ensayo de inhibición de la *TcTIM*, y *HsTIM* (triosa fosfato isomerasa Humana)
  - 5.3.2. Estudios de docking y dinámica molecular en *TcTIM*
  - 5.3.3. Ensayo de inhibición de la Cruzipaína
  - 5.3.4. Ensayo de inhibición de la síntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi*
  - 5.3.5. Estudios metabolómicos de *T. cruzi* utilizando <sup>1</sup>H-RMN
  - 5.3.6. Estudio del mecanismo de muerte por <sup>1</sup>H-RMN en *T. cruzi*
  - 5.3.7. Estudio del mecanismo de muerte por citometría de flujo
  - 5.3.8. Estudios de viabilidad de los parásitos por citometría de flujo
- 5.4. Estudios de parámetros farmacocinéticos
  - 5.4.1. Estudios de estabilidad de fracciones microsomal y citosólica de hepatocitos de rata
  - 5.4.2. Estudio de fluorescencia intrínseca de las moléculas líderes
  - 5.4.3. Análisis de cinética de penetración de los compuestos en *T. cruzi*
- 6. Resultados y discusión
  - 6.1. Química
  - 6.2. Biología
    - 6.2.1. Evaluación de la actividad frente a *T. cruzi*
    - 6.2.2. Ensayos *in vitro* de la combinación de las moléculas líderes
    - 6.2.3. Actividad de los compuestos en la forma tripomastigotes de *T. cruzi*
    - 6.2.4. Test de mutagenicidad (Test de Ames)
    - 6.2.5. Toxicidad aguda (ensayo de up and down) *in vivo*
    - 6.2.6. Estudio de genotoxicidad -Test de micronúcleos en la médula ósea de ratón
    - 6.2.7. Estudios de teratogenicidad para los compuestos líderes
    - 6.2.8. Modelo agudo para la enfermedad de Chagas

- 6.3. Estudios del mecanismo de acción
  - 6.3.1. Inhibición de la TcTIM
  - 6.3.2. Estudios de docking para los mejores inhibidores de la TcTIM
  - 6.3.3. Dinámica molecular de los compuestos más relevantes
  - 6.3.4. Inhibición de cruzipaína
  - 6.3.5. Inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana
  - 6.3.6. Estudio de metabolismo energético por resonancia magnética nuclear
  - 6.3.7. Detección de apoptosis y apoptosis / necrosis tardía en *T. cruzi* por <sup>1</sup>H-RMN
  - 6.3.8. Detección de viabilidad y apoptosis / necrosis tardía en *T. cruzi* por citometría de flujo **Nfx** para, **Bnz**, **2**, **11**, **16** y **2+16**
- 6.4. Parámetros farmacocinéticos de las moléculas más relevantes
  - 6.4.1. Estudio de la Fluorescencia intrínseca de los compuestos
  - 6.4.2. Parámetros farmacocinéticos con SwissADME de las moléculas más relevantes
- 7. Conclusiones y perspectivas

*A Merche por guiarme en esta etapa, por su apoyo incondicional y cariño.*

Agradecimientos:

Agradezco a todas aquellas personas que me acompañaron en este camino y me han ayudado a seguir adelante:

A Merche y Hugo agradezco desde el primer día que me abrieron las puertas del laboratorio y me brindaron la oportunidad de realizar el presente trabajo brindándome su confianza, apoyo y aliento.

A Guzmán por sus ideas, apoyo, confianza y guía desde el comienzo de mi carrera.

A mi hijo Juan gracias por todo lo que me enseñaste en este tiempo, las palabras faltan para expresar lo que siento por vos amor de mi vida.

A mis abuelos por todo lo que me han brindado desde pequeña, por su apoyo incondicional y aliento día a día.

A Marcelo por su amor, compañía y tranquilidad que me brindó en esos momentos que sentí que no podía.

A Sabrina por su amor, compañía y alegría que me brinda día a día.

A mis padres por su amor, apoyo y contención en este recorrido, no dejándome en ningún momento que baje los brazos.

A mis tíos y primos por su amor, compañía y humor que me han ayudado a seguir adelante.

A mis amigas por siempre estar conmigo en los buenos y malos momentos alentándome y por todas las experiencias de vida compartidas.

A mis amigas de generación: Ana, Stefaní, Jeny, Ceci por todos los momentos compartidos, los cursos compartidos y los exámenes salvados.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo, y los momentos lindos compartidos.

A Javier y Estefanía, por la colaboración en los ensayos *in vitro* de *T.cruzi* y citotoxicidad respectivamente.

A Carina Sánchez por el ensayo de Test de Ames.

A María Eugenia Cruces por los ensayos de teratogenicidad y junto con Belén Dávila por los ensayos de toxicidad *in vivo*.

A Lucía Minini y Alicia Merlino por el estudio de docking y dinámica para los compuestos en TcTIM.

A Leticia y Florencia por la disponibilidad a la hora de analizar los resultados de citometría de flujo y el uso del equipo.

Al grupo del Dr. Pérez -Montfort del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México por los ensayos de inhibición de la TcTIM *in vitro*.

A Luis Fabián de Anatomía Patológica, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay por el estudio histopatológico de los ensayos *in vivo*.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina Tropical, San Lorenzo, Paraguay, por los ensayos *in vivo* en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas, los ensayos *in vitro* en la forma tripomastigote de *T. cruzi* y los estudios de clastogenicidad.

A la ANII por la beca de Iniciación a la Investigación, maestría y doctorado.

A PEDECIBA por su apoyo durante la maestría y doctorado.

# Resumen

Previamente en nuestro grupo de investigación, en la búsqueda de inhibidores de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (*TcTIM*) se evaluaron 230 compuestos de nuestra quimioteca, encontrándose que los mejores inhibidores en su mayoría presentan simetría en su estructura. En esa base, se propuso la obtención de moléculas simétricas derivadas de diarilidencetonas de síntesis sencilla, utilizando condiciones de reacción amigables con el ambiente y de bajo costo de producción. Se sintetizaron 25 moléculas de las cuales 8 tuvieron efecto inhibitorio en la *TcTIM*, 9 presentaron un  $CI_{50}$  frente a *T. cruzi* menor a 5  $\mu M$ , destacándose el compuesto (2*E*,5*E*)-2,5-di[(*E*)-3-(2-tienil)aliliden]ciclopentanona (**16**) con un  $CI_{50}$  de 40 nM, 200 veces más activo que el fármaco de referencia **Nfx** ( $CI_{50}$  de 8  $\mu M$ ). Además, se obtuvieron índices de selectividad muy superiores con respecto a los fármacos de referencia. Se destacan, además, el compuesto (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-di(2-furanil)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**2**) ( $CI_{50}$  de 5  $\mu M$ ) y (2*E*,6*E*)-2,6-di[(*E*)-3-(furan-2-il)aliliden]ciclohexanona (**11**) ( $CI_{50}$  de 0.6  $\mu M$ ) como las más activas y selectivas. El derivado **11** mostró excelentes resultados en la inhibición de la *TcTIM* con un  $CI_{50}$ = 86 nM. Además, el compuesto **11** no fue activo contra la TIM de *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* y la humana, demostrando la alta selectividad a la *TcTIM*. Adicionalmente, estas moléculas no fueron mutagénicas según el test de Ames. Las diarilidencetonas líderes se usaron en dosis combinadas entre ellas o con el fármaco de referencia (**Bnz**), en busca de efectos sinérgicos. Se encontraron varias combinaciones sinérgicas *in vitro*. La combinación del compuesto **2+16** *in vivo* indujo una reducción de más de un 90 % del pico de parasitemia en el modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas. En el análisis histopatológico de los diferentes tejidos de los animales tratados con estos compuestos, se observó disminución de la inflamación y la ausencia de amastigotes en el tejido cardíaco. Al estudiar el mecanismo de muerte de los parásitos, por citometría de flujo y por resonancia magnética nuclear de protón, se evidencia que dos de estos compuestos, **2** y **11**, producen muerte por apoptosis tardía/necrosis y la combinación de los compuestos **2+16** induce la muerte de los parásitos por apoptosis.

# Abreviaturas

ADN - ácido desoxiribonucleico	ELISA – ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
ARN r- Ácido ribonucleico ribosómico	EPC - Eritrocitos policromáticos
ATP - Adenosina trifosfato	EPCMNs - Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos
<b>Ac</b> - es la absorbancia a 610 nm del cultivo sin tratamiento	ESI - Ionización por electrospray
<b>A0c</b> - es la absorbancia a 610 nm del cultivo sin tratamiento a tiempo 0	EtOH – Etanol
<b>A0p</b> - es la absorbancia a 610 nm del cultivo con tratamiento a tiempo 0 (día 0)	AcoEt - Acetato de Etilo
<b>Ap</b> - es la absorbancia a 610 nm del cultivo con tratamiento al día 5	FC - Fracción citosólica
<b>Bnz</b> - Benznidazol	FDA - Food Drug Alimentation
BCA - ácido bicinconínico	FIC - Fracción de inhibición de la concentración
c - cuarteto	FICI - Índice de fracción inhibitoria
CA-AM - Calceína acetoximetilada	FET - Toxicidad en embriones en peces
Cho – colina	FM - Fracción microsomal
CI - Porcentaje de inhibición del crecimiento de los parásitos.	GR - Glóbulos rojos
CI <sub>50</sub> - concentraciones de inhibición del 50% de la actividad enzimática o crecimiento de la forma epimastigote de <i>T. cruzi</i> .	HMBC - correlación heteronuclear a larga distancia
CL <sub>50</sub> - Concentración del compuesto que corresponde a los 50% de los embriones positivos	HPLC - Cromatografía líquida de alto rendimiento
CP - Cruzipaina	<sup>1</sup> H-RMN - Resonancia Magnética Nuclear de protón
CV - Valores de concentración de la inhibición	HsTIM - Triosa fosfato isomerasa de Homo Sapiens
COSY - correlación homonuclear	HSQC - correlación heteronuclear a un enlace de distancia
d - doblete	IICS - Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud
dc - doble cuarteto	IGP - porcentaje de concentraciones de la combinación de compuestos que inhibe el crecimiento de los parásitos.
DL <sub>50</sub> - Dosis letal media	IP - Ioduro de Propidio
DMF - Dimetilformamida	IS - Índice de selectividad
DMSO - Dimetilsulfóxido	Ktz – Ketoconazol
dt - doble triplete	m-multiplete
DTU - Unidad de escritura discreta	MMTS - Metanosulfato de metilo
EDTA - ácido etilendiaminotetraacético	MO - Microscopio óptico
EI-Impacto electrónico	MP - Muerte programada
ENC - Eritrocitos Normocromáticos	MTT - Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

Nfx - Nifurtimox  
OMS - Organización Mundial de la Salud  
PAINS - Pain Assay Interference Compound  
PBS - Solución de Buffer Fosfato estéril  
Pos - Posaconazol  
PTC – fosfatidilcolina  
PUFA - ácidos grasos poliinsaturados  
RMN - Resonancia Magnética Nuclear  
RMSF - Distancia cuadrática media de las fluctuaciones  
s – singulete  
sa - señal ancha  
SFB - Suero Fetal Bovino  
**Tbf** – Terbinafine  
*T. brucei* - *Trypanosoma brucei*  
*T. cruzi* - *Trypanosoma cruzi*  
TcTIM - Triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*  
TFA - ácido trifluoracético  
TLC o CCF - Cromatografía en capa fina  
UFC - Unidades formadoras de colonia  
UNAM - Universidad Nacional Autónoma de México



# **INTRODUCCIÓN**

# 1- INTRODUCCIÓN

## 1.1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, comúnmente conocida como la Tripanosomiasis americana, es una enfermedad descubierta por el científico brasileño, Carlos Chagas en el año 1909. El Dr. Carlos Chagas en sus investigaciones develó el agente, vector, patología, clínica y epidemiología, siendo uno de los más completos descubrimientos acerca de una enfermedad realizado por una sola persona en la historia <sup>1</sup>. Es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad olvidada infecciosa tropical en Latinoamérica, donde cerca de 8 millones de individuos padecen la enfermedad, y cerca de 56000 nuevos casos por año son reportados. Además, se estima que esta enfermedad ocasiona la muerte de 10600 individuos por año <sup>2 3 4</sup>. Es endémica en 21 países de Latinoamérica y se ha vuelto una preocupación mundial como resultado de la globalización y migración en masa de individuos infectados. Por ello es que actualmente la enfermedad de Chagas es reportada en 19 áreas no endémicas incluyendo parte de la Unión Europea, Canadá, Estados Unidos, Japón y Australia (**Figura 1**) <sup>5 6</sup>.

Es causada por un parásito monoflagelado, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y transmitida principalmente vía vector a través de deyecciones del insecto hemíptero, que pertenece a la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, y es comúnmente conocido como “vinchucas”. También puede ser transmitida congénitamente, mediante transfusiones de sangre, trasplante de corazón y recientemente se ha descubierto que puede ser transmitida vía oral mediante el consumo de alimentos contaminados con el parásito <sup>6</sup>.

---

<sup>1</sup> <http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>, noviembre 2020

<sup>2</sup> Vos, R.M., Barber, B., Bell, A., Bertozzi -Villa, S., Biryukov, I., Bolliger, F., Charlson T, A., Davis, L., Degenhardt, D., Dicker, et. al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990 –2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **2015**, *Lancet.*, 386:743 –800.

<sup>3</sup> Neghme, A. Hipótesis acerca de la evolución de la tripanosomiasis americana. **1982**, *Parasitología al Día*, 6:23–25.

<sup>4</sup> Usinger R., Wygodzinsky P., Ryckman R. The biosystematics of Triatominae. **1966**, *Ann. Rev. Entomol.*, 2:309–330.

<sup>5</sup> Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J., Montgomery, S.P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease in the United States. **2011**, *Clin. Microbiol. Rev.*, 24:655–681.

<sup>6</sup> Requena -Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D.A.J., Gascon, J., Muñoz, J. Prevalence of Chagas Disease in Latin -American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta -analysis, **2015**, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9:e0003540.

Una vez infectada la persona, el período de incubación de la enfermedad se estima que puede ir de 5 a 7 días, siendo en algunos casos hasta 12 días. La enfermedad presenta dos fases: la fase aguda y la fase crónica. La fase aguda que dura de 2 a 3 meses generalmente es asintomática, la cual puede pasar imperceptible, y está caracterizada por la alta parasitemia en sangre de los individuos infectados. Algunos de los síntomas que pueden llegar a aparecer generales y más frecuentes son: fiebre, abatimiento, cefalea, raquialgia, nerviosismo, irritabilidad, llanto, convulsiones, anorexia, vómitos, diarrea, meteorismo, palpitaciones, precordialgias, dolores musculares, astenia y algunos otros de menor importancia <sup>7</sup>.



**Figura 1.** Población mundial estimada con la enfermedad de Chagas. Se muestra la diseminación de la enfermedad a países no endémicos por movimientos migratorios.

<sup>8</sup>.

De todos los síntomas, la “fiebre” es sin duda el más destacado y se observa más frecuentemente en lactantes y niños pequeños. La fiebre desaparece simultáneamente con los síntomas característicos de la enfermedad siendo el más común el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña (**Figura 2**) <sup>9 10 11 12</sup>. La fase crónica de la enfermedad comienza cuando la parasitemia desciende, y la mayoría de las personas no tiene síntomas a lo largo de la vida. Sin embargo, luego de 10 o 30 años de la infección el 40% de los individuos que padecen la enfermedad manifiestan malestar gastrointestinal o de corazón que pueden llevar a la muerte <sup>12</sup>.

<sup>7</sup> Lugones, H.S. Consideraciones acerca de los síntomas del período agudo de la Enfermedad de Chagas aguda. **1970**, *Segundo Simposio Internacional de Enfermedad de Chagas*, 9:331

<sup>8</sup> [https://elpais.com/elpais/2015/04/10/album/1428681804\\_082993.html#foto\\_gal\\_3](https://elpais.com/elpais/2015/04/10/album/1428681804_082993.html#foto_gal_3)

<sup>9</sup> Lugones, H.S. Consideraciones acerca de los síntomas del período agudo de la Enfermedad de Chagas en la infancia. **1959**, *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas; Rio de Janeiro, Brasil*;861.

<sup>10</sup> Mazza, S., Freire R. Manifestaciones cutáneas en Enfermedad de Chagas. Chagoma de Inoculación, Chagomas Metastásicos y Chagomas Hematógenos. **1940**, *Rev. MEPRA*,46:3-38.

<sup>11</sup> Romaña, C. Enfermedad de Chagas. **1963**, *Buenos Aires; López Libreros Editores*.

<sup>12</sup> Lugones, H.S. Chagas agudo: situación actual (conferencia). **1999**, *1º Simposio virtual de Enfermedad de Chagas. Federación Argentina de Cardiología*. URL: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas/c03lugon/c031lugon/c03lugon.htm>.



**Figura 2.** Síntoma oftalmoganglionar o signo de Romaña.

## 1.2. Generalidades del parásito

*T. cruzi* es un parásito eucariota monoflagelado que pertenece al orden Kinetoplastida, género *Trypanosoma* que infecta invertebrados, mamíferos y plantas. Los humanos son afectados por dos tipos de tripanosomiasis: la enfermedad de Chagas, tripanosomiasis americana, causada por el parásito *T. cruzi* y la enfermedad del sueño, tripanosomiasis africana, causada por el parásito *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*).

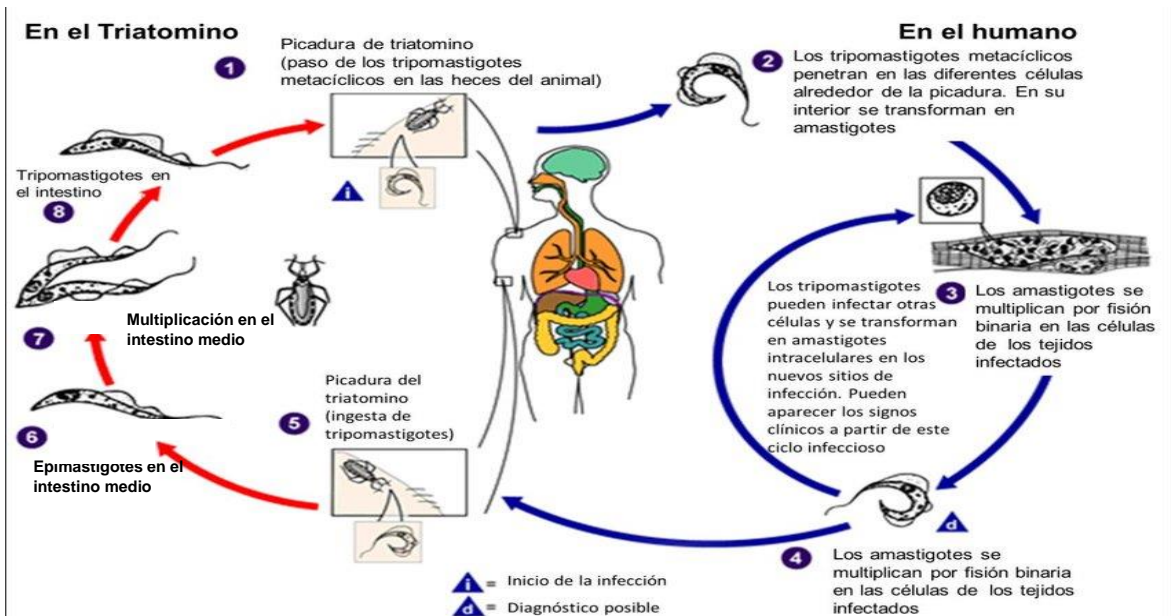
El orden *Kinetoplastida* también incluye especies del género *Leishmania* que causan diferentes tipos de Leishmaniosis en países tropicales y subtropicales <sup>13</sup>.

El ciclo inicia cuando el insecto infectado pica y defeca sobre la herida. En las heces los tripomastigotes metacíclicos (células fusiformes, kinetoplasto subterminal), que se encuentran en el intestino posterior del insecto, entran al torrente sanguíneo del ser humano o animal de forma mecánica por una herida abierta o mucosa. Cuando entra a una célula mamífera, el parásito se convierte en amastigote (células redondeadas sin un flagelo emergente), estas células se multiplican principalmente mediante fisión binaria formando pseudoquistes, cuando la célula se rompe los amastigotes se diferencian a tripomastigotes pudiendo estos últimos infectar cualquier célula nucleada. Cuando un insecto vector (por ejemplo, en Uruguay el vector domiciliario *Triatoma infestans*) succiona sangre de un huésped infectado, algunos tripomastigotes pasan a él a través de la sangre. En el intestino medio del insecto se diferencian a epimastigotes los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva. Luego de la reproducción a través de fisión binaria, los epimastigotes pasan al recto. Allí se convierten en tripomastigotes metacíclicos y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo huésped, repitiendo el ciclo (**Figura 3**) <sup>14 15 16</sup>.

<sup>13</sup> Barret, M.P., Burchmore, R.J.S., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo J.J., Krishna S., The trypanosomiasis. **2003**, *The Lancet*, 362:1469:1480.

<sup>14</sup> Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C.C. *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **2002**, *J. Exp. Med.*, 185: 401–413.

<sup>15</sup> Burgos, J.M., Begher, S., Freitas, J.M., Bisio, M., Duffy, T., Altchek, J., Teijeiro, R., Lopez Alcoba, H., Deccarlini, F., Freilij, H., Levin, M.J., Levalle, J., Macedo, A.M., Schijman, A.G. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi*



**Figura 3.** En la figura se muestra el ciclo de *T. cruzi*, sus etapas en el hombre y en *Triatoma infestans*. (Extraída y modificada de la referencia <sup>17</sup>).

### 1.3. Terapia actual para la enfermedad

Los fármacos actualmente disponibles comercialmente para la enfermedad son Nifurtimox (**Nfx**) y Benznidazol (**Bnz**) que solamente son efectivas en la etapa aguda o muy temprana de la enfermedad (**Figura 4**). Ambos medicamentos tienen muchos efectos secundarios tales como: toxicidad en el sistema nervioso central, leucopenia, entre otros. Además, se encuentran contraindicados en caso de embarazo y son mutagénicos <sup>18 19</sup>. El **Nfx**, comercialmente distribuido como Lampit® por Bayer <sup>20</sup>, actúa por la formación de radicales libres, metabolitos electrofílicos o ambos. El grupo nitro se reduce a grupo amino por la acción de una aminoreductasa <sup>21</sup>. Se estima que

populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. **2005**, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73:1016–1018.

<sup>16</sup> Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **2006**, *PLoS Pathog.*, 2:e24

<sup>17</sup> <https://mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/TrypanosomosisAmericana>. Fecha de acceso 7/12/2020

<sup>18</sup> Beaumier, C.M., Gillespie, P.M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P.J., Bottazzi, M.E. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. **2016**, *Vaccine*, 34:2996–3000.

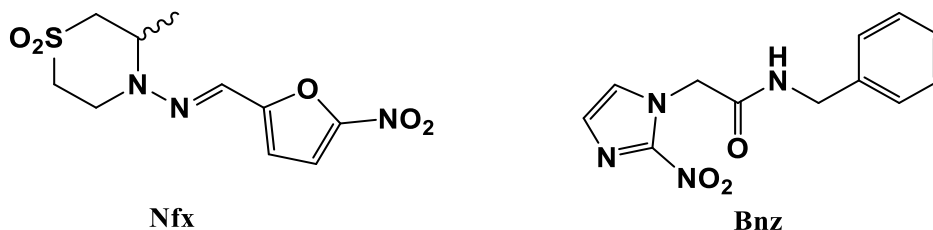
<sup>19</sup> Cabrera, M., Lavaggi, M.L., Hernández, P., Merlino, A., Gerpe, A., Porcal, W., Boiani, M., Ferreira, A., Monge, A., de Cerain, A.L., González, M., Cerecetto, H. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. **2009**, *Toxicol Lett.*, 190: 140-149.

<sup>20</sup> Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos, I., Solórzano, F., Miranda, G. Tripanosomiasis americana. **2008**, *Enfermedad de Chagas*. 17ª edición, capítulo 71.

<sup>21</sup> Maya, J.D., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J.M., Tellez, R., Gaule, C., Morello, A. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **1997**, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 86: 101–106.

el **Nfx** podría inhibir la enzima tripanotión reductasa del parásito, que cataliza la eliminación de especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi*, sin embargo, hoy en día no existe seguridad acerca del mecanismo de acción del fármaco que ejerce su efecto tóxico sobre el parásito<sup>22 23</sup>. El **Bnz**, por otro lado, produciría la modificación de enlaces covalentes de macromoléculas vía nitroreducción del fármaco y nitroreducción de intermedios con los componentes del parásito; o la unión con el ADN, lípidos o proteínas<sup>24</sup>.

Por lo tanto, actualmente los esfuerzos para tratar esta enfermedad están enfocados en controlar la transmisión del vector, la búsqueda de medicamentos más eficientes y con bajos efectos secundarios. En este último aspecto los medicamentos para esta enfermedad tienen que ser de bajo costo, dado que la población que padece esta enfermedad es en su mayoría de bajos recursos económicos. Se han encontrado nuevas moléculas como potenciales fármacos para esta enfermedad, pero su producción es compleja y de alto costo<sup>25 26 27 28 29</sup>. Un ejemplo de estas moléculas fueron los derivados de Posaconazol (**Pos**, **Figura 8 B**), que fracasaron en etapas clínicas avanzadas, pero que además proponían un medicamento diez veces más costoso que los actuales<sup>30</sup>.



**Figura 4.** Fármacos actuales disponibles para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

<sup>22</sup> Hall, B. S., Bot, C., Wilkinson, S. R. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. **2011**, *J. Biol. Chem.*, 286:13088-13095.

<sup>23</sup> Boiani, M., Piacenza, L., Hernandez, P., Boiani, L., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Denicola, A. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide – containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved?. **2010**, *Biochem. Pharmacol.*, 79:1736-1745.

<sup>24</sup> Diaz de Toranzo, E.G., Castro, J.A., Franke de Cazzulo, B.M., Cazzulo, J.J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **1988**, *Experientia*, 44:880-881.

<sup>25</sup> Keenan, M., Abbott, M.J., Alexander, P.W., Armstrong, T., Best, W.M., Berven, B., Botero, A., Chaplin, J.H., Charman, S.A., Chatelain, E., Von Geldern, T.W., Kerfoot, M., Khong, A., Nguyen, T., McManus, J.D., Morizzi J., Ryan E., Scandale I., Thompson R.A., Wang S.Z., White K.L. Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. **2012**, *J. Med. Chem.*, 55: 4189-4204.

<sup>26</sup> Buckner, F.S., Urbina, J.A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **2012**, *Int. J. Parasit.*, ISSN 2211-3207, 10.1016/j.ijppdr.2011.12.002.

<sup>27</sup> Diniz, L. de F., Caldas, I.S., Guedes, P.M., Crepalde, G., de Lana, M., Carneiro, C.M., Talvani, A., Urbina, J.A., Bahia M.T. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **2010**, *Antimicrob Agents Chemother*, 54:2979-2986

<sup>28</sup> Caballero, A.B., Marín, C., Rodríguez-Diéguez, A., Ramírez-Macias, I., Barea, E., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one-based complexes. **2011**, *J. Inorg. Biochem.*, 105:770-776.

<sup>29</sup> Sanchez-Sancho, F., Campillo, N.E., Paez, J.A. Chagas Disease: Progress and New Perspectives. **2010**, *Curr. Med. Chem.*, 17:423-452.

<sup>30</sup> Molina, J., Gomez, P., Salvador, F., Trevino, B., Sulleiro, E., Serre, N., Pou, D., Roure, S., Cabezas, J., Valerio, L., Blanco-Grau, A. Sanchez-Montalva, A., Vidal, X., Pahissa, A. Randomized trial of posaconazole and benzimidazole for chronic Chagas' disease. **2014** *N. Engl. J. Med.*, 370:1899-1908.

#### 1.4. Blancos terapéuticos

Con la secuenciación completa del genoma de *T. cruzi*, se han identificado un gran número de potenciales y validadas dianas terapéuticas para ser utilizadas en el desarrollo de agentes multifuncionales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se pueden mencionar, entre otras, escualeno epoxidasa, C14-desmetilasa, farnesil transferasas, transsialidasa, cAMP-fosfodiesterasas, ribosafosfato isomerasa, triosafosfato isomerasa, tripanotión sintetasa y proteasas (cruzipaína) como potenciales blancos para el desarrollo de nuevas entidades bioactivas contra este parásito <sup>26</sup>.

Una importante característica de *T. cruzi* es la dependencia que tiene este parásito con la glicólisis como recurso energético de supervivencia <sup>31</sup>. Por este motivo las enzimas que participan en la glicólisis pueden considerarse como muy buenos blancos para la búsqueda de nuevos fármacos para esta enfermedad. Dicho parásito realiza lo que se denomina “fermentación aeróbica”, proceso por el cual la glucosa se degrada sólo parcialmente a dióxido de carbono excretando hacia el medio una cantidad considerable de carbono en forma de ácidos carboxílicos, mayoritariamente succinato, y en menor proporción acetato y alanina (en la mayoría de los seres vivos esto ocurre en condiciones anaeróbicas) <sup>32</sup>. En la literatura se indica que existen diversas técnicas empleadas para el estudio de los productos del catabolismo de la glucosa en tripanosomatídeos, un ejemplo es el uso de <sup>13</sup>C- ó <sup>1</sup>H-RMN <sup>33 34 35 36</sup>. En muchos casos dichos estudios se combinan con ensayos enzimáticos específicos como forma de corroborar la excreción de esos metabolitos. El metabolismo energético se desarrolla principalmente en el glicosoma y mitocondria a diferencia de las células eucariotas <sup>37</sup>. La glucosa entra al parásito por difusión facilitada, sin embargo, se desconoce cómo entra al glicosoma. Estos tripanosomatídeos, a diferencias de las células eucariotas,

---

<sup>31</sup> Gómez, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. **1995**, *Chem. Biol.*, 2:847-855.

<sup>32</sup> Franke de Cazzulo, B.M., Martínez, J., M., North, J.M., Coombs, G.H., Cazzulo, J.J. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **1994**, *FEMS Microbiology Letters*, 124: 81-86.

<sup>33</sup> Boiani, L., Aguirre, G., González, M., Cerecetto, H., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Bertinaria, M., Guglielmo, S. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: Mechanism of action studies. **2008**, *Bioorg. Med. Chem.*, 16: 7900-7928.

<sup>34</sup> Boiani, M., Boiani, L., Alicia, A., Hernández, P., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Cerecetto, H., González, M. Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: Synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. **2009**, *Eur. J. Med. Chem.*, 44: 4426-4433.

<sup>35</sup> Penin, P., Sanchez-Moreno, M., de Diego J.A. Proton nuclear magnetic resonance analysis of metabolic end products of the Bolivia strain of *Trypanosoma cruzi* and three of its clones. **1998**, *Comp. Biochem. Physiol.*, 120: 571-574.

<sup>36</sup> Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **2006**, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 149: 1-9.

<sup>37</sup> Michels, P. A. M., Marchand, M., Kohl, L., Allert, S., Wierenga, R. K., Opperdoes, F. R. The cytosolic and glycosomal isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei* have a distant evolutionary relationship. **1991**, *Eur. J. Biochem.*, 198:421-428.

tienen 7 enzimas de la vía glucolítica, dos enzimas del metabolismo del glicerol y varias enzimas de la vía de las pentosas fosfato localizadas en el glicosoma<sup>38 39</sup>.

La hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, enzimas regulatorias claves en la mayoría de los sistemas glicolíticos, desde bacterias a mamíferos, son poco reguladas en el parásito. La casi completa falta de controles inhibitorios determinan la ausencia del “efecto Pasteur”; si bien en la mayoría de los organismos la transición de anaerobiosis a aerobiosis se acompaña por una rápida y considerable disminución en el consumo de glucosa, es decir, el proceso de glicólisis es inhibido por oxígeno, los tripanosomatídeos no muestran dicho efecto o incluso presentan el efecto opuesto<sup>40</sup>.

El piruvato está localizado en un punto metabólico de ramificación llevando a la excreción de varios productos finales, tales como acetato, alanina y lactato. El acetato es el producto final que se forma en mayor cantidad en la mitocondria y es excretado por difusión simple a través de la membrana citoplasmática. Por otro lado, la mayoría de los tripanosomatídeos producen lactato a partir de glucosa aunque a menudo como un producto final minoritario<sup>33 41</sup>.

La triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (*TcTIM*) se ha vuelto una enzima útil en el diseño de nuevos fármacos en la actualidad, ya que es una enzima esencial para la obtención de energía a partir de la glucosa. Por esta razón en la actualidad se propone en muchos trabajos diseñar compuestos capaces de inhibirla, sin alterar la triosafosfato isomerasa de *Homo sapiens* (*HsTIM*)<sup>42 43 44 45</sup>, de modo de matar al parásito sin afectar la vida humana de forma específica.

---

<sup>38</sup>Opperdoes, F.R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **1987**, *Annu Rev Microbiol.*, *41*:127-151.

<sup>39</sup>Sánchez-Moreno, M., Lasztity, P., Coppens, I., Opperdoes, F. R. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia charadas*. **1992**, *Mol. Biochem. Parasitol.*, *54*:185-200.

<sup>40</sup>Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **2006**, *PLoS Pathog.*, *2*:e24.

<sup>41</sup>Novaes, D.G., Gonçalves, R.V., Penitente, A.R., Cupertino, M.C., Maldonado, I., Talvani, A., Natali, A.J. Parasite control and skeletal myositis in *Trypanosoma cruzi*-infected and exercised rats. **2017**, *Acta Trop.*, *170*:8-15.

<sup>42</sup>Téllez-Valencia, A., Avila-Rios, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou M., López-Calahorra F., Gómez-Puyou A. Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. **2002**, *Biochem Biophys Res Commun*, *295*:958–963.

<sup>43</sup>Téllez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez-Puyol, M., Gómez-Puyol, A., Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. **2004**, *J Mol Biol*, *341*:1355–1365.

<sup>44</sup>Olivares-Illana, V., Rodríguez-Romero, A., Becker, I., Berzunza, M., Garcia, J., Perez-Montfort, R., Cabrera, N., Lopez-Calahorra, F., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. **2007**, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *1*: 1 – 8.

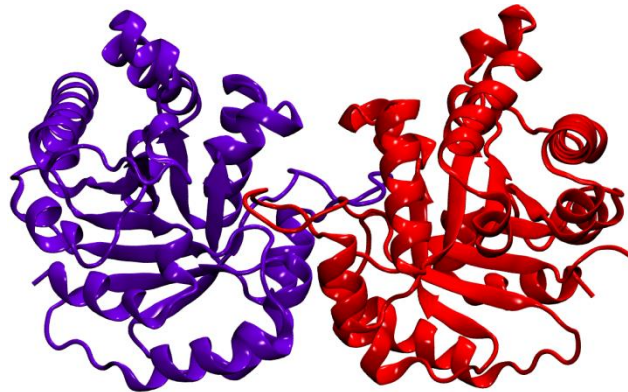
<sup>45</sup>Alvarez, G., Aguirre-Lopez, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., Lopez, G.V, Lavaggi, M.L, Porcal, W., Di Maio, R., Gonzalez, M., Cerecetto, H., Cabrera, N., Perez-Montfort, R., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer – interface – irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. **2010**, *Eur. J. Med. Chem.*, *45*:5767 – 5772.



#### 1.4.1. Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (*TcTIM*).

La *TcTIM* cataliza la isomerización del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en el quinto paso de la glicólisis. Esta misma enzima existe en la mayoría de los seres vivos, incluyendo los humanos. La *TcTIM* y la *HsTIM* presentan iguales residuos catalíticos, sin embargo hay 32 residuos interfaciales que son diferentes en ambas enzimas. La homología es aproximadamente 52 % en esta zona, por lo que podrían encontrarse inhibidores que presenten especificidad por las interfaces en las enzimas parasitarias<sup>46</sup>. Sumado a lo anterior, parásitos con ausencia de TIM no son viables, en este sentido la enzima ha sido propuesta como un posible blanco para el diseño de fármacos para la Enfermedad de Chagas<sup>47</sup>.

En la **Figura 5** se representa la estructura de la *TcTIM*, la cual consiste en ocho cadenas betas paralelas rodeadas por ocho alfa-hélices, formando una estructura tipo barril<sup>44 48</sup>.



**Figura 5.** Representación gráfica de la estructura de la *TcTIM* obtenida mediante difracción de rayos X (PDB ID: 3Q37).

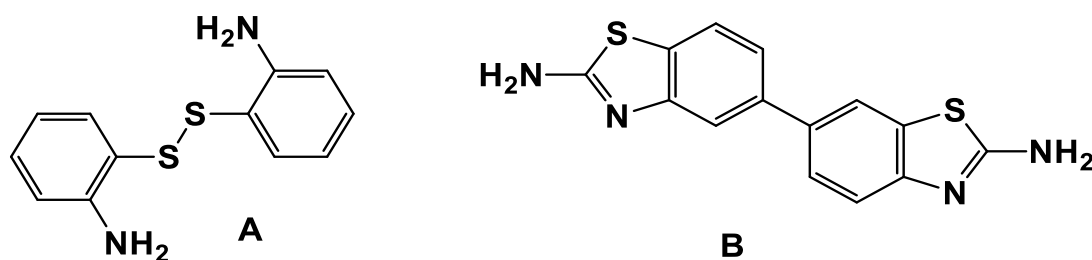
El grupo de Ruy Pérez Montfort, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ha descrito compuestos que inhiben la *TcTIM* que tienen la particularidad de ser simétricos. Además, se ha indagado las interacciones que realizan dichos compuestos con la *TcTIM* y se observó que el compuesto **A** (**Figura 6**)

<sup>46</sup> Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gómez Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Perez-Montfort, R. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. **1998**, *Journal of Molecular Biology*, *283*: 193-203

<sup>47</sup> Olivares-Illana, V., Perez-Montfort, R., Lopez-Calahorra, F., Costas M, Rodriguez-Romero A., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. **2006**, *Biochem.*, *45*: 2556 – 2560

<sup>48</sup> Gonzalez, M., Cerecetto, H. Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective. **2011**, *Expert Opin. Ther Pat.*, *5*:699 – 715.

se une irreversiblemente según lo indica la difracción de rayos X; sin embargo, para el compuesto **B** (Figura 6), por los estudios de cinética correspondientes, se piensa que la unión es reversible <sup>44 45</sup>.



**Figura 6:** Estructuras de los compuestos **A** y **B**, identificados como inhibidores de la *TcTIM* <sup>45</sup>.

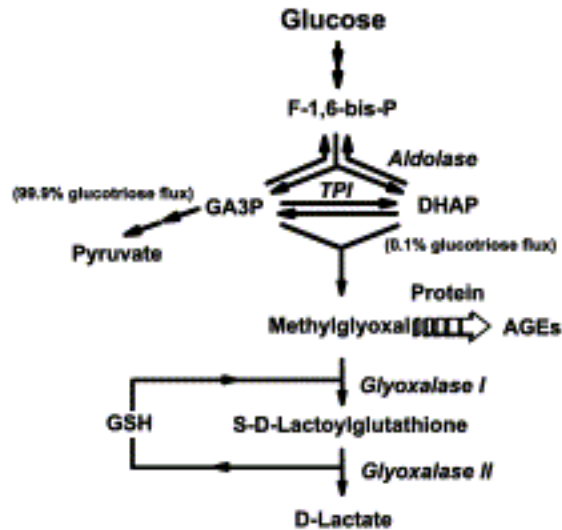
Con lo anterior mencionado nuestro grupo comenzó la búsqueda de compuestos que sean capaces de intervenir en la interface de la *TcTIM* desestabilizando la estructura dimérica de la enzima volviéndola inactiva, interrumpiendo la ruta glicolítica de forma de detener la proliferación del parásito. Además, la acumulación de acetona fosfato derivaría en la formación de metilgloxal, provocando la glicación inespecífica de macromoléculas, derivando en un mal funcionamiento de las mismas, finalmente el exceso de esta sustancia termina en la formación y acumulación de lactato (ver **Figura 7**) <sup>49 50</sup>. La actividad TIM es de importancia crítica para el buen funcionamiento de la célula, interviene en la glucólisis y en otras vías metabólicas de los glúcidos. Por ejemplo, en los seres humanos, enfermedades graves están asociadas con variantes de genes con mutaciones puntuales que causan una disminución de la actividad de la TIM, como por ejemplo anemia hemolítica y neurodegeneración. Los síntomas de estas enfermedades posiblemente están relacionados con la toxicidad de DHAP. Los pacientes homocigotos con esta mutación tienen trastornos graves y generalmente no viven más de 5 años <sup>49 50 51</sup>. La ausencia de la TIM es la única enfermedad de deficiencia glicolítica humana que es letal, generalmente en la primera infancia. El efecto letal de la deficiencia de TIM también se ha demostrado en muchos otros organismos <sup>52</sup>. Por lo tanto, TIM es un objetivo atractivo para la quimioterapia con medicamentos, siempre y cuando no sea atacando las células normales humanas.

<sup>49</sup> Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horányi, M., Baróti, K., Hollan, S., Thornalley, P.J. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency **2003**, *Biochim Biophys Acta.*, 1639:121-132.

<sup>50</sup> Greig, N., Wyllie, S., Patterson, S., Fairlamb, A.H. A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids **2009**, *FEBS J.*, 276:376-86.

<sup>51</sup> Wierenga, R.K., Kapetaniou, E.G., Venkatesan, R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst cell. **2010**, *Mol. Life Sci.*, 67:3961-82.

<sup>52</sup> Michels, P.A.M., Wierenga, R.K. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. **1993**, *Eur. J. Biochem.*, 211: 703-710.



**Figura 7.** Aumento de la DHAP involucra aumento de metilglicoxal provocando glicación, oxidación y nitrosación de macromoléculas (AGEs) <sup>49</sup>.

#### 1.4.2. Cruzípaína

Cruzipaína (CP), la principal cisteín proteasa presente en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* es una endopeptidasa que, al igual que otras enzimas de esta clase, une el sustrato en una conformación extendida ubicándose las cadenas laterales del mismo en subsitios de unión localizados en el sitio activo de la proteína. Las funciones de la cruzipaína no están aun completamente definidas, pero incluirían: 1) la digestión lisosomal de proteínas, exógenas o del propio parásito, 2) la protección contra la respuesta inmune del hospedador, por destrucción del fragmento cristizable de las inmunoglobulinas ligadas a los respectivos antígenos, lo que dejaría el fragmento de unión al antígeno, incapaz de activar el complemento y que actuaría así como protector, 3) un papel en la penetración del tripomastigote en la célula del mamífero, pues se sabe que inhibidores de proteinasas inhiben parcialmente este proceso, 4) un papel en las etapas de diferenciación en diferentes puntos del ciclo de vida del parásito. En estudios realizados, empleando inhibidores de cisteín proteasa capaces de penetrar en el parásito, indican claramente una participación importante de estas enzimas, entre ellas presumiblemente la cruzipaína. Estos estudios abren la posibilidad de desarrollar inhibidores de la cruzipaína como fármacos antichagásicos <sup>53</sup>

54 55

<sup>53</sup> Cazzulo, J.J., Stoka, V., Turk, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the Protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **1997**, *Biol. Chem.*, 378: 1-10.

<sup>54</sup> Franke de Cazzulo, B.M., Martínez, M., North, M.J., Coombs, G.H., Cazzulo, J.J. Effect of proteinase inhibitors on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **1994**, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 124: 81-86.

#### 1.4.3. Biosíntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi*.

Se ha identificado como otra posible diana terapéutica la biosíntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi*. Al igual que los hongos, *T. cruzi* posee claras diferencias, respecto al huésped mamífero, en la biosíntesis de esteroides de membrana. Las principales diferencias radican en que los mamíferos producen colesterol utilizando complejos multicatalíticos, mientras que este protozoo produce ergosterol utilizando proteínas monofuncionales. A partir de estas diferencias y del conocimiento de la ruta biosintética de esteroides de membrana, se han investigado como dianas terapéuticas varias etapas en la biosíntesis de ergosterol a partir de ácido mevalónico<sup>56 57</sup>. Una de las dianas bioquímicas más estudiada es la enzima C-14 esteroil desmetilasa (**Figura 8 A**)<sup>58</sup>. Analizando la actividad antichagásica de inhibidores de dicha enzima comercialmente disponibles, como Ketoconazol e Itraconazol, se encontró que resultaron ser activos *in vitro*, pero no suficientemente poderosos para eliminar *T. cruzi* de animales o humanos infectados crónicamente. Otros potentes inhibidores selectivos de la C-14 esteroil desmetilasa como el **Pos** y el Ravuconazol, también han resultado ser muy activos contra *T. cruzi in vitro* e *in vivo* (**Figura 8 B**)<sup>59</sup>.

La mayoría de los compuestos mencionados han completado buena parte del desarrollo preclínico y clínico humano como antimicóticos, siendo el más avanzado el **Pos**, que ha sido registrado como agente antimicótico sistémico en Estados Unidos, Unión Europea y Australia. Sin embargo, aún no se ha completado la evaluación de dichos compuestos en humanos como agentes anti-*T. cruzi*. Se debe tener en cuenta que estos compuestos presentan importantes efectos cardiotóxicos. Este potencial efecto tendrá que tenerse en cuenta para el diseño de estudios clínicos en humanos, particularmente en lo que se refiere a seguridad en pacientes con alteraciones cardíacas de origen chagásico. También existen otros problemas de aspecto sintético y económico que dificultan su completo desarrollo<sup>60 61 62</sup>.

---

<sup>55</sup> Meirelles, M.N.L., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S.G., Costa, E.M., Murta, A.C.M., Scharfstein, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi in vitro*. **1992**, *Mol. Biochem. Parasitol.*, *52*: 175-184.

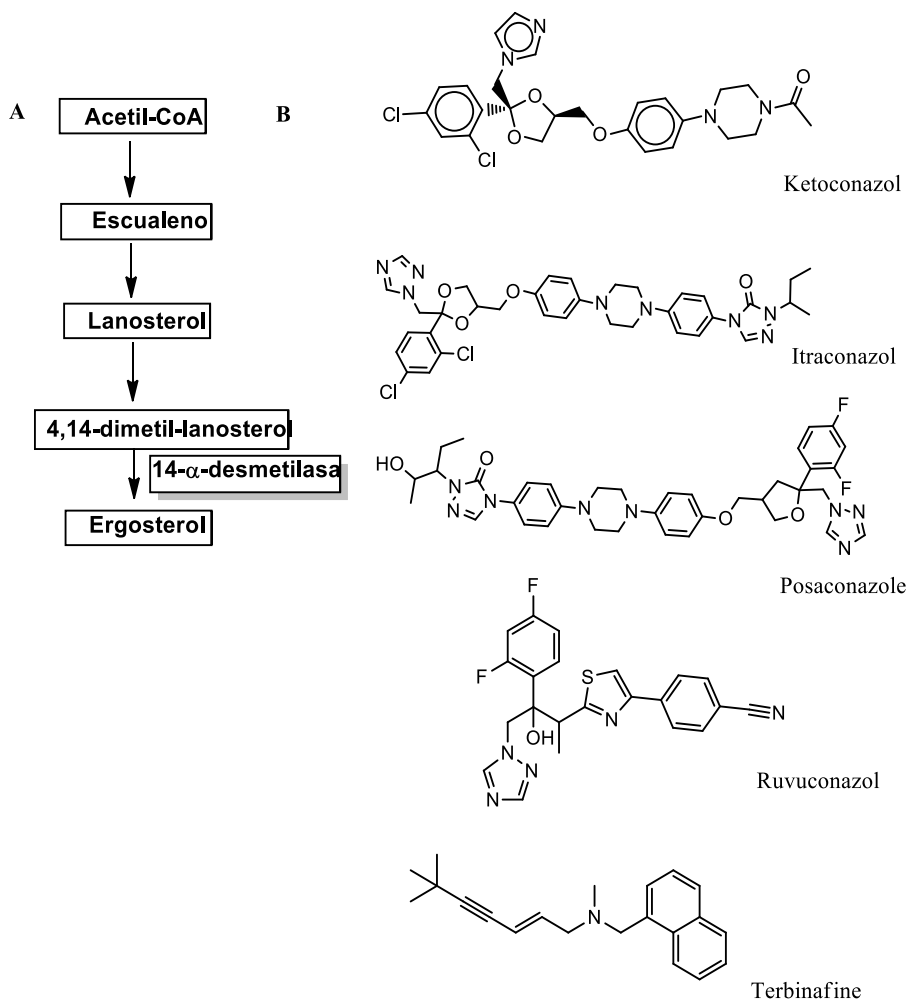
<sup>56</sup> Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **2003**, *Mol. Biochem. Parasitol.*, *126*:129-142.

<sup>57</sup> Urbina, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new Approaches. **2010**, *Acta. Trop.*, *115*:55-68.

<sup>58</sup> Buckner, F.S., Urbina, J.A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **2012**, *Int. J. Parasit.*, *2*:236-242.

<sup>59</sup> Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A.J., Loebenberg, D., Urbina, J.A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **2000**, *Antimicrob Agents Chemother.*, *44*:150-155.

<sup>60</sup> Urbina, J.A., Lira, R., Visbal, G., Bartoli, J. *In-vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **2000**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, *44*:2498-2502.



**Figura 8. A)** Vía metabólica más estudiada para la inhibición de la biosíntesis de esteroides de *T. cruzi*. **B)** Inhibidores reportados de la biosíntesis de esteroides activos contra *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*.

### 1.5. Mecanismo de muerte celular.

El tipo de muerte celular y mecanismos involucrados han tenido relevancias para entender la evolución y desarrollo de enfermedades infecciosas. La muerte programada (MP) es un proceso regulado que permite a organismos eliminar células sin ocasionar un proceso inflamatorio. Dentro de la MP se incluye la apoptosis y la autofagia, mecanismos de automuerte, involucrada en muchos procesos biológicos, que se caracteriza en células mamíferas por la reducción del volumen celular, la

<sup>61</sup> Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Sanchez, G., Vargas, S.L., Rodríguez, J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. **2003**, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 97:23-29.

<sup>62</sup> Ferraz, M.L., Gazzinelli, R.T., Alves, R.O., Urbina, J.A., Romanha, A.J. The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benzimidazole. **2007**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51:1359-1364.

exposición de la fosfatidilserina, activación de las caspasas, activación internucleosomal del ácido desoxiribonucleico (ADN), formación de ampollas en la membrana plasmática, formación de cuerpos apoptóticos, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de citocromo c al citoplasma <sup>63</sup>. Sin embargo, la necrosis es definida como un proceso de muerte celular no apoptótica, mostrando algunos aspectos de la muerte celular programada. Se caracteriza por alteraciones mitocondriales dramáticas, depleción de adenosín trifosfato (ATP), generación de especies reactivas de oxígeno, pérdida de la homeostasis del calcio, vacuolización plasmática y por último fragmentación de la membrana plasmática acompañado de un proceso inflamatorio <sup>64</sup>. Diferentes técnicas se han empleado para el estudio de la muerte de *T. cruzi* tales como citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, Western Blot, electroforesis en gel de agarosa, y análisis estructural o menos destructivos como el análisis de inhibición de las proteasas <sup>65 66 67 68 69</sup>. Varias señales asociadas a lípidos son visibles en espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN), la más importante es la señal del metileno (CH<sub>2</sub>) cerca de 1.3 partes por millón (ppm) y la señal del metilo (CH<sub>3</sub>) cerca de 0.9 ppm. El aumento de las resonancias de metileno en los espectros <sup>1</sup>H-RMN, resultantes de la acumulación de lípidos visibles móviles, se correlaciona con el inicio de la apoptosis en varios modelos celulares tratados con fármacos <sup>70</sup>. Lo anterior se ve reflejado en un aumento en la relación CH<sub>2</sub> / CH<sub>3</sub> <sup>71</sup>, y en algunos casos incrementan las señales de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a 2.8 y 5.4 ppm <sup>72</sup>. Otras señales modificadas son las de los compuestos que contienen colina (colina -Cho-, fosfatidilcolina -PTC-, fosfocolina -PC-, así como taurina y mioinositol) cerca de 3.2 ppm que se han asociado con apoptosis <sup>73</sup>. Sin embargo, los cambios en estas señales parecen no ser

---

<sup>63</sup> Menna-Barreto, R.F., Goncalves, R.L., Costa, E.M., Silva R.S., Pinto, A.V., Oliveira, M.F., de Castro, S.L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **2006**, *Free Radical Biology and Medicine*, 47:644-653.

<sup>64</sup> Zong, W.X., Thompson, C.B. Necrotic death as a cell fate. **2006**, *Genes Dev.*, 1:1-15.

<sup>65</sup> Alvarez, V. E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J. J., Turk, B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **2008**, *The Journal of Biological Chemistry*, 283:3454-3464.

<sup>66</sup> Alvarez, V. E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J. J., Turk, B. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation. A possible new strategy for fighting parasitic infections? **2008**, *Autophagy*, 4:361-363

<sup>67</sup> Jimenez, V., Paredes, R., Sosa, M. A., Galanti, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **2008**, *Journal of Cellular Biochemistry*, 105:688-698.

<sup>68</sup> Menna-Barreto, R. F., Corrêa, J. R., Cascabulho, C. M., Fernandes, J.M. C., Pinto, A. V., Soares, M. J., de Castro, S. L. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. **2009**, *Parasitology*, 136:499-510.

<sup>69</sup> Irigoín, F., Inada, N. M., Fernandes, M. P., Piacenza, L., Gadelha, F. R., Vercesi, A. E., Radi, R. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **2009**, *The Biochemical Journal*, 418:595-604.

<sup>70</sup> Blankenberg, F. G., Storrs, R. W., Naumovskiy, L., Goralski, T., Spielman, D. Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **1996**, *Blood*, 87:1951-1956.

<sup>71</sup> Mikhailenko, V. M., Philchenkov, A. A., Zavelevich, M. P. Analysis of <sup>1</sup>H NMR-detectable mobile lipid domains for assessment of apoptosis induced by inhibitors of DNA synthesis and replication. **2005**, *Cell Biology International*, 29:33-39.

<sup>72</sup> Hakumäki, J. M., Poptani, H., Sandmair, A. M., Ylä-Herttua, S., Kauppinen, R. A. <sup>1</sup>H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the *in vivo* detection of apoptosis. **1999**, *Nature Medicine*, 5:1323-1327.

<sup>73</sup> Milkevitch, M., Shim, H., Pilatus, U., Pickup, S., Wehrle, J. P., Samid, D., Poptani, H., Glickson, J. D., Delikatny, E. J. Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. **2005**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734:1-12.

universales, al menos en las primeras etapas de la apoptosis <sup>74</sup>. La biogénesis, la naturaleza bioquímica y la localización subcelular de los lípidos que originan estos lípidos visibles móviles en resonancia magnética nuclear (RMN) aún están en debate; sin embargo, la espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN) ha sido aceptada como una herramienta confiable para dilucidar los mecanismos de bioquímica de lípidos involucrados en las células y tejidos eucariotas <sup>75 76</sup>. En referencia a la citometría de flujo, la anexina V actúa uniéndose a la fosfatidilserina expuesta en las células apoptóticas, además, el Ioduro de propidio se usa para identificar las células necróticas a medida que se une al ADN o al ácido desoxirribonucleico (ARN) de las células a medida que desaparece la integridad de la membrana <sup>77 78 79 80</sup>. Para la enfermedad de Chagas o cualquier enfermedad, es preferible que el parásito muera por apoptosis que por necrosis porque es menos destructivo y causa menos eventos inflamatorios.

#### 1.6. Polifarmacología en la enfermedad de Chagas.

Estudios han revelado que la polifarmacología para esta enfermedad ha tenido resultados exitosos. En 1988 se realizó el primer estudio, donde se combina Ketoconazol (**Ktz**) con otro agente antifúngico, alilamina SF 86-327 (actualmente conocida como Terbinafine (**Tbf Figura 8 B**)). Según los resultados *in vitro*, es decir, isobogramas, evidenciaron que **Ktz** y **Tbf** mostraron una acción sinérgica tanto en epimastigotes como en amastigotes. Los autores propusieron que la potenciación es consistente con el hecho de que **Ktz** y **Tbf** actúan en diferentes puntos de la ruta biosintética del ergosterol y, en consecuencia, amplifican los efectos. Además, sugirieron que ambos fármacos podrían combinarse en la terapia de infecciones por *T. cruzi* utilizando dosis suficientemente bajas para evitar la interferencia con la síntesis de esteroides por parte del huésped. Se evaluaron *in vivo* la combinación de estos

---

<sup>74</sup> Lehtimäki, K. K., Valonen, P. K., Griffin, J. L., Väisänen, T. H., Gröhn, O. H., Kettunen, M. I., Vepsäläinen, J., Ylä-Herttuala, S., Nicholson, J., Kauppinen, R. A. Metabolite changes in BT4C rat gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death as studied by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. **2003**, *The Journal of Biological Chemistry*, 278:45915–45923

<sup>75</sup> Hakumäki, J. M., Kauppinen, R. A. <sup>1</sup>H-NMR visible lipids in the life and death of cells. **2000**, *Trends in Biochemical Sciences*, 25:357–362.

<sup>76</sup> Quintero, M. R., Cabañas, M. E., Arús, C. A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. **2006**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 31–44.

<sup>77</sup> Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **1995**, *J. Immunol Methods*, 184:39-51.

<sup>78</sup> Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **2000**, *J Immunol Methods*, 243:167-190.

<sup>79</sup> Cornelissen, M., Philippe, J., De Sitter, S., De Ridder, L. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. **2002**, *Apoptosis*, 7:41-47.

<sup>80</sup> Fried, J., Pérez, A. G., Clarkson, B. D. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. **1976**, *J Cell Biol.*, 71: 172-181.

fármacos y se comparó los resultados con los tratamientos con los fármacos solos <sup>81</sup>. Los mejores resultados mostraron que la combinación de ambos fármacos alcanza 100% de supervivencia animal, 100% de parasitemia negativa pero 66% de cura parasitológica en las mismas condiciones. **Ktz** o **Tbf** solos, mostraron peores resultados en algunos de estos indicadores <sup>83</sup>. Se han realizado estudios clínicos en los cuales se trató combinando **Bnz** y **Pos** comparándolos con ambos fármacos separados pero no se implementó en la terapia. Se demostró que el efecto del **Bnz** fue superior al **Pos** aunque en el 37% de los casos se tuvo que suspender su administración debido a efectos secundarios <sup>84</sup>. Se necesita por tanto continuar con la búsqueda de nuevos agentes para esta enfermedad, y la combinación de los mismos en caso que presenten diferente mecanismo de acción de forma de potenciar su acción tripanosomicida, evitando efectos secundarios para el huésped y curando la enfermedad.

### 1.7. Desarrollo y descubrimiento de fármacos

La Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos es un proceso largo que lleva a la industria farmacéutica en promedio, unos 15 años. En este proceso se distinguen distintos niveles de estados del desarrollo de medicamentos: el descubrimiento de las moléculas bioactivas, estudios de toxicología y mecanismo de acción *in vitro* (prototipos), estudios farmacocinéticos, toxicología *in vivo* y prueba de concepto (líderes). En conjunto estos estudios abarcan la etapa preclínica del desarrollo de un medicamento. Luego de esta etapa comienzan las diferentes fases clínicas (candidato a fármaco) para posteriormente registrar lo que es propiamente un medicamento (**Figura 9**) <sup>85</sup>.

---

<sup>81</sup> Maldonado, R. A., Molina, J., Payares, G., Urbina, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. **1993**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, *37*:1353-1359.

<sup>82</sup> Aguilera, E., Álvarez, G., Cerecetto, H., González, M. Polipharmacology in Chagas Disease. **2019**, *Curr. Med. Chem.*, *26*:4476-4489.

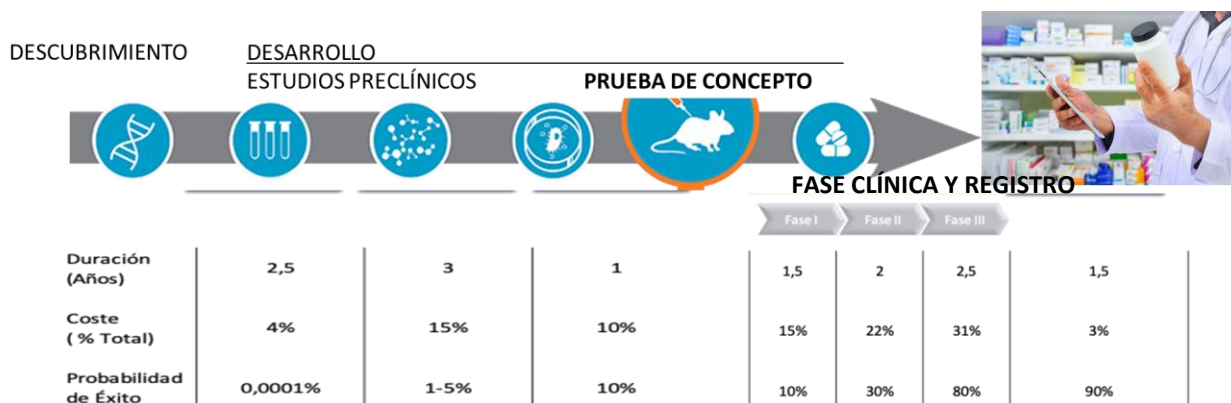
<sup>83</sup> Lazard, K., Urbina, J. A., de Souza, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **1990**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, *34*:2097-2105

<sup>84</sup> Morillo, C. A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., Del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., Mallagray, M., Apt, W., Beloscar, J., Gascon, J., Molina, I., Echeverria, L.E., Colombo, H., Perez-Molina, J.A., Wyss, F., Meeks, B., Bonilla, L.R., Gao, P., Wei, B., McCarthy, M., Yusuf, S.; STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers. **2017**, *J. Am. College Cardiol.*, *69*:939-947.

<sup>85</sup> Chatelain, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?, **2016**, *Comput Struct Biotechnol J*, *15*:98-103.



Dentro de lo que es la enfermedad de Chagas (que hace más de un centenar de años que existe) se ha descubierto muchos prototipos de moléculas activas sin avanzar mucho en los estudios preclínicos, en los que se incluyen estudios de toxicidad, farmacocinética, escalado, etc <sup>86</sup>. Dado lo anterior mencionado, en este trabajo se pretende identificar prototipos de moléculas activas contra *T cruzi* y el desarrollo de dichas moléculas realizando ensayos preclínicos de las mismas para proponer candidatos a fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.



**Figura 9.** Etapas que comprende el desarrollo de un fármaco. El descubrimiento, los estudios preclínicos, y la fase clínica. La Fase Clínica I implica estudios toxicológicos, farmacodinámicos y farmacocinéticos con 20 a 100 voluntarios sanos, la Fase Clínica II implica la confirmación terapéutica con 100 a 500 pacientes, y la Fase Clínica III implica la ampliación de la fase anterior a 1000-3000 pacientes.

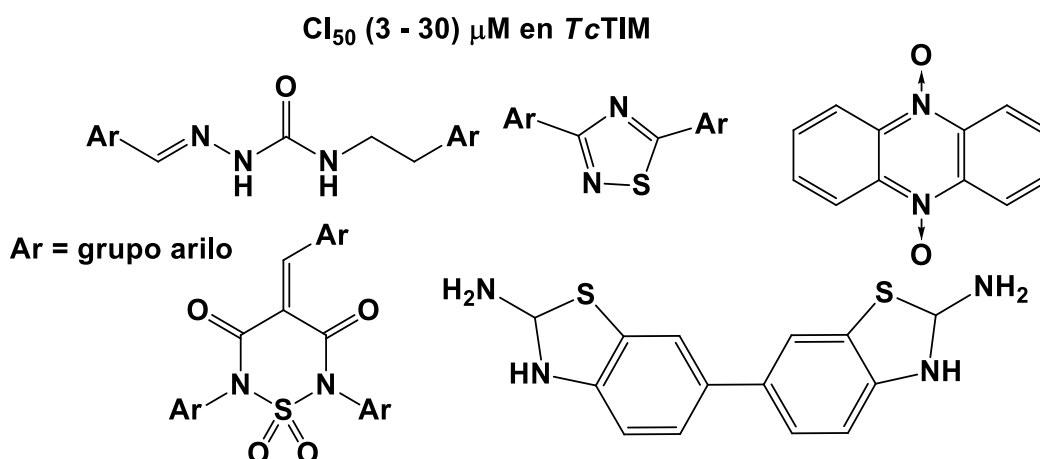
<sup>86</sup> Don, R., Loset, J.R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections, **2014**, *Parasitology*, 141140-146.

# **ANTECEDENTES**

## 2. ANTECEDENTES

Nuestro grupo de investigación ha realizado un tamizaje con una gran variedad de moléculas (230 en total) sobre *TcTIM*. Dentro de las diferentes moléculas encontradas como inhibidores de la enzima a concentraciones de inhibición del 50 % de la actividad enzimática ( $CI_{50}$ ) menores a 30  $\mu\text{M}$ , la mayoría presentan simetría en su estructura (**Figura 10**). Consistente con lo observado para esta enzima con otros inhibidores antes descritos <sup>45</sup>.

En referencia a la actividad biológica de compuestos que sustentan sistemas simétricos electrofílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados se han descrito en la literatura variadas y destacadas propiedades, ya sea como preventivos contra el cáncer <sup>87</sup> como antibacterianos <sup>88 89</sup> y antifúngicos <sup>90</sup>.



**Figura 10.** Motivos estructurales simétricos que inhiben a *TcTIM* <sup>45</sup>.

<sup>87</sup> Padron, J.M., Miranda, P., Padrón, J.I., Martín, V.  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones: A new pharmacophore for the design of anticancer drugs. **2006**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 2263-2269.

<sup>88</sup> Rani, A., Jain, S. Studies in *Enterococcus Faecium* growth-inhibitory action of 1,5-bis(2-hydroxyphenyl)pent-1,4-diene-2-one and related compounds: a search for environmentally benign anti-bacterial agent. **2008**, *Rasayan J. Chem*, 1: 795-801.

<sup>89</sup> Loranda, T., Kocsis, B., Sohar, P., Nagyd, G., Kispale, G., Kranef, H., Schmittg, H., Weckerth E. Synthesis and antibacterial study of unsaturated Mannich ketones. **2001**, *Eur. J. Med. Chem.*, 36: 705-717.

<sup>90</sup> López, S., Castelli, M., Zacchino, S., Domínguez, J., Lobo, G., Charris-Charris, J., Cortés, J.C.G., Ribas, J.C., Devia, C., Rodríguez, A.M., Enriz, R. *In Vitro* Antifungal Evaluation and Structure-Activity Relationships of a New Series of Chalcone Derivatives and Synthetic Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall. **2001**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9:1999-2013.

Especialmente se caracterizan por tener efectos antimicrobianos, en variados microorganismos ya sea en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* e inclusive se ha encontrado que la dibenzalacetona (**Figura 11** compuesto **Prototipo I**) y derivados de la misma presentan actividad contra *T. cruzi*, sin haberse descrito ningún blanco molecular específico<sup>91</sup>. Estudios recientes han demostrado que derivados del **Prototipo I** afectan al sistema redox del parásito ocasionando la muerte en los tres estadios del mismo (epimastigote, amastigote y tripomastigote)<sup>92</sup>.

También se han reportado una serie de bistiazoles simétricos que sustentan en su estructura sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados conjugados con aromáticos que afectan el crecimiento del parásito inhibiendo moderadamente la TcTIM (**Figura 11** compuesto **Prototipo II**)<sup>93</sup>.

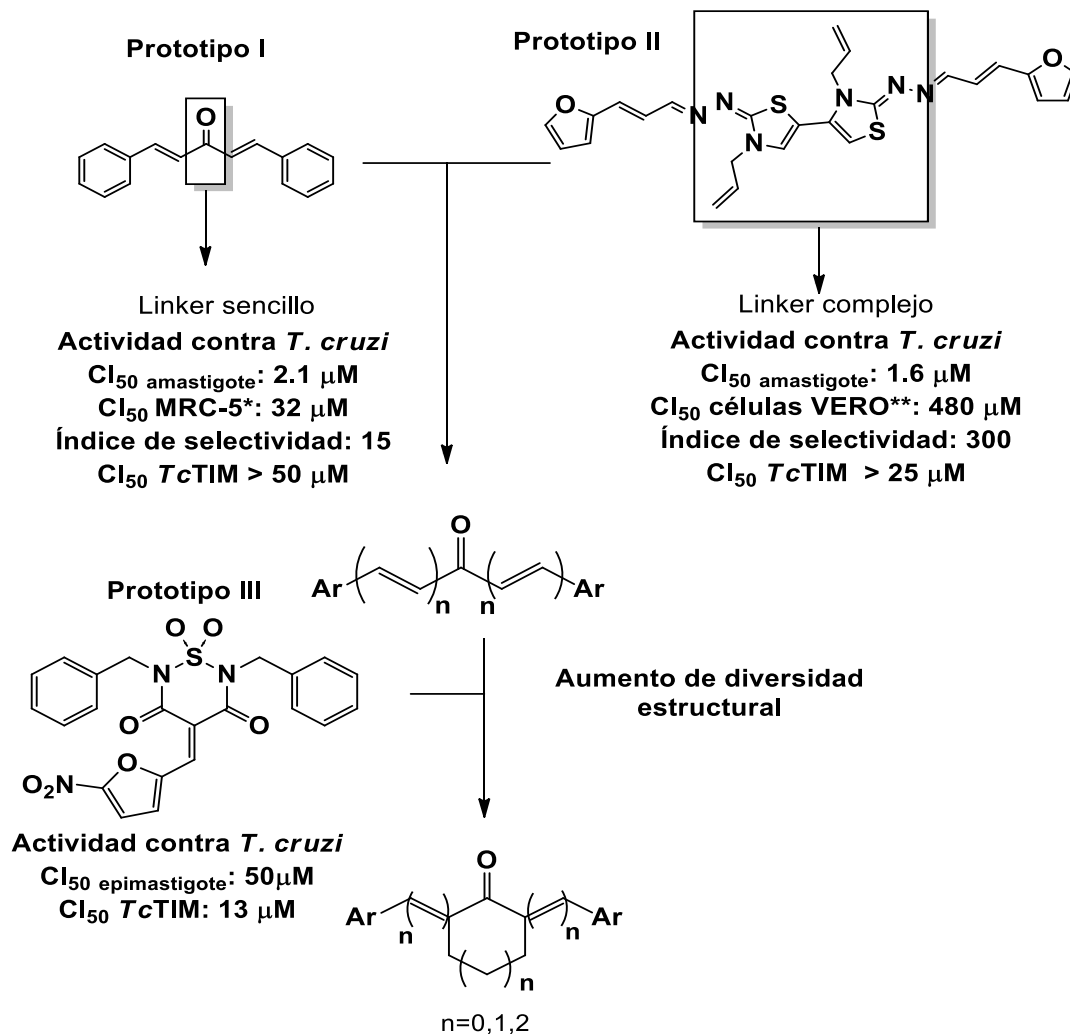
Además, para aumentar la diversidad estructural de los derivados lineales simétricos que surgen de la inspiración en los **Prototipos I** y **II**, se diseñaron moléculas cíclicas en similitud estructural al **Prototipo III**. Este compuesto no es buen inhibidor del crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*, pero si lo es inhibiendo a la TcTIM, como se observa en la **Figura 11**.

---

<sup>91</sup> Davioud, C., Wenzel, I., Müller, T., Hanquet, G., Lafranchi, D.A., Leroux, F., Gendron, T. "Compounds useful against Kinetoplastidae parasites". **2011**, WO2011/033115 A2, Marzo 24.

<sup>92</sup> Lazarin-Bidóia, D, Desoti, V.C., Cardoso Martins, S., Martins Ribeiro, F., Ud Din, Z., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., Vataru Nakamura, C., de Oliveira, S. Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. **2016**, *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 60:891-903.

<sup>93</sup> Álvarez, G., Martínez, J., Varela J., Birriel, E., Cruces, E., Gabay, M., Leal, S., Escobar, P., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, I., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., Gonzalez, M. Develop of bis-thiazoles as *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors. Identification of new non-mutagenic *in vivo* active agents. **2015**, *Eur J Med Chem.*, 100:246–256.

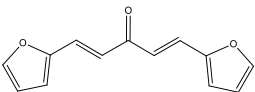
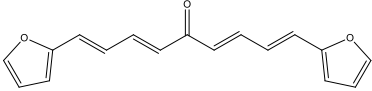
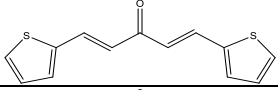
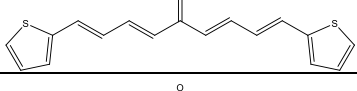
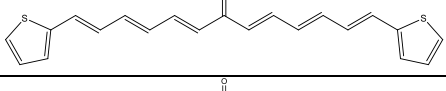
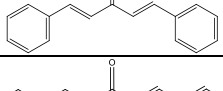
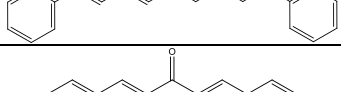
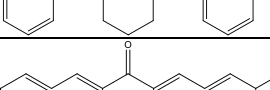
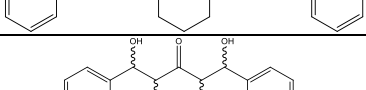
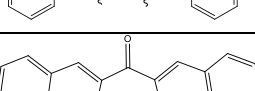
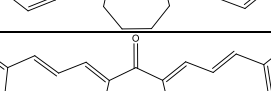
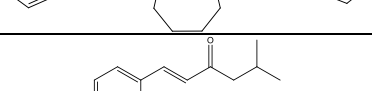
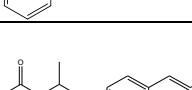
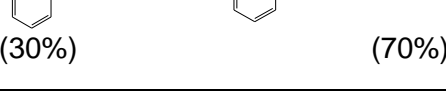
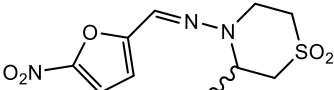


**Figura 11.** Esquema de diseño de arilidenonas de la tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica de la autora de la presente tesis <sup>94</sup>.

Se encontraron 8 arilidenonas simétricas, que fueron activas contra *T. cruzi* ( $CI_{50} < 25 \mu\text{M}$ ) de un total de 11 moléculas sintetizadas (73 %, **Tabla 1**). Además, se sintetizaron otras cetonas asimétricas sin tener efecto tripanosomicida sobre el parásito (la simetría en estas moléculas juega un rol importante en la actividad tripanosomicida) <sup>94</sup>.

<sup>94</sup> Aguilera, E. Síntesis y evaluación biológica de productos activos frente a *Trypanosoma cruzi* con capacidad de inhibición de TcTIM. 2014, Tesina de graduación en la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

**Tabla 1.** Actividad antiproliferativa de los derivados desarrollados en la tesina de grado de la autora de esta tesis, **Familia A** sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*, macrófagos murinos cepa J774.1, índice de selectividad e inhibición de la actividad de la triosa fosfato de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM).

Compuesto	Estructura	IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> <sup>a</sup> (μM)	CI <sub>50</sub> J774.1 <sup>b</sup> (μM)	IS <sup>c</sup>	CI <sub>50</sub> en TcTIM (μM) <sup>d</sup>
1		23,9 ± 1,5	115 ± 6	4,8	5±1
2		5,0 ± 0,7	60 ± 3	12	3±0,7
3		5,0 ± 0,8	38 ± 4	7,6	>25
4		12,6 ± 1,4	188 ± 6	14,9	>25
2d3*		> 25	ND	ND	>25
Prototipo I		7,2 ± 0,8	22 ± 5	3,0	>25
5		11,0 ± 1,3	50 ± 5	4,5	>25
6		5,1 ± 0,3	115 ± 5	22,5	>25
7		14,2 ± 2,7	168 ± 6	12	ND
5*		> 25	ND <sup>e</sup>	ND	ND
6d1*		> 25	ND	ND	ND
6d2*		> 25	ND	ND	ND
7d1*		> 25	ND	ND	ND
7d2*		> 25	ND	ND	ND
Nfx		8 ± 1	316	39,5	>25

a) Concentración del compuesto requerida que inhibe el 50% del crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*. [b] Concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de los macrófagos murino J774.1; el dato representa la media de dos experimentos independientes por triplicado. [c] Índice de Selectividad (IS) CI<sub>50</sub> sobre J774.1/CI<sub>50</sub> contra *T. cruzi*. [d] Concentración que inhibe el 50% de la actividad de la TcTIM. [e] No determinado. \* Numeración de los compuestos que coincide con la tesina de grado de la autora de esta tesis.

Estas moléculas tienen una desventaja que son sistemas carbonilos  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados catalogados como motivos Pan Assay Interference Compounds (PAINS) que según el artículo de Jonathan Baell y Michael A. Walters <sup>95</sup>, son moléculas que reaccionan de manera no selectiva produciendo falsos positivos en muchos ensayos biológicos y bioquímicos <sup>95</sup>. Redundando en la identificación de moléculas tóxicas por su acción inespecífica reactiva, pero debemos tener en cuenta que este estudio es un estudio teórico que toma en cuenta fragmentos de moléculas y no al comportamiento de las mismas en su totalidad.

Para probar que esta categorización no aplica a estas moléculas, la selectividad de estos inhibidores de la TcTIM se ensayó usando la TIM humana, determinando que estos inhibidores presentan  $CI_{50}$  mayores a 100  $\mu$ M. Esto último evidencia que a pesar de que estas moléculas son aceptores de Michael y tienen motivos catalogados como PAINS, son selectivas. Se destaca, además, que desde el punto de vista toxicológico estas moléculas muestran baja toxicidad inespecífica según los estudios *in vitro* e *in vivo* <sup>96</sup>.

Dado que la polifarmacología como ya se nombró anteriormente resulta interesante para potenciar efectos de moléculas líderes, que tienen blancos moleculares en vías metabólicas lejanas, se trabajará con la amida (**LIDER II, Figura 12**) sintetizada en la tesis del Dr. Guzmán Álvarez ya que es un excelente inhibidor de la cruzipaina y tiene excelentes resultados tanto sea *in vivo* como *in vitro*, con bajos efectos tóxicos inespecíficos y sin efectos mutagénicos <sup>97</sup>.

---

<sup>95</sup> Baell, J., Walters, M.A. Chemical con artists foil drug discovery. **2014**, *Nature*, 513: 481-483.

<sup>96</sup> Cruces, M.E. Estudios pre-clínicos de toxicidad de futuros fármacos, Tesina de Graduación de la Licenciatura en Bioquímica. **2015**, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

<sup>97</sup> Álvarez, G. Investigación y desarrollo de agentes anti-*Trypanosoma cruzi* con moderados efectos tóxicos y dirigidos a múltiples dianas. **2013**, Tesis de doctorado en química, Facultad de Química-PEDECIBA, Universidad de la República.

### 3. OBJETIVOS GENERALES

Identificar arilidenonas simétricas y/o combinaciones con otros compuestos activos como candidatos a terapia anti-*T. cruzi* con bajos efectos tóxicos, y no mutagénicos.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

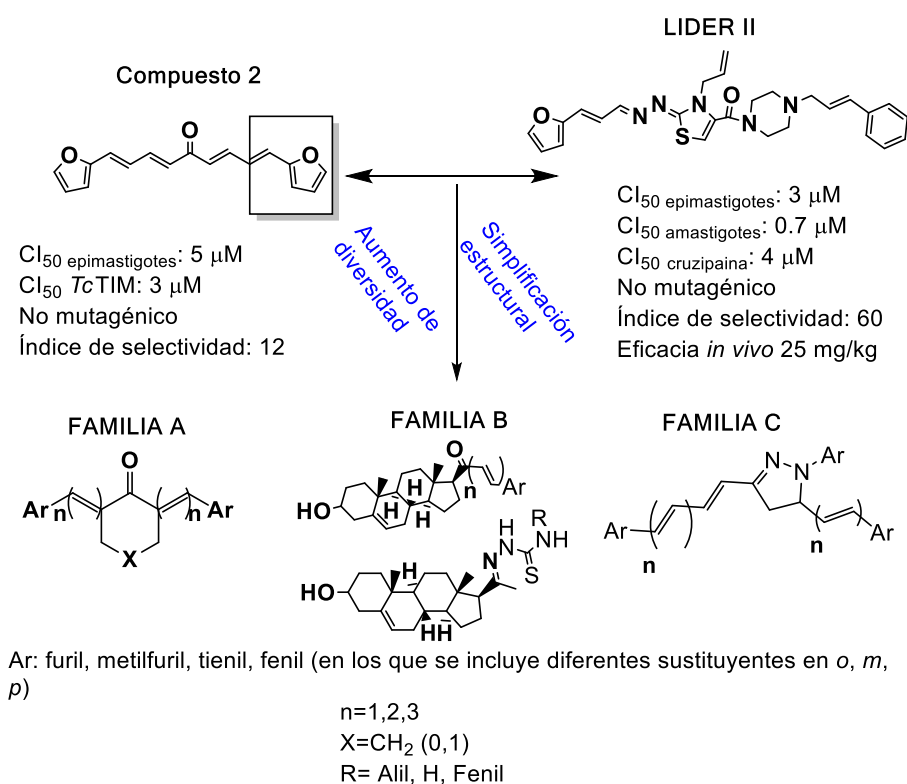
1. Sintetizar nuevas arilidenonas simétricas lineales y cíclicas, caracterización espectroscópica y fisicoquímica de las nuevas moléculas.
2. Caracterización biológica *in vitro* frente a *T. cruzi* de los nuevos derivados desarrollados y la combinación de las mismas entre sí o con otros compuestos activos.
3. Estudios toxicológicos, selectividad, mutagenicidad, genotoxicidad de las moléculas y combinaciones más activas frente al parásito.
4. Estudios *in vivo* de actividad en modelo agudo de la enfermedad de Chagas de los líderes identificados y combinaciones.
5. Estudios de mecanismo de acción en la triosafosfato isomerasa, cruzipaína, en la biosíntesis de esteroides, mecanismo de muerte y metabólica por <sup>1</sup>H-RMN.
6. Estudio de parámetros farmacocinéticos.



# **PROPUESTA DE TRABAJO**

#### 4. PROPUESTA DE TRABAJO

Se propone, a partir de los antecedentes mencionados anteriormente, sintetizar nuevas arilidenonas modificándolas químicamente inspiradas en los prototipos y líderes antes mencionados, y las moléculas más relevantes obtenidas en la tesina de grado de la autora de esta tesis, como se muestra en la **Figura 12**. Con el objetivo de aumentar la diversidad estructural de las mismas, se trabajará con tres familias, la **Familia A** deriva del aumento de la diversidad estructural de arilidenonas, la **Familia B** de la incorporación de otros motivos estructurales al sistema de moléculas activas previamente descritas, inspirado en moléculas esteroideas tripanosomicidas y en el **LÍDER II**. La **Familia C**, de la supresión de los aceptores de Michael de las arilidenonas para probar el impacto de estos motivos en la actividad biológica. La síntesis de las **Familias B** y **C** no será objeto de esta tesis, los compuestos de esas series se usarán en los estudios biológicos. Todas estas moléculas, presentan simplicidad estructural, de síntesis verde (amigable con el ambiente) y de bajo costo de producción.



**Figura 12.** Esquema de moléculas con potencial actividad tripanosomicida diseñadas para esta tesis.

Para la caracterización biológica *in vitro* frente a *T. cruzi*, se utilizará el estadio epimastigote, con todos los compuestos seleccionados. En primera instancia, se

estudiará la actividad tripanosomicida de los compuestos a 25  $\mu\text{M}$ , empleando un método turbidimétrico. Como fármacos de referencia se emplearán **Nfx** y **Bnz**. Si se encuentran compuestos con actividad tripanosomicida se realizarán los ensayos que se mencionan a continuación. La actividad tripanosomicida la definimos como  $\text{CI}_{50} < 25 \mu\text{M}$ . Si bien el estadio epimastigote no es el representativo de la infección en humanos, es un modelo sencillo y económico para el diseño racional y el ensayo de un gran número de moléculas. Como los blancos a los cuales se apunta son constitutivos de todos los estadios, esta actividad en la forma epimastigote se podría extrapolar a las formas tripomastigote y amastigote. Además, la evidencia de la actividad de este tipo de moléculas en la forma amastigote ha sido probada anteriormente para el **Prototipo I** y el **LÍDER II** sustentando entonces la posible extrapolación de esta actividad para las nuevas moléculas<sup>91 97</sup>.

Para los estudios de toxicidad inespecífica se utilizará el ensayo de citotoxicidad en células de mamífero (macrófagos murinos). Se definirá el índice de selectividad como el cociente entre  $\text{CI}_{50}$  en macrófagos y el  $\text{CI}_{50}$  en el parásito. La baja toxicidad se definirá arbitrariamente para aquellos compuestos que presenten un índice de selectividad (IS) mayor a 10 (como se describe en trabajos previos<sup>91 94</sup>). Se utilizará el test de Ames como ensayo de mutagenicidad. Estudios de toxicidad oral aguda, crónica y genotoxicidad *in vivo* en ratones. Si los derivados desarrollados tienen actividad tripanosomicida y baja toxicidad inespecífica se procederá a ensayos *in vivo* en el modelo murino de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Dependiendo del comportamiento en los estudios antes mencionados, se buscará la combinación de los líderes y **Bnz** para investigar efectos de sinergismo, antagonismo o adición.

Paralelamente se plantea el estudio de los mecanismos de acción de los productos más relevantes. Se ensayarán en las dianas para las cuales estas moléculas pueden llegar a ser potenciales inhibidores; a saber, cruzipaína, triosafosfato isomerasa y biosíntesis de esteroides de membrana. Se estudiará el mecanismo de muerte por citometría de flujo y  $^1\text{H}$ -RMN. Por otra parte, reconocer si el metabolismo energético es modificado por el compuesto, aportaría datos para mapear el mecanismo de acción. Lo mencionado anteriormente se estudiará utilizando metabolómica por  $^1\text{H}$ -RMN<sup>98 99</sup>

100

---

<sup>98</sup> Bringaud, F.; Riviere, L.; Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *149*: 1–9.

<sup>99</sup> Benitez, D., Casanova, G., Cabrera, G., Galanti, N., Cerecetto, H., Gonzalez, M. Initial studies on mechanism of action and cell death of active N-oxide-containing heterocycles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. **2014**, *Parasitology*, *5*:682-696.

<sup>100</sup> Benitez, D., Cabrera, M., Hernández, P., Boiani, L. et al. 3-Trifluoromethylquinoxaline N,N'-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-*T. cruzi* agents and mechanism of action studies. *Med Chem.* **2011**, *54*:3624-3636.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Química.

#### 5.1.1. Generalidades

Los disolventes empleados en el presente trabajo fueron destilados previamente a su uso. Además, algunos de ellos son secados mediante procedimientos preestablecidos<sup>101 102</sup>. El etanol absoluto empleado es de origen comercial (DORWIL), al igual que otros de los reactivos fueron obtenidos de BAKER ANALIZED, Janssen, Fluka, SIGMA-ALDRICH, Merck, Santa Cruz biotechnology. El avance de las reacciones y pureza relativa de los productos se controlan empleando cromatografía en capa fina (TLC por su sigla en inglés) en placas de poliéster recubiertas con sílica o alúmina y para revelado con luz ultravioleta de 254 nm. Las fases móviles que se han utilizado consisten en mezclas de distintas proporciones de hexano y acetato de etilo. Para llevar a cabo el revelado de los cromatogramas se emplean diferentes técnicas: exposición a la luz ultravioleta (254 y 365 nm), exposición a vapores de yodo, rociado con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidracina etanólico en medio ácido), rociado con una mezcla de *p*-anisaldehído:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:etanol en una proporción 1:4:95 (v/v/v).

Alcanzada la síntesis de un determinado producto en la presente tesis se procede al análisis de las propiedades fisicoquímicas, realizando anteriormente el secado del producto sintetizado mediante el uso de técnicas convencionales realizadas en el laboratorio, tales como secado en desecadores sílica gel para eliminar el exceso de disolventes empleados para su síntesis. Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes indicados con cada producto y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), multiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt), doble cuarteto (dc) y señal ancha (sa). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Para obtener los espectros de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC, HMBC y se utilizan las secuencias de pulso disponibles en el software del equipo<sup>103 104</sup>. La numeración de los carbonos es arbitraria para todas las moléculas.

Los espectros de masa se realizan en un espectrómetro SHIMADZU GCMS-QP 2010 ULTRA utilizando impacto electrónico (EI) o LC/MSD-Serie 100 utilizando ionización

<sup>101</sup> Perrin, D.D., Armarego, W.L.F. Purification of Laboratory Chemicals. **1996**, Butterworth-Heinemann: Oxford.

<sup>102</sup> Perry, R.H., Green, D.W. Perry's. Chemical Engineers Handbook. **1997**, 7th Edition, editorial McGraw-Hill, New York USA.

<sup>103</sup> Aue, W. P., Bartholdi, E., and Ernst, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. **1976**, *Journal of Chemical Physics.*, **64**: 2229-46

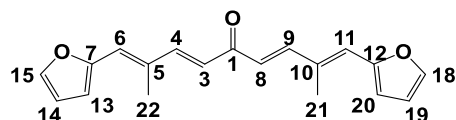
<sup>104</sup> Martin, G. E; Zekter, A. S. Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity. **1988**, New York: VCH Publishers, Inc., 59.

por electroespray (ESI) como forma de ionización, se utilizaron para la determinación de la pureza. Los puntos de fusión (PF) se determinan experimentalmente utilizando un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100. El rendimiento de reacción en % (R).

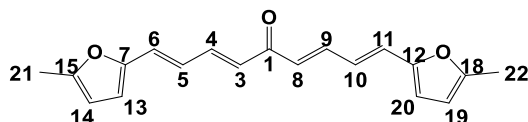
### 5.1.2. Procedimiento general de síntesis de los compuestos de la **Familia A**.

En un matraz de fondo redondo se colocaron 2.2 mmol de la cetona correspondiente y 4.5 mmol del aldehído correspondiente. La mezcla se disolvió en 4.4 mL de agua y 3.5 mL de etanol (95%) y se agregó 4.4 mmol de hidróxido de sodio. Se mezcla 2.2 mmol de la cetona correspondiente con 4.5 mmol del aldehído correspondiente. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por TLC de sílica como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó una mezcla de hexano:acetato de etilo (7:3). El sólido precipitado se filtró a vacío lavándose con agua fría y se purificó por recristalización en etanol.

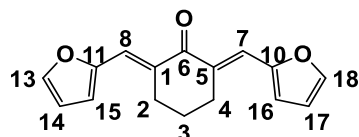
### 5.1.3. Caracterización estructural de los compuestos.



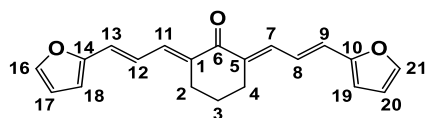
**(1E,3E,6E,8E)-1,9-Di(furan-2-yl)-2,8-dimethylnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (8):** sólido naranja, R=85%, P.F.= 145-147 °C,  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.53 (2H, d,  $J=1.5$ ,  $\text{H}_{15,18}$ ), 7.48 (2H, d,  $J=15.4$ ,  $\text{H}_{3,8}$ ), 6.66 (2H, d,  $J=16.0$ ,  $\text{H}_{6,11}$ ), 6.55 (2H, d,  $J=1.5$ ,  $\text{H}_{13,20}$ ), 6.42 (2H, t,  $J=1.5$ ,  $\text{H}_{14,19}$ ), 6.32 (2H, s,  $\text{H}_{4,9}$ ), 2.25 (6H, s,  $\text{H}_{21,22}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 199 ( $\text{C}_1$ ), 151 ( $\text{C}_{7,12}$ ), 149 ( $\text{C}_{6,11}$ ), 146 ( $\text{C}_{3,8}$ ), 144 ( $\text{C}_{15,18}$ ), 129 ( $\text{C}_{5,10}$ ), 128 ( $\text{C}_{4,9}$ ), 113 ( $\text{C}_{14,19}$ ), 111 ( $\text{C}_{13,20}$ ), 14 ( $\text{C}_{21,22}$ ). MS (EI) m/z (%): 294 ( $\text{M}^+$ , 100); 133 ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}^+$ ; 33). Análisis Elemental: C, 77.53; H, 6.16; O, 16.31.



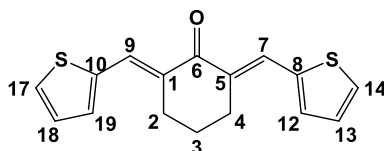
**(1E,3E,6E,8E)-1,9-Di(5-metilfuran-2-il)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (9):** sólido naranja, R=67%, P.F.= 135-138 °C,  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.42 (2H, d,  $J=11.0$ ,  $\text{H}_{3,8}$ ), 6.87 (2H, d,  $J=11.1$ ,  $\text{H}_{4,9}$ ), 6.75 (2H, d,  $J=11.1$ ,  $\text{H}_{6,11}$ ), 6.55 (2H, d,  $J=1.6$ ,  $\text{H}_{14,19}$ ), 6.52 (2H, d,  $J=11.0$ ,  $\text{H}_{5,10}$ ), 6.47 (2H, d,  $J=1.8$ ,  $\text{H}_{13,20}$ ), 2.30 (6H, s,  $\text{H}_{21,22}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 100 ( $\text{C}_{13,20}$ ), 113 ( $\text{C}_{14,19}$ ), 125 ( $\text{C}_{6,11}$ ), 128 ( $\text{C}_{3,8}$ ), 143 ( $\text{C}_{4,9}$ ), 152 ( $\text{C}_{7,12}$ ), 153 ( $\text{C}_{15,18}$ ), 189 ( $\text{C}_1$ ), 15 ( $\text{C}_{21,22}$ ). MS (EI) m/z (%): 294 ( $\text{M}^+$ , 100). Análisis Elemental: C, 77.53; H, 6.16; O, 16.31.



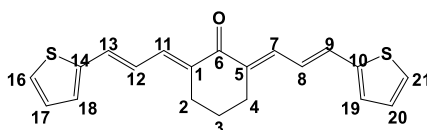
**(2E,6E)-2,6-Di(furan-2-ilmetilen)ciclohexanona (10):** sólido amarillo, R=99%, P.F.= 142-144 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.58 (2H, d,  $J=3.4$ ,  $\text{H}_{13,18}$ ), 7.57 (2H, s,  $J=11.5$ ,  $\text{H}_{7,8}$ ), 6.87 (2H, d,  $J=3.4$ ,  $\text{H}_{15,16}$ ), 6.54 (2H, m,  $\text{H}_{14,17}$ ), 3.03 (4H, m,  $\text{H}_{2,4}$ ), 1.91 (2H, m,  $\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 193 ( $\text{C}_6$ ), 150 ( $\text{C}_{10,11}$ ), 143 ( $\text{C}_{13,18}$ ), 135 ( $\text{C}_{1,5}$ ), 122 ( $\text{C}_{7,8}$ ), 113 ( $\text{C}_{14,17}$ ), 107 ( $\text{C}_{15,16}$ ), 27 ( $\text{C}_{2,4}$ ), 24 ( $\text{C}_3$ ). MS (EI) m/z (%): 254 ( $\text{M}^+$ , 100); 226 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_3^+$ ; 31). Análisis Elemental: C, 75.57; H, 5.55; O, 18.88.



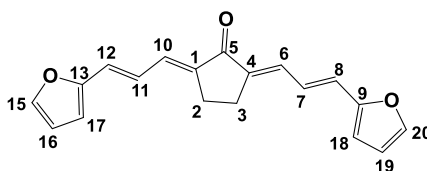
**(2E,6E)-2,6-Bis[(E)-3-(furan-2-il)aliliden]ciclohexanona (11):** sólido marrón, R=60%, P.F.= 156-158 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.65 (2H, d,  $J=6.8$ ,  $\text{H}_{16,21}$ ), 7.35 (2H, s,  $\text{H}_{7,11}$ ), 7.05 (2H, d,  $J=12.2$ ,  $\text{H}_{8,12}$ ), 6.75 (2H, d,  $J=12.2$ ,  $\text{H}_{9,13}$ ), 6.55 (2H, m,  $\text{H}_{18,19}$ ), 6.41 (2H, m,  $\text{H}_{17,20}$ ), 2.79 (4H, m,  $\text{H}_{2,4}$ ), 1.88 (2H, m,  $\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 193 ( $\text{C}_6$ ), 149 ( $\text{C}_{10,14}$ ), 145 ( $\text{C}_{16,21}$ ), 142 ( $\text{C}_{1,5}$ ), 137 ( $\text{C}_{7,11}$ ), 130 ( $\text{C}_{9,13}$ ), 129 ( $\text{C}_{10,14}$ ), 113 ( $\text{C}_{18,19}$ ), 111 ( $\text{C}_{17,20}$ ), 28 ( $\text{C}_{2,4}$ ), 24 ( $\text{C}_3$ ). MS (EI) m/z (%): 306 ( $\text{M}^+$ , 100); 184 ( $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4^+$ ; 10). Análisis Elemental: C, 78.41; H, 5.92; O, 15.67



**(2E,6E)-2,6-Di(tien-2-ilmetilen)ciclohexanona (12):** Sólido amarillo, R=51%, P.F.= 197-200 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.89 (2H, s,  $J=11.5$ ,  $\text{H}_{7,9}$ ), 7.58 (2H, d,  $J=3.6$ ,  $\text{H}_{12,19}$ ), 7.43 (2H, d,  $J=4.0$ ,  $\text{H}_{14,17}$ ), 7.01 (2H, m,  $\text{H}_{13,18}$ ), 2.96 (4H, m,  $\text{H}_{2,4}$ ), 1.98 (2H, m,  $\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 193 ( $\text{C}_6$ ), 137 ( $\text{C}_{8,10}$ ), 133 ( $\text{C}_{1,5}$ ), 131 ( $\text{C}_{7,9}$ ), 130 ( $\text{C}_{14,17}$ ), 129 ( $\text{C}_{12,19}$ ), 128 ( $\text{C}_{13,18}$ ), 27 ( $\text{C}_{2,4}$ ), 24 ( $\text{C}_3$ ). MS (EI) m/z (%): 286 ( $\text{M}^+$ , 100); 258 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{S}_2^+$ ; 30). Análisis Elemental: **C**, 67.10; **H**, 4.93; **O**, 5.59; **S**, 22.39.

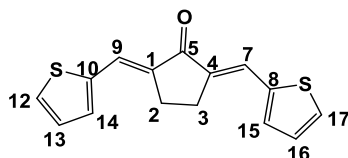


**(2E,6E)-2,6-Di(3-tien-2-ilaliliden)ciclohexanona (13):** Sólido amarillo, R=98%, P.F.= 168-170 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.44 (2H, s,  $\text{H}_{7,11}$ ), 7.39 (2H, d,  $J=3.6$ ,  $\text{H}_{16,21}$ ), 7.23 (2H, d,  $J=3.8$ ,  $\text{H}_{18,19}$ ), 7.14 (2H, d,  $J=4.0$ ,  $\text{H}_{17,20}$ ), 7.07 (2H, d,  $J=11.5$ ,  $\text{H}_{8,12}$ ), 6.88 (2H, d,  $J=11.7$ ,  $\text{H}_{9,13}$ ), 2.77 (4H, m,  $\text{H}_{2,4}$ ), 1.64 (2H, m,  $\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 192 ( $\text{C}_6$ ), 142 ( $\text{C}_{1,5}$ ), 141 ( $\text{C}_{10,14}$ ), 137 ( $\text{C}_{7,11}$ ), 130 ( $\text{C}_{9,13}$ ), 129 ( $\text{C}_{8,12}$ ), 128 ( $\text{C}_{16,21}$ ), 127 ( $\text{C}_{17,20}$ ), 126 ( $\text{C}_{18,19}$ ), 28 ( $\text{C}_{2,4}$ ), 24 ( $\text{C}_3$ ). MS (EI) m/z (%): 338 ( $\text{M}^+$ , 100); 241 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{OS}_2^+$ ; 52). Análisis Elemental: **C**, 70.97; **H**, 5.36; **O**, 4.73; **S**, 18.95.

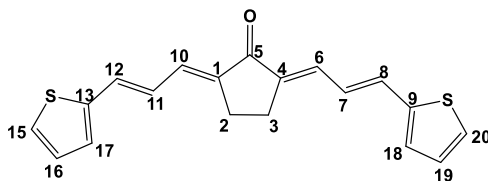


**(2E,5E)-2,5-Di[3-(furan-2-il)aliliden]ciclopentanona (14):** sólido marrón, R=82%, P.F.= 129-132 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.47 (2H, d,  $J=11.7$ ,  $\text{H}_{6,7}$ ), 7.20 (2H, d,  $J=1.4$ ,  $\text{H}_{16,19}$ ), 6.89 (2H, d,  $J=11.7$ ,  $\text{H}_{8,9}$ ), 6.86 (2H, d,  $J=11.7$ ,  $\text{H}_{10,11}$ ), 6.75 (2H, m,  $\text{H}_{14,21}$ ), 6.48 (2H, t,  $J=3.6$ ,  $\text{H}_{15,20}$ ), 2.90 (4H, s,  $\text{H}_{2,3}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 198 ( $\text{C}_5$ ), 149 ( $\text{C}_{12,13}$ ), 145 ( $\text{C}_{16,19}$ ), 141 ( $\text{C}_{1,4}$ ), 132 ( $\text{C}_{6,7}$ ), 129 ( $\text{C}_{8,9}$ ), 128 ( $\text{C}_{10,11}$ ), 113 ( $\text{C}_{15,20}$ ), 111 ( $\text{C}_{14,21}$ ), 30 ( $\text{C}_{2,3}$ ). MS (EI) m/z (%): 292 ( $\text{M}^+$ , 100); 159 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}^+$ ; 53). Análisis elemental: **C**, 78.06; **H**, 5.52; **O**, 16.42.

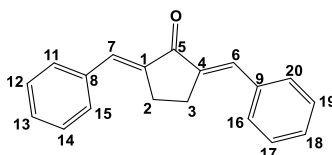




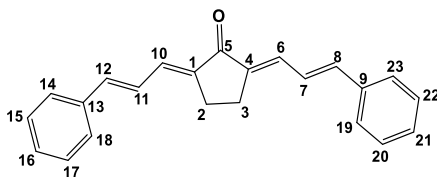
**(2E,5E)-2,5-Di[(thien-2-yl)methylidene]ciclopentanona (15):** Sólido amarillo, R=98%, P.F.= 223-226 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.82 (2H, s,  $J=11.0$ ,  $\text{H}_{7,9}$ ), 7.58 (2H, d,  $J=4.7$ ,  $\text{H}_{12,17}$ ), 7.43 (2H, d,  $J=3.5$ ,  $\text{H}_{15,14}$ ), 7.19 (2H, m,  $\text{H}_{13,16}$ ), 3.07 (4H, m,  $\text{H}_{2,3}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 198 ( $\text{C}_5$ ), 137 ( $\text{C}_{8,10}$ ), 133 ( $\text{C}_{1,4}$ ), 130 ( $\text{C}_{12,17}$ ), 129 ( $\text{C}_{14,15}$ ), 128 ( $\text{C}_{13,16}$ ), 127 ( $\text{C}_{7,9}$ ), 30 ( $\text{C}_{2,3}$ ). MS (EI) m/z (%): 272.03 ( $\text{M}^+$ , 100). Análisis elemental: C, 66.14; H, 4.44; O, 5.87; S, 23.54.



**(2E,5E)-2,5-Di[3-(thien-2-yl)allylidene]ciclopentanona (16):** sólido naranja, R=100%, P.F.= 168-170 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.32 (2H, d,  $J=5.0$ ,  $\text{H}_{15,20}$ ), 7.49 (2H, s,  $\text{H}_{6,10}$ ), 7.20 (2H, d,  $J=3.5$ ,  $\text{H}_{17,18}$ ), 7.15 (2H, d,  $J=4.5$ ,  $\text{H}_{16,19}$ ), 7.11 (2H, d,  $J=15.3$ ,  $\text{H}_{7,11}$ ), 6.78 (2H, d,  $J=15$ ,  $\text{H}_{8,12}$ ), 2.90 (2H, s,  $\text{H}_{2,3}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 198 ( $\text{C}_5$ ), 141 ( $\text{C}_{9,13}$ ), 140 ( $\text{C}_{1,4}$ ), 132 ( $\text{C}_{6,10}$ ), 130 ( $\text{C}_{8,12}$ ), 129 ( $\text{C}_{7,11}$ ), 128 ( $\text{C}_{15,20}$ ), 127 ( $\text{C}_{16,19}$ ), 126 ( $\text{C}_{17,18}$ ), 30 ( $\text{C}_{2,3}$ ). MS (EI) m/z (%): 324.06 ( $\text{M}^+$ , 100). Análisis elemental: C, 70.33; H, 4.97; O, 4.93; S, 19.77.

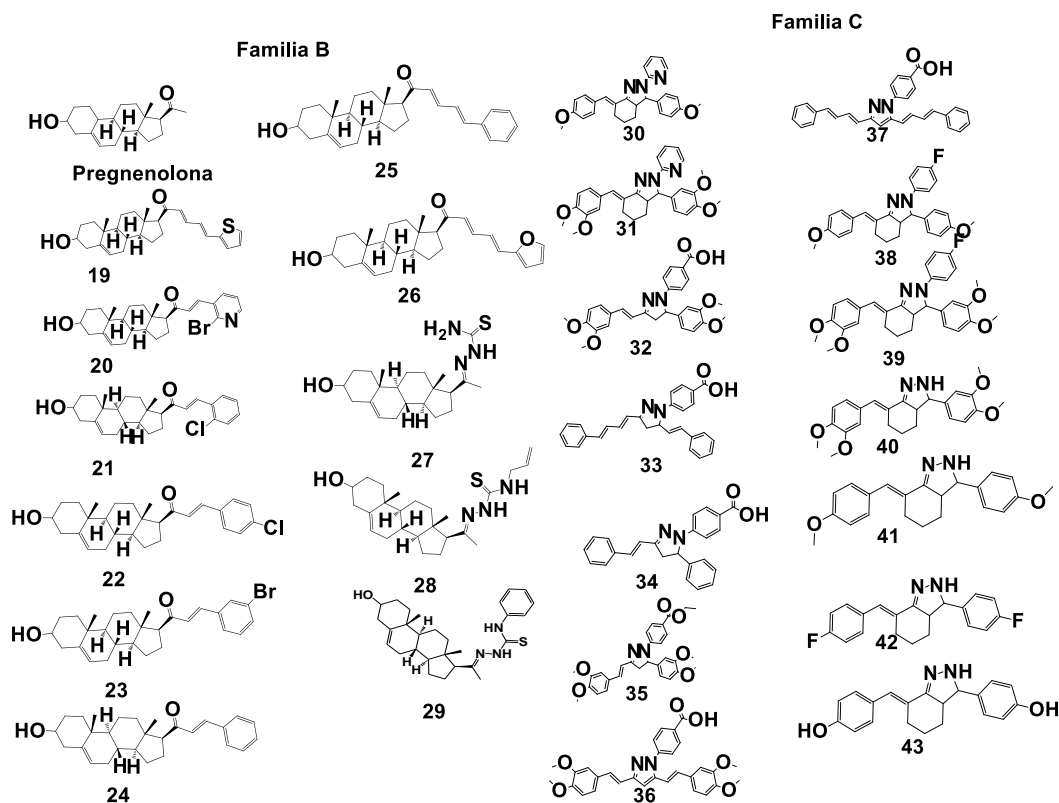


**(2E,5E)-2,5-Dibenzilidenciclopentanona (17):** Sólido amarillo, R=90%, P.F.= 186-188 °C,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta\text{H}$  (ppm): 7.66 (2H, s,  $J=11.0$ ,  $\text{H}_{6,7}$ ), 7.63 (4H, m,  $\text{H}_{11,15,16,20}$ ), 7.44 (6H, m,  $\text{H}_{12,13,14,17,18,19}$ ), 3.15 (4H, s,  $\text{H}_{2,3}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 197 ( $\text{C}_5$ ), 146 ( $\text{C}_{1,4}$ ), 136 ( $\text{C}_{8,9}$ ), 133 ( $\text{C}_{6,7}$ ), 129 ( $\text{C}_{12,14,17,19}$ ), 128 ( $\text{C}_{13,18}$ ), 127 ( $\text{C}_{11,15,16,20}$ ), 30 ( $\text{C}_{2,3}$ ). MS (EI) m/z (%): 260.12 ( $\text{M}^+$ , 100). Análisis elemental: C, 87.66; H, 6.19; O, 6.15



**(2E,5E)-2,5-Di(3-phenylallylidene)ciclopentanona (18):** sólido amarillo, R=33%, P.F.= 220-225 °C,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $\delta$  (ppm): 7.54 (4H, m,  $\text{H}_{14,18,19,23}$ ), 7.52 (2H, s,  $J=15.5$ ,  $\text{H}_{6,10}$ ), 7.40 (4H, m,  $\text{H}_{16,18,19,21}$ ), 7.33 (4H, m,  $\text{H}_{7,11,16,21}$ ), 7.00 (2H, m,  $J=15.0$ ,  $\text{H}_{8,12}$ ), 2.95 (4H, s,  $\text{H}_{2,3}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 198 ( $\text{C}_6$ ), 140 ( $\text{C}_{1,4}$ ), 137 ( $\text{C}_{8,9,12,13}$ ), 133 ( $\text{C}_{6,10}$ ), 129 ( $\text{C}_{15,17,20,22}$ ), 128 ( $\text{C}_{16,21}$ ), 127 ( $\text{C}_{14,18,19,23}$ ), 125 ( $\text{C}_{7,11}$ ), 30 ( $\text{C}_{3,4}$ ). MS (EI)  $m/z$  (%): 312.15 ( $\text{M}^+$ , 100). Análisis Elemental: C, 88.43; H, 6.45; O, 5.12.

La síntesis de las **Familias B y C (Figura 13)** no fueron objeto de esta tesis, dicha síntesis fue descrita anteriormente <sup>105 106</sup>, al igual que el compuesto **2** <sup>94</sup> y el **LÍDER II** <sup>97</sup>



**Figura 13.** Estructura de los compuestos de la **Familia B y C** utilizada en este trabajo para los estudios biológicos.

<sup>105</sup> Matiadis, D., Mavroidi, B., Panagiotopoulou, A., Methenitis, C., Pelecanou, M., Sagnou, M. (E)-(1-(4-Ethoxycarbonylphenyl)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxystyryl)-2-pyrazoline: Synthesis, Characterization, DNA-Interaction, and Evaluation of Activity Against Drug-Resistant Cell Lines. *Molbank* **2020**, M1114; doi:10.3390/M1114.

<sup>106</sup> Aguilera, E., Perdomo, C., Espindola, A., Corvo, I., Faral-Tello, P., Robello, C., Serna, E., Benítez, F., Riveros, R., Torres, S., Vera de Bilbao, N.I., Yaluff, G., Alvarez, G. A Nature-Inspired Design Yields a New Class of Steroids Against Trypanosomatids. **2019**, *Molecules*, *24*:3800-3822.

## 5.2 Biología

### 5.2.1 Ensayo de actividad de los compuestos frente a *T. cruzi*.

Los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 (unidad de escritura discreta (DTU) Tc VI) o cepa Y (DTU TcII), se cultivan a 28 °C en medio axénico (infusión cerebro-corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, hemina 0,02 g/L, D-(+)-glucosa 0.3 g/L, estreptomycin 0.2 g/L, penicilina 200000 U/L, complementado con 10 % de suero fetal bovino). Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones aeróbicas. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0.6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Los compuestos a evaluar se preparan en una solución stock de dimetilsulfóxido (DMSO) (solución madre de 24 mM) y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes, a modo de ejemplo (25 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM). Los parásitos son incubados con los compuestos a 28 °C por 5 días. El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula como:  $PI = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$ , donde  $A_p$  es la absorbancia a 610 nm del cultivo con tratamiento al día 5;  $A_{0p}$  es la absorbancia a 610 nm del cultivo con tratamiento a tiempo 0 (día 0);  $A_c$  es la absorbancia a 610 nm del cultivo sin tratamiento (control negativo, solo hasta 0.4 % de DMSO) al día 5;  $A_{0c}$  es la absorbancia a 610 nm del cultivo sin tratamiento a tiempo 0. El  $CI_{50}$  corresponde a la concentración del compuesto capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar % inhibición vs % log10 de la concentración (utilizando OriginLab 8.5), ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann (curva dosis respuesta). Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes <sup>107</sup>.

---

<sup>107</sup> Álvarez, G., Varela, J., Márquez, P., Gabay, M., Arias Rivas, C. E., Cuchilla, K., Echeverría, G.A., Piro, O.E., Chorilli, M., Leal, S.M., Escobar, P., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N.V., González, M., Cerecetto, H. Optimization of antitrypanosomatid agents: identification of nonmutagenic drug candidates with *in vivo* activity. **2014**, *J. Med. Chem.*, 57:3984 – 3999.

### 5.2.2. Ensayo para la combinación de compuestos y construcción de los isobologramas

Para calcular los efectos de las diferentes combinaciones ensayadas *in vitro* en la forma epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2, se aplica el método descrito previamente, de la misma forma que en la sección anterior<sup>108 109 110</sup>. El crecimiento celular fue seguido por la medición de la absorbancia de a 610 nm todos los días. Se realiza una placa de 24 pocillos con diferentes concentraciones de cada compuesto líder (con mejor acción tripanosomicida *in vitro*) combinadas dependiendo de su CI<sub>50</sub> inicial disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca excedió el 0.4 %. Las diferentes concentraciones utilizadas de cada combinación de compuestos fueron: 0.25 veces CI<sub>50</sub>, 0.5 veces su CI<sub>50</sub>, 0.75 veces CI<sub>50</sub>; 1 vez su CI<sub>50</sub>. Después de cinco días el porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) fue calculado para cada mezcla de la siguiente manera:  $IC (\%) = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$ , donde  $A_p$  = A610 nm del cultivo que contiene la combinación de los compuestos en el día 5,  $A_{0p}$  = A610 nm del cultivo que contiene el compuesto justo después de la adición del inóculo (día 0),  $A_c$  = A610 nm del cultivo en ausencia de la combinación (control) en el día 5,  $A_{0c}$  = A610 nm en ausencia de la combinación en el día 0. Luego, los valores de combinación (CV) fueron determinados gráficamente y cada fracción de la inhibición de la concentración (FIC) se calculó, de acuerdo con Hallander, *et al.*<sup>108</sup>, como el CI<sub>50</sub> combinado dividido por el solo CI<sub>50</sub>. El CV se definió como las concentraciones de la combinación de compuestos que permite el 50 % de inhibición (IGP = 50 %). Se calculó el índice de fracción inhibitoria de la siguiente forma:  $FICI = (CI_{50} \text{ del compuesto A en combinación} / CI_{50} \text{ compuesto A solo}) + (CI_{50} \text{ compuesto B en combinación} / CI_{50} \text{ compuesto B solo})$ . Un valor de FICI menor a 1 indica sinergismo; mayor a 1 indica antagonismo e igual a 1 indica aditividad respectivamente. Los datos también se expresaron gráficamente como isobologramas, representando las concentraciones de cada compuesto. Cada dosis de la combinación de compuestos se testeó por triplicado y en dos experimentos independientes. Los CI<sub>50</sub> de cada compuesto se calcularon como se describe en la sección anterior<sup>111</sup>.

<sup>108</sup> Hallander, H.O., Dombusch, K., Gezelius, L., Jacobson, K., Karlsson, I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. **1982**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22:743-752.

<sup>109</sup> Urbina, J.A., Lazard, K., Aguirre, T., Piras, M.M., Piras, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **1988**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32: 1237-1242.

<sup>110</sup> Veiga-Santos, P, Barrias, S, Santos, J, Moreira, TB, de Carvalho, TM, Urbina, JA, et al. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **2012**, *Int J Antimicrob Agents*, 40: 61-71.

<sup>111</sup> Aguilera E, Varela J, Birriel E, Serna E, Torres S, Yaluff G, et al. Potent and selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: inhibition of parasite growth through multitarget activity. **2016**, *Chem Med Chem*, 11: 1328-1338.

### 5.2.3. Actividad frente a la forma tripomastigote de *T. cruzi*.

Estos ensayos fueron realizados por la autora en colaboración con el Grupo de la Dra. Vera de Bilbao, en el Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción, Paraguay según el protocolo IORG0010088 (aprobado por comité de ética), bajo la supervisión de la Lic. Gloria Yaluff. Se partió de ratones infectados con 7 días post-infección y en el pico de parasitemia ( $> 1.0 \times 10^6$  parásitos/mL), se extrae la sangre del ratón vivo (anestesiado) de aorta u ojo (1 mL por ratón), se usa citrato como anticoagulante, se la distribuye en placa de 96 pocillos. Se utiliza un volumen final de 100  $\mu$ L (90  $\mu$ L de sangre + 10  $\mu$ L de con una concentración stock de 25 mM conteniendo 10% de DMSO), para dar una concentración final de compuesto de 25  $\mu$ M (concentración de DMSO final no excede 0.4% v/v). Se deja a 4°C, 24 horas (h), se cuentan 5  $\mu$ L en microscopio óptico (MO) 40x (método de los 50 campos) <sup>112</sup>. El ensayo se realiza por triplicado o cuadruplicado.

### 5.2.4 Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos.

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos contra *T. cruzi* y calcular el índice de selectividad (IS), definido como la relación entre el  $CI_{50}$  en las células de mamífero y el  $CI_{50}$  en *T. cruzi*. Se emplearon macrófagos murinos J774.1 Se siembra una placa de 96 pocillos transparente con 50000 células/mL, la misma se incuba durante 24 horas a 37 °C. Luego de este periodo, las células deben estar en un 70-80 % de confluencia. Se preparan disoluciones stock de los compuestos a ensayar con el disolvente adecuado DMSO a una concentración tal que en la placa el disolvente no supere el 0.5 % v/v. Luego se coloca medio de cultivo fresco en tubos de 1.5 mL estériles y se realizan las diluciones seriadas de los compuestos. Se retira el medio de cultivo de la placa y se adiciona el compuesto ya disuelto en medio de cultivo fresco (volumen final 200  $\mu$ L). Se incuba durante 48 horas en estufa a 37 °C, 5 %  $CO_2$ . Se realizan los siguientes controles: células con disolvente y Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), células sin disolvente y con MTT, blanco de lectura: células con disolvente y sin MTT. Luego del periodo de incubación se observan las células en el microscopio y se realizan anotaciones acerca del estado de las mismas. El medio de cultivo se retira, se prepara la disolución de MTT (0.1 mg/mL en PBS estéril) y se adicionan 100  $\mu$ L de esta disolución en cada pocillo. En el blanco de lectura se colocan 100  $\mu$ L de PBS estéril sin MTT. Posteriormente, se incuba

---

<sup>112</sup> Álvarez, G., Varela, J., Cruces, E., Fernández, M., Gabay, M., Leal, S.M., Escobar, P., Sanabria, L., Serna, E., Torres, S., Thiel, S.J.F., Yaluff, G., De Bilbao, N.I.V., Cerecetto, H., González, M. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of chagas' disease. **2015**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59:1398–1404.

durante 3 horas a 37 °C. Luego de este procedimiento se retira la disolución de MTT y se adicionan en cada pocillo 180 µL de DMSO y 20 µL de disolución amortiguadora glicina para MTT (glicina 0.1 M, NaCl 0.1 M, EDTA 0.5 M). Se agita la placa en agitador orbital por 1 minuto y se realiza la lectura de absorbancia a 560 nm. Se calcula el % citotoxicidad según la fórmula: % citotoxicidad =  $1 - [(Abs_{muestra\ con\ MTT} / Abs_{control\ con\ DMSO\ con\ MTT})] \times 100$ <sup>104</sup>.

#### 5.2.5. Ensayos de mutagenicidad (Test de Ames)

Estos ensayos fueron realizados en conjunto con la autora y la Bach. Carina Sánchez (responsable de dichos ensayos en el Grupo de Química Orgánica Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR). La capacidad mutagénica de los compuestos fue determinada a partir de un cultivo  $2 \times 10^9$  UFC/mL en medio Oxoid N°2 en fase exponencial de *Salmonella typhimurium* cepa TA98, T100, T102, TA1535 y TA1537 (hisD3052, dependiente de histidina)<sup>113 114 115 116</sup>. Se evaluaron cinco diluciones seriadas al tercio en DMSO partiendo de la máxima dosis no tóxica estimada a partir de los resultados del ensayo de toxicidad realizado inicialmente. Se realizaron controles positivos con 4-nitro-o-fenilendiamina (20.0 µg/placa) en el caso de mutagenicidad sin activación. Como control negativo se utilizó DMSO (50 µL/placa) y control del fenotipo (resistencia a ampicilina, tetraciclina, cristal violeta y luz UV sensible). Se incubó por 1 h a 37 °C. Se adicionó 2 mL de una disolución de agar que contiene 10 mL de disolución de histidina [(0.5 mM) / biotina (0.5 mM)] por cada 100 mL. Se cultivó luego en agar mínimo glucosa durante 48 h a 37 °C. El número de revertientes fue contado manualmente y se expresó como el promedio de duplicados ± desviación estándar. El producto se consideró mutagénico cuando el número de colonias revertientes duplica al control negativo en al menos dos dosis consecutivas. La preparación de la suspensión bacteriana, de disolución de la fracción S9, del producto y de la primera parte del ensayo (hasta que los tubos con todas las disoluciones pasan a la estufa para su incubación) se realizó en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar y con material estéril (autoclave a 121 °C por 20 min o manteniendo la esterilidad del fabricante). El agregado de la disolución de histidina/biotina y la siembra de las placas se realizó bajo corriente de aire ascendente generada por un mechero.

<sup>113</sup> Maron, D.M., Ames, B.N. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. **1983**, *Mut. Res.*, 113:173- 215.

<sup>114</sup> Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **2000**, *Mut. Res.*, 455: 29-60.

<sup>115</sup> Guía OECD, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf> (acceso 13/10/2020).

<sup>116</sup> Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **1976**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70:782-786.

### 5.2.6 Toxicidad oral aguda *in vivo* en ratón.

Estos ensayos fueron realizados por la Lic. María Eugenia Cruces y la Lic. Belén Dávila (responsables de dichos ensayos en el grupo de Química Orgánica Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR, protocolo aprobado por comité de ética nro. OECD/OCDE42503/10/08). Para el ensayo de up & down se utilizaron ratones CD1 y Balb/c, de 3 meses de edad, con un peso aproximado de entre 18-20 g empleando 2 ratones por cada grupo. Los compuestos se administraron por vía oral utilizando cánula intragástrica con el vehículo indicado a las dosis recomendadas por la Food Drug Administration (FDA) (se utilizó el software en línea para predicción de la dosis)<sup>117</sup>. Luego de la administración se observaron los animales durante 24 horas y si no había signos de toxicidad se duplicaba la dosis administrada. Se observaron por 24 horas más y, en el caso de no haber signos de toxicidad, se administraba una dosis diez veces mayor (hasta un máximo de 2000 mg/kg). Se observaron los ratones por 24 horas luego de esa última administración y se dejaron sin tratamiento con alimentación y agua por una semana. Como medida de toxicidad se observa el aspecto general y comportamiento del animal y el cambio de peso diario. Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se realizó la necropsia y se observaron macroscópicamente los órganos para visualizar signos de toxicidad. Para la predicción de dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de los compuestos se utilizó el mismo software ([http://tox.charite.de/protox\\_II/](http://tox.charite.de/protox_II/)).

### 5.2.7 Genotoxicidad evaluada mediante el test de micronúcleos *in vivo* en ratón.

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Vera de Bilbao, en el Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción, Paraguay según el protocolo IORG0010088, bajo la supervisión de la Lic. Gloria Yaluff. Se realiza el tratamiento agudo vía oral en ratones CD-1 de 3 meses de edad con 150 mg/kg de compuesto a estudiar. Se emplearon 3 grupos de tratamiento; GRUPO I: control negativo, tratado con 200 µL de Vehículo, GRUPO II: tratado con 150 mg/Kg del compuesto a evaluar. GRUPO III: control positivo, tratado con 50 mg/Kg de ciclofosfamida. El tratamiento de cada grupo fue repetido cinco veces, totalizando 5 animales por concentración. La vía utilizada en la administración del control negativo y del compuesto en el grupo I y II fue oral utilizando una cánula esofágica y en el grupo III la vía fue intraperitoneal, para el fármaco utilizado como control positivo. La intervención se hizo en dos dosis: a las 24 y 48 h antes del sacrificio, salvo la ciclofosfamida que se administró en única dosis, 24 h antes del sacrificio. Al final del experimento se retiran los fémures y se remueve la médula ósea

---

<sup>117</sup> Nucleic Acids Research, **2018**, *46*:W257–W263; doi: 10.1093/nar/gky318.

roja con suero fetal bovino, mantenido a 37°C. Se homogeniza el material y se transfiere a un tubo de centrifuga cónico. Se centrifuga a 500 g durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se preparan las muestras con las células restantes, fijándolas en metanol absoluto por 5 minutos. Se tiñen las muestras con colorante Giemsa al 4% por 3 minutos. Se analizan en microscopio óptico de inmersión y se cuentan 1000 eritrocitos policromáticos (EPCs) por animal tratado, incluyendo los que presentaron micronúcleos (EPCMNs). También se evaluó la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) versus los eritrocitos normocromáticos (ENC), en 100 células. La proporción de EPCMNs fue calculada para cada grupo y los grupos de tratamiento con el compuesto y ciclofosfamida se comparan con el grupo control negativo. El análisis estadístico se realizó a partir de los valores individuales de los parámetros evaluados, calculándose los valores medios y sus desviaciones estándar, para cada uno de los grupos experimentales. Los datos fueron procesados mediante el software de análisis estadístico SPSS 21.0. ANOVA ( $p < 0.05$ ). Se siguieron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, 2007). Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

Para todos los estudios *in vivo* se utilizaron los compuestos en el siguiente vehículo que consiste en una microemulsión constituida por: 10% de tensoactivo compuesto por Eumulgin HRE® 40, oleato de sodio y fosfatidilcolina (8:6:3), 10% de fase oleosa formada por colesterol y 80 % de buffer fosfato (pH = 7,4). Primero se disuelve el colesterol, eumulgin y fosfatidilcolina y compuesto, si corresponde, en cloroformo hasta solubilización completa, y se evapora a vacío el disolvente hasta sequedad absoluta estricta. Para asegurar la total remoción del cloroformo se hace pasar una corriente de N<sub>2</sub> por 5-10 min. Paralelamente se disuelve el oleato de sodio en el buffer y se deja en agitación orbital durante 12 h a temperatura ambiente. Luego se adiciona esta solución a la mezcla sólida obtenida previamente, se homogeniza y se sumerge en un baño de ultrasonido a máxima potencia durante 30 minutos, de no ser homogénea la solución o no tener la consistencia deseada, se sumerge en baño de ultrasonido durante 30 minutos adicionales.



### 5.2.8 Teratogenicidad- FET Preparación de los embriones<sup>96</sup>.

Este ensayo fue realizado por la Lic. María Eugenia Cruces (grupo de Química Orgánica Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR). Para el mismo se utilizan huevos de zebrafish aportados por el grupo de trabajo del Institut Pasteur de Montevideo a cargo del Dr. Flavio Zolessi. Los huevos se recolectaron y se descartaron los no fecundados. El resto se incuban en una estufa a 32 °C durante unas 5 horas aproximadamente, donde se hallan en un estado de desarrollo de 75 % de epibolia. En esta etapa se les quita manualmente la membrana que protege al embrión (corion)<sup>118</sup>. Esto se realiza en una placa con agarosa al 1 % y medio para embriones. Se preparan dos placas de 96 pocillos con fondo curvo. Cada pocillo contiene 200 µL y se disponen de la siguiente manera: 16 pocillos con el control negativo que corresponde a DMSO 1 % en agua del acuario, 16 pocillos con el control positivo que corresponde a cafeína 2.4 mM<sup>110</sup> en agua de ósmosis reversa, y 16 pocillos por cada una de las 5 concentraciones distintas del compuesto en estudio disuelto en DMSO al 1 %. Los embriones decorionados se traspasan a la placa con una pipeta pasteur. Se coloca un embrión por placa y se verifica que no haya sufrido ninguna lesión al traspasarlo. Para el caso del compuesto **2**, se evalúa el compuesto a concentraciones de 3, 6, 12, 24 y 48 µM. El ensayo se repite 5 veces en estas condiciones. Para el caso del compuesto **11** se realiza un primer ensayo con concentraciones 3, 6, 12, 24 y 48 µM pero no se observaba toxicidad a esas concentraciones por lo que se procedió a aumentarlas. Se realiza un segundo ensayo a concentraciones 50, 75, 100, 150 y 200 µM. Luego, se realiza un tercer ensayo en el cual se ajustaron las concentraciones a 50, 75, 100, 125 y 150 µM. Luego de preparadas las placas, se procede a la evaluación de los embriones. Para esto se colocan en una cámara húmeda para evitar la evaporación de los compuestos y se incuban a 26 °C o 28 °C. A las 24 horas se realiza la primera observación y se recambia la mitad del medio de cada pocillo para asegurarse que las concentraciones continúen siendo constantes durante las 96 horas de exposición. Para ello se quitan 100 µL de cada pocillo y se reponen con 100 µL nuevos. Se observan bajo lupa los embriones uno por uno con especial atención a las características previamente mencionadas que permiten discriminar positivos de negativos, siendo los primeros en los cual se considera que el compuesto muestra cierta toxicidad para el embrión. Además, se registra cualquier otro tipo de anomalía que pueda dar indicios de teratogenicidad. Se realizan las anotaciones en una planilla y se vuelven a poner en la estufa en la cámara húmeda a 28 °C. Lo mismo se realiza cada 24 horas hasta llegar a las 96 horas de exposición donde el ensayo se da por

---

<sup>118</sup> Aparicio, G.; Zolessi, F.; Cerecetto, H.; González, M.; Alvarez, A. Toxicity assessment of different trypanocidal agents on zebrafish embryos in LAZEN, **2014**.

finalizado. Los embriones son sacrificados en etanol 70 %. Se califican como embriones positivos aquellos que presentan al menos alguna de las siguientes características: coagulación del embrión, falta de latido cardíaco, falta de formación de somites y no desprendimiento de la cola. La curva obtenida se ajustó a una sigmoidea utilizando el programa OriginLab 8.5. Luego se extrapola el valor de 50 % de embriones positivos y el valor de concentración correspondiente es el CL<sub>50</sub>. Se registró, algún otro tipo de anomalías observadas. Para la validación del ensayo, en el control negativo debe haber una tasa de sobrevivencia mayor a 90 % y en el control positivo una tasa de mortalidad mayor a 30 % a las 96 horas de exposición.

#### 5.2.9 Estudios *in vivo* en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas en ratón.

Estos ensayos fueron realizados por la autora, en colaboración con el Grupo de la Dra. Vera de Bilbao, en el Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción, Paraguay según el protocolo IORG0010088 y supervisada por la Lic. Elva Serna. Se infectaron ratones Balb/c (día 0) de 3 meses de edad con sangre infectada de ratones en inicio del pico de parasitemia (parasitemia mayor a  $1.0 \times 10^6$  p/mL), con el clon CI Brener de *T. cruzi* (10000 parásitos por ratón), se inoculó intraperitonealmente. Se siguió la parasitemia a partir del cuarto día post infección y hasta que todos los ratones del grupo estén positivos. Las medidas de parasitemia se hacen por el micrométodo de Hemoconcentración y conteo: se extrajo la sangre de los ratones por un pinchazo en la cola y tomando con capilares la sangre. Un capilar por ratón saca entre 8-18 mm de altura de sangre. Los milímetros se convirtieron a  $\mu$ L por una tabla previamente descrita y calibrada en el laboratorio. Se centrifugaron los capilares a 3000 g por 40 s. Se observó la carga parasitaria en el capilar por MO (en el capilar se repartieron los Glóbulos Rojos (GR) en un extremo y el suero de sobrenadante, en la interfase se encuentran los tripomastigotes. Luego se cortó el capilar unos mm sobre la interface hacia la parte de GR, se extendieron en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se contaron los parásitos en 50 campos (MO en el 40x), se calculó el número total de campos microscópicos y se obtiene el factor correspondiente a 1/50 de ese número total de campos. Este factor, multiplicado por el de tripomastigotes contados en cada porta, nos proporciona el número de parásitos por  $5 \text{ mm}^3$  y finalmente se compara con las cifras de los animales control. Para la serología, se tomaron de la misma forma 4 capilares llenos de sangre, se cortaron y se guardaron en tubos para realizar el ELISA <sup>119</sup>. Una vez que todos los ratones fueron positivos en la parasitemia se inició el tratamiento. El tratamiento dura

---

<sup>119</sup> Aguilera, E., Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., de Bilbao, N.V., Cerecetto, H., Álvarez, G., González, M. Looking for combination of benzimidazole and *Trypanosoma cruzi*-triosephosphate isomerase inhibitors for Chagas disease treatment. 2018, *Fundação Oswaldo Cruz*, 3:153-160.

15 días consecutivos, se administraron los compuestos vía oral mediante cánula intragástrica una vez al día. La parasitemia se siguió semanalmente, a los 30 y 60 días se extrajo 200 µL de sangre de la cola del ratón para pruebas serológicas (test de ELISA para detectar antígenos de *T. cruzi*). El día 60 finaliza el experimento y se eutanasia los animales.

#### 5.2.10 Histopatología de corazón, bazo, intestino, riñón e hígado de los ratones al finalizar los ensayos in vivo en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas.

Al día 60, luego del sacrificio, se tomaron muestras de los tejidos del corazón, bazo, intestino, riñón e hígado y se almacenaron en formaldehído al 10 %, seguido de deshidratación en soluciones de alcohol y xilol e incrustación en parafina. Cada órgano se incluyó por separado en parafina y se cortó en un microtomo a 6 mm. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron bajo un microscopio Zeiss a 10, 40 y 100 aumentos. Se tomaron fotografías con todos estos aumentos con una cámara digital Olympus X-785 acoplada al microscopio. Este análisis fue realizado por la unidad de histopatología del Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

### 5.3 Estudio de Mecanismo de Acción

#### 5.3.1. Ensayo de inhibición de la TcTIM y HsTIM (triosa fosfato isomerasa Humana).

Estos ensayos fueron realizados en colaboración por el grupo del Dr. Pérez -Montfort del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todas las enzimas son expresadas en *Escherichia Coli* y purificadas como lo describe la literatura <sup>46</sup>. En la mezcla de la reacción (pH=7.4) conteniendo trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, gliceraldehído-3-fostato 1 mM y 0.9 unidades de α-glicerol-fosfato deshidrogenasa, se determina la actividad de la enzima en la dirección de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato <sup>120 121 122</sup>. Los compuestos se disuelven en un 10 % v/v de DMSO, incubándolos durante 2 horas con la enzima (5 µg/mL) a una temperatura de 37 °C. La reacción enzimática comienza con el agregado

<sup>120</sup> Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A, Rojo Dominguez, A., Perez-Montfort, R. Using evolutionary changes to achieve species – specific inhibition of enzyme action – studies with triosephosphate isomerase. **1995**, *Chem. Biol.*, 2:847 – 855.

<sup>121</sup> Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gomez-Puyou, M., Ostoa- Saloma, P., Perez-Montfort, R., Gomez-Puyou, A. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity – triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. **1998**, *Eur. J. Biochem.*, 253:684 – 691.

<sup>122</sup> Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gomez-Puyou, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., Perez-Montfort, R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. **1997**, *Eur. J. Biochem.*, 244:700 – 705.

de 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de incubación a la mezcla de reacción (volumen final 1 mL, concentración final de TIM 5 ng/mL), midiendo el descenso en la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard a 25 °C. El  $\text{CI}_{50}$  corresponde a la concentración del compuesto capaz de provocar un 50 % de inhibición de la actividad enzimática. Esta concentración se determinó al graficar % inhibición enzimática vs  $\log_{10}$  (concentración), ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann (curva dosis respuesta). Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes<sup>99</sup>. Para todos los compuestos inhibidores se verificó que no se afectara la actividad de la  $\alpha$ -glicerol-fosfato deshidrogenasa.

### 5.3.2. Estudios de docking y dinámica molecular (MD) en TcTIM<sup>123</sup>.

Estos estudios fueron realizados por las doctoras Lucía Minini y Alicia Merlino, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR. Las estructuras de rayos X de TcTIM y HsTIM no ligadas se recuperaron del Banco de Datos de Proteínas (<http://www.rcsb.org/pdb>); códigos de acceso 1TCD y 2JK2, respectivamente. Los cálculos de MD se realizaron utilizando el módulo *sander* implementado en Amber 12 suite, con el campo de fuerza ff03.r1. Se agregaron átomos de hidrógeno e iones cloruro (para neutralizar la carga) a cada proteína con la utilidad *leap*. Cada sistema se colocó en una caja octaédrica truncada de agua explícita TIP3P, se extendió 10 Å fuera de la proteína en todos los lados. Las estructuras de TcTIM y HsTIM se trataron de la siguiente manera: a) el agua y los contraiones se relajaron para minimizar la energía durante 2.000 pasos (500 pasos de descenso más pronunciados (SD) y 1.500 pasos de gradiente conjugado (CG) con la proteína restringida con una fuerza constante de 500 kcal / molÅ<sup>2</sup>; b) el sistema se minimizó sin restricciones durante 15.000 pasos (5.000 SD y 10.000 CG). Las interacciones de largo alcance se consideraron utilizando el método de Ewald de malla de partículas (PME) y se utilizó un límite de interacciones no unidas de 10 Å. Después de la minimización, cada sistema se calentó gradualmente en un conjunto NVT de 0 a 300 K a más de 100 ps utilizando el algoritmo de acoplamiento Berendsen. Este procedimiento fue seguido por 5 ns de simulaciones NPT a 300 K y 1 atm de presión utilizando el algoritmo de dinámica de Langevin. Todos los enlaces que involucran átomos de hidrógeno fueron restringidos utilizando el algoritmo SHAKE. Se usó un paso de tiempo de 2.0 fs para todas las dinámicas de producción y las coordenadas de los sistemas se guardaron cada 0.2 ps. Las estructuras promedio de TcTIM y HsTIM en las últimas 4 ns de las trayectorias se calcularon con el paquete ptraj en AmberTools 12 y se usaron para los cálculos de acoplamiento posteriores. Los compuestos se optimizaron completamente en el nivel

<sup>123</sup> Minini, L., Álvarez, G., González, M., Cerecetto, H., Merlino, A. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors. Insights into the inhibition mechanism and selectivity. **2015**, *J. Mol. Graph. Model*, **58**: 40-49.

B3LYP / 6-31G (d, p) en agua usando el modelo continuo IEF-PCM con radios atómicos Bondi. La naturaleza de las estructuras optimizadas como especies estables se inspeccionó verificando los valores propios de la matriz analítica de Hesse, calculada al mismo nivel de teoría, para ser positiva en todos los casos. Todos estos cálculos se realizaron con el software Gaussian09.

Para predecir el sitio de unión de los compuestos en *TcTIM* y en *HsTIM*, se realizó el acoplamiento flexible de ligando usando una caja de cuadrícula de 124×126×126 puntos con un espacio de cuadrícula de 0.603 Å para cubrir toda la superficie de la proteína (Docking Ciego). La caja de la cuadrícula estaba centrada en la macromolécula. Una vez que se determinó el sitio de unión, las energías libres de unión se refinaron usando una caja de cuadrícula más pequeña de 60×60×66 puntos con un espacio de 0.375 Å, ahora centrado en el sitio de unión al ligando. Los resultados que difieren en menos de 2.0 Å en la desviación de raíz cuadrada se agruparon en el mismo grupo. La conformación con la energía de unión más baja se eligió del grupo más poblado y el complejo ligando-proteína correspondiente se usó para otros estudios de MD. Todos los cálculos de acoplamiento se realizaron con el paquete de software AutoDock 4.2 utilizando el algoritmo genético lamarckiano. Se utilizó un tamaño de población de 150 individuos y  $2.5 \times 10^6$  evaluaciones de energía para 50 ejecuciones de búsqueda. Para el resto de los parámetros se emplearon valores por defecto.

Dinámica molecular ligando-proteína. Ligando-TIM MD se realizó como se describe en la sección anterior utilizando el campo de fuerza GAFF para ligandos. Las cargas parciales de RESP para los compuestos se obtuvieron usando Gaussian09 en el nivel HF / 6-31G\* y se empleó el módulo de *antechamber* para obtener los parámetros del campo de fuerza.

Análisis de trayectoria. La estabilidad de los TIM sin ligando y los correspondientes complejos inhibidor-enzima se verificaron a partir de la desviación cuadrática media (RMSD) y la flexibilidad de los sistemas se evaluó a partir de las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF). Para los cálculos de RMSD se utilizaron estructuras de energía minimizada como la estructura de referencia. Los RMSF se calcularon en relación con las estructuras promediadas. Los análisis RMSD y RMSF se realizaron utilizando la utilidad ptraj. El área de superficie accesible por solvente (SASA) sobre los residuos interfaciales seleccionados para los complejos apo-*TcTIM* e inhibidor de *TcTIM* se calculó usando CPPTRAJ.

### 5.3.3. Ensayo de inhibición de la Cruzipaína.

Se incubó la cruzipaína (6.0  $\mu\text{M}$ ), purificada de epimastigotes de *T. cruzi*<sup>124</sup>, en una mezcla de reacción conteniendo (concentración final en 100  $\mu\text{L}$ ) PBS, pH 7.4, o amortiguador acetato de sodio, pH 5.3, 50 mM, DTT (ditiotreitól) 5.0 mM y 100  $\mu\text{M}$  del compuesto a estudiar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC ( $K_m = 1.8 \mu\text{M}$ ) para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  y se controla el aumento en la fluorescencia (excitación 380 nm y emisión 460 nm) durante 10 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro y espectrofluorímetro Varioskan (Thermo, Waltham, MA). Los compuestos se agregan disueltos en DMSO y el control (100 % de actividad enzimática) contiene la misma concentración de disolvente. La concentración de DMSO nunca excede el 10 %. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. Para estudiar la inhibición no específica se realizaron los ensayos en presencia del detergente no iónico Tritón X-100. Una solución del detergente 0.02 % v/v se prepara en el momento en PBS o amortiguador acetato 100 mM (pH 7.4 y 5.3 respectivamente) y se agregan 50  $\mu\text{L}$  de esta solución para obtener una concentración final de detergente de 0.01 %. Dicha concentración fue evaluada previamente y mostró no interferir con la actividad enzimática.

### 5.3.4. Ensayo de inhibición de la síntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi*<sup>125</sup>.

Los parásitos de *T. cruzi*, forma epimastigote, cepa Y, se cultivaron en 0.6 mL de medio BHI-triptosa en matraces de cultivo. Los compuestos en sus respectivas  $\text{CI}_{50}$  se incubaron durante 72 h a 28 °C con  $10 \times 10^6$  parásitos/mL. Como control negativo, se usaron parásitos en ausencia de los compuestos. Se usó terbinafina ( $\text{CI}_{50} = 44.7 \mu\text{M}$ ) como control positivo, que ha demostrado actividad inhibitoria en la biosíntesis de esteroides de membrana con acumulación de escualeno. La extracción de esteroides de membrana se realizó al final de la incubación. Para este propósito, las muestras se centrifugaron a 750 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en PBS (6 mL, 0.05 M, pH 7.4). Luego se centrifugó nuevamente a 750 g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento resultante se resuspendió en cloroformo: metanol (2:1) y la suspensión se mantuvo a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, se añadió solución saturada de NaCl (5 mL) y la mezcla se extrajo con cloroformo (3 mL) y *n*-hexano (3 mL), teniendo cuidado de no tomar ninguna fase acuosa. El volumen extraído se aplicó a una placa de TLC de gel de

<sup>124</sup> Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C., Hellman, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **1989**, *Mol Biochem Parasitol.*, 33:33-42.

<sup>125</sup> Couto, M., Sánchez, C., Dávila, B., Machín, V., Varela, J., Álvarez, G., Cabrera, M., Celano, L., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., González, M. 3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-*Trypanosoma cruzi* Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies. **2015**, *Molecules*, 20:14595-14610.

sílíce. La cromatografía se realizó eluyendo con *n*-hexano, para identificar el escualeno, y una vez con *n*-hexano: EtOAc (8: 2) para identificar el ergosterol. Las manchas en la placa se revelaron con luz ultravioleta (254 nm) y exposición al vapor de yodo. El experimento se realizó por triplicado y se utilizó estándares comerciales de ergosterol, lanosterol, colesterol y escualeno.

### 5.3.5. Estudios metabólicos de *T. cruzi* utilizando $^1\text{H-RMN}$ <sup>99 100</sup>.

Para evaluar el cambio del perfil metabólico que inducen los compuestos en estudio, se incubó 1 mL de  $10 \times 10^6$  epimastigotes, cepa Y, en medio de cultivo (BHI-triptosa), a 28 °C, durante 48 h con el compuesto de interés. A la hora cero del experimento, previo a preparar el repique de  $10 \times 10^6$  parásitos/mL, se hizo un lavado para sustituir el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, para ello se centrifugó a 3000 g, 10 min, se descartó el medio y se sustituyó por medio fresco. Se incluyó en cada ensayo un “Control medio de cultivo” que contiene 1 mL de medio de cultivo más el disolvente en el que se disolvieron los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los parásitos tratados. A las 48 h se centrifugó a 3000 g, 10 min y se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se agregaron a un tubo de RMN de 5 mm. Se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida (DMF) (estándar interno) y 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ . Los espectros se adquirieron realizando un total de 64 escanes y se procesaron según: sobre el FID se aplica “Full FT” y se realizó el referenciado del espectro respecto al EtOH a 1.17 ppm. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo respecto a un “Control parásitos sin tratamiento” que contenía 1 mL de una suspensión de  $10 \times 10^6$  parásitos/mL de medio de cultivo, más el disolvente en el que se disolvieron los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los tratados (en este caso se toma en cuenta la integrada bajo la curva de las diferentes señales de los metabolitos excretados, respecto a el estándar interno de la DMF). Un porcentaje positivo (+) significa un incremento en la excreción del metabolito respecto al “Control parásitos metabolitos” y un porcentaje negativo (–) implica una disminución en la excreción del metabolito respecto al “Control parásitos sin tratamiento”. Para el estudio de los metabolitos internos, los parásitos en las mismas condiciones antes descritas se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 0.6 mL de agua deuterada y cloroformo, se sonicó la mezcla por 5 min a máxima potencia y luego se centrifugó a 10000 g por 5 min. El sobrenadante, fase acuosa superior se tomó en un tubo de RMN y se analizó en un equipo de 500 MHz, con funciones de supresión de agua y proteínas.

### 5.3.6. Estudio del mecanismo de muerte por $^1\text{H}$ -RMN en *T. cruzi* <sup>126</sup>.

Preparación de la muestra celular: Se partió de  $10 \times 10^6$  parásitos/mL, cepa Y de *T. cruzi* en la forma epimastigote, de los cuales se inoculó 0.6 mL/pocillo, en placas de 24 pocillos. A cada placa se le incubó los compuestos a evaluar a la concentración deseada, y se incluye otra placa donde se coloca en cada pocillo el disolvente de los compuestos. Transcurrido el tiempo, al final del experimento, se recogió los parásitos de cada pocillo de una placa en un tubo cónico de 15 mL. Se centrifugó a 3000 g, 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó 3 veces con PBS estéril y se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  del mismo. Por último, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de PBS con el pellet en un tubo de RMN de 5 mm y se le agregó 90  $\mu\text{L}$  de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Se homogeneizó la suspensión de parásitos previo a introducir el tubo en el equipo de RMN. Los espectros se adquirieron realizando un total de 128 escanes y se procesaron de la siguiente forma: sobre el FID, se aplicó "Full FT". Se ajustó la fase manual (aplicando "zero order"), se corrigió la línea de base aplicando "Full Auto" y se realizó el referenciado del espectro. La señal de EtOH (1.170 ppm) se utilizó como estándar interno.

### 5.3.7. Estudio del mecanismo de muerte por citometría de flujo <sup>127</sup>.

Estos estudios fueron realizados en colaboración junto con la Dra. Leticia Pérez y la Mag. Florencia Mosquillo del Laboratorio de Interacciones Moleculares del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Para los estudios de mecanismo de muerte de los compuestos se usó el kit Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell (Thermo Fischer Scientific). Se incubaron  $1 \times 10^6$  parásitos/mL de la forma epimastigote de *T. cruzi*, cepa Tulahuen2 (en fase exponencial en condiciones aeróbicas) con los compuestos (evaluados a  $20 \times \text{CI}_{50}$  por 6 y 24 horas). Luego de la incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X a 3000 g durante 10 min y finalmente se resuspende en 100  $\mu\text{L}$  de buffer de unión de anexina (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) o PBS. Se incubaron los parásitos durante 15 min con 2  $\mu\text{L}$  Anexina V (AV) 5 mg/mL (Alexa Fluor®488) y 1  $\mu\text{L}$  yoduro de propidio (IP) 1 mg/mL. Los parásitos se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Bioscience). El análisis de dos parámetros se realizó utilizando un detector de señal de 533/30 nm (FL1) para AV y un detector de señal de emisión de paso largo de 670 nm (FL3) para IP. Se analizaron 10000 eventos para cada uno de los dos experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando

<sup>126</sup> Benitez, D., Pezaroglo, H., Martínez, V., Casanova, G., Cabrera, G., Galanti, N., González, M., Cerecetto, H. Study of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis. **2012**, *Parasitology*, 139: 506-515.

<sup>127</sup> Scalese, G., Mosquillo, M.F., Rostán, S., Castiglioni, J., Alho, I., Pérez, L., Correia, I., Marques, F., Costa Pessoa, J., Gambino, D. Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. **2017**, *J. Inorg. Biochem.*, 175: 154-166.



el software BD CSampler (BD Bioscience). Los parásitos no tratados se usaron como control. Para el control positivo de apoptosis y necrosis, los parásitos se trataron con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 50 μM y 100 μM durante 2.5 horas respectivamente. Estos controles se suelen emplear en espectros de emisión donde algunos de los extremos de los fluorocromos se solapan, procedimiento conocido como compensación. Es por ello que para compensar se usa controles “sigle stain” para cada fluoróforo empleado y se iguala las medias de una población negativa con una población positiva.

#### 5.3.8. Estudios de viabilidad de los parásitos por citometría de flujo <sup>118</sup>.

Estos estudios fueron realizados por la autora bajo la supervisión de la Dra. Leticia Pérez del Laboratorio de Interacciones Moleculares del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Para estos estudios, cultivos de la forma epimastigote de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2, fueron obtenidos en la fase exponencial, bajo condiciones aerobias en medio axénico BHI-triptosa como se menciona antes. Los estudios de viabilidad se realizaron mediante evaluación de la actividad esterasa de los parásitos usando Calceina Acetoximetilado (CA-AM) e IP (Thermo Fisher Scientific). Los parásitos no tratados (utilizados como control) y los parásitos tratados con compuesto evaluados a 20 × CI<sub>50</sub> por 6 y 24 horas (1 × 10<sup>6</sup> parásitos/mL) se centrifugaron luego de 6 y 24 horas de incubación, se lavaron tres veces y se resuspendieron en 0.1 mL de PBS 1X que contenía 0.1 mM de CA-AM y 1 mg/mL de IP. Las muestras se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente para CA-AM y 15 minutos para IP, posteriormente se analizaron inmediatamente por citometría de flujo con un filtro de 533/30 nm (FL1) para CA-AM y un filtro de paso largo de 670 nm (FL3) para IP. Se adquirió la intensidad de fluorescencia para 10000 eventos de dos experimentos independientes y los datos se analizaron utilizando el software BD CSampler (BD Bioscience).

## 5.4. Estudios de parámetros farmacocinéticos

### 5.4.1. Estudios de estabilidad con fracciones microsomal y citosólica de hepatocitos de rata.

Para la determinación de la estabilidad en las diferentes fracciones (citosólica y microsomal de hepatocitos de rata) se usaron las diferentes proteínas presentes en las mismas. Las fracciones fueron preparadas acorde con lo antes descrito <sup>128</sup>. La concentración proteica en las diferentes fracciones se determinó por el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Sigma, como lo sugiere el manual. La concentración final de las moléculas en el medio acuoso fue de 400  $\mu$ M y preparada de un stock en DMSO de 40 mM. Las soluciones fueron homogeneizadas e incubadas a 37 °C a los 10 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h. (por TLC) Para esto se incubó a 37 °C en un volumen de 1 mL: 2.5  $\mu$ L de Cloruro de Magnesio 30 mM (MgCl); 2.5  $\mu$ L de Nicotinamida Adenosina Dinucleótido Fosfato (NADP+) 40 mM; 5  $\mu$ L de Glucosa-6-fosfato 350 mM (Glu6P); 5  $\mu$ L de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Glu6PD) 50 U/mL, 5  $\mu$ L del stock de los compuestos 40 mM y el volumen del Buffer fosfato (PH=7) debe ser tal que FC y FM presenten una concentración proteica final de 0.1 mg/mL. Luego de eso, se evaluó la estabilidad de los compuestos **2**, **11** y **16** en la fracción citosólica (FC) y microsomal (FM) de hepatocitos de rata a diferentes tiempos: 0, 30 y 60 minutos por HPLC. Una vez que los tiempos transcurrieron en dichas fracciones se extrajo el compuesto con 200  $\mu$ L de acetato de etilo y se inyectó en una columna C18 (Thermo) 50 $\mu$ L de la muestra en un volumen Isocrático de la fase móvil 50A:50B A) Ácido trifluoroacético 0.05 % en agua B) acetonitrilo realizando un espectro de 250 nm a 650 nm y las corridas fueron de 1 hora para todos los compuestos. También se preparó una TLC de sílica, sembrando la extracción en acetato de etilo a diferentes tiempos en orden de evaluar la presencia de productos de descomposición de las moléculas en estudio. La fase móvil que se empleó para la TLC fue hexano:acetato de etilo (7:3).

### 5.4.2. Estudio de fluorescencia intrínseca de las moléculas líderes.

Para las moléculas con mejor acción tripanosomicida se realizó espectros de absorción y emisión de las mismas. Para eso se utilizaron diferentes disolventes: DMSO, etanol y acetonitrilo. Los espectros fueron realizados en el VARIOSKAN

<sup>128</sup> Boiani, M., Merlino, A., Gerpe, A., Porcal, W., Croce, F., Depaula, S., Rodríguez, M.A. o-Nitroanilines as major metabolic products of anti-*Trypanosoma cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans in microsomal and cytosolic fractions of rat hepatocytes and in whole parasitic cells. *Xenobiotica* **2009**, 39:236–248.

FLASH de ThermoScientific. Absorción máxima del compuesto **2** fue a 440nm (emisión 550), el compuesto **11** absorbe a 430 nm (emisión 550 nm) y el compuesto **16** absorbe a 450 nm (emite a 550 nm).

#### 5.4.3. Análisis de cinética de penetración de los compuestos en *T. cruzi*.

Con los datos obtenidos de la sección anterior en un microscopio de fluorescencia (ZOETM Fluorescent Cell Imager) se estudió qué sucedía a los 30 minutos luego de la incorporación a los parásitos en cultivo del compuesto **2**, **16** y la combinación más eficiente en el *in vivo* (**2+16**). Para esto se dejó crecer durante 5 días *T. cruzi*, epimastigote cepa Tulahuen 2, a partir del día 5 se tomaron  $1 \times 10^6$  parásitos/mL y se sembraron en una placa de 24 pocillos con un  $CI_{50}$  de los compuestos **2**, **16** y la combinación más eficiente de **2+16** (correspondiente con  $\frac{1}{4}$  de sus  $CI_{50}$  de ambos compuestos). Los parásitos a los 30 minutos de tratados fueron lavados con PBS estéril pH=7.4 y fijados con una disolución de paraformaldehído 4 %. Luego las células fueron tratadas con Hoechst 33342 marcador nuclear (ImmunoChemistry Technologies, LLC) y con WGA-green marcador de membrana (thermofisher scientific, USA). Luego se lavan 3 veces los parásitos con PBS estéril pH=7.4 y 3 veces con agua miliQ. Se analizan las imágenes en el microscopio de fluorescencia para conocer si los compuestos ingresaron a los parásitos.

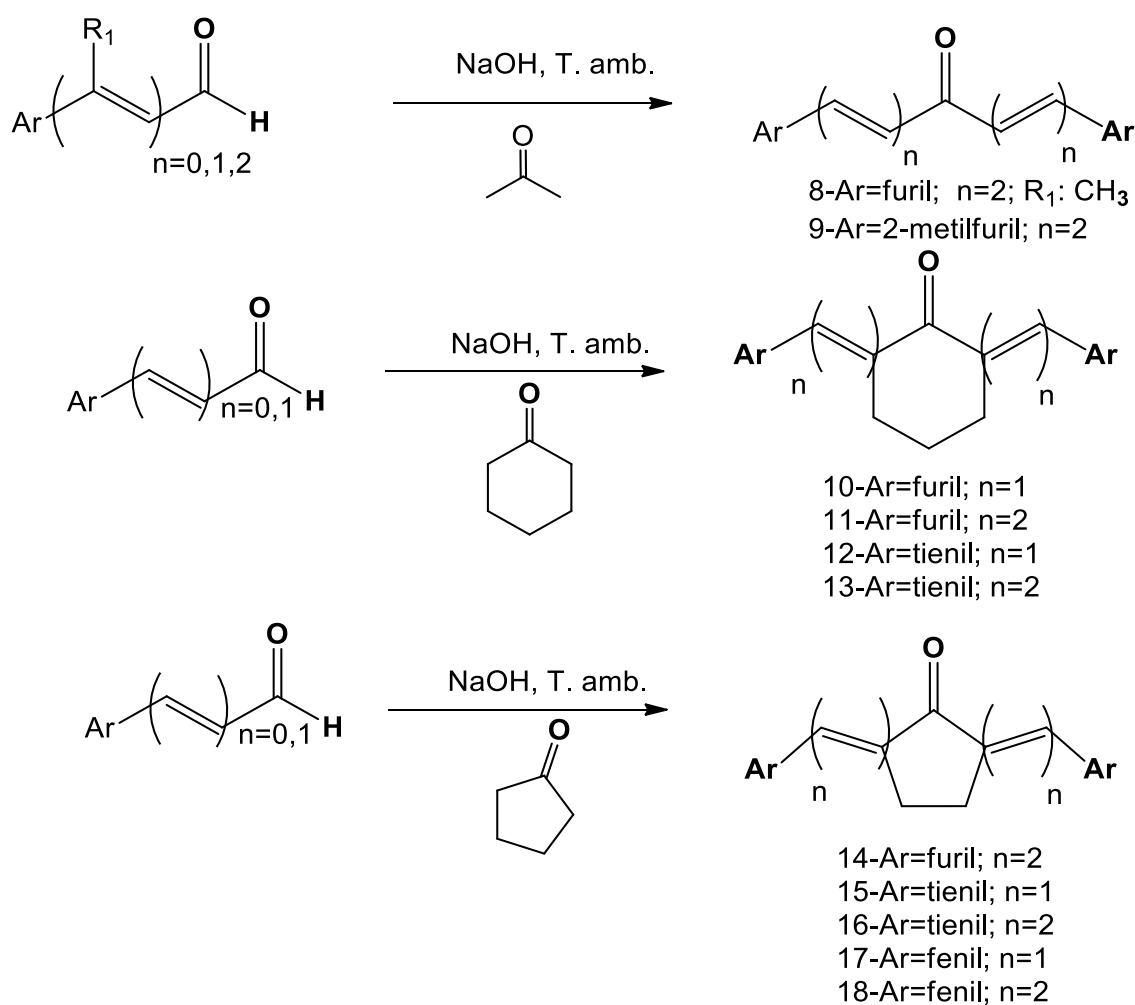
#### 5.4.4. Predicción de parámetros farmacocinéticos.

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

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**6.1. Química:** El diseño inicial de las moléculas se basa en los antecedentes antes descritos, donde se tomaron en cuenta el compuesto **2**, **Prototipo II**, **Prototipo III** y **LIDER II**<sup>92-95</sup>. Los compuestos del presente trabajo se obtienen mediante reacciones químicas en condiciones amigables con el ambiente (química verde) y mediante procedimientos de síntesis sencillos. (**Familia A**, **Figura 14 y 15**).



**Figura 14.** Ruta sintética para obtención de los compuestos de la **Familia A**.



A continuación, y con objeto de mejorar rendimientos de reacción de los compuestos de interés, se tomó la síntesis del compuesto **2** como modelo. Se muestra en la **Tabla 2** las condiciones ensayadas para la condensación aldólica entre la acetona y el aldehído correspondiente. A su vez, se realizó para los nuevos compuestos activos la síntesis a escala (*mg* a *g*) para poder realizar todos los ensayos biológicos a partir de un mismo lote.

La condición óptima de reacción fue una mezcla etanol:agua (1.0:1.2) con 2 eq de soda (optimizado de 6 eq inicialmente) y 1 hora de reacción a temperatura ambiente. Con estos resultados de síntesis, se implementaron las mismas condiciones para la preparación de las nuevas moléculas de la **Familia A** como se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 2.** Estudio de las condiciones óptimas de reacción para la condensación aldólica.

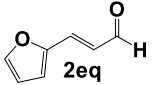
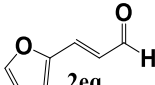
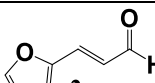
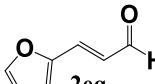
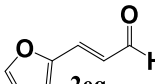
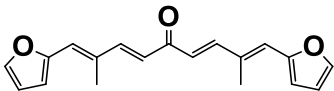
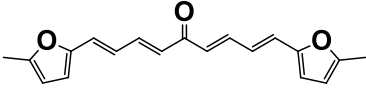
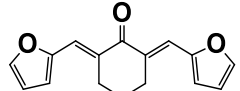
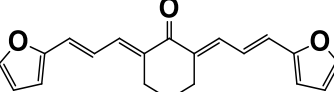
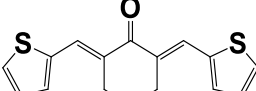
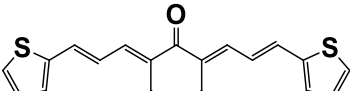
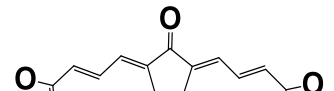
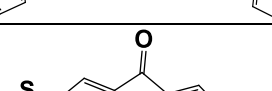
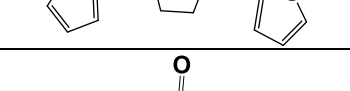
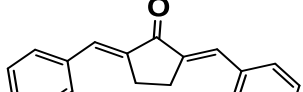
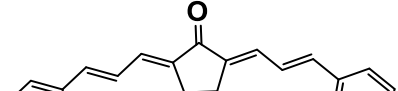
REACCIÓN	CONDICIONES	RESULTADOS
R1	 <p>2eq</p> <p>etanol:agua (1.0:1.2), NaOH (2 eq), acetona (1 eq), temperatura ambiente, 1 hora</p>	<p>Rendimiento: 80 %</p> <p>Sólido naranja, producto precipita con alto grado de pureza.</p>
R2	 <p>2eq</p> <p>EtOH (95%), NaOH (2 eq), acetona (1 eq), temperatura ambiente, 1 hora</p>	<p>Rendimiento:70 %</p> <p>Sólido naranja, producto que se obtiene al evaporar a vacío el disolvente (EtOH). Se recristaliza en etanol con carbono activado.</p>
R3	 <p>2eq</p> <p>H<sub>2</sub>O, NaOH (2 eq), acetona (1 eq), temperatura ambiente, hasta 24 horas.</p>	<p>No se obtiene el producto por descomposición de los reactivos. Se monitorea la reacción cada 10 minutos al inicio, visualizando el aldehído de partida hasta las 2 horas y media sin lograr disminuir la presencia del mismo). Se deja la reacción 24 horas y se observa la formación de otros productos no deseados más polares y apolares que el compuesto de interés.</p>
R4	 <p>2eq</p> <p>etanol:agua (1.0:1.2), NaOH (2 eq), acetona (1 eq), reflujo.</p>	<p>No se obtiene el producto por descomposición de los reactivos. Se monitorea la reacción cada 10 min, visualizando el aldehído de partida hasta que se deja de observar el mismo. En dicho momento no se obtiene el producto deseado, visualizando otros productos.</p>
R5	 <p>2eq</p> <p>etanol:agua (1.0:1.2), NaOH (1 eq), acetona (1 eq), temperatura ambiente, 45 minutos.</p>	<p>Rendimiento: 40 %.</p> <p>Aspecto: sólido naranja.</p> <p>Sólido naranja, producto precipita con alto grado de pureza.</p>

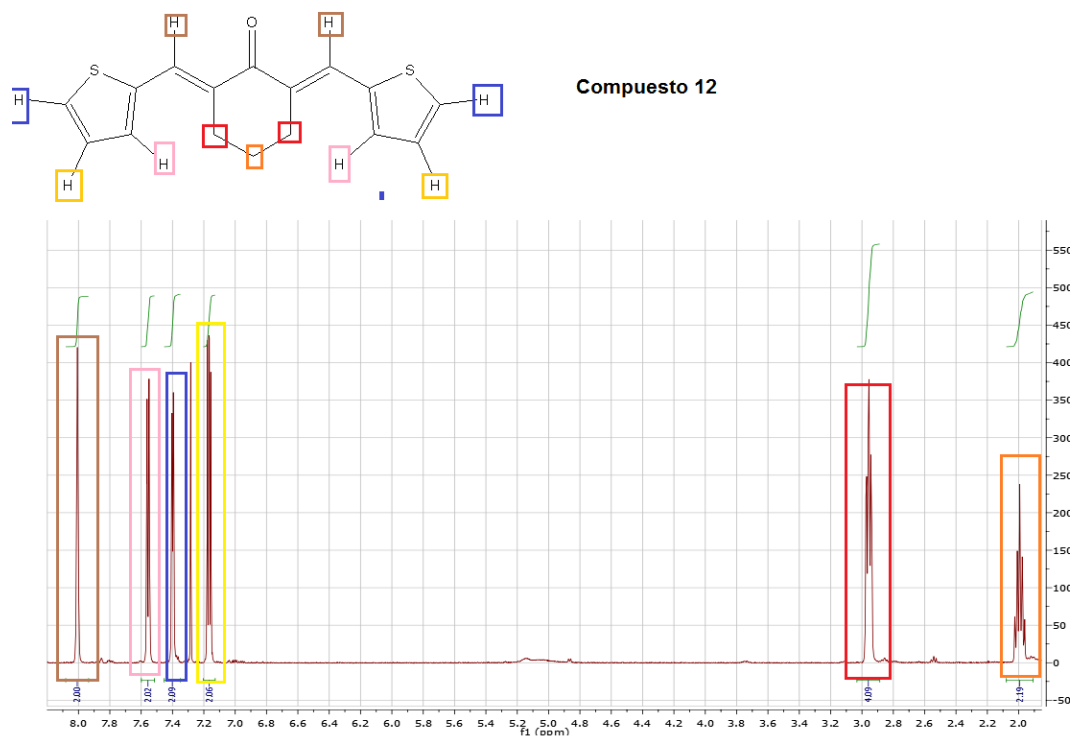


Tabla 3. Resultados de síntesis para la Familia A

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%) <sup>*</sup>	Nombre
8		85	(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> )-1,9-Di(furan-2-il)-2,8-dimetilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona
9		67	(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> )-1,9-Di(5-metilfuran-2-il)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona
10		99	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-2,6-Di(furan-2-ilmetilen)ciclohexanona
11		60	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-2,6-Di[( <i>E</i> )-3-(furan-2-il)aliliden]ciclohexanona
12		51	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-2,6-Di(tien-2-ilmetilen)ciclohexanona
13		98	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-2,6-Di(3-tien-2-ilaliliden)ciclohexanona
14		82	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i> )-2,5-Di[3-(furan-2-il)aliliden]ciclopentanona
15		98	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i> )-2,5-Di[(tioen-2-il)metilen]ciclopentanona
16		100	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i> )-2,5-Di[3-(tien-2-il)aliliden]ciclopentanona
17		90	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i> )-2,5-Dibencilidenciclopentanona
18		33	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i> )-2,5-Di(3-fenilaliliden)ciclopentanona

\* Todas las moléculas fueron aisladas del crudo de la reacción por filtración y su pureza fue monitoreada por TLC y en caso que fuera necesario, purificadas por recristalización de etanol.

A continuación, se muestra a modo de ejemplo el análisis de la espectroscopía para el compuesto **12** de la **Familia A**. En la **Figura 16** se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, donde se pueden observar las señales características de los protones del grupo tienilo, que se marcan en amarillo, azul y rosa, y los protones olefínicos, que se marcan en marrón, los protones del ciclo de 6 carbonos se marcan en rojo y naranja respectivamente.

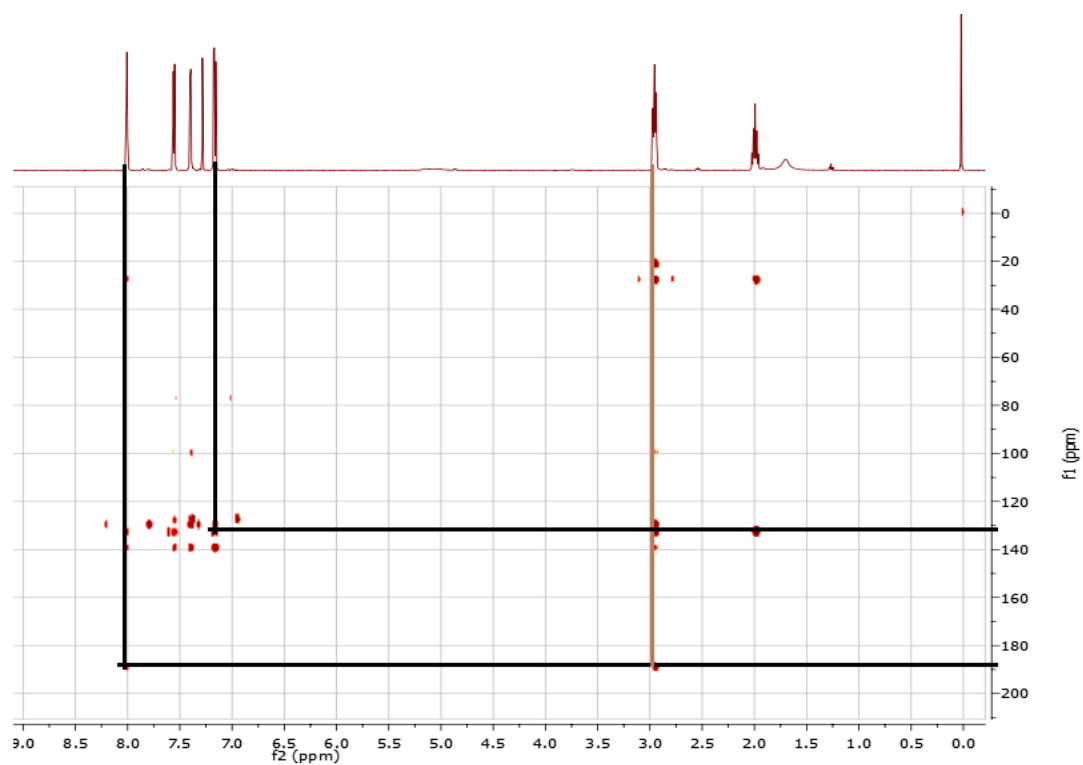


**Figura 16.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **12** en  $\text{CDCl}_3$  adquiridos a  $25^\circ\text{C}$ .

Como se muestra en la **Figura 16**, la señal remarcada en azul se corresponde con aquellos protones que pertenecen al sustituyente tienilo y se encuentran más cercanos al azufre. Con un desplazamiento de 7.39 ppm se encuentran enlazados a carbonos que presentan desplazamientos de 130 ppm (**Figura 17**). La asignación de estos protones resultó del experimento de HMBC (**Figura 18**), el cual permite analizar correlaciones a largas distancias, por lo tanto, se pueden identificar los carbonos que no se encuentran enlazados directamente a un protón. Los protones en amarillo del tienilo se encuentran enlazados a un carbono que presenta un desplazamiento de 128 ppm, por otro lado, los protones en rosa se encuentran enlazados a un carbono que presenta un desplazamiento de 129 ppm. Los protones que se encuentran en marrón pertenecientes al doble enlace se encuentran enlazados a carbonos que presentan desplazamientos de 131 ppm, respectivamente.

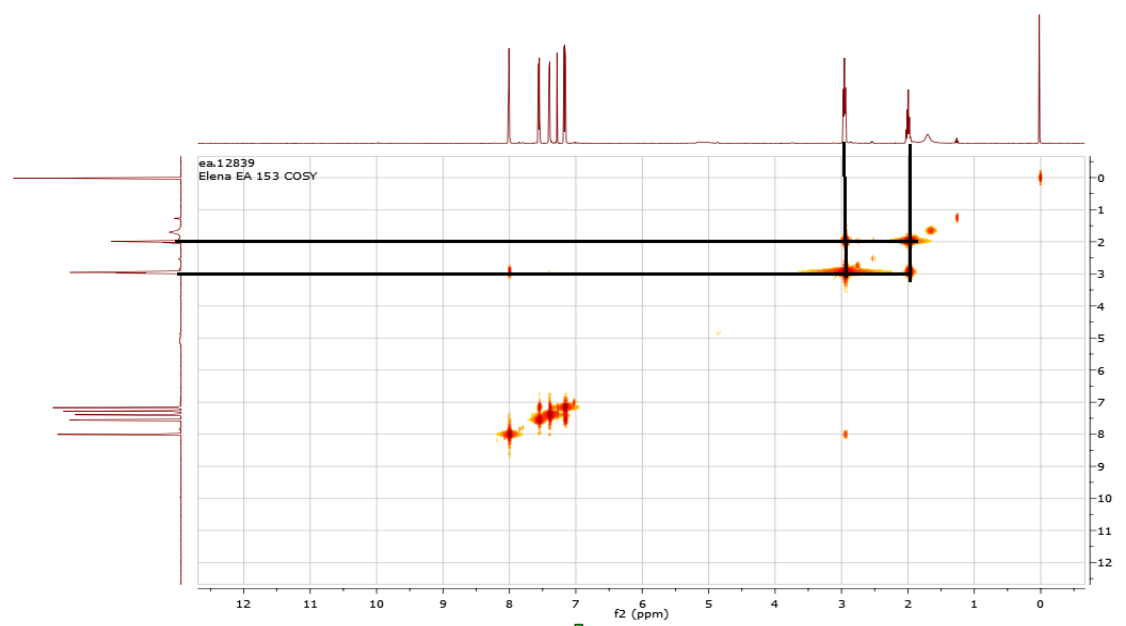


**Figura 17.** Resultado del experimento de correlación heteronuclear a un enlace de distancia (HSQC) del compuesto **12**. Las líneas indican correlaciones a un enlace.



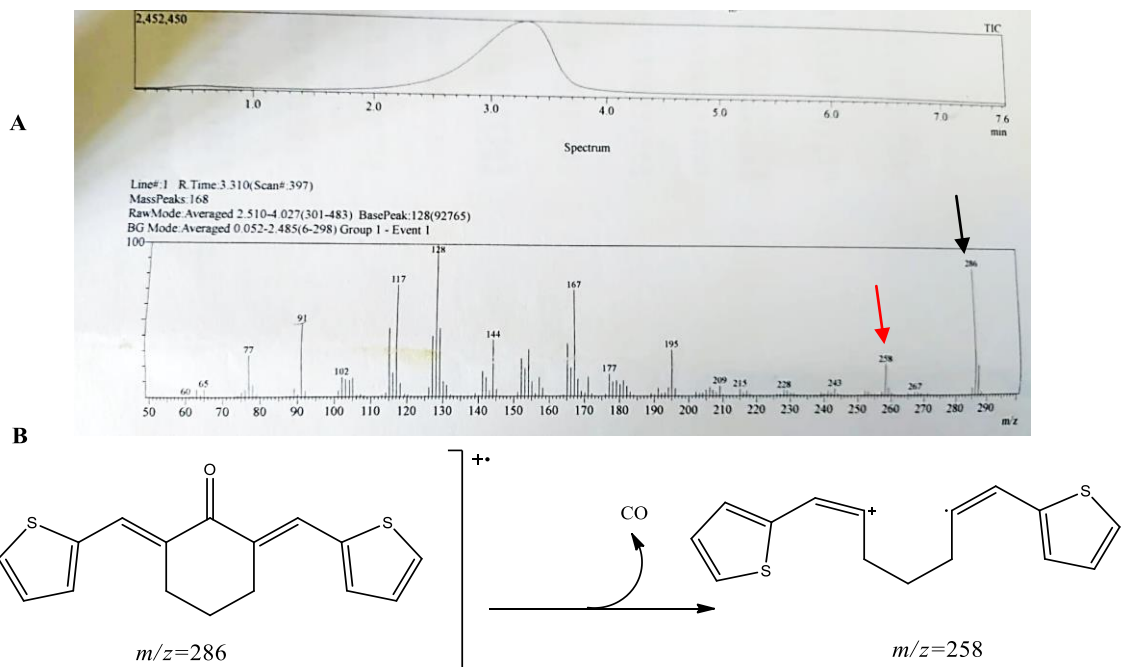
**Figura 18.** Resultado del experimento de correlación heteronuclear a larga distancia (HMBC) del compuesto **12**. Las líneas indican correlaciones a dos enlaces.

El experimento de correlación homonuclear COSY (**Figura 19**), permite estudiar la conectividad de una molécula mediante la determinación del acoplamiento escalar protón – protón. Es decir, los protones a un enlace.



**Figura 19.** Resultado del experimento de correlación homonuclear (COSY) del compuesto **12**. En naranja se muestran las correlaciones y sus respectivos protones en la molécula.

En cuanto a la espectrometría de masa se utilizará como ejemplo los resultados obtenidos con el derivado **12**. Como se puede observar en la **Figura 20**, está presente un ion de relación  $m/z$  286 que corresponde al ion molecular ( $M^+$ ). Además, está presente un ion de relación  $m/z$  258 que evidencian fragmentaciones completamente esperables para cetonas.



**Figura 20.** A) Espectro de masa para el compuesto **12**, indicado con flecha negra el  $M^+$  y con la roja el fragmento derivado de la pérdida del carbonilo **12**. B) Análisis de las fragmentaciones posibles observadas en la espectrometría de masas para el compuesto **12**.

## 6.2. Biología

### 6.2.1. Evaluación de la actividad frente a *T. cruzi*.

Los derivados sintetizados de la **Familia A** fueron inicialmente testeados frente a la forma epimastigote de *T. cruzi*, como forma de conocer su potencialidad como agentes antichagásicos. En primera instancia se determina el porcentaje de inhibición del crecimiento (PI) a una concentración fija de 25  $\mu$ M de un cultivo de 5 días de crecimiento y luego, para aquellos compuestos con porcentaje de inhibición del crecimiento mayor a 50 %, se trabaja a concentraciones variables para determinar el  $CI_{50}$  de cada compuesto. Este último corresponde a la concentración necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento de los parásitos <sup>129 130</sup> (**Tabla 3 Familia A y Tabla 4 Familia B y C**). Por otro lado, las arilidenonas a las cuales se le calcula el  $CI_{50}$  en *T. cruzi* se testea en macrófagos murinos cepa J774.1 para calcular el IS de los compuestos ( $CI_{50}$  en J774.1 /  $CI_{50}$  sobre *T. cruzi* como se mencionó en materiales y métodos). De esta manera se observa que tan selectivo es el compuesto hacia el parásito (**Tabla 3 y 4**).

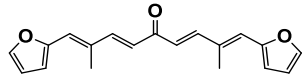
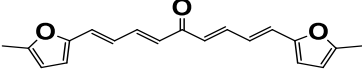
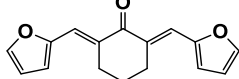
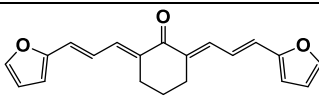
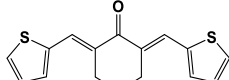
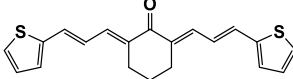
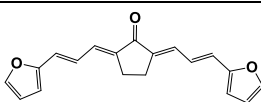
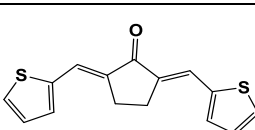
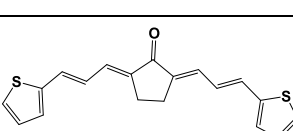
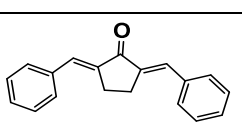
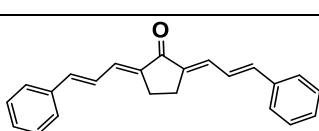
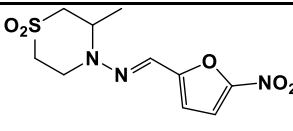
La mayoría de los compuestos de la **Familia A** tienen actividad contra *T. cruzi*, siete de once compuestos tiene mejor actividad que el fármaco de referencia **Nfx**. El compuesto **16** con un  $CI_{50}$  de 40 nM es el compuesto más potente. Este es 200 veces más potente y casi 10 veces más selectivo que **Nfx**. A partir de estos resultados se pueden extraer ciertas conclusiones según la estructura-actividad tripanosomicida y selectividad para los compuestos: cuando aumenta el número de insaturaciones aumenta la actividad y selectividad en general de las moléculas como se puede observar en los siguientes grupos de pares: **15 y 16**; **12 y 13**; **10 y 11**. Sin embargo esto no ocurre en el siguiente grupo de pares **17 y 18**.

---

<sup>129</sup> Buckner, F.C., Verlinde, C.L., La Flamme, A.C., Van Voorhis, W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta – galactosidase. **1996**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**:2592 – 2597.

<sup>130</sup> Santoro, G.S., Cardoso, M.G., Guimaraes, L.G., Freire, G.F., Soares, M.J. Antiproliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **2007**, *Parasitol.*, **134**:1649 – 1665.

**Tabla 3.** Actividad antiproliferativa de los derivados desarrollados de la **Familia A** sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*, macrófagos murinos cepa J774.1 e índice de selectividad.

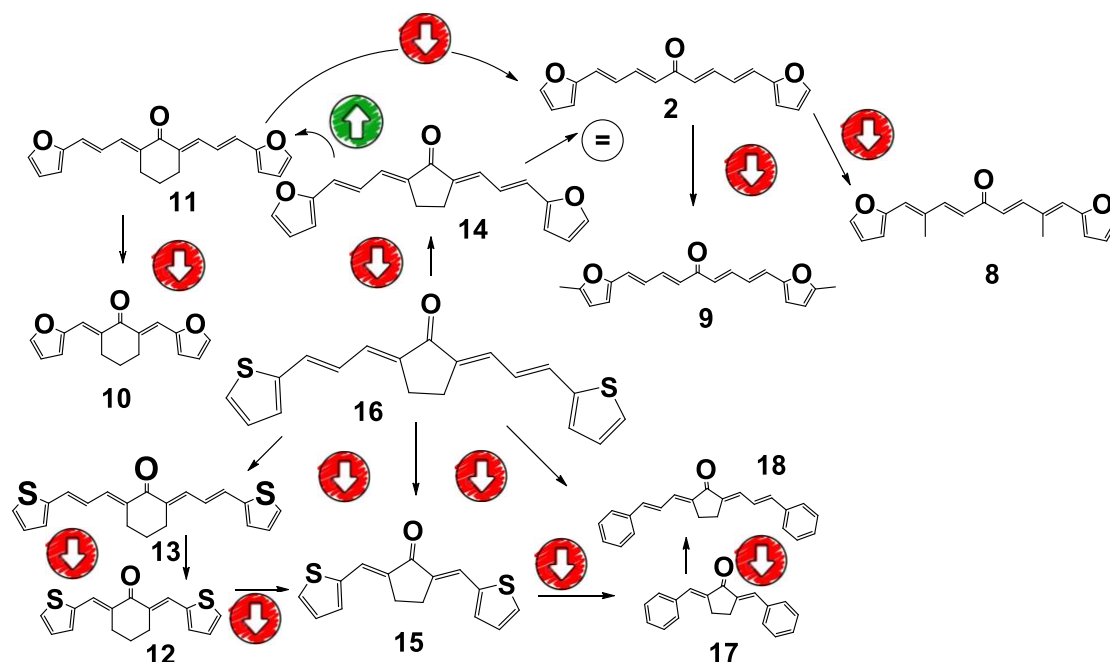
Compuesto	Estructura	CI <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> <sup>a</sup> (μM)	CI <sub>50</sub> J774.1 <sup>b</sup> (μM)	IS <sup>c</sup>
8		82±2.0	33±5	4
9		9.4±1.4	32±4	4
10		7.3±1.6	115±5	16
11		0.6±0.2	10±2	17
12		3.6±0.9	73±4	20
13		0.6±0.2	20±1	33
14		5.4±1.6	19±2	4
15		6.5±1.1	50±4	8
16		0.04±0.01	15±4	375
17		15.9 ± 1.2	6.2±0.8	0.4
18		>25	ND <sup>d</sup>	ND
Nfx		8 ± 1	316±23	40

a- Concentración del compuesto que inhibe el 50% del crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*. b- Concentración del compuesto que inhibe el 50% del crecimiento de los macrófagos murino J774.1; el dato representa la media de dos experimentos independientes por triplicado. c- Índice de Selectividad (IS): CI<sub>50</sub> sobre J774.1/CI<sub>50</sub> contra *T. cruzi*. d- No determinado.

La incorporación de un metilo que dona electrones por efecto inductivo a la molécula en el caso de la molécula **8** y **9**, puede provocar desestabilización del anillo de furano (provocando la apertura del mismo). Esto explicaría la menor actividad frente al parásito (aumentado el  $CI_{50}$ ) comparada con la molécula **2** siendo además menos selectiva (esto puede ser causa del aumento de la reactividad inespecífica ante moléculas biológicas presentes en las células).

A su vez se observó que un cambio en la linealidad de la molécula con la incorporación de un ciclo de 5 o 6 carbonos, aumenta la selectividad de las mismas como se puede observar al comparar las parejas: **2** vs **11**; **4** vs **16**; **1** vs **11**. Por lo anterior mencionado se puede llegar a sugerir que, al restringir la flexibilidad de las moléculas, aumenta la selectividad de las mismas. Lo anterior mencionado se ejemplifica en la **Figura 21**, donde se parte de la molécula **16** (parte central de la figura) y se dibujan flechas en verde y rojo, siendo el verde un aumento de la actividad-selectividad y en rojo la pérdida de la misma. A su vez si se compara las ciclohexanonas con las ciclopentanonas, no hay una clara relación estructura-actividad; sin embargo, cuando se comparan los grupos arilos de las mismas, son más activas y selectivas, aquellas que sustentan en su estructura tienilo, que furilo y que fenilo respectivamente. Lo anterior mencionado puede ser causa que el furano al tener como heteroátomo al oxígeno que es más electronegativo que el azufre y que el carbono, lo que hace al anillo aromático menos estable ya que los electrones tienden a estar más cerca al oxígeno, siendo menor el carácter aromático del mismo. El furano y el tiofeno son estructuralmente muy similares entre sí ya que son grupos aromáticos de 5 átomos, lo único que lo diferencia es un átomo de oxígeno en el caso del furano y de azufre en el caso del tiofeno. Sin embargo, para el benceno al estar constituido por carbonos e hidrógenos y al agregar un átomo más al anillo aromático hace que en este caso disminuya la actividad tripanosomicida para las arilidenonas en este trabajo descritas.





**Figura 21.** Relación estructura actividad (REA) tripanosomicida-selectividad de las arilidenonas descritas para la **Familia A**.

En el marco del diseño de nuevas moléculas tripanosomicidas, nuestro grupo sintetizó una serie de nuevas moléculas esteroideas (**Familia B**<sup>131</sup>) y pirazoles (**Familia C**<sup>105</sup> sintetizados en colaboración con el National Center for Scientific Research “Demokritos”, Institute of Biosciences & Applications, Athens, Greece). La **Familia B** surgió a partir de moléculas esteroideas que han demostrado poseer actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antifúngica que se obtiene de los huevos de garrapata *Rhipicephalus microplus*<sup>132</sup>, de las partes áreas extraídas con *n*-hexano de un extracto metanólico de la raíz del árbol *Pentalinon andrieuxii*<sup>133 134</sup> y también de modo sintético<sup>102 135</sup> Estas se diseñaron inspiradas en el compuesto **2** y al **LIDER II**, para aumentar la lipofilia, estabilidad metabólica, generar diversidad y también asimetría. La **Familia C** surge de la eliminación de los aceptores de Michael para la formación del anillo pirazólico de diarlidencetonas o derivados curcuminoides. Derivando en estructuras sin motivos PAINS con asimetría y simetría comparables para los estudios de REA y la inhibición de la TIM.

<sup>131</sup> Espíndola, A. Nuevos derivados de pregnenolona con actividad antibiofilm, **2015**, Tesina de fin de Carrera de Lic. Bioquímica, Facultad de Ciencias – UdelaR.

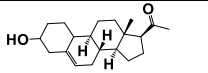
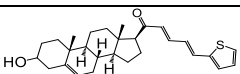
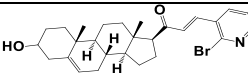
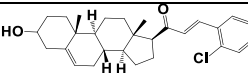
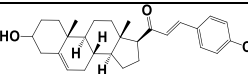
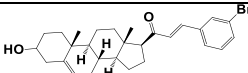
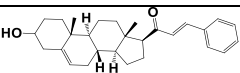
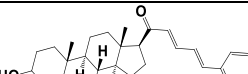
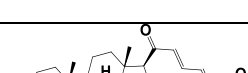
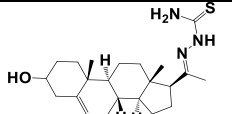
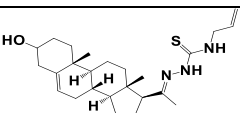
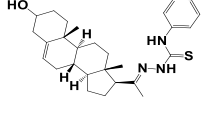
<sup>132</sup> Potterat, O., Hostettmann, K. Boophilin, an Antimicrobial Sterol Amide from the Cattle Tick *Boophilus microplus*. **1997**, *Helv. Chim.*, *80*:2066–2072

<sup>133</sup> Pan, L., Lezama-Davila, C.M., Isaac-Marquez, A.P., Calomeni, E.P., Fuchs, J.R., Satoskar, A.R., Kinghorn, A.D. Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. **2012**, *Phytochemistry*, *82*:128–135.

<sup>134</sup> Leliebre-Lara, V., Monzote Fidalgo, L., Pferschy-Wenzig, E.M., Kunert, O., Nogueiras Lima, C., Bauer, R. *In Vitro* Antileishmanial Activity of Sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). **2016**, *Molecules*, *21*:1045-1055.

<sup>135</sup> Lone, I.H.; Khan, K.Z.; Fozdar, B.I.; Hussain, F. Synthesis antimicrobial and antioxidant studies of new oximes of steroidal chalcones. **2013**, *Steroids*, *78*:945–950.

**Tabla 4.** Actividad antiproliferativa de los derivados desarrollados de la **Familia B y C** sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*, macrófagos murinos cepa J774.1 e índice de selectividad (IS) (las leyendas coinciden con la **Tabla 3**).

Compuesto	Estructura	CI <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> <sup>a</sup> (μM)	CI <sub>50</sub> J774.1 <sup>b</sup> (μM)	IS <sup>c</sup>
<b>Familia B</b>				
Pregnenolona		>25	ND	-
19		>25	ND	-
20		>25	ND	-
21		12±3	100±10	8.3
22		>25	ND	-
23		20±5	ND	-
24		>25	ND	-
25		>25	ND	-
26		>25	ND	-
27		1.2±0.3	50 ± 3	42
28		8±2	25 ± 2	3
29		25±3	25 ± 5	1

**Familia C**

<b>30</b>		>25	ND	-
<b>31</b>		>25	ND	-
<b>32</b>		>25	ND	-
<b>33</b>		9±2	>15	> 1.7
<b>34</b>		>25	ND	-
<b>35</b>		>25	ND	-
<b>36</b>		>25	ND	-
<b>37</b>		>25	ND	-
<b>38</b>		>25	ND	-
<b>39</b>		>25	ND	-
<b>40</b>		15±5	11±3	0.73
<b>41</b>		5±2	>15	> 3
<b>42</b>		4±1	15±2	4
<b>43</b>		>25	ND	-

Los compuestos de la **Familia B** y **C**, fueron utilizados para la caracterización biológica frente a la forma a *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (para las moléculas más relevantes) que se muestran en la **Tabla 5**. Los compuestos **21** y **23**, mostraron actividad moderada, el compuesto **26** derivado esteroideo del compuesto **2** no tuvo actividad, mostrando una vez más el papel de la simetría en la actividad biológica de los compuestos de la **Familia A**. Sin embargo, cuando nos acercamos al modelo del **LIDER II** con las tiosemicarbazona precursoras de la tiazolidenhidracinas **27**, **28** y **29** se gana en actividad frente a *T. cruzi*. En cuanto a la **Familia C**, la pérdida de un grupo aceptor de Michael (como tienen las arilidenonas) y como se observa en la **Tabla 4**, las hacen a estas moléculas menos efectivas frente al parásito y a su vez presentan  $CI_{50}$  bajos frente a células mamíferas, para los derivados que fueron activos frente a *T. cruzi*. Por lo tanto, las moléculas de la **Familia C** son menos activas y selectivas en comparación de las moléculas sintetizadas en la **Familia A** y **Familia B**. En cuanto al carácter de PAINS de la **Familia A** en contraste con lo esperado para la **Familia C**, donde corrigiendo ese tema estructural (es decir la eliminación del sistema aceptor de Michael) no se gana ni actividad antiparasitaria, ni mejora en la toxicidad inespecífica. Esto último reafirma el carácter específico de la **Familia A** contra *T. cruzi*.

Observando los resultados biológicos y haciendo un análisis de las diferentes estructuras, se pueden extraer ciertas observaciones relevantes. Lo primero que se observa es que las arilidenonas son más activas que los derivados esteroideos. Esto puede ser consecuencia que las moléculas esteroideas al ser más lipofílicas dificultan la solubilidad de las mismas en el medio donde se cultiva los parásitos, por lo que es difícil obtener una dosis-respuesta de las mismas en estas condiciones ensayadas. Además, como ya se ha observado previamente<sup>109</sup> la simetría de las moléculas juega un rol fundamental en la actividad tripanosomicida.

Cabe destacar que las moléculas con mayor efecto tripanosomicida *in vitro* en las condiciones ensayadas son las arilidenonas. Además, en general, al aumentar el número de insaturaciones, aumentó la actividad para las mismas. Lo anterior mencionado sucede para las parejas de moléculas **15** y **16**; **12** y **13**; **10** y **11**. En las moléculas no-cíclicas y derivados del compuesto **2**, al introducir metilos en diferentes partes de la molécula, en la cadena lineal y en el anillo del furano, derivados **8** y **9** respectivamente, le quitó actividad tripanosomicida a las mismas, lo que puede ser consecuencia de la posible apertura del furano, restando estabilidad ya que las vuelven más reactivas provocando una rápida metabolización. Se concluye además de estos resultados que al introducir un ciclo de 5 carbonos y 6 carbonos en las mismas respecto al carbonilo aumentó la actividad y esto se vio reflejado al comparar las moléculas **2** y **11**; **4** y **16**; **1** y **11**. Por último se observa que los grupos aromáticos en

este tipo de moléculas muestran el siguiente orden de actividad: tienilos más activos que furilos y por último fenilo.

#### 6.2.2. *Ensayos in vitro de la combinación de las moléculas activas.*

Estos ensayos, en este tipo de enfermedades están cada vez más en uso para mejorar la eficacia y tolerancia del tratamiento. En el contexto de este posgrado se estudió la combinación de diferentes moléculas que actúen desde el punto de vista metabólico del parásito en vías distintas procurando la completa cura de la enfermedad, reducir dosis, acortar tiempos de tratamiento o inclusive disminuir las dosis del tratamiento actual. Para esto se utilizaron las moléculas más activas descritas en el presente trabajo **11**, **16**, **27** y descritas por nuestro grupo de investigación como las moléculas **2**<sup>94</sup> y el **LIDER II**<sup>97</sup> combinadas entre sí o con **Bnz**. Es conocido que el **Bnz** actúa modificando mediante enlaces covalentes a macromoléculas vía nitroreducción del fármaco y nitroreducción de intermedios con los componentes del parásito; o la unión con el ADN, lípidos o proteínas<sup>24</sup>. Del compuesto **2** se sabe que es inhibidor de la TIM<sup>111</sup>, pudiendo además inhibir otras enzimas del parásito como se mostrará más adelante. El compuesto **11** es un excelente inhibidor, de la TIM del parásito y además inhibe a la cruzipaína (ver más adelante). El compuesto **16** inhibe de manera moderada a la TIM y cruzipaína siendo la mejor molécula que inhibe el crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*. El **LIDER II**, sintetizado en la tesis de doctorado del Dr. Guzmán Álvarez<sup>136</sup>, se conoce que al igual que el compuesto **16** es muy selectivo para el parásito en varias formas del parásito, además de tener eficacia *in vivo*, siendo un excelente inhibidor de la cruzipaína (CI<sub>50</sub>:4 μM).

Todos estos compuestos tienen efecto dosis respuesta en la forma epimastigote de *T. cruzi* con CI<sub>50</sub> que varían desde el rango nanomolar hasta micromolar. Al investigar la combinación de los mismos se ha encontrado algunos resultados interesantes (**Tabla 5**): realizando los isobogramas correspondientes se encontró sinergismo con el compuesto **2+Bnz**, el compuesto **2+11**, el compuesto **2+LIDER II**, **2+16**, **16+LIDER II**, no siendo así para las combinaciones de compuestos **11+16** y **16+Bnz**. Teniendo en cuenta los resultados *in vitro* antes mencionados para la molécula **27** (esteroide con mecanismo desconocido) se decide combinar a esta y las arilidenonas (**2,11** y **16**). En todas las combinaciones que involucraron al compuesto **27** se observa antagonismo. En la **Tabla 5** se muestra el análisis isoblográfico para cada una de las combinaciones *in vitro* ensayadas.

---

<sup>136</sup> Álvarez, G. Investigación y desarrollo de agentes anti-*Trypanosoma cruzi* con moderados efectos tóxicos y dirigidos a múltiples dianas. **2013**, Tesis de doctorado en química, Facultad de Química-PEDECIBA, Universidad de la República.

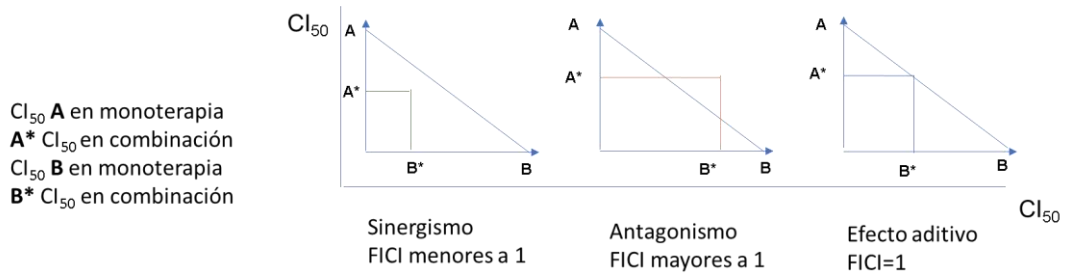
Para este ensayo de las moléculas más relevantes se ensayaron las siguientes combinaciones para el posterior cálculo del FICI y la construcción de isobogramas:  $Cl_{50}$  de **A** +  $Cl_{50}$  de **B**;  $\frac{3}{4} Cl_{50}$  de **A**+  $\frac{3}{4} Cl_{50}$  de **B**;  $\frac{1}{2} Cl_{50}$  de **A**+  $\frac{1}{2} Cl_{50}$  de **B**; y finalmente  $\frac{1}{4} Cl_{50}$  de **A**+  $\frac{1}{4} Cl_{50}$  de **B**. En la **Figura 22** se ejemplifica la construcción de isobogramas y su análisis.

$Cl_{50}$ <b>A+B</b>	$\frac{3}{4} Cl_{50}$ <b>A+B</b>
$\frac{1}{2} Cl_{50}$ <b>A+B</b>	$\frac{1}{4} Cl_{50}$ <b>A+B</b>
$\frac{1}{6} Cl_{50}$ <b>A+B</b>	$\frac{1}{8} Cl_{50}$ <b>A+B</b>
Control (-)	$Cl_{50}$ Nfx

Se calculan los nuevos  $Cl_{50}$  de **A** y **B** en combinación ( $A^* Cl_{50}$  y  $B^* Cl_{50}$  )

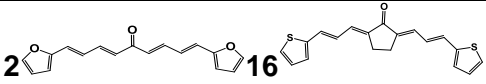
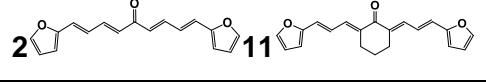
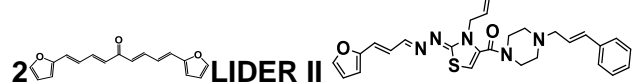
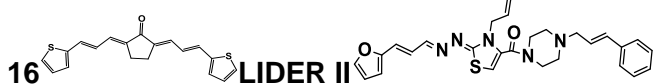
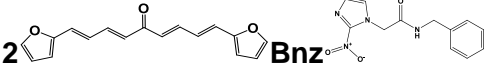
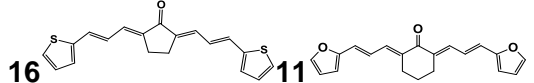
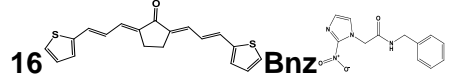
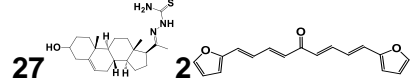
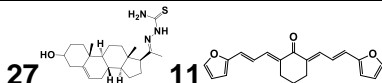
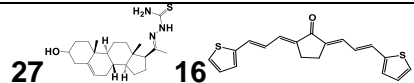
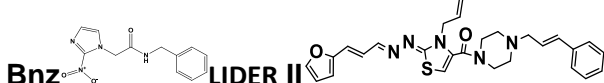
Se calcula índice de la fracción inhibitoria fraccional (FICI)=  $A^* Cl_{50} / Cl_{50} A + B^* Cl_{50} / Cl_{50} B$

Se construyen isobogramas con los nuevos  $Cl_{50}$  de los compuestos en combinación de donde resultan los siguientes gráficos:



**Figura 22.** Construcción y análisis de isobogramas <sup>108 109</sup>.

**Tabla 5.** Análisis isobolográfico de las combinaciones ensayadas entre los compuestos líderes.

Combinación	Efecto	FICI	Proporción molar*
 2 16	Sinergismo	0.5	125/1
 2 11	Sinergismo	0.75	8/1
 2 LIDER II	Sinergismo	0.75	1/1.2
 16 LIDER II	Sinergismo	0.75	1/133
 2 Bnz	Sinergismo	0.5	1/1
 16 11	Antagonismo	2	-
 16 Bnz	Antagonismo	2	-
 27 2	Antagonismo	2	-
 27 11	Antagonismo	2	-
 27 16	Antagonismo	1.5	-
 Bnz LIDER II	Adición	1	1/2

\*Relación molar óptima de sinergismo.

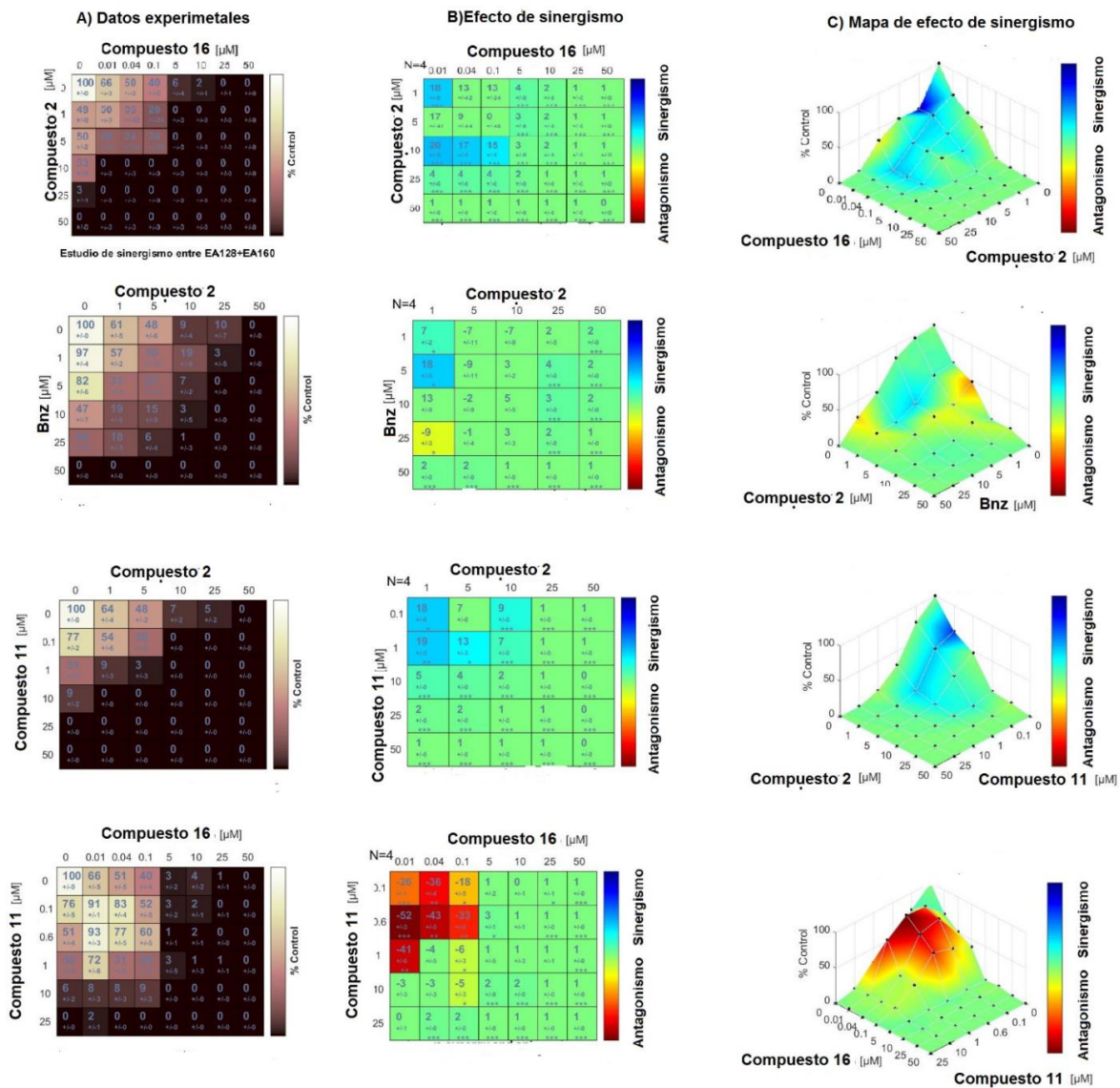
Se utiliza además para el estudio de combinaciones, el software gratuito Combeneft<sup>137</sup>, que permite el análisis, la visualización avanzada y la cuantificación de combinaciones de fármacos y otros agentes obteniendo las matrices que analizan por colores si existe sinergismo o antagonismo (el color rojo indica antagonismo y el azul sinergismo, **Figura 23**). Utilizando, como en este caso, el modelo de Loewe se puede observar que cuando dos compuestos se combinan en un ensayo de tablero de ajedrez como en la **Figura 23**, el contorno dosis-respuesta observado puede ser recto, convexo o cóncavo. Combinaciones de compuestos con contornos rectos son Loewe-aditivo. Cuando el contorno isofenotípico de la dosis respuesta es significativamente cóncavo o convexo, la combinación es sinérgica o antagónica, respectivamente. En la **Figura 23** se muestra los resultados más relevantes para las combinaciones de las moléculas sintetizadas en este trabajo.

Al comienzo de estos ensayos se consideraron las moléculas con mejor acción tripanosomicida y el fármaco de referencia **Bnz**, que se conocían que tenían mecanismo de acción diferente encontrando resultados interesantes con acción sinérgica como muestra la **Tabla 5**. Esto se refleja para las moléculas **2+16**, **2+Bnz** como las combinaciones con acción tripanosomicida más potente. Posteriormente se decide combinar entre sí las moléculas activas de esta tesis para tratar de buscar los menores efectos tóxicos en los animales infectados y buscando la dosis mínima de administración, así como el tiempo de administración. En este caso y dado que el programa analiza combinaciones de 5 concentraciones de 4 experimentos diferentes, se analiza arbitrariamente concentraciones muy altas con respecto al  $CI_{50}$  de cada compuesto, cercanas al  $CI_{50}$  (o a la misma dosis como el caso de la molécula **16**) y alejadas del mismo, obteniendo los resultados que se detallan en la **Figura 23**.

---

<sup>137</sup> <https://sourceforge.net/projects/combeneft/>





**Figura 23.** Efecto de las diferentes combinaciones del **Bnz**, **2**, **11**, **16** en la forma aislada de epimastigote de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2. La viabilidad celular fue visualizada por turbidimetría (610 nm) a los 5 días de realizar el ensayo. **A)** Columna que muestra los datos experimentales de las diferentes dosis de los compuestos (en los ejes x e y), la intersección en la matriz muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento de los parásitos. **B)** Columna que muestra según el modelo Loewe el valor de la sinergia para cada combinación. Los valores negativos muestran un efecto antagónico para la combinación (en rojo), no así para los valores positivos que muestran un efecto sinérgico (en azul). Estos valores coloreados son significativamente diferentes respecto al control, no siendo así para los valores que se encuentran en verde. **C)** Mapa de valores de sinergismo según el modelo de Loewe. Los p valor depende de los \* en la Columna **B**: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 10^{-3}$ ; \*\*\* $p < 10^{-4}$ . Los datos son expresados como resultado de 4 experimentos independientes (N=4).

Estos resultados reflejaron para estas moléculas, que generalmente las que presentan diferente mecanismo de acción, potenciaron su acción tripanosomicida *in vitro*, no siendo así para las que se conocen que presentan los mismos blancos moleculares como los compuestos **11+16**. Estos resultados son promisorios para continuar con ensayos *in vivo*, que se mostrarán más adelante, en el modelo murino agudo para la enfermedad de Chagas. Además, los gráficos que presenta la **Figura 23**, para el caso de la molécula **2+Bnz** indican dosis en las cuales la combinación tiene efectos antagónicos (a dosis altas del **Bnz** y bajas dosis del compuesto **2**) y sinérgicas siendo la mejor ensayada a  $\frac{1}{4}$  de sus respectivos  $CI_{50}$ .

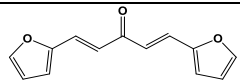
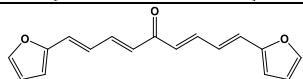
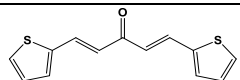
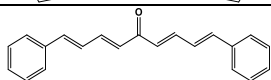
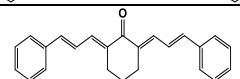
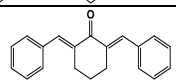
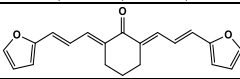
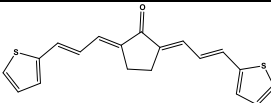
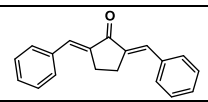
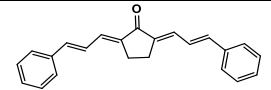
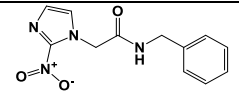
### 6.2.3. *Actividad de los compuestos en la forma tripomastigote de T. cruzi.*

Se ensayaron los compuestos con mejor acción tripanosomicida y selectividad en la forma epimastigote contra la forma tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, en una placa de 96 pocillos de fondo plano. El ensayo se detuvo a las 24 horas. Como se muestra en la **Tabla 6**, los compuestos con mejor acción citotóxica ante esta forma del parásito fueron **3, 5, 7 y 16** con  $CI_{50}$  menor a 25  $\mu$ M. Otros compuestos con acción moderada provocan aproximadamente el 50 % de la muerte del parásito en ese estadio a 25  $\mu$ M: **1, 2, 6, 11, 17 y 18**.

Se pudo observar la variabilidad de la actividad citotóxica entre los diferentes estadios del parásito, como en otros trabajos anteriores de nuestro grupo con la serie de donde deriva el compuesto **LIDERII**, **Prototipo I** y el **Prototipo II**. En dichos trabajos también se observa una correlación positiva entre el efecto en la forma epimastigote y la forma amastigote, donde la actividad era más fuerte en la forma amastigote<sup>91 97</sup>. Por lo anterior mencionado es que en la presente tesis no se hicieron estudios en la forma amastigote, la forma relevante intracelular, porque consideramos que el comportamiento de estos compuestos será similar a los antes mencionados y por ende la actividad en la forma epimastigote representará la actividad en la forma amastigote. Sin embargo, en la forma tripomastigote, observamos una gran variabilidad en el efecto citotóxico. La forma tripomastigote es el estadio que más se diferencia desde el punto de vista metabólico y biológico con las otras dos formas del parásito, ya que éste es incapaz de reproducirse y además el metabolismo es exacerbado a la producción de energía, para el movimiento y la invasión de nuevas células. También lo encontramos en la sangre donde el fármaco libre para actuar es difícil de tenerlo disponible, dado el carácter liposoluble de la mayoría de los compuestos. De todas formas, el efecto citotóxico mantuvo una cierta relación en el compuesto **16**, el más potente en la forma epimastigote con un  $CI_{50}$  de 40 nM. También hay que considerar, que el efecto citotóxico es a las 24 vs 120 horas en la forma epimastigote. Dado los

resultados anteriores, para los compuestos más relevantes se decide realizar el test de mutagenicidad (test de Ames)

**Tabla 6.** Actividad citotóxica de los compuestos más relevantes ante la forma tripomastigote de *T. cruzi*.

Compuesto	Estructura	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	% a 25 μM <sup>b</sup>
1		-	53
2		-	50
3		7.2±1.2	-
5		8.2±0.5	-
6		-	52
7		6±1	-
11		-	52
16		7.2±1.6	-
17		-	52
18		-	50
<b>Bnz</b>			50

a-Valores de CI<sub>50</sub> contra la forma tripomastigote; los resultados representan la media ± la desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicados. b- Porcentaje de inhibición a 25 μM medido a las 24 h.

#### 6.2.4. Test de mutagenicidad (Test de Ames).

Dado que los fármacos antichagásicos de referencia, **Nfx** y **Bnz**, son mutagénicos<sup>19</sup> y que la ausencia de mutagenicidad es una de las primeras cribas que debe superar un agente para poder continuar con el *pipeline* de los estudios pre-clínicos (según se recomienda en las guías de estudios preclínicos para el desarrollo de fármacos), se decide realizar este estudio para los derivados más prometedores.

Para ello, se realizaron estudios de mutagenicidad *in vitro* mediante test de Ames<sup>105</sup>. En este ensayo, con diferentes cepas de *S. typhimurium* (hisD3052, dependiente de histidina), un compuesto se considera mutagénico cuando el número de colonias revertientes (mutadas) duplica el número de colonias naturalmente revertientes (control negativo) al menos en dos niveles de dosis consecutivas y además hay un

efecto dosis-respuesta. Además, para tener en cuenta el potencial mutagénico de metabolitos de estos compuestos, debido a la metabolización hepática, se debe realizar el ensayo en presencia de fracción S9 de hepatocitos de rata.

Desde el trabajo previo en la tesis de grado, se ha investigado la mutagenicidad de estos compuestos, resultando el compuesto **2**, no mutagénico en presencia y ausencia de la fracción S9. Se continuó con estos estudios para los compuestos con mejor acción tripanosomicida y selectividad, resultando en su mayoría no mutagénicos como muestra la **Tabla 7**, teniendo estos ensayos completos para todas las cepas de *S. thyphimurium* según recomendaciones de las agencias reguladoras de fármacos.

**Tabla 7.** Test de Ames utilizando las cepas de *S. thyphimurium* para los compuestos más relevantes (los resultados de observan en la **Tabla A1** de Anexos).

Compuesto	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
<b>1</b>	Mutagénico				
<b>5</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>6</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>8</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>10</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>11</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>12</b>	Mutagénico				
<b>13</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>15</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>16</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>17</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico
<b>18</b>	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico	No Mutagénico

Cómo se puede observar en la **Tabla 7**, la mayoría de estos compuestos no son mutagénicos a excepción del compuesto **1** y **12**. Estos resultados realizados con el Test de Ames ubica a estos compuestos como potenciales fármacos para la enfermedad de Chagas. Dado que los compuestos más relevantes en cuanto a su acción tripanosomicida, selectividad y mutagenicidad son el **11** y **16**, se realiza el Test de Ames en la cepa TA98 en presencia de S9, siendo no mutagénicos también (**Tabla A2** de anexos).

#### 6.2.5. Toxicidad aguda (ensayo de up and down) in vivo.

Luego de verificada la baja toxicidad *in vitro* y la potente actividad tripanosomicida de las moléculas, y siguiendo con los pasos de desarrollo preclínico de medicamentos, se ensayó la toxicidad oral aguda *in vivo* de las mismas. Para el estudio, los compuestos se administraron en forma oral en la misma microemulsión que se utilizó en el estudio farmacológico sobre el modelo agudo de la enfermedad de Chagas. Para el estudio, se siguieron las guías de la OECD (Test Guideline 423), en las cuales se recomienda el uso del programa estadístico AOT 425 StatPgm, el cual calcula mediante el registro de dosis – respuesta el índice de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) permitiendo el uso de un número reducido de animales (**Tabla 8**), cumpliendo así con el principio de las “3R”<sup>138</sup>

139

Para el compuesto **2**, se comenzó administrando por vía oral una dosis de 550 mg/kg y luego se aumentó a una dosis máxima de 2000 mg/kg hasta que cumplió uno de los criterios de finalización del ensayo. En este caso, los 3 ratones administrados con la dosis máxima, vivieron luego de las 48 horas de la administración. Al evaluarse la toxicidad del producto a los 14 días, el segundo de los ratones administrado con la dosis máxima murió a los 10 días post-administración. El DL<sub>50</sub> calculado por el programa estadístico es 2000 mg/kg, siendo esta dosis la dosis límite, es decir, el compuesto **2** presenta baja toxicidad aguda en las condiciones del ensayo trabajadas. Para el compuesto **11**, se comenzó administrando vía oral una dosis máxima de 2000 mg/kg hasta que se cumplió uno de los criterios de finalización del ensayo. En este caso, los 5 ratones administrados con la dosis máxima, vivieron luego de las 48 horas de la administración. Se evaluó la toxicidad del producto durante 14 días. El DL<sub>50</sub> calculado por el programa estadístico es mayor 2000 mg/kg, siendo esta dosis la dosis límite, es decir, el compuesto **11** presenta también baja toxicidad aguda en las condiciones del ensayo. Lo mismo sucede con el compuesto **16**. Al igual que para el compuesto **2**, a lo largo del ensayo, durante los 14 días, los ratones fueron evaluados mediante el test de Irwin<sup>140</sup> y las masas de los mismos fueron registradas. Se observa que para el compuesto **2**, **11** y **16** no presentaron signos de toxicidad aguda en el modelo utilizado en las condiciones trabajadas. El compuesto **27** también fue evaluado en las mismas condiciones y se obtuvo un valor de DL<sub>50</sub> mayor a 2000 mg/kg.

<sup>138</sup> Development, T. O. f. E. C.-o. a. Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **2001**.

<sup>139</sup> Sterling, S., and Rispin, A. Incorporating the 3Rs into regulatory scientific practices, ILAR J 43 Suppl, **2002**, S18-20

<sup>140</sup> Roux, S., Sablé, E., Porsolt, R. D. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Current. Protoc. Pharmacol.*, **2005**, Chapter 10, Unit 10.10.

6.2.6. *Estudio de clastogenicidad -Test de micronúcleos en la médula ósea de ratón.*

En este estudio se administraron los compuestos en los mismos vehículos que en el ensayo anterior a una dosis de 150 mg/kg vía oral a las 24 horas antes del sacrificio y otra dosis a las 48 horas antes del sacrificio, salvo la ciclofosfamida que se administró en única dosis, 24 horas antes del sacrificio. Al final del experimento se retiran los fémures y se remueve la médula ósea roja. Se analizan en microscopio óptico de inmersión y se cuentan 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) por animal tratado, incluyendo los que presentaron micronúcleos (EPCMNs). También se evaluó la relación de EPC versus los eritrocitos normocromáticos (ENC), en 100 células. La proporción de EPCMNs fue calculada para cada grupo y los grupos de tratamiento con el compuesto y ciclofosfamida se comparan con el grupo control negativo.

**Tabla 8.** Estudio de clastogenicidad: evaluación de micronúcleos. Se muestra la media de micronúcleos por ratón y la correspondiente DL<sub>50</sub> luego de la administración de los compuestos **2**, **11**, **16** y **27** a 150 mg/Kg de ratón.

Tratamiento*	Número de EPCMN**	Media de Mn/ ratón ± DE <sup>+</sup>	DL <sub>50</sub> mg/kg
Control	19	4±1	-
<b>2</b>	20	4±1	=2000
<b>11</b>	30	6±2	>2000
<b>16</b>	26	5±1	>2000
<b>27</b>	24	5±1	>2000
Ciclofosfamida	180	36±2	-

\*Se realizan 5 ensayos idénticos en momentos independientes, \*\*Sumatoria de los eritrocitos policromáticos micronucleados encontrados en los 5 ensayos, <sup>+</sup>Porcentaje de eritrocitos policromáticos micronucleados ± desviación estándar.

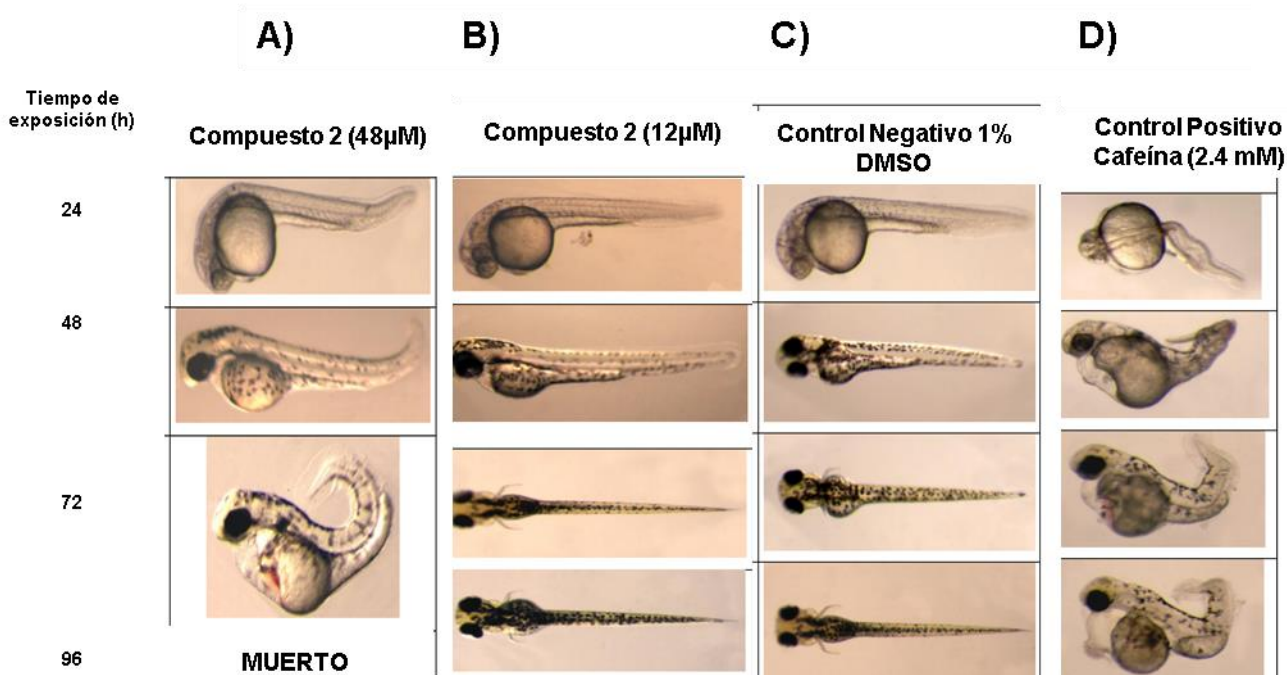
En la **Tabla 8** se observa que el número de células aberrantes en el tratamiento con los compuestos son similares al control negativo y significativamente menor en comparación con el control positivo, donde se encontraron 180 eritrocitos policromáticos micronucleados. Se puede concluir, entonces, que los compuestos evaluados no presentan genotoxicidad.

### 6.2.7. Estudios de teratogenicidad para los compuestos líderes.

Para el estudio de la toxicidad de los compuestos **2** y **11** en embriones, se realizó el *test de Toxicidad de Embriones de Peces* (FET, por sus siglas en inglés) recomendado en la guía OECD (Test Guideline 236). En este ensayo los embriones en etapas tempranas de desarrollo se tratan con los compuestos en estudio y se observó el comportamiento dosis-respuesta de los mismos durante 96 horas de exposición. Para el caso del compuesto **2**, se trabajó con 5 dosis seriadas (3, 6, 12, 24 y 48  $\mu\text{M}$ , **Figura 24**). Se utilizaron 16 embriones por dosis y, además, para poder validar el ensayo se utilizó un control negativo y un control positivo. Como control negativo se utilizó DMSO al 1 % ya que éste se utiliza como disolvente del compuesto a iguales concentraciones (concentración no tóxica para los embriones). Como control positivo se utilizó cafeína 2.4 mM. La cafeína fue utilizada como control positivo dado que en un trabajo previo del grupo se estableció que presentaba toxicidad importante a esa concentración <sup>112</sup>. Los ensayos validados son aquellos que presentan una letalidad menor a 20 % en el control negativo y mayor a 30 % en el control positivo (**Figura 23**).

Durante el experimento se evalúa diariamente el estado de los embriones y se califican como positivos (efectos teratogénicos) aquellos embriones que presentaron al menos alguna de las siguientes características: coagulación del embrión, falta de latido cardíaco, disminución de la frecuencia cardíaca, falta de formación de somites y anomalías en la cola (curvatura de la misma). Además, se registraron otro tipo de anomalías como algunas malformaciones que puedan dar indicios de efectos teratogénicos. Para el cálculo de la concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) se graficaron los % de positivos en función de las concentraciones del compuesto hasta las 96 horas. Se ajustaron a una curva sigmoidea y se extrapoló el valor de la dosis en la cual el porcentaje de positivos es 50 %, el cual corresponde al  $\text{CL}_{50}$ .

El valor de  $\text{CL}_{50}$  calculado para el compuesto **2** en un período de exposición de 96 horas de un embrión en desarrollo temprano, fue de 22  $\mu\text{M}$  el cual es 4 veces más alta que el  $\text{CI}_{50}$  en la forma epimastigote de *T. cruzi* <sup>96</sup>.

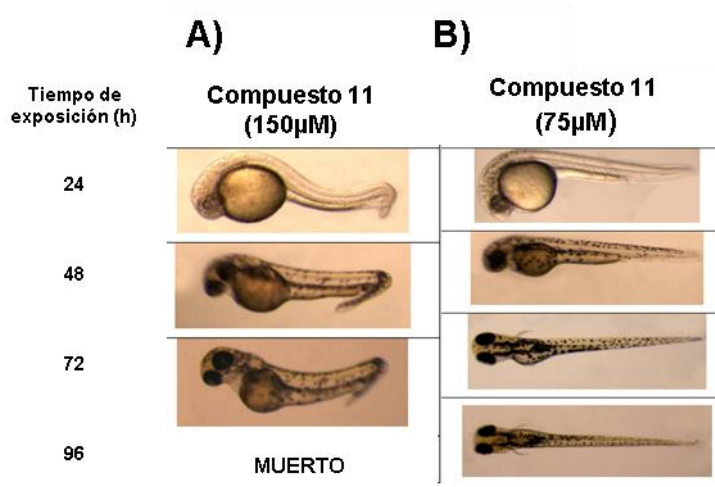


**Figura 24.** Estudio de Teratogenicidad del compuesto **2**. A) Embrión de pez cebra tratado con el compuesto **2** a 48 µM. Se observa que a las 24 horas el embrión presente una leve curvatura en la cola que se va acentuando a medida que transcurre el tiempo. A las 72 horas se observa una curvatura dorsal acentuada de la cola. A las 96 horas el embrión muere. B) Embrión de pez cebra tratado con el compuesto **2** a 12 µM. Durante las 96 horas se observa un desarrollo normal del embrión. C) Se utiliza como control negativo DMSO al 1 %. D) Se utiliza como control positivo cafeína a una concentración de 2.4 mM. Figura extraída y modificada de la referencia <sup>96</sup>

Para el compuesto **11**, en primer lugar, se realizó un ensayo piloto, en el cual se probó el compuesto a concentraciones 3, 6, 12, 24 y 48 µM, utilizando como referencia los experimentos realizados con el compuesto **2**. En este primer ensayo no se observó letalidad ni siquiera en las concentraciones más altas si bien sí se observó en el control positivo, por lo cual se procedió a realizarlo con una nueva serie de dosis: 50, 75, 100, 150 y 200 µM. A las concentraciones de 150 y 200 µM se observó una letalidad del 100 % de los embriones, por lo cual se terminó ajustando el rango de dosis a ensayar a 50, 75, 100, 125 y 150 µM (**Figura 25**).



Una vez ajustado el rango de dosis, el ensayo se repitió hasta obtener 3 ensayos validados. El valor del  $CL_{50}$  calculado para el compuesto **11** en un período de exposición de 96 horas de un embrión en desarrollo temprano, es de  $100 \mu\text{M}$  una dosis 167 veces a la  $Cl_{50}$  en el parásito ( $Cl_{50} = 0.6 \mu\text{M}$ )<sup>104</sup>. Además, se debe considerar el factor de bioconcentración que nuestro grupo ha demostrado que existe en este tipo de ensayos donde el medio es acuoso y las moléculas liposolubles se concentran en el embrión, provocando una exacerbación de los efectos tóxicos<sup>141</sup>.



**Figura 25.** Estudio de teratogenicidad para el compuesto **11**. A) Muestra los embriones tratados con el compuesto **11** a una concentración de  $150 \mu\text{M}$ ; se puede observar que a las 24 horas el pez observa una leve curvatura en la cola que se va acentuando a lo largo de su desarrollo y culmina a las 96 horas con la muerte del mismo. B) Se trata a los embriones con  $75 \mu\text{M}$  del compuesto **11**, donde se observa un desarrollo normal del embrión. Los controles son los mismos que se muestran en la **Figura 24**. Figura extraída y modificada de la referencia<sup>96</sup>.

<sup>141</sup> Álvarez, G., Perdomo, C., Coronel, C., Aguilera, E., Varela, J., Aparicio, G., Zolessi R., F., Cabrera, N., Vega, C., Rolón, M., Tojas de Arias, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., González, M. Multi-Anti-Parasitic Activity of Arylidene Ketones and Thiazolidene Hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. **2017**, *Molecules*.; 22:709-735.

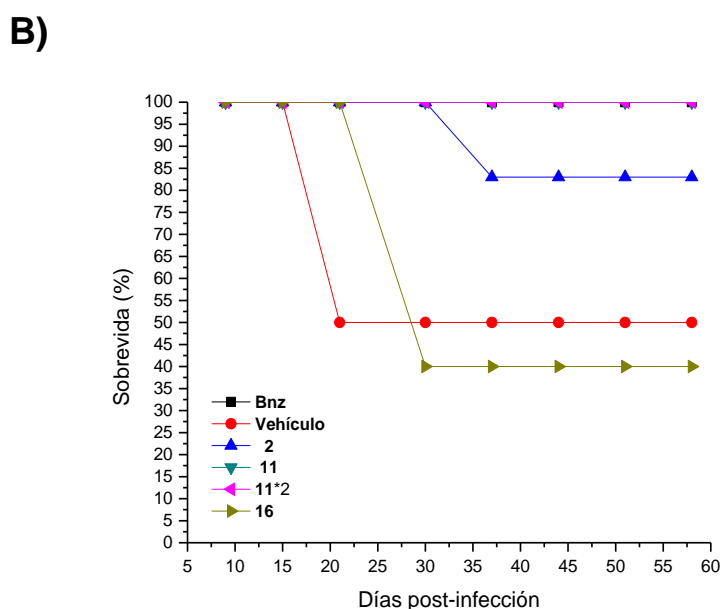
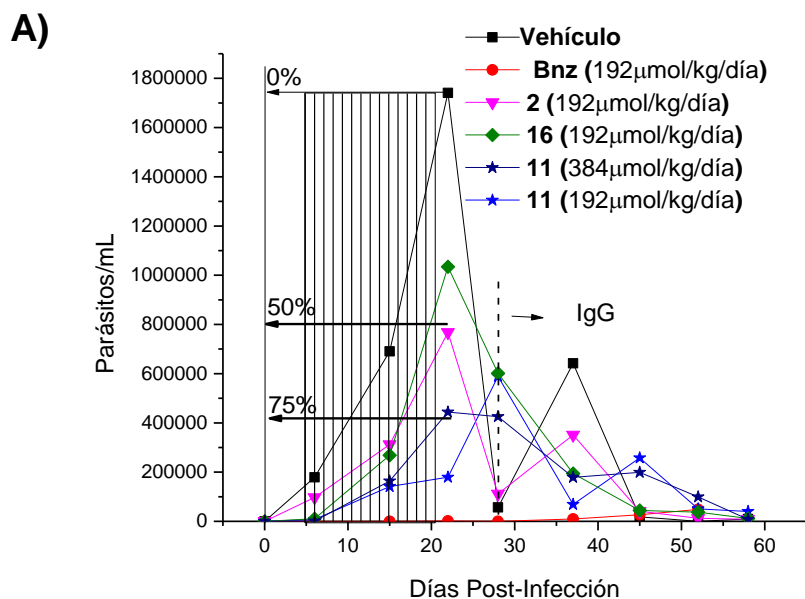
#### 6.2.8. *Modelo murino agudo para la Enfermedad de Chagas.*

Debido a los prometedores resultados obtenidos *in vitro* y de baja toxicidad de los compuestos **2**, **11**, **16** y **27** es que se decidió continuar avanzando hacia más ensayos preclínicos y esta etapa de prueba de concepto *in vivo*.

Por este motivo es que se decidió estudiar a los compuestos en monoterapia para conocer el efecto de estos en animales infectados con *T. cruzi*. Esto se realizó a través del estudio de la evolución de la parasitemia de los animales infectados, simulando la etapa aguda de la enfermedad de Chagas. Se utilizó **Bnz** como fármaco de referencia. Para optimizar la administración oral, se seleccionó una microemulsión como vehículo que previamente demostró buen comportamiento con compuestos como el **LIDER II**<sup>97</sup>. Para este experimento, ocho ratones BALB/c machos (por grupo), infectados con el clon CL Brener, DTU Tc VI, fueron tratados por vía oral (cánula intragástrica) durante 15 días con los compuestos **2**, **11** y **16** a 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día (se utilizó la dosis óptima previamente establecida para el **LIDERII**<sup>97</sup>). Dado que el compuesto **11** fue el mejor inhibidor de la triosafosfato isomerasa del parásito, con bajos efectos tóxicos y no mutagénicos asociados al mismo, se decidió evaluarlo también a una dosis de 384  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día. Se administró **Bnz** como control en idénticas condiciones, 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día durante 15 días. El curso de la infección se monitoreó en los ratones infectados contando parásitos sanguíneos cada 7 días y la supervivencia de los animales, esto fue seguido durante 60 días después de la infección.

El compuesto **2** condujo a una disminución significativa de la parasitemia (más del 50 % en el pico máximo de parasitemia al día 22 post-infección y en el segundo pico al día 37, **Figura 26 A**) y al final del ensayo existe un 83 % de supervivencia de los ratones tratados (versus 50 % para animales no tratados en el mismo ensayo, **Figura 26 B**).

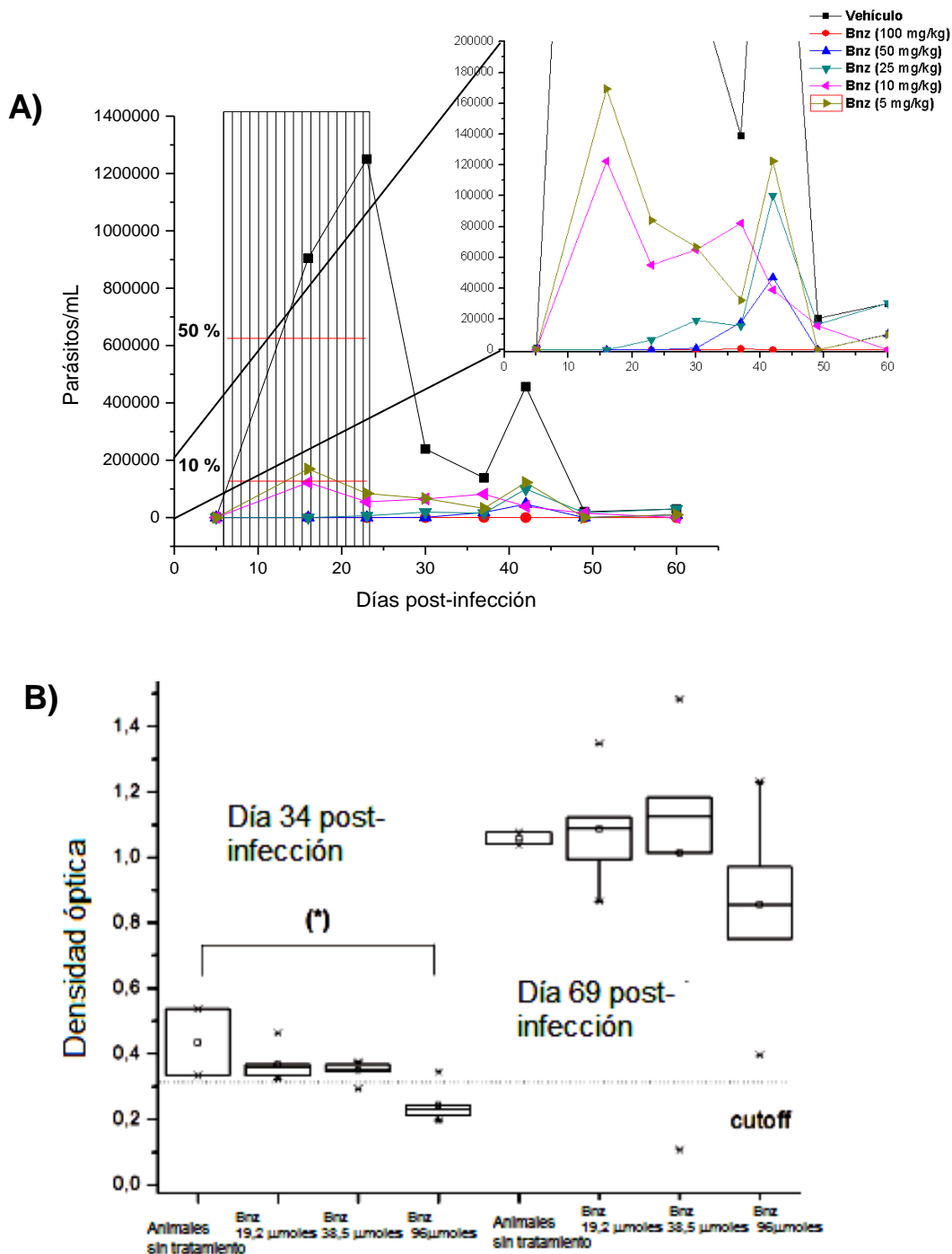
El compuesto **11** en las dos dosis analizadas mostró una disminución significativa del nivel de parasitemia, pero no se observó un comportamiento dosis –respuesta. El mismo administrado a 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día durante 15 días, fue capaz de promover un corrimiento de los picos máximos de parasitemia, del día 21 al 28, y del día 38 al 45. Además, los animales tuvieron una supervivencia en los ensayos a ambas dosis del 100 %.



**Figura 26.** Estudio *in vivo* de los compuestos **2**, **11** y **16** (a una dosis de 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día, a excepción del compuesto **11** que se administra además a 384  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día que se representa en la figura como **11\*2** en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas. **A)** Se compara la curva de la parasitemia de los animales tratados con los animales no tratados (se le administra solo el vehículo a los mismos y se utiliza como control). La zona sombreada de la imagen corresponde con la administración de los compuestos (15 días). La línea vertical punteada corresponde con la activación del sistema inmune de los animales infectados que se visualiza en la gráfica por la producción de IgG (aproximadamente a los 30 días). El porcentaje se determina por el decrecimiento respecto al pico máximo de parasitemia de los animales no tratados. **B)** Sobrevida de los ratones tratados con **2**, **11** y **16**.

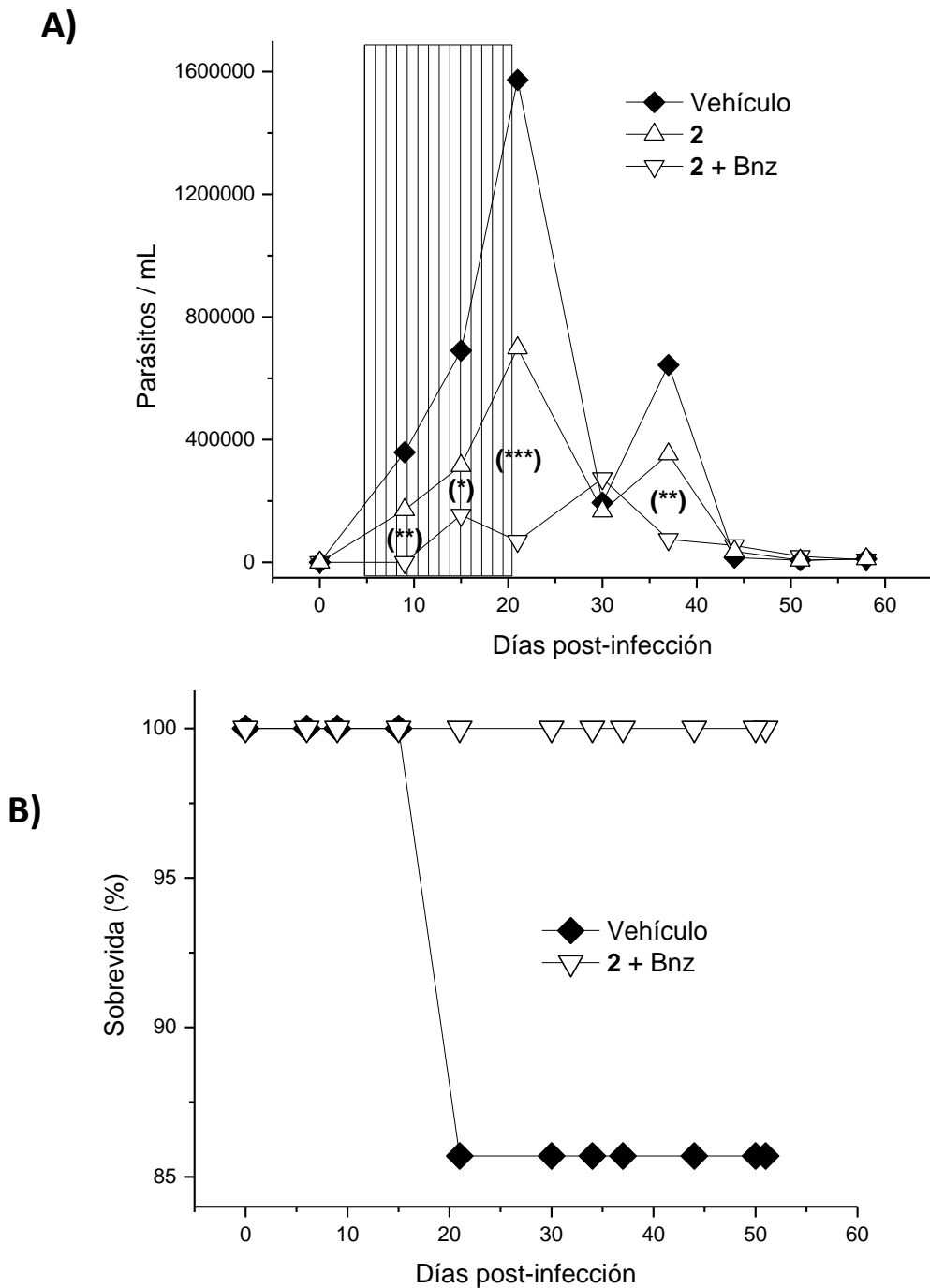
El compuesto **16** mostró efecto tóxico en este ensayo, la sobrevida de los animales para este compuesto fue del 40 % de los animales infectados (**Figura 26 B**). Esto va en contraste con el índice de selectividad *in vitro* mostrado en la **Tabla 3** y el estudio de toxicidad aguda *in vivo*.

Estos datos prometedores, impulsaron a seguir estudiando la combinación de estos compuestos entre sí y con el fármaco de referencia, **Bnz**, para estudiar si mejora la actividad anti-parasitaria en el modelo *in vivo*. Se propone disminuir la dosis del **Bnz** y aumentar la dosis de estas moléculas ya que las mismas no son tóxicas ni mutagénicas a las dosis efectivas, lo que sí se observó con los fármacos actuales disponibles para esta enfermedad. Para esto se estudió la dosis-respuesta de **Bnz** (384 µmol/kg de peso corporal/día; 192 µmol/kg de peso corporal/día; 96 µmol/kg de peso corporal/día; 38,5 µmol/kg de peso corporal/día; 19,2 µmol/kg de peso corporal/día). Como se observa en la **Figura 27**, el **Bnz** es efectivo, incluso aún a dosis muy bajas. El porcentaje de sobrevida en estos ensayos fue de 100 % para los animales tratados y los no tratados. Se decidió trabajar a partir de estos resultados y con las combinaciones *in vivo* de las mejores combinaciones obtenidas a partir de los ensayos *in vitro*, en la forma epimastigote de *T. cruzi*. Para esto se trabajó con la combinación de **2+Bnz**, **2+16**, **2+11** y **LIDERII+16**.

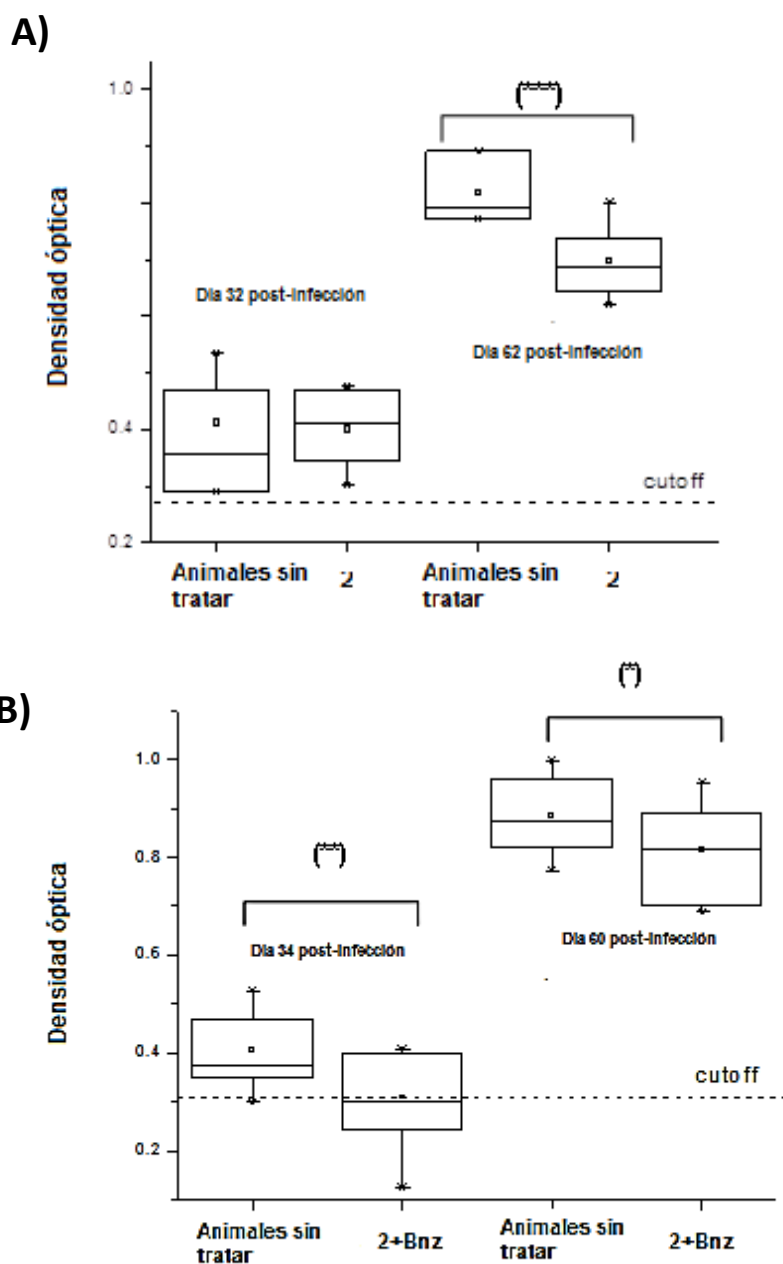


**Figura 27.** Curva dosis-respuesta de **Bnz** evaluado a diferentes dosis en el modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas. **A)** Curva de parasitemia de los animales infectados tratados con **Bnz (100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg, 10 mg/kg, 5 mg/kg, 0 mg/Kg)** (dosis equivalente en moles: 384  $\mu\text{mol/kg/día}$ ; 192  $\mu\text{mol/kg/día}$ ; 96  $\mu\text{mol/kg/día}$ ; 38,5  $\mu\text{mol/kg/día}$ ; 19,2  $\mu\text{mol/kg/día}$  respectivamente) y los no tratados. También arriba a la derecha se muestra la misma curva con aumento entre 0-20000 p/mL. **B)** Niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* para los diferentes tratamientos. La línea de corte (cutoff) corresponde a los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* de animales sanos (n=3). Las diferencias significativas fueron evaluadas en relación con el grupo control por el test-Student: (\*)  $p < 0,03$ .

Dado que la combinación de **2+Bnz** tiene un FICI= 0.5 *in vitro* (en la forma epimastigote de *T. cruzi*) se decidió bajar la dosis de **Bnz** con respecto al compuesto **2** para el estudio *in vivo*, ya que como se mencionó antes este fármaco de referencia presenta muchos efectos secundarios en las personas que lo utilizan, presentando además efectos mutagénicos. Por lo que se incorporó el **Bnz** en la combinación a una dosis de 38.5 µmol/kg de peso corporal/día. La dosis de **Bnz** también fue elegida a partir de los datos de serología, dado que los niveles de anticuerpos anti- *T. cruzi* no se ven modificados significativamente frente a los animales no tratados (ver **Figura 27B**). Un FICI de 0.5 de la combinación, sugiere que *in vitro* se requiere un cuarto de su valor para que se llegue al mismo efecto, por lo tanto, se decidió mantener la dosis del compuesto **2** que provocó una disminución de la parasitemia de aproximadamente un 50 % y reducir un cuarto la dosis de **Bnz**. Como se puede visualizar en la gráfica (**Figura 28 A**), la adición de esta pequeña proporción de **Bnz**, provocó que el perfil de la parasitemia se reduzca significativamente en los días 9, 15, 21 y 37 en comparación con la administración del compuesto **2** en monoterapia. Además, el perfil de supervivencia de los ratones fue mejor (100 % de supervivencia) que para el compuesto **2** (83 % de supervivencia) y los animales no tratados (85 % de supervivencia) (**Figura 28 B**). A su vez en los ensayos serológicos, se observó que la combinación de **2+Bnz** fue capaz de disminuir los anticuerpos anti-*T. cruzi*, respecto a los animales no tratados, (desde el día 34 como lo indica la **Figura 28 B**). Entonces en la cuantificación de estos anticuerpos se observó que estos decrecen significativamente cuando se administran los compuestos **2** y **Bnz** en combinación respecto al compuesto **2** y el **Bnz** en monoterapia.



**Figura 28.** Estudios *in vivo* de la combinación del compuesto **2** y **Bnz**. **A)** Parasitemia de los ratones tratados con 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día del compuesto **2** y la combinación de **2+Bnz** a una dosis de 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día+38.5  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día de **Bnz**. La zona sombreada de la imagen corresponde con la administración de los compuestos (15 días). **B)** Sobrevida de los ratones tratados con la combinación de **2+Bnz** a una dosis de 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día+38.5  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día de **Bnz**. Los distintos tratamientos fueron significativamente diferentes según el test de Student's ((\*\*\*)  $p < 0.03$ , (\*\*)  $p < 0.05$ , (\*)  $p < 0.06$ ).



**Figura 29.** Niveles de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en sangre en diferentes tratamientos. **A)** Compuesto **2** ensayado a una dosis de 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día y animales sin tratamiento. **B)** Combinación de **2+Bnz** (192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día+38.5  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día) y animales sin tratamiento. Cutoffs o las líneas punteadas corresponde al nivel de anticuerpos para animales sanos (n=3). Los tratamientos de los diferentes grupos fueron significativamente diferentes según test de Student's ((\*\*\*)  $p < 0.06$ , (\*\*)  $< 0.10$ , (\*)  $p < 0.20$ ).



En la búsqueda de encontrar combinaciones selectivas y efectivas, teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro* para selectividad, mutagenicidad y actividad tripanosomicida se selecciona la combinación **2 + 16** (FICI = 0.5). El compuesto **16**, fue el más activo *in vitro* en la forma epimastigote de *T. cruzi*, y además mostrando una baja toxicidad oral aguda *in vivo*, sin embargo, la baja sobrevivencia de los ratones en el tratamiento a 192 µmol/kg de peso corporal/día en el modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas, indica que en condición de infección o las múltiples dosis de 192 µmol/kg, pueden ser tóxicas. Teniendo en cuenta esto último es que se decidió trabajar con el compuesto **16**, en combinación siempre a dosis más bajas que la antes ensayada. Para la elección de la dosis se tuvo en cuenta la relación molar entre los dos compuestos según lo indica la **Tabla 5**. La relación molar para esta combinación establece que la relación óptima entre ambos compuestos es: cada 125 mol del compuesto **2** se debe usar 1 mol del compuesto **16** (dicha relación se concluye a partir de los  $CI_{50}$  de cada uno de los compuestos). Por lo tanto, se preparó una microemulsión de **2+16** a una dosis de 192 µmol/kg de peso corporal/día del compuesto **2** más una dosis de 1.5 µmol/kg de peso corporal/día de **16**. También se decidió trabajar con el compuesto **2+LIDERII** dado el valor de su FICI= 0.75, teniendo en cuenta además la relación molar a partir de su  $CI_{50}$  que establece que cada mol del compuesto **2** necesita aproximadamente un mol del **LIDERII**. Sin embargo, para reducir el uso de animales, dado que los resultados para el **LIDERII** en monoterapia ya fueron reportados para una dosis de 102 µmoles/kg de peso corporal/día<sup>97</sup>, se preparó en una microemulsión, una combinación de compuestos que contiene 192 µmoles/kg de peso corporal/día del compuesto **2** y 102 µmoles/kg de peso corporal de ratón/día del **LIDERII**, es decir una relación 1.9 / 1 en vez de la óptima de 1/1.2.

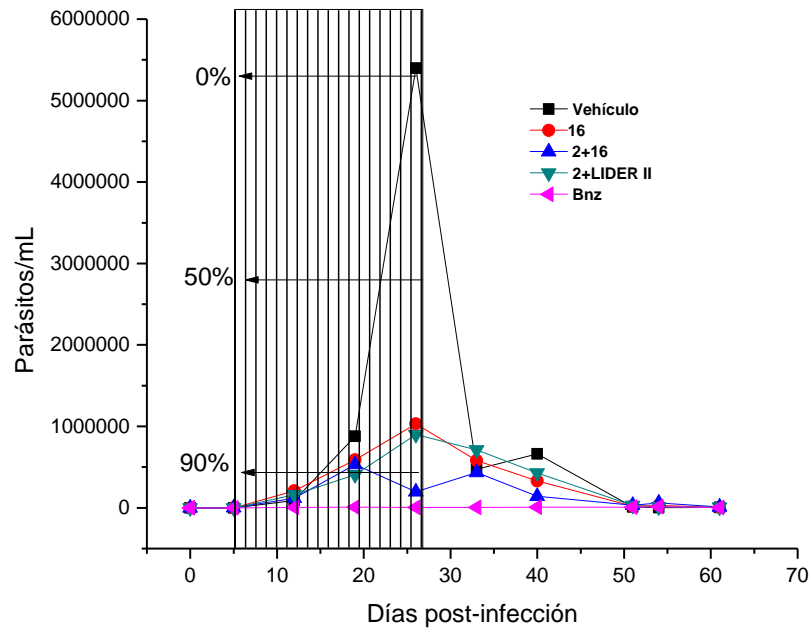
Los resultados de estos estudios se muestran en la **Figura 30 A**. Por un lado, el estudio del compuesto **16** en monoterapia a una dosis de 1.5 µmoles/kg de peso corporal de ratón/día disminuyó el pico de parasitemia aproximadamente en un 82 % respecto a la dosis anterior ensayada de 192 µmoles/kg de peso corporal/día que disminuía la parasitemia aproximadamente un 41 % respecto del pico máximo (pero con efectos tóxicos). Por lo tanto, se logró mejorar la acción tripanosomicida *in vivo* del compuesto **16** a bajas dosis con una sobrevivencia de 100% (en la dosis de 192 µmoles/kg de peso corporal/día se obtuvo únicamente una sobrevivencia del 40 %). Estos resultados podrían estar indicando que al disminuir la dosis disminuyen los efectos tóxicos inespecíficos sobre los animales.

Por otro lado, la combinación **2+16** fue más activa que los compuestos administrados en monoterapia (el compuesto **2** disminuye en un 50 % el pico de parasitemia, a la misma dosis, mientras que el compuesto **16** lo disminuye un 83 %), ya que disminuye

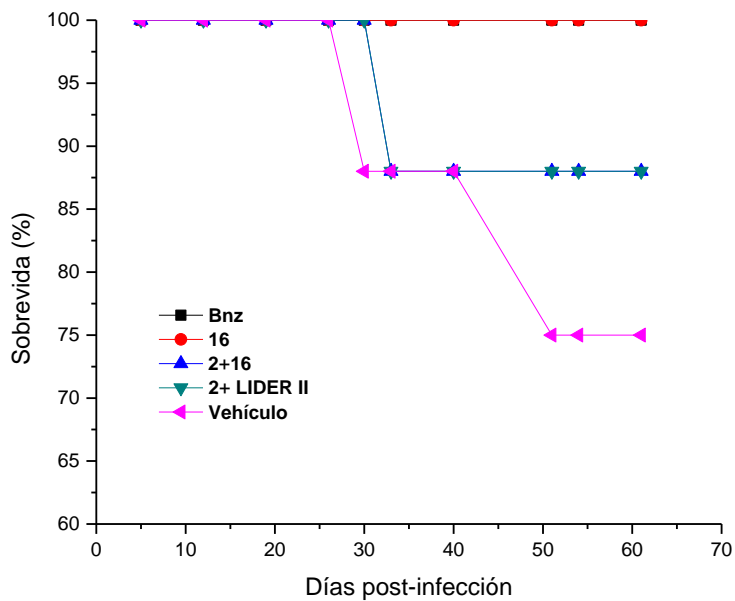
el pico de parasitemia en un 90 %, aboliendo, además, los dos máximos de parasitemia. A pesar de los excelentes resultados en cuanto a la parasitemia, la sobrevivencia de los ratones fue menor que para el compuesto **16** a esa dosis ya que sobrevivieron un 88 % de los ratones, de todas formas, este porcentaje fue mayor a los animales sin tratar (un 75 % de los animales que no recibieron tratamiento sobrevivieron) lo que se refleja en la **Figura 30 B**.

En monoterapia el **LIDERII** disminuyó el pico de la parasitemia en un 77 % y el compuesto **2** en un 50 % con una sobrevivencia de 100 % y 83 % respectivamente. Sin embargo, la combinación como se observa en la **Figura 30 A** disminuyó la parasitemia aproximadamente un 80%, manteniendo la sobrevivencia de los animales en un 88 % (**Figura 30 B**). Esta combinación no demostró mejoras considerables a la monoterapia en la proporción ensayada, que no fue la óptima. En este sentido otros ensayos *in vivo* en los cuales no se utilizó la proporción óptima identificada en el estudio *in vitro* dieron resultados similares insatisfactorios.

**A)**



**B)**



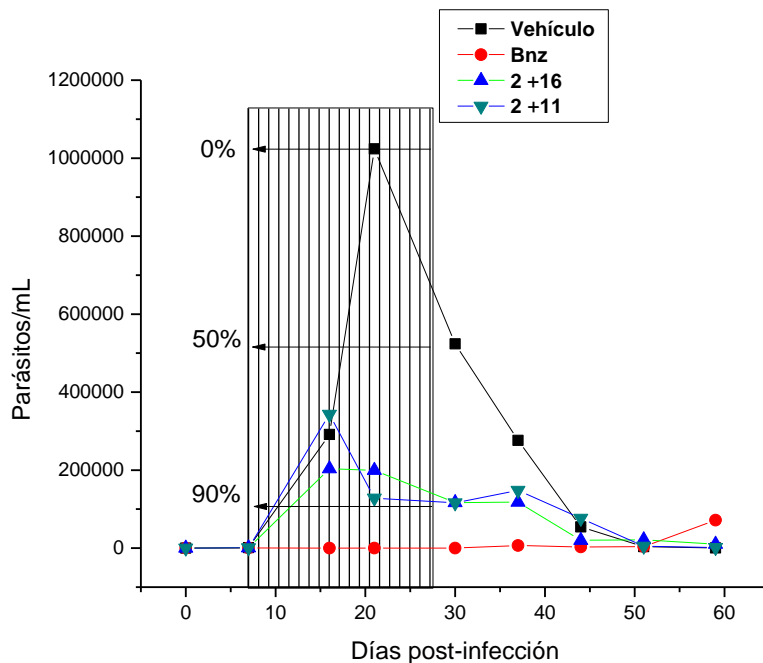
**Figura 30.** Estudios *in vivo* de la combinación con el compuesto **16** en monoterapia y ensayada en combinación **2+16** y la combinación **2+LIDERII**. **A)** Parasitemia de los ratones tratados con 1.5  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día del compuesto **16**; la combinación de **2+16** a una dosis de 192  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día + 1.5  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día; y la combinación de **2+LIDERII** ensayada a una dosis de 192  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día + 102  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día. **B)** Sobrevida de los ratones de los diferentes tratamientos mostrados en la parte A.

Dado los excelentes resultados obtenidos hasta el momento de las diferentes combinaciones en cuanto a los perfiles de parasitemia, conociendo que en la mayoría de los casos (a excepción del compuesto **16** en monoterapia a una dosis de 192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día) mejora o mantiene igual la sobrevivencia de los ratones, se decidió abarcar todas las combinaciones que dieron sinergismo *in vitro*. Por lo tanto, por último, se estudió el efecto que tiene la combinación *in vivo* para los compuestos **2+11**. Además, en el caso de la combinación **2+16** (dado sus excelentes resultados), se decidió aumentar la dosis de ambos compuestos para mejorar el efecto tripanosomicida. Por lo tanto, manteniendo la relación molar entre ambos compuestos (como es el caso de todas las combinaciones), se decidió investigar distintas dosis (en este caso aumentarlas). Para la combinación de **2+16** se trabajó en este caso a una concentración de 282  $\mu\text{mol/kg}$  de **2** y 2.2  $\mu\text{mol/kg}$  de **16**. Como se observó, se aumenta aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de sus dosis.

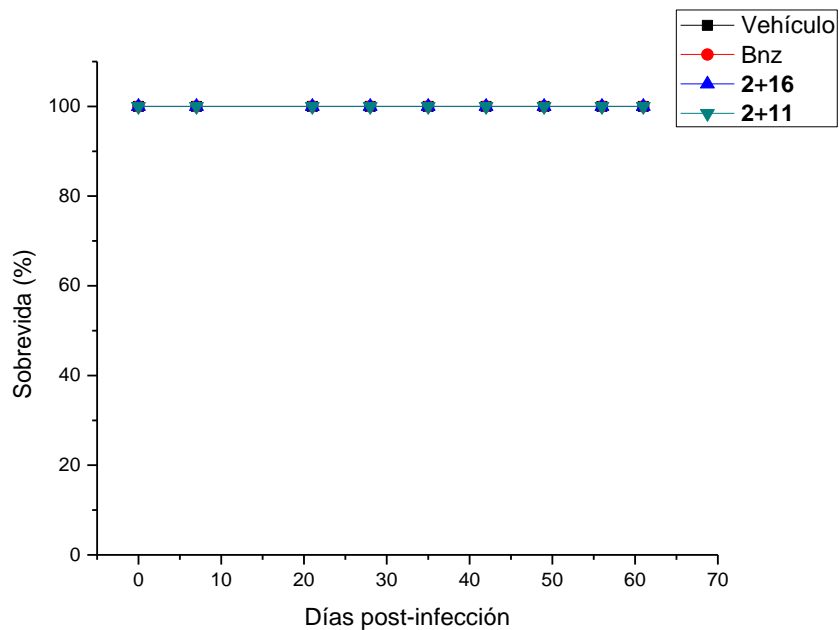
Para la combinación **2+11**, ambos compuestos a pesar de inhibir a la TIM de forma selectiva en el parásito, el **11** es el mejor inhibidor de la TIM descrito hasta el momento, siendo el **2** un posible inhibidor de la CYP51. Para esta combinación se trabajó inicialmente a una dosis mayor del compuesto **2** a la ensayada anteriormente (282  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día y 17  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día), esto se debe a que la toxicidad es baja a esta dosis según el  $\text{DL}_{50}$  de este compuesto.

En el primer pico de parasitemia para la combinación de **2+11** se observa que el mismo aparece antes del día 20 (**Figura 31 A**) y disminuyó la parasitemia aproximadamente un 67 % respecto a los animales no tratados. Cuando se analiza la combinación **2+16** (282  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día + 2.2  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día), al aumentar la dosis de ambos compuestos, no se observó una relación dosis respuesta, ya que no disminuyó la parasitemia respecto a la otra combinación (192  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día + 1.5  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal/día). Sin embargo, existe una mejora en la sobrevivencia de los animales, del 88 % al 100 %. Hasta el día 40 todos los animales tratados, presentaron una mejor parasitemia que los no tratados, posterior al día 40 se observa un perfil de parasitemia similar, aunque luego del día 50 el **Bnz** tuvo una respuesta menos favorable ya que aumenta la parasitemia inclusive mayor que los animales no tratados.

**A)**



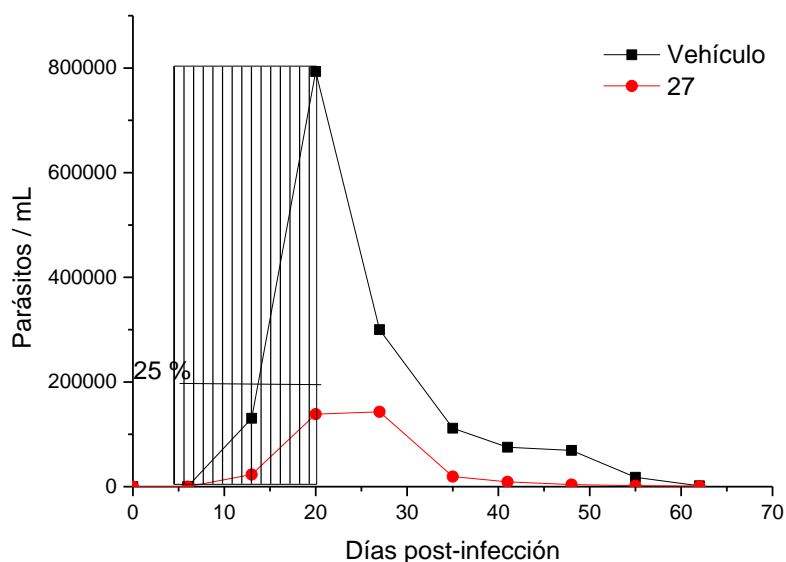
**B)**



**Figura 31.** Estudios *in vivo* de la combinación con el compuesto **2+16** y de la combinación **2+11**. **A)** Parasitemia de los ratones tratados con la combinación de **2+16** a una dosis de 282  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día + 2.2  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día; y la combinación de **2+11** ensayada a una dosis de 282  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día + 17  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día. **B)** Sobrevida de los ratones de los diferentes tratamientos mostrados en la parte **A**.

De acuerdo a la parasitemia observadas en la **Figura 31** de los ratones infectados y tratados se puede extraer las siguientes conclusiones preliminares: para la combinación de **2+11** al disminuir la dosis para ambos compuestos se reduce en un 72 % la parasitemia, por lo que no hay mucha diferencia con la dosis más alta para dicha combinación que redujo un 67 % la parasitemia. Además, el compuesto **2** ensayado a la misma dosis que la combinación **2+11** tuvo el mismo efecto. Sin embargo, el compuesto **2** ensayado a esa dosis fue más efectivo que el ensayado a 192  $\mu\text{moles/kg}$  de peso de ratón/día ya que el anterior disminuyó un 50 % el pico de parasitemia de los ratones infectados versus un 72 %.

Finalmente se decidió ensayar el compuesto **27** en monoterapia dado su buen perfil toxicológico y su potente acción *in vitro* frente a epimastigotes de *T. cruzi*. En la **Figura 32**, se observa que el compuesto **27** logra un control de la parasitemia de los ratones, con una disminución del 82% el máximo de parasitemia del grupo sin tratamiento.



**Figura 32.** Estudios *in vivo* del compuesto **27** ensayado a una dosis de 127  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal/día durante 15 días. La sobrevivencia del grupo tratado fue del 100% y la del no tratado del 60%.

**Tabla 9.** Ensayos *in vivo* con resultados más prometedores en cuanto a la evaluación de los compuestos en monoterapia y en combinación.

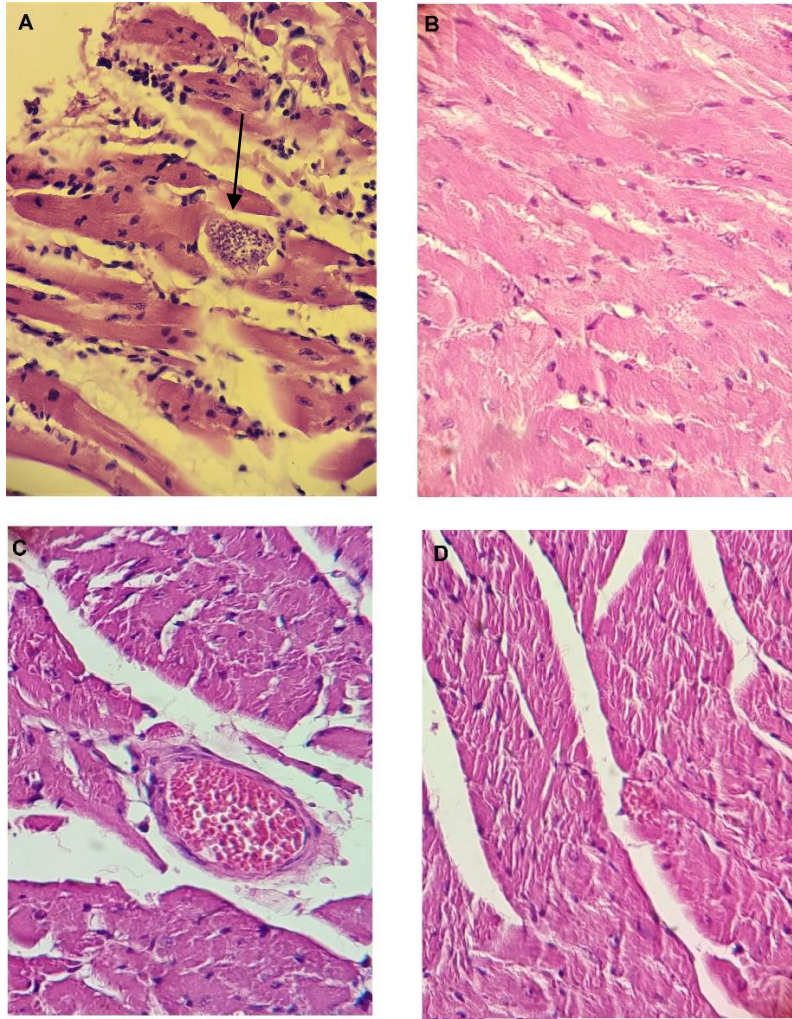
Tratamiento	Dosis en $\mu$ moles/kg/día	Porcentaje de reducción del pico de parasitemia	Día post infección de aparición del pico de parasitemia	Sobrevida
Control	-	0	21*	Variable
<b>2</b>	192	50	22	83
<b>11</b>	384	75	25	100
	192	60	29	100
<b>11+2</b>	17+282	65	15	100
<b>16</b>	192	40	22	40
	1.5	80	24	100
<b>16+2</b>	1.5+192	90	19	88
	2.2+282	80	17	100
<b>Bnz</b>	48	95	43	100
	38	90	15	100
	10	80	15	100
<b>Bnz+2</b>	38+192	83	30	100
<b>LIDERII</b>	102	77	20	100
<b>LIDERII+2</b>	102+192	82	26	88
<b>27</b>	127	82	27	100

\*Calculado del promedio de todos los ensayos.

En la **Tabla 9** se muestra un resumen de los resultados más destacados para estos estudios en el modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas. Se destacan los resultados para el compuesto **16** evaluado a dosis muy bajas (1.5  $\mu$ moles/kg/día) que disminuye significativamente la parasitemia de los animales infectados y produce excelentes niveles de sobrevida y las combinaciones **2+16** y **2+LIDERII** donde se observa y se correlaciona sinergismo tanto sea *in vitro* como *in vivo* siendo la sobrevida de los animales mayor a los animales sin tratamiento (88% para la combinación **2+LIDERII** y 100% para **2+16**). Además, la combinación de **2+16** tiene inclusive mejores resultados que el **Bnz** administrado en monoterapia a una dosis de 38.5  $\mu$ mol/kg/día ya que el pico de parasitemia de los animales tratados se observa mucho después de finalizado el tratamiento.

Complementariamente se realizó el análisis histopatológico *ex vivo* de los animales tratados con la combinación de **2+16**; **2+LIDERII** y el control. A los 60 días post infección en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas, se sacrifican los animales para terminar el experimento y se extraen, bazo, riñones, hígado, intestino y corazón de ratones de cada grupo para estudiar el efecto del tratamiento en los órganos infectados. Los cambios histopatológicos en el bazo, los riñones, el hígado, el intestino y el corazón de los animales no tratados y tratados se observaron con un microscopio óptico después de la tinción de tejidos con hematoxilina y eosina. Los resultados con mayores diferencias se observaron en el corazón como se muestra en la **Figura 33**. En la **Figura 33 A** se muestran cortes de tejido cardíaco de animales infectados que presentan infiltrados inflamatorios mononucleares pronunciados en el pericardio y entre las fibras miocárdicas. Por el contrario, se observa una disminución de estos infiltrados en los tejidos de animales infectados tratados (**Figura 33 B, 33 C y 33 D**). Además, se observaron amastigotes en los animales infectados no tratados (**Figura 33A**) pero estos resultados no aparecieron en los animales tratados (**Figura 33B, 33C y 33D**).





**Figura 33.** Secciones de tejido cardiaco de animales infectados con *Trypanosoma cruzi*: **A)** Animales no tratados. **B)** Animales tratados con compuestos 2+16. **C)** Animales tratados con compuestos 2+LIDERII. **D)** Animales tratados con Bnz. Tinción con hematoxilina - eosina, aumento 40X.

### 6.3. Estudio del mecanismo de acción.

Con motivo de conocer el o los mecanismos de acción de esta serie de compuesto en esta sección se describen una serie de ensayos que evalúan posibles blancos moleculares de estas moléculas.

#### 6.3.1. Inhibición de la TcTIM

Debido al rol fundamental de la TIM en *T. cruzi* se realiza el ensayo *in vitro* con esta enzima y las moléculas más relevantes como se observa en la **Tabla 10**. Se evalúa la inhibición a 25  $\mu$ M, para los compuestos que presenten un porcentaje de inhibición mayor al 50% se realizan las curvas dosis respuesta para determinar la  $CI_{50}$ . Algunos compuestos precipitan a 25  $\mu$ M lo que lleva a una variabilidad de los datos de inhibición y también dificultan la conformación de la curva dosis respuesta a estas dosis.

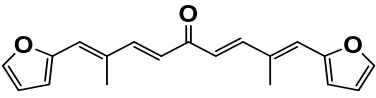
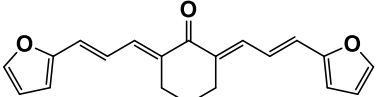
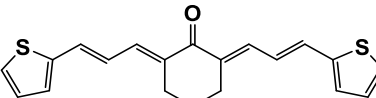
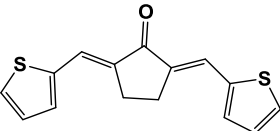
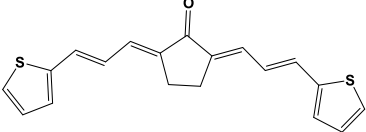
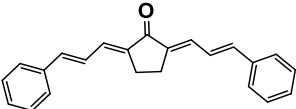
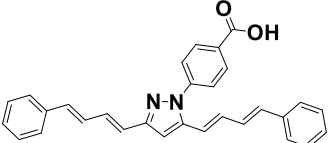
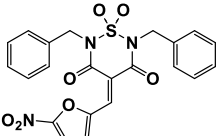
Dado los resultados obtenidos, se detecta un nuevo inhibidor de TcTIM, compuesto **11**, con mejor capacidad de inhibición que los inhibidores descritos previamente en la literatura<sup>142 143</sup>. A su vez el compuesto **11**, es 150 veces más potente que el **Prototipo III** como inhibidor simétrico de la TcTIM. La simetría de las moléculas y el tamaño, además del tipo del heteroátomo presente en el heterociclo son importantes para la inhibición de la enzima (más adelante se discutirá los resultados de docking y dinámica molecular de las moléculas más relevantes).

---

<sup>142</sup> Alvarez, G., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Marins, E.B., Tinoco, L., Batthyány, C.I., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., González, M. 1,2,4-thiadiazol-5(4H)-ones: a new class of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase. Study of the mechanism of inhibition. **2013**, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 28:981– 989.

<sup>143</sup> Alvarez, G., Martínez, J., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Pérez-Díaz, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Garat, G., Merlino, A., González, M., Cerecetto, H. New chemotypes as *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors: a deeper insight into the mechanism of inhibition. **2014**, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 29:198– 204.

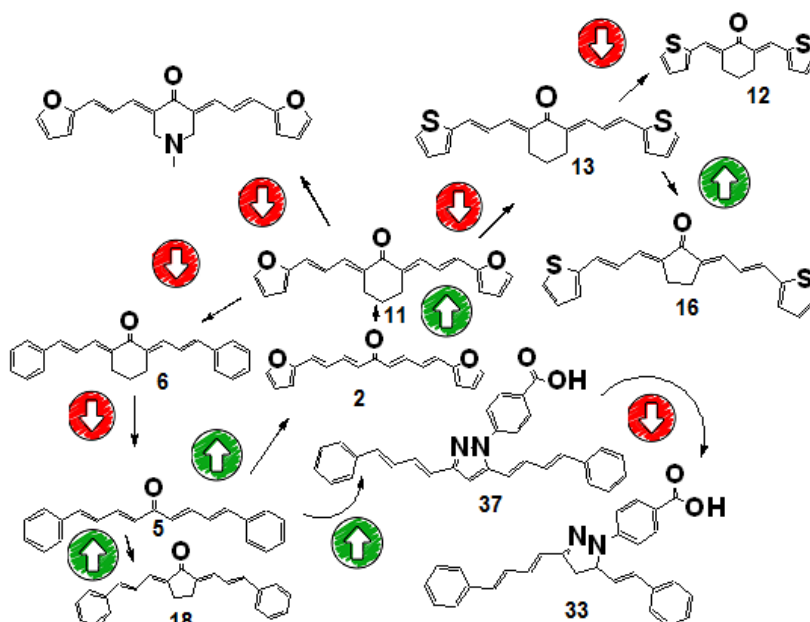
**Tabla 10.**  $Cl_{50}$  de la actividad inhibitoria de la triosa fosfato isomerasa de *T. cruzi*.

Compuesto	Estructura	$Cl_{50}$ en <i>TcTIM</i> ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>
8		$3.0 \pm 0.7$
11		$0.086 \pm 0.007$ (IS >1000) <sup>c</sup>
13		$7 \pm 1$
15		$6 \pm 1$
16		$4.7 \pm 0.8$
18		$7 \pm 1$
37		$15 \pm 3$
Prototipo III <sup>b</sup>		$13 \pm 0.5$

<sup>a</sup>  $Cl_{50}$  representa la media de dos experimentos independientes realizados por triplicados. <sup>b</sup> Inhibidor descrito anteriormente<sup>45</sup>. <sup>c</sup> Índice de selectividad con respecto a la máxima dosis ensayada en la *HsTIM* de 100  $\mu M$  (0% de inhibición).

Para corroborar la selectividad de la inhibición, los compuestos inhibidores de la *TcTIM* se analiza su actividad sobre la *HsTIM* mostrando porcentajes de 0% de inhibición a las concentraciones entre 25 y 100  $\mu\text{M}$ . Además, como parte del programa de búsqueda de moléculas bioactivas de nuestro grupo esta serie de moléculas se estudiaron con otras TIM de otros organismos (*Fasciola hepática*<sup>144</sup>, *T. brucei*, *Leishmania mexicana*, *Rhipicephalus microplus*<sup>145</sup>) y no presentaron efecto inhibitorio en las mismas. Esto confirma la selectividad y especificidad de estas moléculas para la *TcTIM*. En la **Figura 34** se estudia la relación estructura-actividad entre la actividad de inhibición para la *TcTIM* para las moléculas en estudio.

La clara asociación con la simetría se pudo observar cuando se comparó el compuesto **37** con su análogo asimétrico inactivo **33** (al igual que con todos los derivados asimétricos de la **Familia C**, los cuales fueron inactivos frente a esta enzima). Lo otro destacable es el largo de las moléculas, cuando se cambia de una conjugación de 2 a un doble enlace se pierde actividad. Se observa que los compuestos que contienen furilo y tienilo son más activos que las que presentan fenilo. Entre los derivados de furilo y tienilo hay una relación entre la conformación adoptada para el anillo de 5 y el anillo de 6, donde el anillo de 6 es mejor para el furilo y el de 5 para el tienilo, esto se explica mejor cuando se estudia en el docking donde el tamaño del azufre es contrarrestado por la conformación más estrecha del anillo de 5.

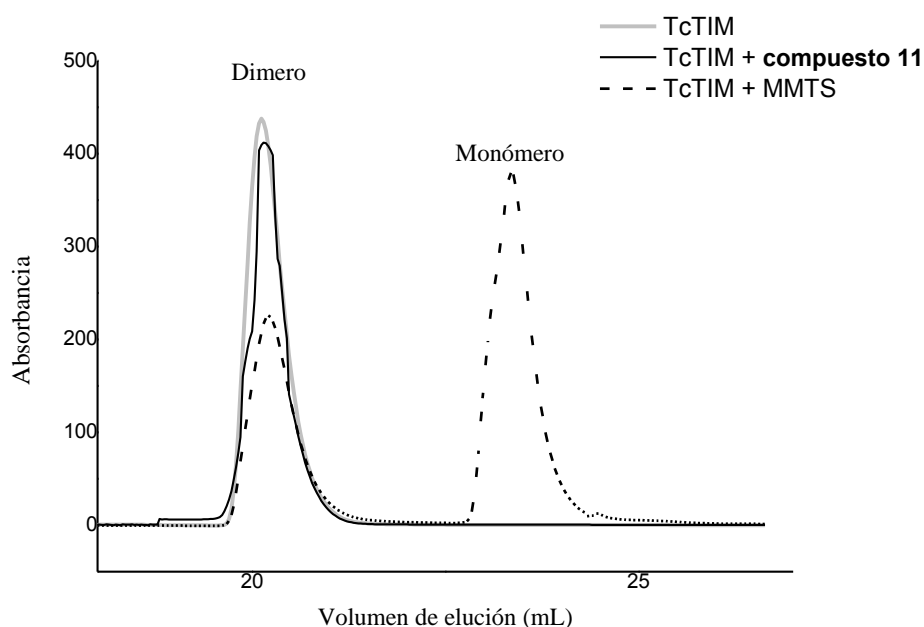


<sup>144</sup> Ferraro, F., Corvo, I., Bergalli, L. *et al.* Novel and selective inactivators of Triosephosphate isomerase with anti-trematode activity. **2020**, *Sci Rep.*, 10:2587-2600.

<sup>145</sup> Saramago, L., Gomes, H., Aguilera, E., Cerecetto, H., González, M., Cabrera, M., Alzugaray, MF., da Silva Vaz Junior, I., Nunes da Fonseca, R., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Merlino, A., Moraes, J., Álvarez, G. Novel and Selective Rhipicephalus microplus Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. **2018**, *Vet Sci.*, 5:74-93.

**Figura 34.** Esquema representativo del estudio de la relación estructura actividad de los compuestos sintetizados y su actividad inhibitoria sobre la *TcTIM*. Las flechas en verde indican aumento de la actividad y las flechas en rojo indican una disminución de la actividad.

Además, se estudió mediante cromatografía de exclusión molecular si el compuesto **11** actúa mediante la desestabilización del dímero en la *TcTIM*. Para ello, se comparó con un agente de monomerización como el metanosulfato de metilo (MMTS) <sup>146</sup>. Este estudio demostró que la enzima siempre eluye como dímero (**Figura 35**). Estos resultados demuestran que la causa de la inhibición del compuesto **11** no implica la desdimerización.



**Figura 35.** Cromatografía de exclusión molecular de la *TcTIM*. Se muestra el perfil de elución del dímero de la *TcTIM* (línea gris continua), *TcTIM* con compuesto **11** (línea negra continua) y *TcTIM* con MMTS (línea punteada negra).

<sup>146</sup> Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. **1995**, *Chem. Biol.*, 2:847- 855.

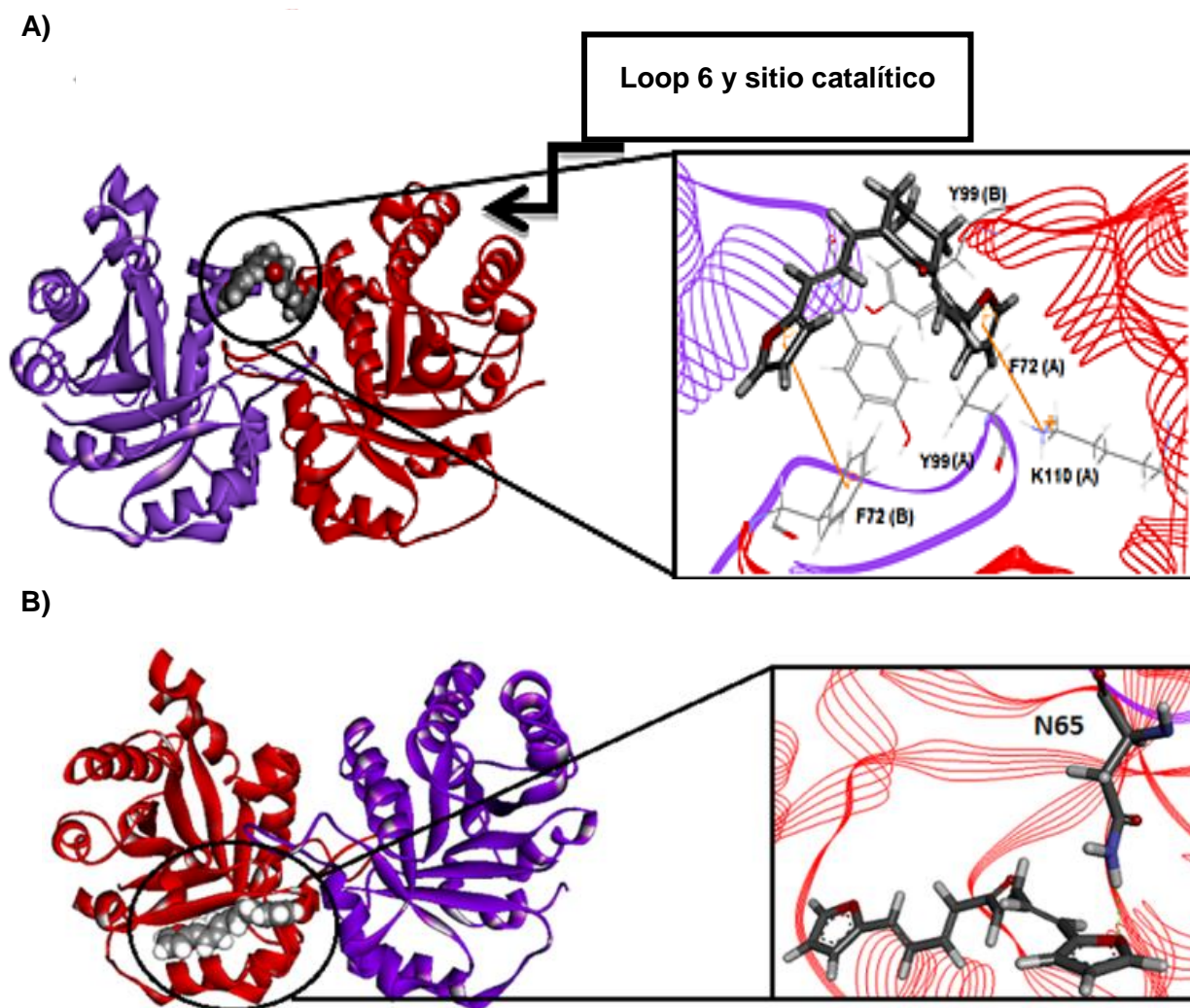
### 6.3.2. Estudios de docking para los mejores inhibidores de la TcTIM.

Fundamentado en los resultados de los ensayos de inhibición de la TcTIM se procede a realizar estudios de docking molecular. Los estudios de docking moleculares fueron realizados por la Dra. Lucía Minini y la Dra. Alicia Merlino (Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR), luego de los ensayos experimentales *in vitro* de inhibición de la enzima. Estos estudios se realizaron para estudiar la interacción de los inhibidores con la biomolécula (TcTIM) a través de cálculos teóricos. Para esto se eligieron los mejores inhibidores de la enzima.

A partir de los antecedentes descritos en la tesina de grado de la autora de este trabajo, se observó que el compuesto **2** interacciona con los aminoácidos de la interfaz de la proteína, ampliamente reconocidos como fundamentales para la integridad y actividad de la enzima <sup>147</sup>. Por otra parte, el compuesto **1** presentó baja actividad debido a que este compuesto interaccionaría con la biomolécula en un sitio lejano a la interfaz o al sitio activo. Al comparar los modos de unión del compuesto **2** y el compuesto **4** (que no es inhibidor de la enzima), se pudo ver que el compuesto **2** estabiliza la unión de la hendidura de la enzima por enlaces de hidrógeno <sup>92</sup>. El oxígeno del furilo del compuesto **2** interacciona por enlace de hidrógeno con el nitrógeno de la Glicina 100 de la enzima estabilizando la interacción en el sitio activo. Además, el oxígeno carbonílico del compuesto **2** interacciona con el residuo de Arginina 95 de la cadena lateral. Al analizar el compuesto **9**, donde el cambio radica en la presencia de un tienilo en lugar de un furilo, se puede concluir que además de la presencia de los dobles enlaces conjugados, el furilo es imprescindible en las moléculas para ubicarlas adecuadamente en la enzima y provocar la inhibición de la actividad de la TcTIM.

Basado en los resultados previos se estudia el docking molecular del compuesto **11** (el inhibidor más potente de la serie con un  $CI_{50}$  en el orden nanomolar), ya que esta molécula presenta dobles enlaces conjugados y furilo como grupo aromático. Los resultados del docking mostraron que el compuesto se ubicó en la interfaz de la enzima al igual que el compuesto **2** estableciendo interacciones hidrofóbicas con el residuo de la Tirosina 99 y la Fenilalanina 72 de ambos monómeros. Además, los furilos proporcionan interacciones de tipo  $\pi$ -catión y  $\pi$ - $\pi$  con los residuos de la Lisina 110 del monómero **A** y Fenilalanina 72 del monómero **B** respectivamente (**Figura 36 A**).

<sup>147</sup> Cháñez-Cárdenas, M.L., Pérez-Hernández, P., Sánchez-Rebollar, B.G., Costas, M., Vázquez-Contreras, E. Reversible Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* in Guanidinium Hydrochloride Involves Stable Dimeric and Monomeric Intermediates. **2005**, *Biochemistry*, *44*:10883-10892.



**Figura 36.** Modo de interacción de los compuestos con la interfaz de TIM. A) interacción de *TcTIM* y el compuesto **11**. B) interacción de *HsTIM* y el compuesto **2**.

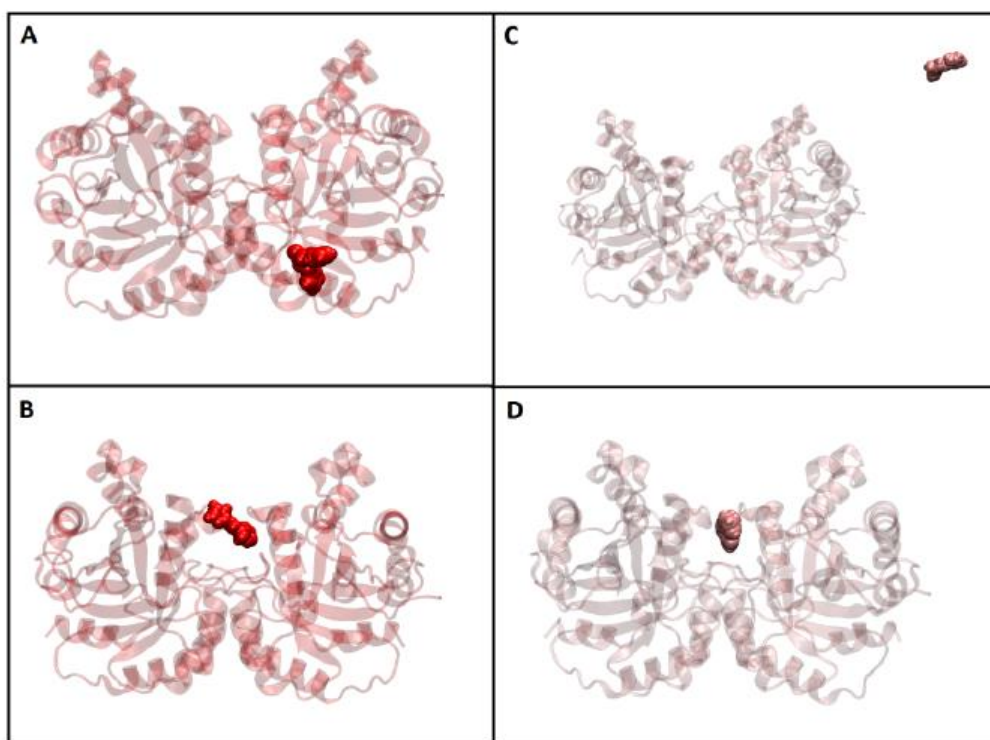
Curiosamente, el residuo de la Fenilalanina 72 se encuentra en el bucle 3 de la enzima que participa en la integridad del mantenimiento de la *HsTIM*, no siendo así en *TcTIM* ya que este residuo interacciona débilmente en la superficie de la enzima (**Figura 36 B**). Esto podría explicar la selectividad de este compuesto para la enzima del parásito. Se realizaron también intentos de cristalización de la enzima con los inhibidores con dos diferentes técnicas, esto lo realizó el Dr. Alvarez en colaboración con el grupo del Dr. Guillon de la Universidad de Lion en Francia. Se ensayó la técnica de co-cristalización (de dos formas, con una disolución de inhibidor o con el inhibidor presente adherido a un vidrio luego de la evaporación del disolvente) y “socking” (sumergir cristales de la proteína en una disolución del inhibidor) y ninguna resultó en cristales de la proteína y el ligando, lo observado se asocia a la dificultad de mantener la relación ligando proteína, dado que las condiciones de cristalización óptima de la enzima necesitan concertación de proteína superiores a los 30 mg/mL y los compuestos a estas concentraciones tan altas precipitan, cuando se usan concentraciones bajas de compuestos se obtienen cristales de la proteína sola. Muchas veces se observa precipitación de la proteína cuando se pone en contacto con los inhibidores, impidiendo la cristalización. Se continuaran estudiando otras condiciones de cristalización con menores concentraciones de proteína.

### 6.3.3. *Dinámica molecular de los compuestos más relevantes.*

Con el fin de profundizar en la interacción de los compuestos **1**, **2**, **4**, y **11** con la enzima *TcTIM*, se realizan estudios de dinámica molecular. Estos estudios al igual que el docking molecular fueron realizados por la Dra. Lucía Minini y la Dra. Alicia Merlino (Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR).

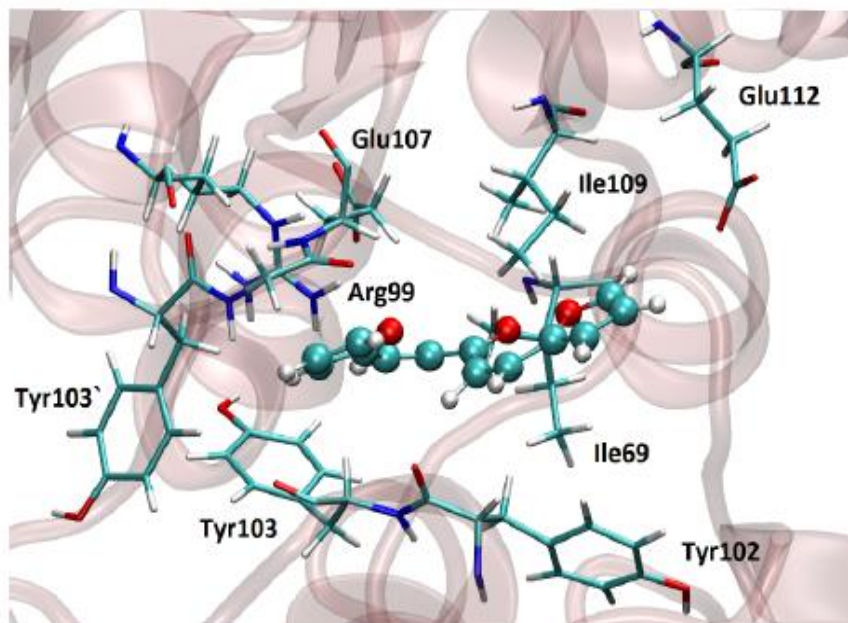
Para el compuesto **1**, en el *docking* molecular se obtienen 23 *cluster* posibles, el *cluster* más poblado con 8 conformaciones se encuentra en la región mostrada en la **Figura 37 A**, mientras que hay 5 *cluster* que se encuentran en la interfaz de la proteína (**Figura 37 B**). Al estudiar la dinámica molecular para el compuesto **1** a los 100 ns de dinámica molecular utilizando como complejo inicial al *cluster* más poblado (**Figura 37 A**) se observa que a los 20 ns de simulación el compuesto pierde dicho posicionamiento y se mueve hacia el disolvente quedando solvatado en el mismo por los restantes 80 ns de la dinámica molecular (**Figura 37 C**). Debido a los resultados obtenidos y conociendo el poder inhibitorio de dicho compuesto se realizó otra simulación teniendo como punto de partida el *cluster* más favorable que se posiciona en la interfaz de la proteína (**Figura 37 B**). En este caso, en los 100 ns de dinámica no se pierde el posicionamiento del compuesto, el mismo se mantiene en la interfaz durante los 100 ns de la simulación (**Figura 37 D**).





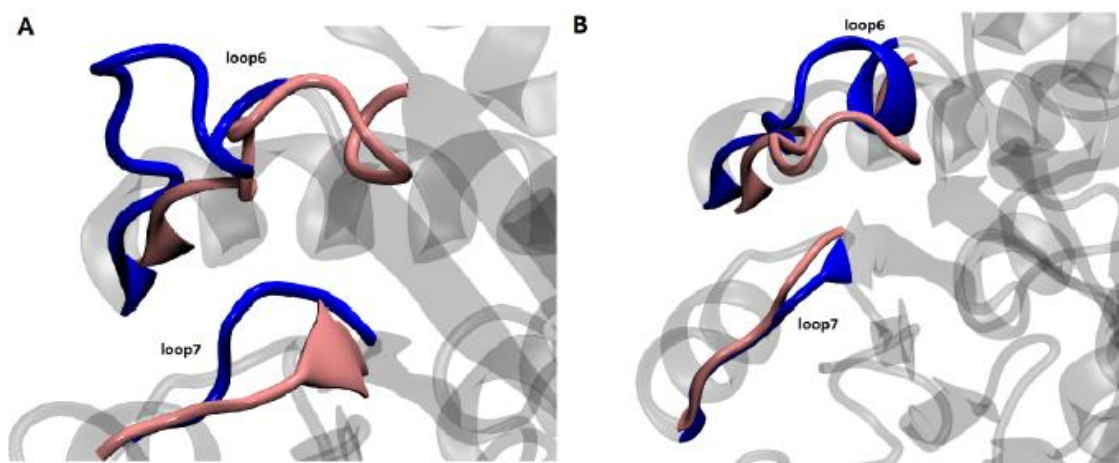
**Figura 37.** Estudios de docking y dinámica molecular: **A)** Sitio de interacción del compuesto **1** y la *TcTIM* mostrando el clúster más poblado de la enzima (8 conformaciones) luego de realizar el docking molecular. **B)** Sitio de interacción del compuesto **1** y la *TcTIM* mostrando los 5 clúster que se encuentran en la interfaz de la proteína (más favorable) luego de realizar el docking molecular. **C)** Resultados de la dinámica molecular del compuesto **1** y la *TcTIM* utilizando el clúster de la proteína más poblado. **D)** Resultados de la dinámica molecular del compuesto **1** y la *TcTIM* utilizando el clúster más favorable para la proteína.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la dinámica molecular es posible concluir que este compuesto interaccionaría con la interfaz de TcTIM, lo que podría explicar su inhibición *in vitro*. Este compuesto interacciona con un *cluster* hidrofóbico en el interfaz conformado por Tirosina 103, 102, Leucina 70 y 110 (**Figura 38**).



**Figura 38.** Sitio de interacción del compuesto **1** en la interfaz de la *TcTIM*. En celeste se representa los carbonos; en blanco los hidrógenos; en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

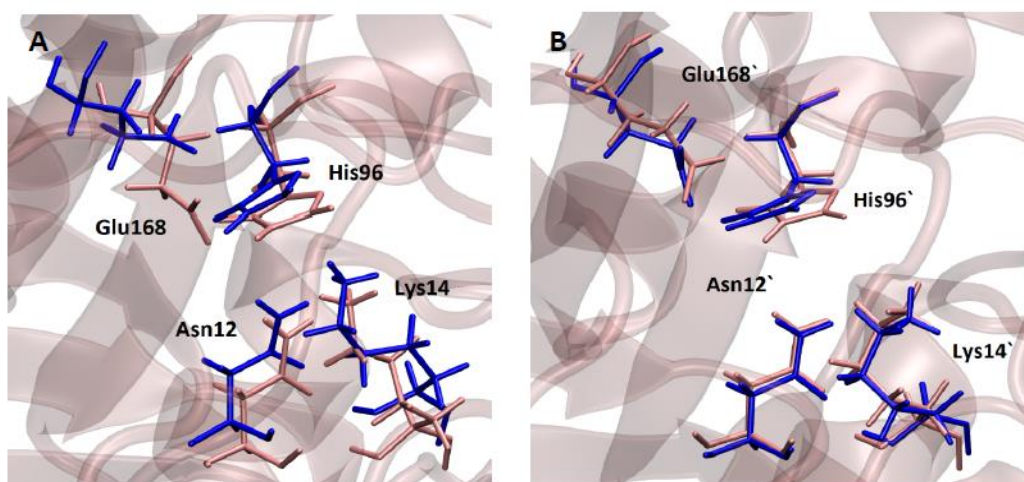
Debido a la importancia en la interacción entre los dos monómeros en la interfaz, el posicionamiento en dicha región podría causar diferencias en el posicionamiento de los residuos catalíticos como también cambios en el posicionamiento del loop6 y loop7, importantes para la catálisis ya que regulan la entrada del sustrato al sitio activo. Como se puede observar en la **Figura 39** este compuesto genera cambios principalmente en la conformación del loop6.



**Figura 39.** Cambios en la conformación del loop6 y loop7 de la *TcTIM* por el compuesto **1**. **A)** Posicionamiento del loop 6 y 7 en presencia del compuesto **1** (rosado) y en ausencia de ligando (azul) en el **monómero A**. **B)** Posicionamiento del

loop6 y 7 en el **monómero B** en presencia del compuesto **1** (rosado) y en ausencia de ligando (azul).

En el monómero A se observa un corrimiento del loop6 hacia el sitio activo, mientras que el loop7 se aleja del loop6 respecto al mismo en ausencia de ligando (**Figura 40 A**). En el monómero B, el loop6 se cierra mientras que el loop7 no sufre modificaciones relevantes (**Figura 40 B**). Respecto a los residuos del sitio activo, solo el de Glutamato 168 (Glu168) en el monómero A sufre cambios relevantes en su posicionamiento, esto se encuentra relacionado con el corrimiento del loop6, ya que el mismo se encuentra en dicho loop. En el monómero B los cambios en el posicionamiento de los residuos catalíticos son menos relevantes y no se observa un corrimiento relevante del residuo de Glu168 (**Figura 40 B**).

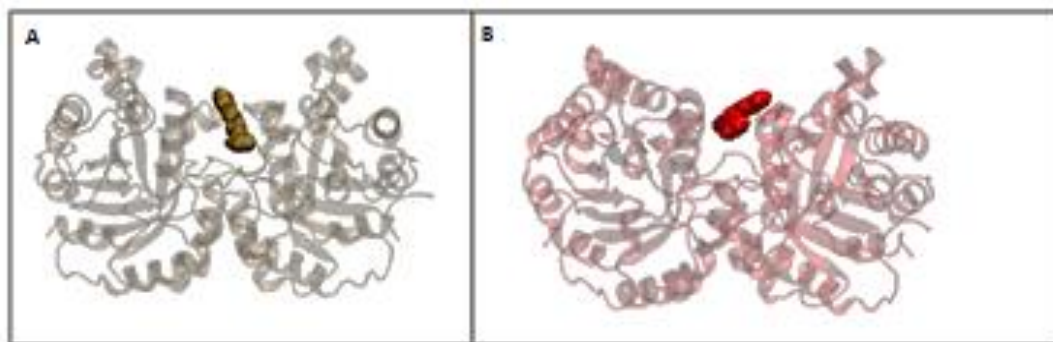


**Figura 40.** Posicionamiento de los residuos del sitio activo en presencia (rosado) y ausencia del compuesto **1** (azul). **A)** Sitio activo del monómero A **B)** Sitio activo monómero B.

Para el compuesto **2**, en el docking molecular se obtienen 8 cluster donde el compuesto **2** se mantiene en la interfaz del dímero (**Figura 41 A**). Es por esta razón se realiza una dinámica molecular de 100 ns con el compuesto en la interfaz. Los resultados de dinámica y docking concuerdan ya que el compuesto **2** se mantiene en la interfaz en toda la interacción (**Figura 41 B**)

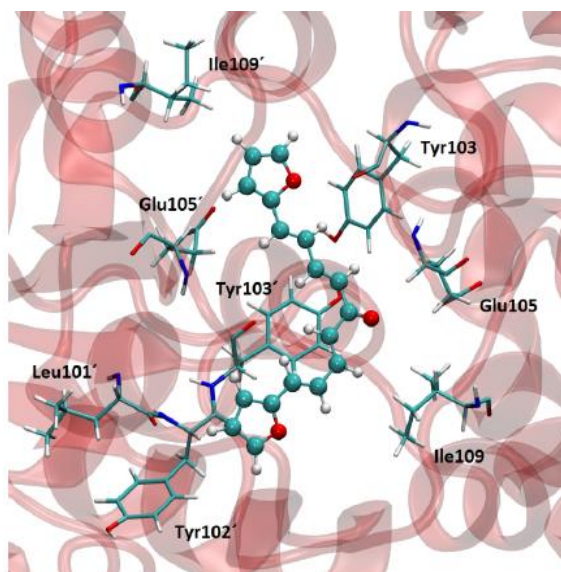
Posteriormente se estudian los cambios que genera el compuesto **2** en la estructura de la proteína. Para esto se estudian el comportamiento del loop 6 y 7 al igual que para el compuesto **1**. En la dinámica molecular del compuesto **2** como se muestra en la **Figura 43**, se observa que el compuesto no genera grandes cambios en los mismos que indiquen una inhibición de la enzima. La presencia de este compuesto en el loop6

del monómero A genera una apertura del mismo. Estos resultados indicarían que la presencia del compuesto no estaría generando la inhibición de la enzima.

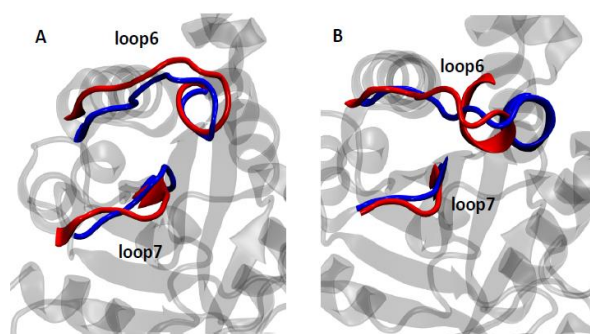


**Figura 41.** Estudios de docking y dinámica molecular. Sitio de interacción del compuesto **2** en *TcTIM* después del docking molecular (**A**) y después de la dinámica molecular (**B**).

En la **Figura 42** se puede observar las interacciones del compuesto **2** con la enzima en el sitio de la interfaz.



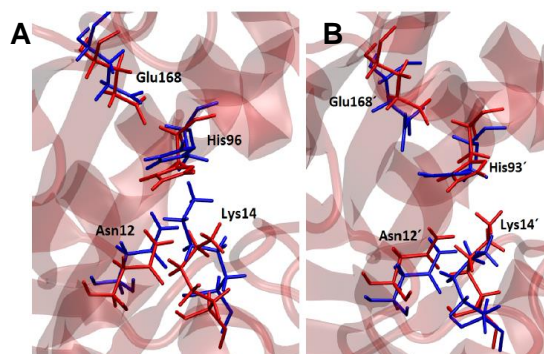
**Figura 42.** Sitio de interacción del compuesto **2** en la interfaz de *TcTIM*. En celeste se representa los carbonos; en blanco los hidrógenos; en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.



**Figura 43.** Cambios en la conformación del loop6 y loop7 por acción del compuesto **2**. **A)** Posicionamiento del loop6 y 7 en presencia del compuesto **2** (rojo) y en ausencia de ligando (azul) en el monómero A. **B)** Posicionamiento del loop6 y 7 en el monómero B.



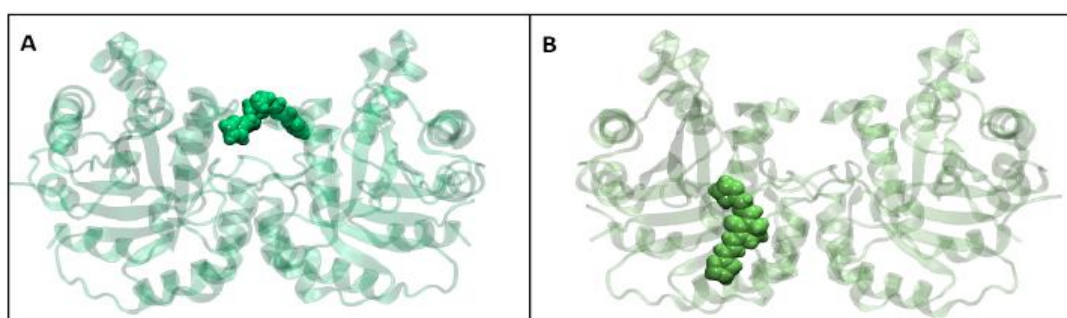
Además, la presencia del compuesto **2** no estaría generando grandes diferencias en el posicionamiento de los residuos catalíticos de la interfaz de la enzima. No se observan cambios relevantes en el posicionamiento del residuo Glu168 (**Figura 44**).



**Figura 44.** Posicionamiento de los residuos del sitio activo en presencia (rojo) y ausencia del compuesto **2** (azul). **A)** Sitio activo del monómero A, **B)** Sitio activo monómero B.

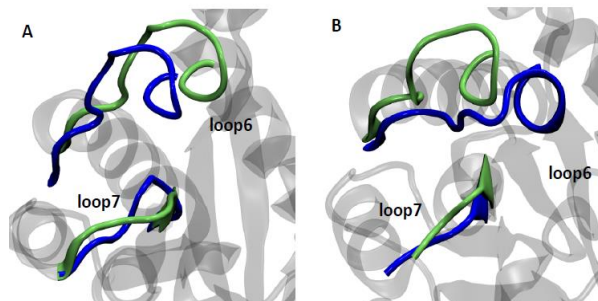
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es posible concluir que el compuesto **2** como tal no sería capaz de inhibir a TcTIM debido a que no se observan cambios relevantes en los loops de interés (**Figura 43**) ni en el posicionamiento de los residuos catalíticos (**Figura 44**). Esto lleva a pensar que el compuesto estaría afectando otra parte de la estructura de la enzima que no fue considerada en la DM.

A partir del docking del compuesto **11**, donde se obtiene que el compuesto interactúa en la interfaz de la TcTIM, se realiza la dinámica en las mismas condiciones. Sin embargo, como se observa en la **Figura 45 B**, el compuesto **11** luego de la dinámica no permanece en la interfaz, sino que se mueve de la misma pasando por el loop6.



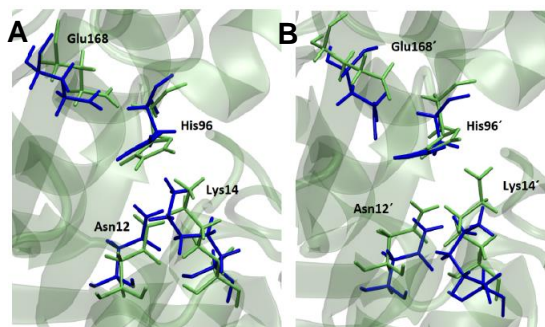
**Figura 45.** Sitio de interacción del compuesto **11** en TcTIM **A)** después del docking molecular y **B)** después de la dinámica molecular.

Además, la presencia de este compuesto promueve que el loop 6 se abra alejándose del loop 7, lo cual no estaría explicando la inhibición de este compuesto, debido a que cuando hay inhibición de la *TcTIM* este loop tiende a cerrarse por la ocupación del sitio activo (**Figura 46**).

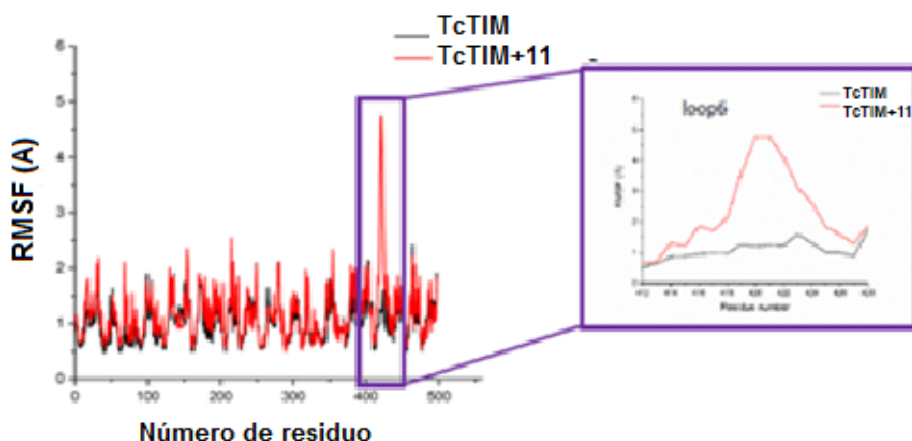


**Figura 46.** Cambios en la conformación del loop6 y loop7. **A)** Posicionamiento del loop6 y 7 en presencia del compuesto **11** (verde) y en ausencia de ligando (azul) en el monómero A. **B)** Posicionamiento del loop6 y 7 en el monómero B.

Además, este compuesto **11** genera cambios en los residuos catalíticos, (**Figura 47**). A partir del estudio de la distancia cuadrática media de las fluctuaciones (RMSF) se obtiene que solo hay una diferencia importante a nivel del loop6 del monómero B (**Figura 48**), este cambio se ve reflejado en el posicionamiento de dicho loop en este monómero, este cambio se debe no solo a la apertura del mismo, sino que también al corrimiento observado respecto al loop en ausencia de compuesto.



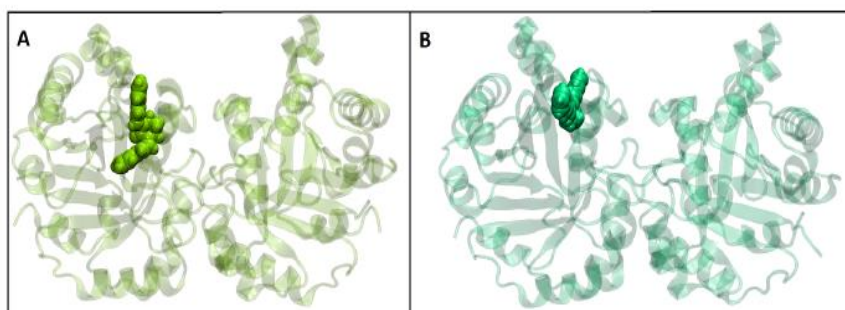
**Figura 47.** Posicionamiento de los residuos del sitio activo en presencia (verde) y ausencia del compuesto **11** (azul). **A)** Sitio activo del monómero A, **B)** Sitio activo monómero B.



**Figura 48.** RMSF de los residuos según los C $\alpha$ . El mayor corrimiento se observa en el loop6 del monómero B.

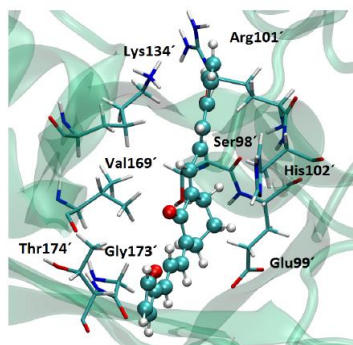
Al igual que para el compuesto **2**, se puede suponer que el compuesto **11**, según la dinámica molecular del cluster más probable, no estaría inhibiendo a la enzima. Por lo tanto, su actividad de inhibición a la enzima se podría explicar por otros sitios de interacción de la molécula con la enzima que no fueron considerados en la DM.

Se realizaron estudios de docking y dinámica del inhibidor más potente de la *TcTIM* (compuesto **11**) en la *HsTIM* dado que los resultados experimentales muestran que no inhiben la enzima humana. A partir del docking obtenido en la *HsTIM* y el compuesto **11**, se obtienen 8 *cluster* con el compuesto posicionado en la región observada en la **Figura 49A**, mientras que solo se obtienen 2 *cluster* en la interfaz y debajo del loop6. Luego de la dinámica molecular se observa que el compuesto **11**, no se posiciona en la interfaz de la enzima, sino que se encuentra en una región cercana al loop6 (**Figura 49B y Figura 50**).



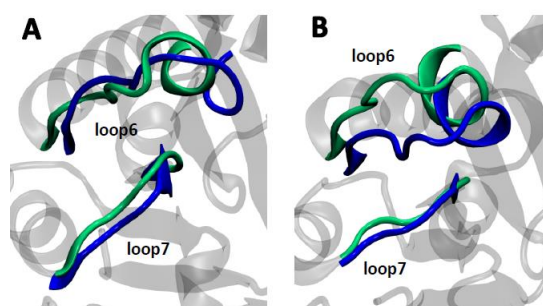
**Figura 49.** Sitio de interacción del compuesto **11** en *HsTIM* **A)** después del docking molecular y **B)** después de la dinámica molecular.





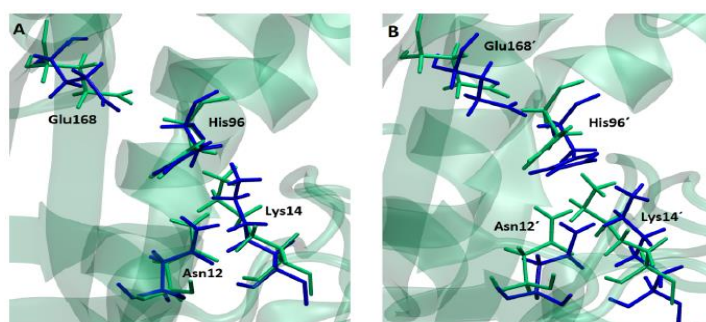
**Figura 50.** Sitio de interacción del compuesto **11** en *HsTIM*. En celeste se representa los carbonos; en blanco los hidrógenos; en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

La presencia de este compuesto no genera grandes cambios en el posicionamiento de los loops 6 y 7 (**Figura 51**), solo el loop 6 del monómero B sufre cambios quedando más abierto que lo observado en ausencia de compuesto (**Figura 51 B**).



**Figura 51.** Cambios en la conformación del loop6 y loop7 en la *HsTIM* por acción del compuesto **11**. **A)** Posicionamiento del loop6 y 7 en presencia del compuesto **11** (verde) y en ausencia de ligando (azul) en el monómero A. **B)** Posicionamiento del loop6 y 7 en el monómero B.

En el monómero B de la proteína humana se observan mayores corrimientos en el posicionamiento de los residuos catalíticos, pero los mismo no evidencian inhibición de *HsTIM* (**Figura 52B**), tal cual se observó experimentalmente.



**Figura 52.** Posicionamiento de los residuos del sitio activo en presencia (verde) y ausencia del compuesto **11** (azul). **A)** Sitio activo del monómero A, **B)** Sitio activo monómero B.

#### 6.3.4. Inhibición de cruzipaína.

Al observar que los compuestos de la **Familia A** no sólo explican su acción tripanosomicida por la inhibición de la TcTIM, se decidió explorar otros blancos moleculares de inhibición, como la cruzipaína. Se evalúa la inhibición a 100 µM, para los compuestos que presenten un porcentaje de inhibición mayor al 30%, se realizan las curvas dosis respuesta para determinar la CI<sub>50</sub>. Así, se detectaron dos nuevos inhibidores para esta enzima, el compuesto **11** y **16**. Cabe destacar que esta enzima fue purificada de la forma epimastigote de los parásitos, siendo la actividad de inhibición más representativa que la actividad de inhibición de la enzima recombinante denominada cruzaína. En la versión recombinante se encuentran inhibidores de esta enzima en el orden nanomolar, sin embargo, en la enzima purificada solo se encuentran inhibidores en el rango micromolar<sup>148 149 150</sup>. Por otro lado, se evaluaron los compuestos **2**, **8**, **18** y **19** desarrollados en la tesina de grado y doctorado, los cuales muestran una inhibición moderada (a 100µM inhiben aproximadamente el 50% de la actividad enzimática como se muestra en la **Tabla 11**). Los derivados de la **Familia B**, que fueron diseñados como análogos del **LIDER II** inhibidor de cruzipaína, no fueron testeados en la misma por ser inactivos.

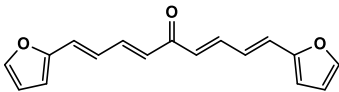
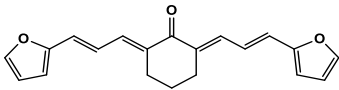
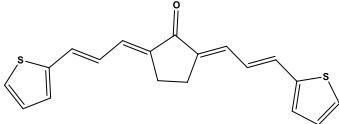
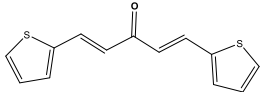
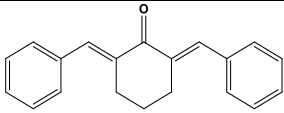
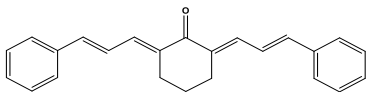
---

<sup>148</sup> Merlino, A., Benitez, D., Chavez, S., Da Cunha, J., Hernández, P., Tinoco, L., González, M. Development of second generation amidinohydrazones, thio- and semicarbazones as *Trypanosoma cruzi* inhibitors bearing benzofuroxan and benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds. **2010**, *MedChemComm.*, 1:216-228.

<sup>149</sup> Caputto, D. M. E., Fabian, L.E., Benítez, D., Merlino, A., Ríos, N., Cerecetto, H., Moltrasio, G. Y., Moglioni, A. G., González, M., Finkielstein, L. M. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **2011**, *Bioorg. Med. Chem.*, 19:6818-6826.

<sup>150</sup> Yadav, A. K., Kumar, M., Verma, M., Kumar, M., Kumar, M. Designing of Species-specific inhibition: The cysteine residues of triosephosphate isomerase. **2014**, *Bas. Res. J. Med. Clin. Sci.*, 3:62-66.

**Tabla 11.**  $CI_{50}$  de la actividad inhibitoria de la cruzipaina de *T. cruzi*. Para los compuestos con inhibición menor al 30 % a 100  $\mu$ M se muestra el porcentaje de inhibición mostrado a 100  $\mu$ M.

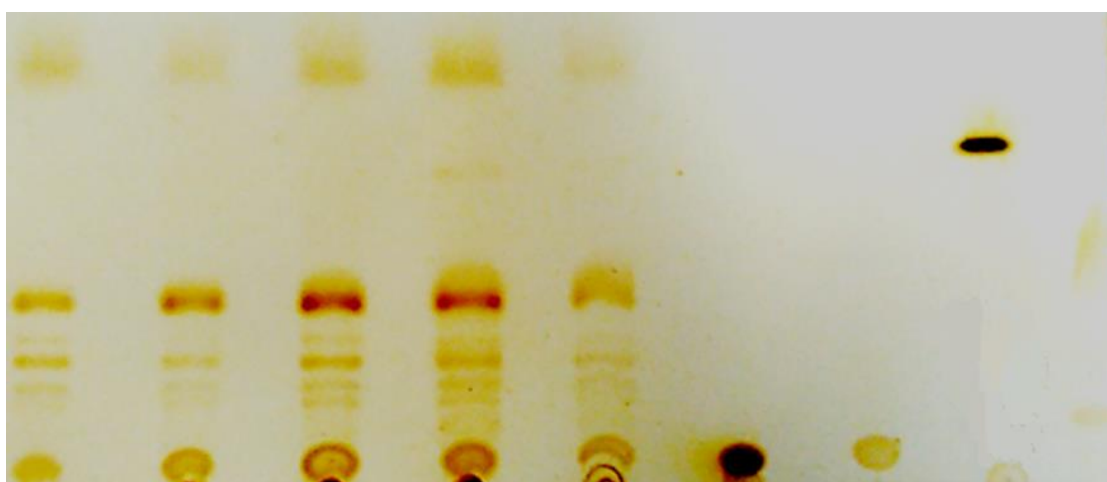
Compuesto	Estructura	$CI_{50}$ en cruzipaina ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Inhibición (%) a 100 $\mu$ M
2		-	48
11		37 $\pm$ 1	-
16		42 $\pm$ 2	-
3		-	49
18		-	38 <sup>b</sup>
19		-	40

<sup>a</sup> Valores de  $CI_{50}$  contra cruzipaina; los resultados representan la media $\pm$ la desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicados. <sup>b</sup> De acuerdo a la referencia <sup>151</sup> a 100  $\mu$ M este compuesto inhibe 31 % de la actividad de la enzima recombinante (cruzaína).

<sup>151</sup> Braga, S.F., Alves, E.V.P., Ferreira, S.R., Fradico, J.R.B., Lage, P.S., Duarte, M.C., Ribeiro, T.G., Jfflnior, P.A.F., Romanha, A.J., Tonini, M.L., Steindel, M., Coelho, E.F., de Oliveira, R.B. Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones. **2014**, *Eur. J. Med. Chem.*, 71:282-289.

### 6.3.5. Inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana.

Los compuestos estudiados tienen similitud estructural con el escualeno, un intermedio en la biosíntesis de ergosterol, importante lípido involucrado en la estabilidad de las membranas celular. Por tal motivo, se estudió la capacidad de inhibir la biosíntesis de esteroides de membrana de los compuestos más activos (**2**, **11** y **16**). Se estudia la acumulación o depleción de algunos intermedios de esta ruta bioquímica mediante análisis cualitativos por TLC <sup>152</sup>. Ninguno de estos compuestos fue capaz de provocar la acumulación de escualeno u otro intermedio de la biosíntesis de ergosterol, como se puede observar en la **Figura 53** con el control positivo, terbinafine (**Tbf**), un conocido antifúngico con actividad tripanosomicida por su capacidad de inhibir la escualeno epoxidasa. Comparado con el control los compuestos no mostraron cambios a nivel de esteroides e intermedios analizados. Sin embargo, el compuesto **2**, fue capaz de decrecer la acumulación de ergosterol en los parásitos al igual que el control positivo. De acuerdo con estos resultados, se podría inferir que otro posible blanco molecular para el compuesto **2** puede ser la C14 $\alpha$ -lanosterol desmetilasa (CYP51), una enzima considerada un potencial blanco para el tratamiento de la enfermedad de Chagas <sup>153</sup>.



**Figura 53.** Análisis mediante TLC de los intermediarios de la ruta de la biosíntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi*. Se muestran los resultados de los parásitos sin tratamiento y para los tratados con los compuestos **2**, **11**, **16** y **Tbf** (control positivo). Imagen procesada de la TLC original para mejorar el contraste y visualizar marcas, para esto se le quito el fondo. La TLC fue revelada con vapores de yodo.

<sup>152</sup> Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N.V., Miño, P., Chiriboga, X., Cerecetto, H., González, M. *In vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of hydro-ethanolic extract and isolated active principles from *Aristeguietia glutinosa* and mechanism of action studies. **2014**, *Molecules*, *19*:8488-8502.

<sup>153</sup> Doyle, P. S., Chen, C.-K.; Johnston, J. B., Hopkins, S. D., Leung, S. S. F., Jacobson, M. P., Engel, J. C.; McKerrow, J. H., Podust, L. M. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. **2010**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, *54*:2480-2488.

### 6.3.6. Estudio de metabolismo energético por resonancia magnética nuclear.

Dado que el compuesto **2** no reveló ningún cambio en el metabolismo energético de *T. cruzi*<sup>92</sup> y que demostró tener sinergismo contra el parásito en la combinación *in vitro* con el fármaco de referencia **Bnz**<sup>154</sup> se buscó ver qué vía del metabolismo energético del parásito se está afectando. La técnica de cuantificación de metabolitos excretados al medio de cultivo por <sup>1</sup>H-RMN, implementada en nuestro grupo de investigación<sup>98</sup>, es sencilla ya que a diferencia de las técnicas bioquímicas estándares, en un solo experimento se pueden identificar todos los metabolitos excretados. Las señales de los metabolitos identificados en el medio de cultivo para epimastigote de *T. cruzi* cepa Y se muestran en la **Tabla 12**. Se analizan las muestras por triplicado. Los metabolitos excretados y las enzimas que intervienen en la ruta glicolítica del parásito se muestran en la **Figura 55**. Los compuestos **2** y **Bnz** fueron evaluados a la dosis que fueron sinérgicas (1/4 del CI<sub>50</sub> de cada uno por separados y la combinación de ambos a dicha concentración, **Tabla 13**). Si bien la combinación en este caso presentó un perfil diferente que los parásitos sin tratar para los siguientes metabolitos: succinato, piruvato y acetato, indicando que estaría afectando la vía glucolítica del parásito, pero no se encontró diferencias significativas según el test de Student. El compuesto **2** como efectivamente se muestra en la tesis de grado de la autora de esta tesis, no afecta los metabolitos excretados al medio respecto al control sin tratar. **Bnz** afecta la excreción de la glicina al medio incrementándola (42%) de forma significativamente estadística de acuerdo al test de Student (en amarillo en la **Tabla 13**). Lo que estaría mostrando una modificación la acción de la *acetil-CoA: glicina C-acetiltransferasa* incrementando su actividad como se visualiza en la **Tabla 13 y la Figura 54**.

Por otra parte, se estudiaron los compuestos **2** y **16** que demostraron también actividad sinérgica a 1/4 de sus CI<sub>50</sub>. Los resultados para estos compuestos, en la combinación no resultaron con diferencias significativas para el test de Student en relación a los metabolitos excretados. Se observó que el compuesto **16** incrementa la producción de glicina y succinato (como se observa en amarillo en la **Tabla 14**) pudiendo provocar el incremento de la actividad de las siguientes enzimas: *fumarato reductasa glicosomal* dependiente de NADH y *acetil-CoA:glicina C-acetiltransferasa* como se observa en la **Tabla 14 y Figura 54**.

También se estudió el efecto del compuesto **11** en los metabolitos internos por RMN, observándose una acumulación de ciertos metabolitos, mayoritariamente lactato, esto

---

<sup>154</sup> Aguilera, E., Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., de Bilbao, N.V., Cerecetto, H., Álvarez, G., González, M. Looking for combination of benznidazole and *Trypanosoma cruzi*-triosephosphate isomerase inhibitors for Chagas disease treatment. **2018**, *Fundação Oswaldo Cruz*, 3:153-160.

reafirma el posible mecanismo de acción de esta molécula como inhibidor de la triosafosfato isomerasa encargada del metabolismo de intermediarios glucolíticos de tres carbonos, esto lleva a la acumulación de dihidroxiacetona fosfato que es transformada a metilglioxal y luego a lactato.

**Tabla 12.** Señales utilizadas para identificar los metabolitos excretados en el medio de cultivo por epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y.

	Glicina (Gly)	Succinato (Succ)	Piruvato (Pyr)	Acetato (Ace)	Alanina (Ala)	Lactato (Lac)	Etanol (EtOH)
$\delta^a$ (ppm)	3.547	2.391	2.358	2.121	1.465	1.316	1.170
Multiplicidad	s <sup>d</sup>	S	S	s	d <sup>e</sup>	d	t <sup>f</sup>
Rango de integración	3.552 a 3.542	2.402 a 2.376	2.367 a 2.347	2.124 a 2.117	1.488 a 1.436	1.338 a 1.296	1.198 a 1.136
J(Hz) <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	-	-	-	7.24	6.85	7.08

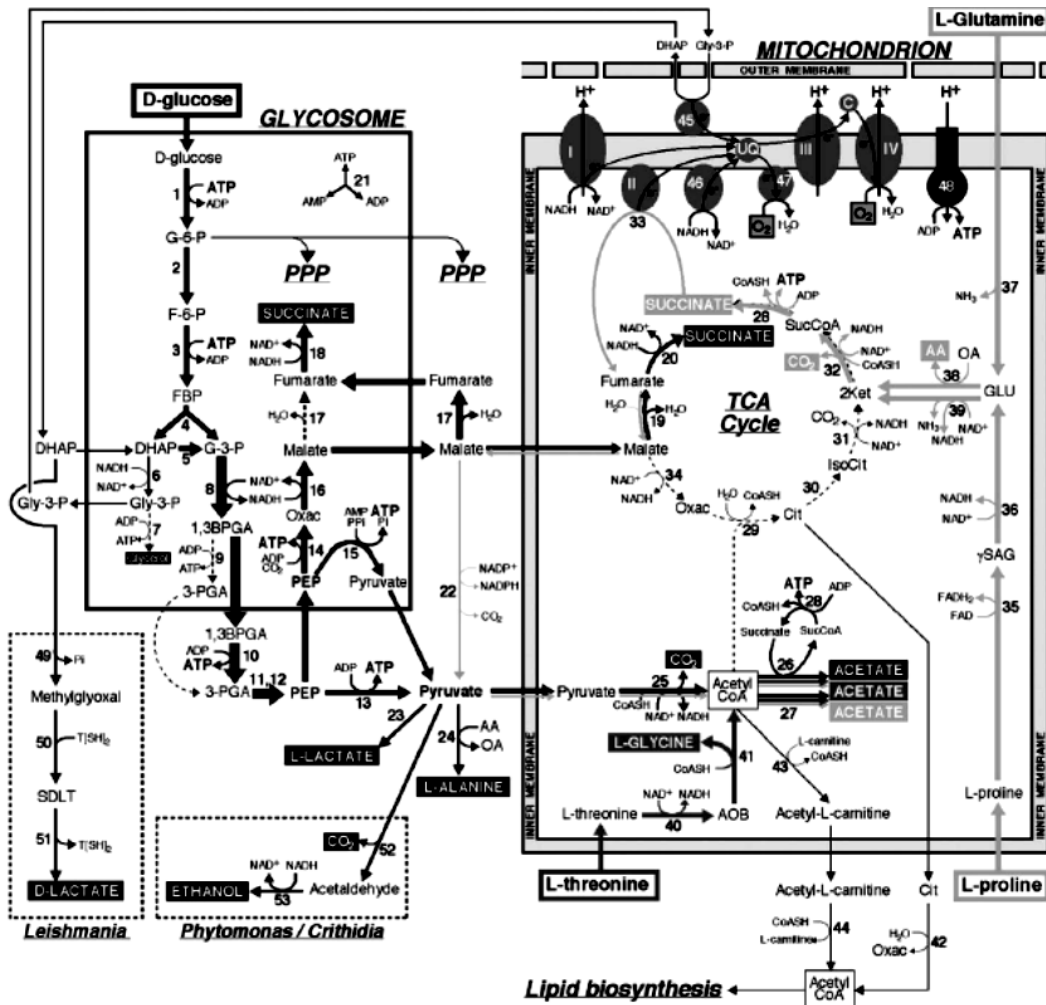
<sup>a</sup> Los valores de  $\delta$  (desplazamiento químico) presentan un error de  $\pm 0.002$ . <sup>b</sup> Los valores de J (constante de acoplamiento) presentan un error de  $\pm 0.03$ . <sup>c</sup> No acopla. <sup>d</sup> Singulete. <sup>e</sup> Doblete. <sup>f</sup> Triplete.

**Tabla 13.** Resultados a partir de los estudios por <sup>1</sup>H-RMN de los metabolitos excretados del compuesto **2** y el **Bnz**.

Metabolito	Gly	Succ	Pyr	Ace	Ala	Lac
<b>Bnz</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub> + <b>2</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub>	1.78 $\pm$ 0.46	4.00 $\pm$ 1.12	3.67 $\pm$ 0.61	11.99 $\pm$ 1.68	9.89 $\pm$ 3.03	4.71 $\pm$ 1.97
<b>Bnz</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub>	2.07 $\pm$ 0.32	4.17 $\pm$ 1.48	5.51 $\pm$ 1.24	12.26 $\pm$ 1.58	9.09 $\pm$ 2.13	5.23 $\pm$ 1.35
<b>2</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub>	1.63 $\pm$ 0.20	4.12 $\pm$ 0.80	4.03 $\pm$ 0.99	12.84 $\pm$ 3.02	8.36 $\pm$ 1.35	4.08 $\pm$ 1.34
Medio	1.46 $\pm$ 0.21	4.46 $\pm$ 0.31	5.00 $\pm$ 1.84	13.56 $\pm$ 2.79	9.37 $\pm$ 1.45	4.71 $\pm$ 1.36

**Tabla 14.** Resultados a partir de los estudios por <sup>1</sup>H-RMN donde se estudian los metabolitos excretados del compuesto **2** y el **16**.

Metabolito	Gly	Succ	Pyr	Ace	Ala	Lac
<b>16</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub> + <b>2</b> $\frac{1}{4}$ IC <sub>50</sub>	1.35 $\pm$ 0.16	5.65 $\pm$ 0.23	7.19 $\pm$ 0.83	13.82 $\pm$ 2.07	9.71 $\pm$ 0.01	4.71 $\pm$ 0.79
<b>16</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub>	1.53 $\pm$ 0.01	7.08 $\pm$ 0.04	6.28 $\pm$ 0.17	13.56 $\pm$ 0.03	10.39 $\pm$ 1.77	4.98 $\pm$ 0.03
<b>2</b> $\frac{1}{4}$ Cl <sub>50</sub>	1.48 $\pm$ 0.13	7.32 $\pm$ 1.33	7.08 $\pm$ 1.26	15.25 $\pm$ 2.26	9.2 $\pm$ 2.4	4.98 $\pm$ 0.30
Medio	1.39 $\pm$ 0.03	5.24 $\pm$ 0.43	4.01 $\pm$ 0.94	11.49 $\pm$ 1.16	8.09 $\pm$ 0.40	3.99 $\pm$ 0.14



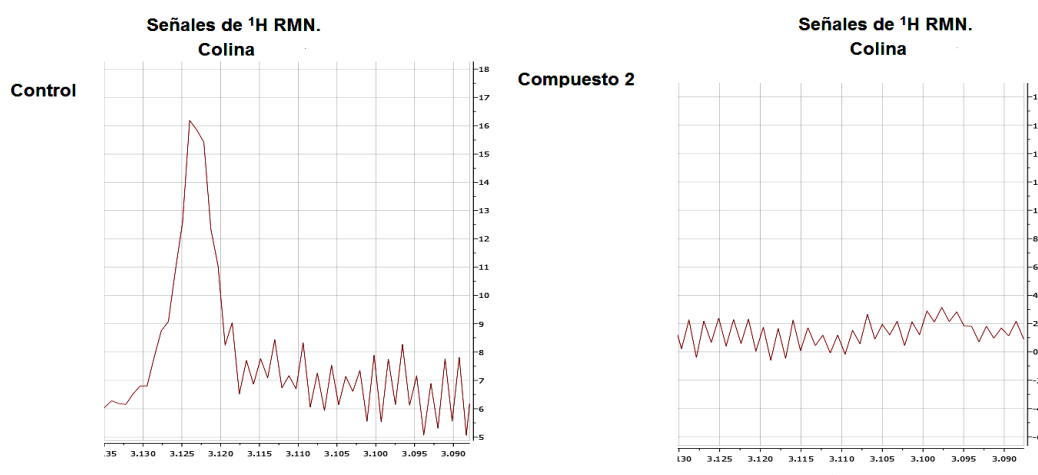
**Figura 54.** Metabolismo de las fuentes de carbono en tripanosomatídeos en un medio rico en glucosa. Flechas oscuras, grises y grises claras representan los pasos enzimáticos del metabolismo de D-glucosa, L-treonina y L-prolina/L-glutamina, respectivamente. Los productos finales excretados (Acetato, Alanina, glicerol, Glicina, Lactato, Succinato y CO<sub>2</sub>) de D-glucosa, L-treonina y L-prolina/L-glutamina están escritos con letras blancas en rectángulos negros, grises o grises claros, respectivamente. Las flechas con diferente grosor representan el flujo metabólico de cada paso enzimático. Las flechas punteadas indican pasos que posiblemente ocurren en un bajo nivel o no ocurren. Se muestra el compartimento glicosomal, el compartimento mitocondrial, el ciclo de los TCA, el vínculo con la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la biosíntesis de lípidos. La membrana mitocondrial externa, que es permeable a metabolitos, sólo se muestra en la vecindad de la cadena de transporte de electrones. Las vías de producción de D-lactato y EtOH (rectángulos punteados) sólo han sido observados en *Leishmania* spp. y *Phytomonas/Crithidia*, respectivamente. Las enzimas involucradas en este proceso catabólico son: 1, hexoquinasa; 2, glucosa-6-fosfato isomerasa; 3, fosfofructoquinasa; 4, aldolasa; 5, triosafosfato isomerasa; 6, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 7, glicerol quinasa; 8, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 9, fosfoglicerato quinasa glicosomal; 10, fosfoglicerato quinasa citosólica; 11, fosfoglicerato mutasa; 12, enolasa; 13, piruvato quinasa; 14, fosfoenolpiruvato carboquinasa; 15, piruvato fosfato diquinasa; 16, malato deshidrogenasa glicosomal; 17, fumarasa glicosomal y mitocondrial; 18, fumarato reductasa glicosomal dependiente de NADH; 19, fumarasa mitocondrial; 20, fumarato reductasa mitocondrial dependiente de NADH; 21, adenilato quinasa glicosomal; 22, enzima málica; 23, enzima desconocida; 24, alanina aminotransferasa; 25, complejo piruvato deshidrogenasa; 26, acetato:succinato CoA-transferasa; 27, enzima desconocida; 28, succinil-CoA sintasa; 29, citrato sintasa; 30, aconitasa; 31, isocitrato deshidrogenasa; 32, complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa; 33, succinato deshidrogenasa (complejo II de la cadena respiratoria); 34, malato deshidrogenasa mitocondrial; 35, L-prolina deshidrogenasa; 36, pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa; 37, L-glutamina deaminasa; 38, glutamato aminotransferasa; 39, glutamato deshidrogenasa; 40, L-treonina deshidrogenasa; 41, acetil-CoA: glicina C-acetiltransferasa; 42, citrato liasa; 43 y 44, acetil-L-carnitina transferasa; 45, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD; 46, NADH deshidrogenasa insensible a rotenona; 47, oxidasa alternativa; 48, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa; 49, reacción espontánea; 50, glioxalasa I; 51, glioxalasa II; 52, piruvato descarboxilasa; 53, alcohol deshidrogenasa ligada a NAD; complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria. (Figura extraída de la referencia <sup>155</sup>)

<sup>155</sup> Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **2006**, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 149: 1-9.

### 6.3.7. Detección de apoptosis y apoptosis / necrosis tardía en *Trypanosoma cruzi* por $^1\text{H}$ -RMN.

Ha sido descrito que es posible conocer si una célula muere por necrosis o apoptosis a través de los cambios en el recambio de lípidos y la estructura de la membrana por  $^1\text{H}$ -RMN <sup>127 128</sup>. En nuestro grupo y en antecedentes anteriores se ha descrito que en los sistemas celulares cuya muerte es por apoptosis, la relación entre las intensidades de metileno ( $\text{CH}_2$ ) (1.3 ppm) y el grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) (0.9 ppm), debido a los lípidos de membrana, aumenta <sup>156</sup>. Sin embargo, para la necrosis se observa que la señal de colina (3.10-3.30ppm) desaparece <sup>120</sup>. El origen celular de estas resonancias se debe principalmente a la presencia mayoritaria de cadenas laterales de los triacilglicéridos. Los estudios de  $^1\text{H}$ -RMN corroboraron los resultados obtenidos por citometría de flujo (ver más adelante). En este estudio se incluyeron los fármacos de referencia **Nfx** y **Bnz**.

Para el compuesto **2** se observó que los parásitos probablemente estén experimentando necrosis ya que la señal de la colina desaparece como se muestra a modo de ejemplo en la **Figura 55**. La señal de la colina en el control está presente. Lo mismo sucedió para el compuesto **11** y para **Nfx**. Para el compuesto **16** y **Bnz** no se observaron los cambios en el espectro característicos ni de apoptosis ni de necrosis (ver **Figura A1** del anexo).



**Figura 55.** Estudio de muerte celular por RMN. Se observa el control del ensayo donde se visualiza la señal de la colina (parásitos sin tratamiento) y los parásitos tratados con el compuesto **2**.

<sup>156</sup> Gui-you, Z., Rui-yu, Z. H. U., Ye, X. U., Yong-bin, Y. A. N., Yao-ren, D. A. I. Increase in Methylene Resonance Signal Intensity Is Associated with Apoptosis in Plant Cells as Detected by  $^1\text{H}$ -NMR. **2004**, *Acta Bot. Sin.*, 46:711–718.



**Tabla 15.** Relación entre CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> entre los diferentes tratamientos y el control.

Tratamiento de los parásitos	Relación CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub>
<b>Control</b>	0.27
<b>Nfx</b>	0.25
<b>Bnz</b>	0.50
<b>2</b>	3.00
<b>11</b>	0.18
<b>16</b>	0.06

Como se mencionó anteriormente un incremento en la relación CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> sugiere que los parásitos estarían muriendo por apoptosis. Dado los resultados que muestra la **Tabla 15** el tratamiento de los parásitos con compuesto **2** presenta claramente espectros con un aumento considerable de este cociente, por lo que en este caso se podría sugerir que el compuesto **2** estaría produciendo apoptosis y necrosis (apoptosis tardía).

6.3.8. *Análisis de viabilidad y mecanismo de muerte celular en Trypanosoma cruzi por citometría de flujo para Nfx, Bnz, 2, 11, 16 y 2+16.*

Para el estudio de viabilidad de las células se utilizó el marcador CA-AM que no es fluorescente, pero al ser internalizada por las células vivas, la actividad de las enzimas esterasas de las células vivas, transforma la CA-AM en calceína (CA) que si es fuertemente fluorescente <sup>157</sup>.

Para el análisis de viabilidad de los parásitos se realizaron incubaciones de 6 y 24 horas con los compuestos **Nfx, Bnz, 2, 11, 16** y **2+16** usando una concentración correspondiente a 20 × Cl<sub>50</sub> (5 μM, 0.6 μM y 0.04 μM para el compuesto **2, 11** y **16**, respectivamente). Dado que la metodología empleada para la determinación del Cl<sub>50</sub> se basa en 5 días de incubación <sup>102</sup>, se emplearon dosis 20 veces más altas para analizar la viabilidad y el mecanismo de muerte celular a los tiempos antes mencionados. En base a las observaciones *in vitro* que mostraban que la combinación de compuestos más efectiva (tanto sea por la relación molar como el FICI) fue para los compuestos **2+16**, se estudió si existía un cambio tanto en el patrón de viabilidad como en el mecanismo de muerte con respecto a los compuestos independientes.

<sup>157</sup> Gil-Loyzaga, P. Cultivo de Células Animales Y Humanas, Aplicaciones en Medicina Regenerativa. 2011, Ed. Visión Libros, Madrid, España, ISBN 13: 9788499837376.

En función de los resultados de la marcación con CA-AM/IP, se observó para el compuesto **2** un 82 % y 98 % de parásitos doblemente marcados luego de 6 y 24 horas de incubación respectivamente, lo cual es compatible con una muerte celular por apoptosis/necrosis tardía como fue descrito recientemente en *Leishmania* (**Figura 56**)<sup>158</sup>, ya que al ser CA+/IP+ sugiere que cambia la permeabilidad de la membrana plasmática (sin romperse la integridad de la misma) y de la membrana nuclear.

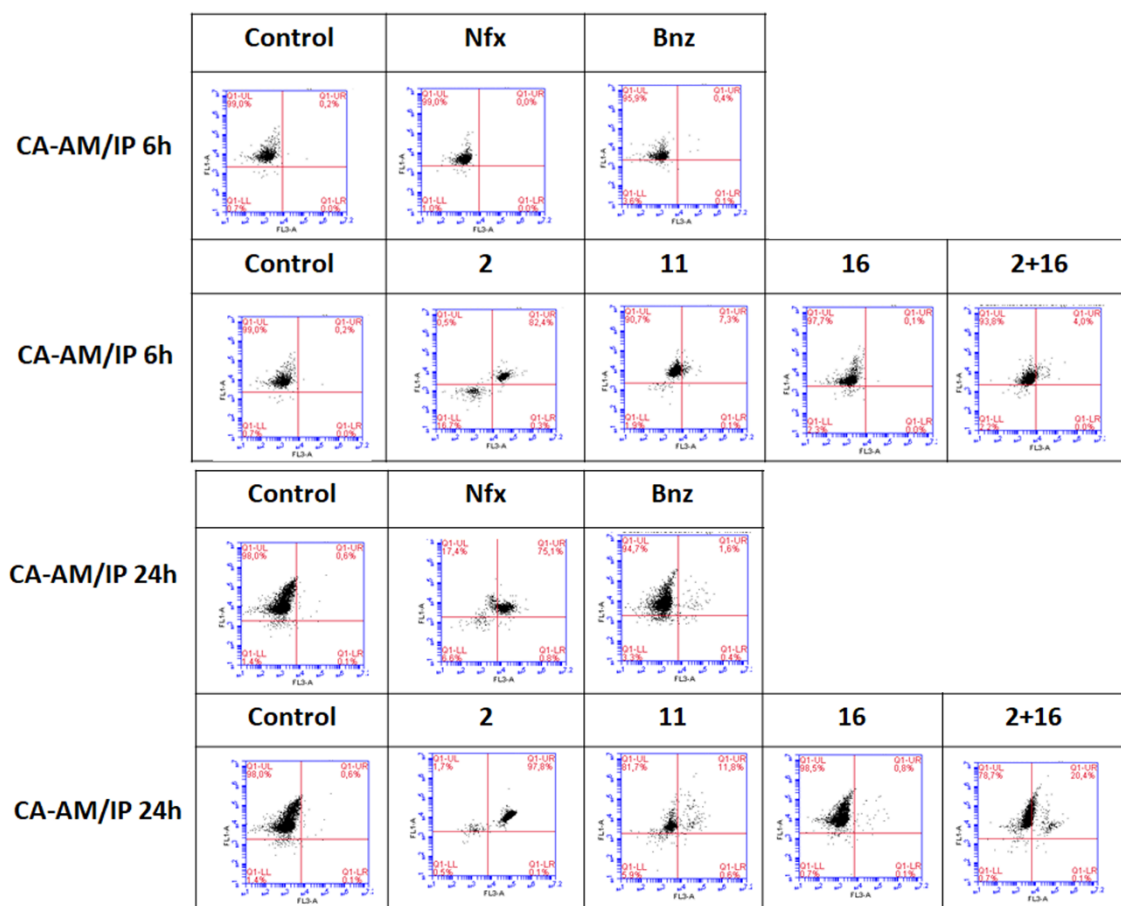
Para el compuesto **11**, el mecanismo de muerte observado sugiere también un posible mecanismo de muerte celular por apoptosis tardía, dado que se observa un leve corrimiento de las células hacia la zona CA+/IP+ en presencia del compuesto a las 6 horas (7.3 %) y a las 24 horas (11.8 %) (**Figura 56**). Para el compuesto **16** no hay cambios significativos según la **Figura 56** con el control (la mayoría de las células son CA+). Sin embargo en la combinación de **2 + 16**, tanto sea para las 6 horas o 24 horas hay un leve corrimiento hacia la zona de CA+/IP+ como se observa en el compuesto **11** (4 % y 20 % respectivamente) lo que estaría indicando como se menciona anteriormente indicios de apoptosis tardía. Para los fármacos de referencia, específicamente para **Nfx**, a las 24 horas se observa una doble marcación de los parásitos CA+/IP+ que estaría indicando una apoptosis tardía. No se observa cambios para los parásitos tratados con **Bnz**.

En cuanto a los resultados para los compuestos, al estudiar viabilidad celular, sorprendentemente para el compuesto **11** y **16**, parecería que no afectara la viabilidad de los parásitos, lo que no concuerda con los hallazgos *in vitro* según la **Tabla 3**. Esto podría explicarse por la diferencia en los tiempos de acción de los compuestos, dado que los ensayos *in vitro* son el resultado de incubaciones a 5 días y los ensayos de viabilidad son realizados en un máximo de 24 horas. Una hipótesis podría ser que el compuesto tenga una cinética de entrada al parásito lenta o que el mecanismo de acción no esté vinculado a procesos de apoptosis o necrosis. También estos resultados según Montella, *et al.*<sup>159</sup>, podría explicar que el parásito use la activación de las esterasas como un mecanismo de resistencia, ya que la activación de estas enzimas pueden modificar por efecto hidrolítico a diferentes componentes en la célula, como proteínas, lípidos o carbohidratos. Por lo tanto, la no modificación de la actividad de las esterasas o inclusive la activación puede ser interpretado como mecanismo de defensas del parásito<sup>159</sup>. Entonces como perspectiva de esto, sería interesante evaluar la actividad esterasa luego de 5 días.

---

<sup>158</sup> Basmacıyan, L., Azas, N., Casanova, M. Calcein+/PI- as an early apoptotic feature in *Leishmania*. **2017**, *PLoS ONE*, **17**: e0187756.

<sup>159</sup> Montella, I. R., Schama, R., Valle, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance. **2017**, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **107**:437-449.

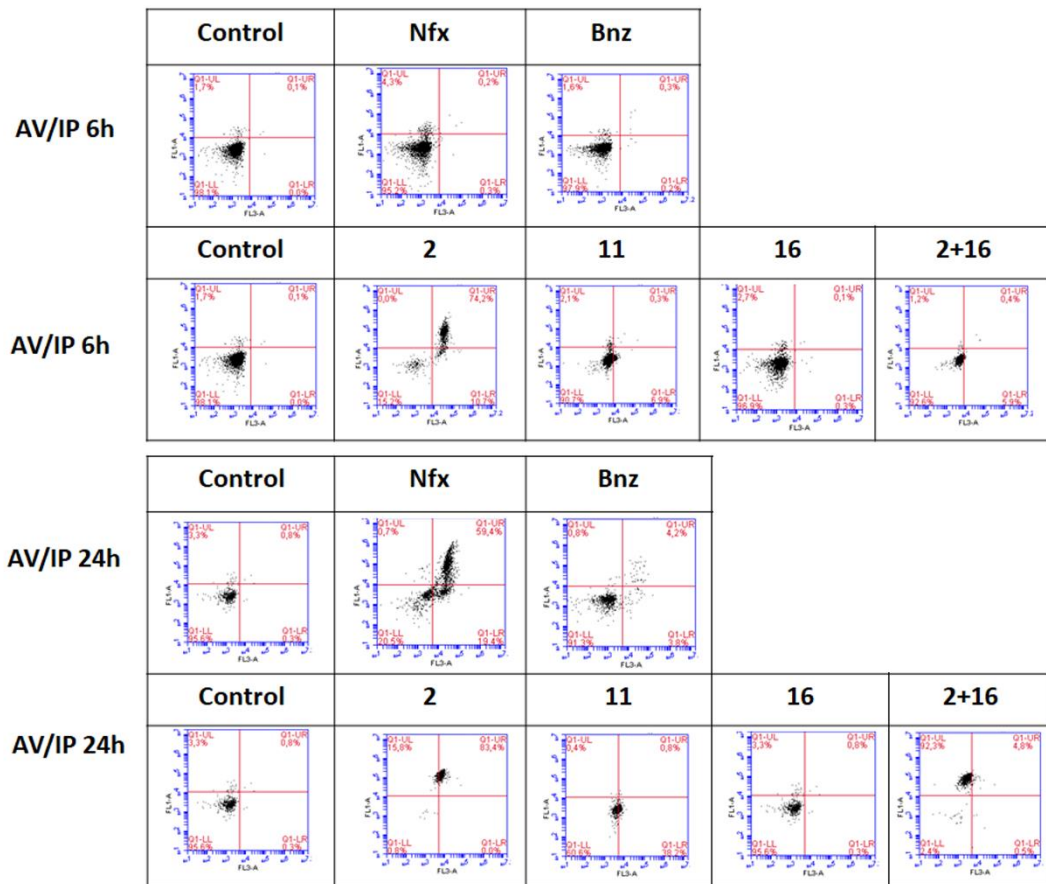


**Figura 56.** Análisis de la viabilidad y mecanismo de muerte por citometría de flujo inducido en los parásitos a las 6 horas y 24 horas de incubación a una concentración  $20 \times CI_{50}$  de **Nfx**, **Bnz**, **2**, **11**, **16** y **2 + 16**. La viabilidad y el mecanismo de muerte fue analizados mediante kit comerciales usando reactivos fluorescentes como la calceína e IP utilizando citometría de flujo.

Con respecto al análisis del mecanismo de muerte celular de los parásitos tratados con  $20 \times CI_{50}$  a través de la marcación con AV e IP (**Figura 57**), se observa que para el compuesto **2**, los parásitos están doblemente marcados lo que concuerda con los resultados que se muestran en la **Figura 56** lo que estaría indicando que el mecanismo de muerte del compuesto sería por apoptosis tardía (74 % a las 6 horas vs 84 % a las 24 horas). Para el compuesto **11**, se estarían observando indicios que los parásitos mueren por necrosis ya que a las 6 horas hay una marcación de IP+ del 7 % vs un 38 % a las 24 horas. Sin embargo y como se refleja en la **Figura 56** al ser CA+ los parásitos tratados con **11** a las 24 horas y según la bibliografía, los parásitos podrían estar muriendo por apoptosis tardía por aumento en la permeabilidad de las membranas y membrana nuclear. Para el compuesto **16** no se observan diferencias significativas respecto al control por lo que no se puede concluir, según estos

resultados, el mecanismo de muerte para esta molécula aunque anteriormente se discute que los parásitos podrían estar actuando manteniendo activas a las esterases como mecanismo de defensa <sup>150</sup>.

Por último, lo que es interesante de observar es que para la combinación de **2 + 16** hay un cambio en el mecanismo de muerte respecto a los compuestos independientes (**2** y **16**), matando a los parásitos por apoptosis ya que a las 24 horas se observa que la población es AV+/IP-, no observando cambios significativos a las 6 horas. Para los fármacos de referencia, se observa que el mecanismo de muerte que ocasiona el **Nfx** en los parásitos reafirma lo que se muestra en la **Figura 57**, que los parásitos mueren mayoritariamente por apoptosis tardía por la doble marcación AV+/IP+ mayoritariamente (59 %) a las 24 horas, no observando grandes diferencias a las 6 horas. Sin embargo, no se observa apoptosis, apoptosis tardía ni necrosis para el otro fármaco de referencia, **Bnz**. Estas similitudes en el mecanismo de muerte celular coinciden con los resultados del análisis de <sup>1</sup>H-RMN. Al no observar apoptosis, apoptosis tardía ni necrosis para **Bnz** y para el compuesto **16** estaría sugiriendo la participación de otro mecanismo de muerte celular.



**Figura 57.** Análisis del mecanismo de muerte por citometría de flujo inducido en los parásitos a las 6 horas y 24 horas de incubación a una concentración  $20 \times CI_{50}$  de **Nfx**, **Bnz**, **2**, **11**, **16** y **2 + 16**. La viabilidad y el mecanismo de muerte fueron analizados mediante kit comerciales usando reactivos fluorescentes como la AV e IP utilizando citometría de flujo.

Con estos resultados se puede concluir que tanto en  $^1H$ -RMN como en citometría de flujo se obtiene los mismos resultados para todas las situaciones estudiadas. A excepción del **Nfx** que no se observa apoptosis tardía por  $^1H$ -RMN pero si necrosis. Aún no se conoce, el mecanismo de muerte que ocasiona el compuesto **16** ni **Bnz** en los parásitos (aunque se puede plantear la hipótesis de que puedan producir la activación de las esterasas como mecanismo de defensa). El mecanismo de muerte de la combinación de **2+16** mostró que los parásitos mueren por apoptosis temprana mayoritariamente. Esto es menos invasivo para el huésped que la necrosis o apoptosis tardía que provoca procesos de inflamación en el huésped como se menciona en la introducción. En concordancia con lo observado en los estudios histopatológicos donde los infiltrados de células del sistema inmunitario eran menores en los grupos tratados (**Figura 33**).

#### 6.4. Parámetros farmacocinéticos de las moléculas más relevantes

##### 6.4.1. Análisis del metabolismo *in vitro* de los compuestos **2**, **11** y **16** por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

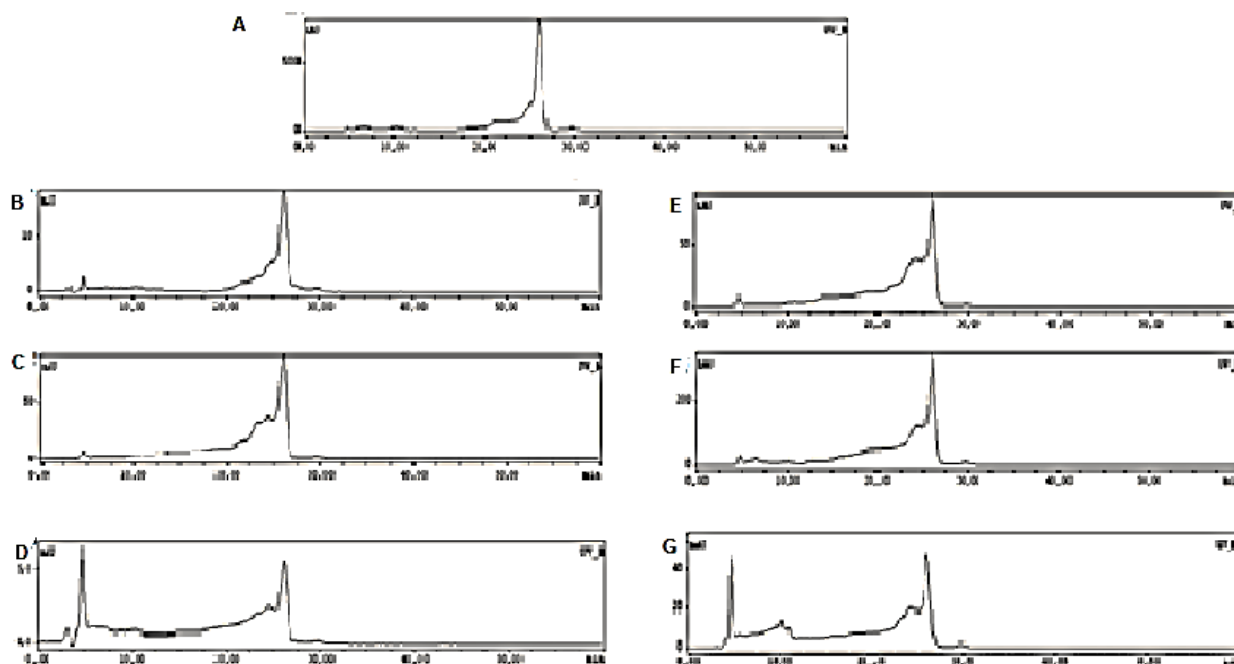
El análisis cualitativo de la metabolización *in vitro* por la fracción microsomal (FM) y citosólica (FC) de hepatocito de rata de los compuestos **2**, **11** y **16** se realizó mediante la técnica de HPLC en fase reversa. Para esto se ejecutó el seguimiento de la metabolización a diferentes tiempos (0, 30 y 60 minutos).

Tanto sea en la FC, como en la FM de los hepatocitos tratados con los compuestos **2** y **11** se observa que a partir de una hora, más del 50 % de los compuestos se transforma en otros compuestos generalmente más hidrofílicos que los mismos, ya que aparecen señales con un tiempo de retención menor. En la **Figura 58** se muestra a modo de ejemplo para el compuesto **2** la metabolización del compuesto con la FC y FM a diferentes tiempos.

En la **Figura 58 A** se visualiza el cromatograma correspondiente al compuesto **2** sin metabolización. En la **Figura 58 B** se visualiza la FC incubada con **2** a tiempo 0, donde se observó que el pico principal correspondiente al compuesto no desaparece, pero comienza a observarse un pequeño hombro con tiempo de retención menor que correspondería a una estructura más hidrofílica (la metabolización es parcial y no total). En la **Figura 58 C** se muestra el cromatograma de la FC incubado con **2** durante 30 minutos donde se observa un hombro más pronunciado con tiempo de retención menor al igual que en el caso de la FC a tiempo 0. En la **Figura 58 D** se observa la FC incubado con el compuesto **2** durante 60 minutos, en este caso la mayoría del compuesto se ha modificado en un compuesto más hidrofílico dado su tiempo de retención, quedando menos del 25 % del compuesto original. En la **Figura 58 E-G** se observa lo mismo en la FM que en la FC para el compuesto **2** a tiempo 0, 30 y 60 min.

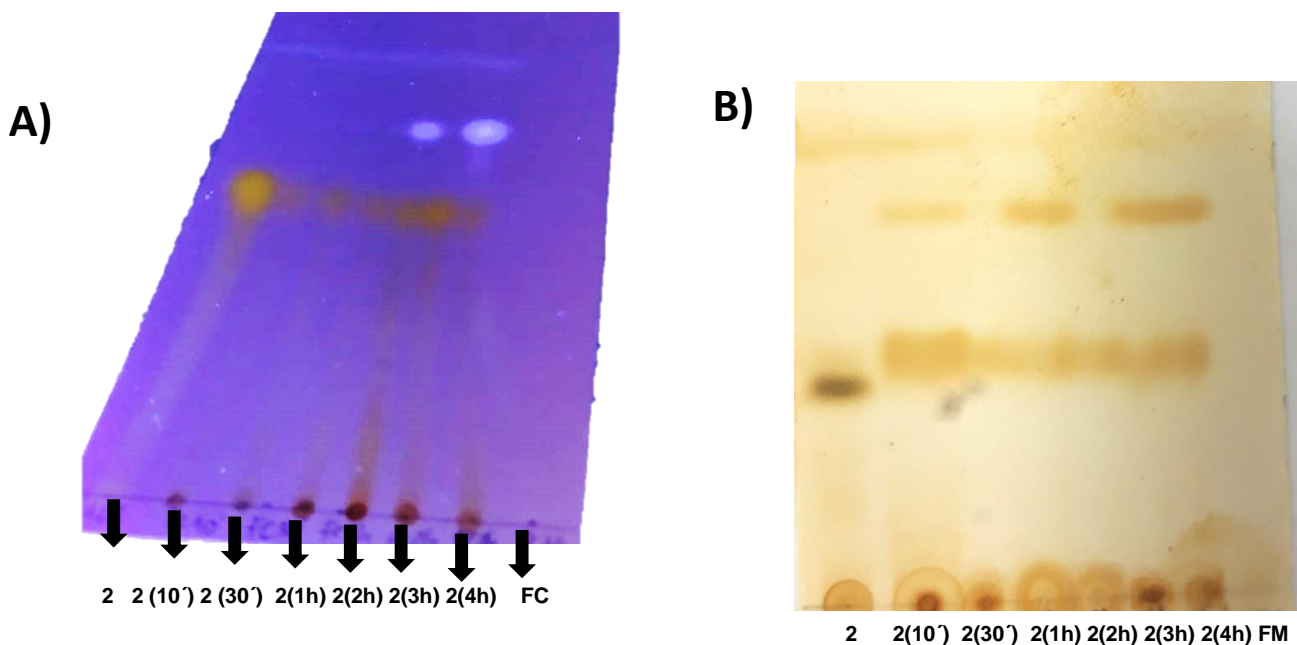
Para los compuestos **2** y **11** como se puede visualizar en la **Figura 58** y en la **Figura A2** de Anexo, a medida que transcurre el tiempo se van observando nuevos productos de metabolización. A la hora de metabolización del compuesto **11**, se observó la aparición de otros productos y la desaparición del mismo (se observa en el cromatograma picos con tiempo de retención menor al compuesto que corresponden a moléculas más hidrofílicas). Para el compuesto **2** se observó algo similar, sin embargo, a la hora, tanto en la FM, como en la FC (si bien hay moléculas más hidrofílicas que el compuesto **2**) la modificación del mismo no es tan rápida como el compuesto **11**. Por último, el compuesto **16** es el que menos se modifica, ya que a la hora mayoritariamente se observó el pico correspondiente al compuesto (según la **Figura**

A3 del anexo), observándose un pico de mucha menor intensidad con tiempo de retención mayor que correspondería a una molécula más apolar que el compuesto de partida.



**Figura 58.** Estudio de metabolización del compuesto **2** mediante HPLC. **A)** **2** (disolución en DMSO a una concentración de 0.4 mM) medido de 440 nm de absorción y 550 nm de emisión, utilizando como fase móvil agua (H<sub>2</sub>O) y ácido trifluoroacético (0.05%): Acetonitrilo, 50:50. **B)** FC+**2** a 0.4 mM (tiempo de incubación: 0 min). **C)** FC+**2** a 0.4 mM (tiempo de incubación: 30 minutos). **D)** FC+**2** a 0.4 mM (tiempo de incubación 60 min hora). **E)** FM + **2** a 0.4 mM (tiempo de incubación 0 min). **F)** FM+**2** a 0.4 mM (tiempo de incubación a 30 minutos). **G)** FM+**2** a 0.4 mM (tiempo de incubación 60 min).

Por otro lado, se siguió para los tres compuestos el metabolismo *in vitro* para la FC y la FM hasta las 4 horas analizando por TLC (SiO<sub>2</sub>, hexano:acetato de etilo, 7:3). A partir de los 10 minutos comienza a quedar retenido un compuesto en el origen, apareciendo un nuevo compuesto apolar luego de las 2 horas, En la **Figura 59 A** se muestra a modo de ejemplo para el compuesto **2** la TLC de la FC desde los 10 minutos hasta las 4 horas y en la **Figura 59 B** la FM en el mismo lapso de tiempo.



**Figura 59.** Cromatografía en capa fina del compuesto **2** a los tiempos: 0, 10', 30', 1h, 2h, 3h y 4 h. **A)** FC revelada por UV, **B)** FM revelada con yodo.

Se concluye en esta etapa del trabajo que tanto sea para los compuestos **2** y **11** los tiempos de vida media en la FC y FM de hepatocitos de rata son menores en la FM que en la FC. Como se puede observar en la **Figura 59 B** a los 10 minutos de estar en contacto el compuesto **2** con la FM de hepatocitos de rata, se observa la aparición de metabolitos.

En cuanto a la estructura y el metabolismo, la influencia de los ciclos de 6 carbonos y 5 carbonos no parece afectar la estabilidad metabólica de estas moléculas. Tanto sea la molécula **2**, como la **11** se metabolizan más rápidamente en las condiciones de estudio. Para el compuesto **16** la estabilidad es mayor. Esto estaría mostrando que el heterociclo, tienilo versus furilo, estaría influyendo en la mayor estabilidad <sup>160</sup>.

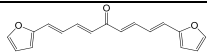
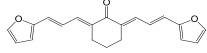
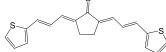
<sup>160</sup> Chen, L.J., DeRose, E.F., Burka, L.T. Metabolism of furans *in vitro*: Ipomeamine and 4-Ipomeanol. **2006**, *Chem. Res. Toxicol.*, 19:1320-1329.



#### 6.4.2. Estudio de la fluorescencia intrínseca de los compuestos

Se realiza el estudio de la fluorescencia intrínseca de las más relevantes arilidenonas para realizar estudios *in vitro* de distribución y penetración y, eventualmente, de distribución *in vivo*. Se estudió la fluorescencia intrínseca de los líderes de esta serie de arilidenonas, específicamente de los compuestos **2**, **11** y **16**. Se analizaron tres disolventes: acetonitrilo, dimetilsulfóxido y etanol. Para los compuestos **2** y **11** el disolvente con mayor sensibilidad fue el etanol, ventaja a destacar ya que el mismo puede ser utilizado para ensayos *in vivo*, no así sucedió para el compuesto **16** ya que el mejor disolvente fue el dimetilsulfóxido. En la **Tabla 16** se expresa la longitud de onda máxima de absorción para los tres compuestos y se recogen los datos de emisión.

**Tabla 16.** Datos espectroscópicos de los compuestos en estudio

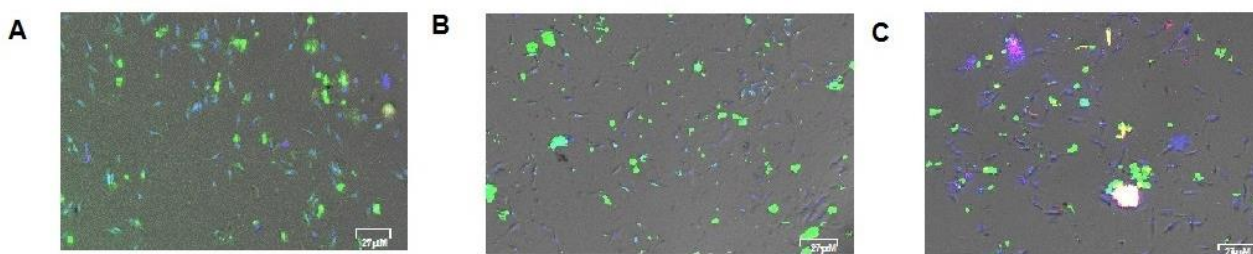
Compuesto	Estructura	LOmax abs* (nm)	LOmax em (nm)**
<b>2<sup>a</sup></b>		<b>440</b>	<b>550</b>
<b>11<sup>a</sup></b>		<b>430</b>	<b>550</b>
<b>16<sup>b</sup></b>		<b>450</b>	<b>570</b>

\*Longitud de onda máxima de absorción \*\*Longitud de onda máxima de emisión. <sup>a</sup> Disuelto en etanol. <sup>b</sup> Disuelto en DMSO.

Mediante microscopía de fluorescencia se pueden seguir los tiempos que el compuesto entra en el parásito y seguir el porcentaje de vida y muerte a diferentes concentraciones. Esto último es de mucha utilidad para los estudios de mecanismo de acción donde se ve la célula en contexto global y se necesita ajustar dosis y tiempos para lograr ver los cambios metabólicos que llevan a la muerte de la célula. También es de utilidad en los estudios *in vivo* de biodistribución de estas moléculas fluorescentes por técnicas de imagenología molecular, permiten el ajuste de dosis y tiempos de administración para el modelo murino de la enfermedad de Chagas.

Dado los excelentes resultados *in vitro* de la combinación con el compuesto **2+16** y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se estudió que sucedía a los 30 min. en los parásitos tratados con los compuestos **2** y **16** en monoterapia y en la combinación. Para ello se utilizó  $\frac{1}{4}$  de los  $CI_{50}$  de los compuestos ya que es la concentración con menor FICI en la combinación, se empleó además marcadores de núcleo (Hoechst 361/497) y marcadores de membrana (WGA 495/519). Se observó que a la media

hora para los compuestos **2** y **16**, no se visualiza la presencia de dichos compuestos en los parásitos como lo muestra la **Figura 60 A** y **B**. Sin embargo, para la combinación **2+16** se puede ver que comienza a aparecer compuestos en los parásitos (rojo en **Figura 60 C**). A su vez en este tipo de imágenes que utilizan marcadores de membrana y de núcleo se puede visualizar, además, el tipo de muerte que estos compuestos podrían ocasionar en el parásito. Lo anterior se confirma por la presencia de dichos marcadores en los parásitos, ya que se debería observar la forma característica de los parásitos, como lo muestra la **Figura 60 A**, con la membrana en color verde y el núcleo en azul. Sin embargo, en las **Figura 60 B** y **60 C** comienza a apagarse en mayor medida el color verde, y la forma del núcleo no comienza a ser tan definida (punto azul definido en la **Figura 60 A**).



**Figura 60.** Microscopía de fluorescencia de los parásitos tratados durante 30 minutos con los compuestos más relevantes. **A)** Compuesto **16** más los parásitos a una concentración de un cuarto de su  $CI_{50}$  tratados durante 30 minutos. **B)** Compuesto **2** más los parásitos a una concentración de un cuarto de su  $CI_{50}$  tratados durante 30 minutos. **C)** Compuesto **2+16** más los parásitos a una concentración de un cuarto de su  $CI_{50}$  tratados durante 30 minutos. En verde se visualiza la membrana de los parásitos marcados con WGA; en azul se visualiza material genético marcado con Hoechst y en rojo los compuestos.

Según estos estudios concluimos que los compuestos ingresan al parásito luego de los 30 minutos cuando son administrados en combinación, no siendo así para la monoterapia en donde los compuestos tardan más tiempo en entrar al parásito y por ende hacer su efecto. Esto podría ser parte del efecto sinérgico que observamos en los estudios anteriores.

6.4.3. *Parámetros farmacocinéticos con SwissADME de las moléculas más relevantes.*

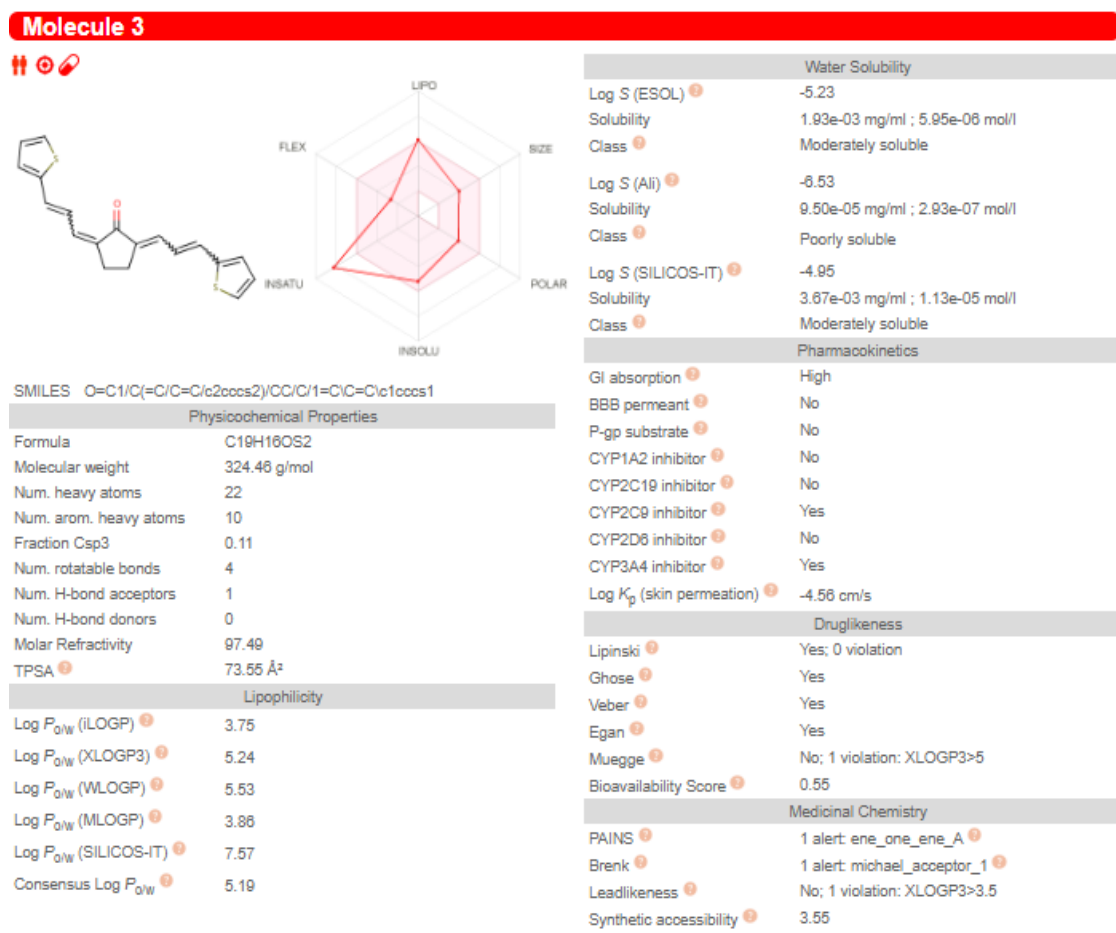
El desarrollo de una molécula como futuro fármaco implica la evaluación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Modelos informáticos como SwissADME se utilizan para predecir parámetros farmacocinéticos, en el proceso de descubrimiento de moléculas prometedoras como futuros fármacos. Además, cuando los materiales y reactivos de síntesis nuevas moléculas son costosos, y se debe elegir las moléculas con mejor perfil como fármaco (*drug-like*), estos paquetes informáticos sirven de herramientas para diseño y selección de futuras nuevas moléculas. La herramienta web SwissADME brinda acceso gratuito a un grupo de modelos predictivos rápidos y robustos para propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, basada en similitud con fármacos, entre los que se encuentran los métodos internos como el BOILEDegg, iLOGP y biodisponibilidad en el organismo. Se garantiza una entrada e interpretación de datos fáciles y eficientes gracias a un interfaz agradable al usar a través del sitio web sin inicio de sesión (<http://www.swissadme.ch>). Se utiliza dicha herramienta para analizar parámetros farmacocinéticos, para las moléculas **2**, **11** y **16** (Tabla 17).

**Tabla 17.** Análisis usando SwissADME para los compuestos **2**, **11** y **16**.

Molécula	Solubilidad en agua (mg/mL)	Absorción gastrointestinal	Absorción de la Barrera Hematoencefálica	Inhibidor CYP	Permeabilidad en piel (cm/s)	xLogP	Motivos PAINS
<b>2</b>	Moderada $4,9 \cdot 10^{-2}$	Alta	Sí	1A2, C19, C9	-5,4	>3,5	Aceptor de Michael y Polieno
<b>11</b>	Moderada $6,7 \cdot 10^{-3}$	Alta	Sí	1A2, C19, 2A4	-4,9	>3,5	Aceptor de Michael y Polieno
<b>16</b>	Moderada $1,9 \cdot 10^{-3}$	Alta	No	2C9	-4,6	5,2	Aceptor de Michael y Polieno
<b>Bnz</b>	Alta 2,3	Alta	No	no	-7,2	3,7	Grupo nitro

Estos datos sugieren que todas las moléculas líderes en este trabajo poseen un perfil tipo fármaco para la enfermedad de Chagas ya que, a pesar de presentar motivos PAINS, no son inhibidores de muchos CYP predominando en estos resultados el compuesto **16** (sugiere que puede ser metabolizado por el organismo fácilmente) y además presentan buenos parámetros para permear la membrana de las células ( $x\text{LogP} > 3,5$ ). A la vez al presentar alta absorción gastrointestinal también sugiere que pueden ser administrados por vía oral, con un potencial ingreso adecuado al organismo. También presentan moderada solubilidad en agua y en el caso de **16**,

como **Bnz**, no atravesarían la barrera hematoencefálica lo que sugiere que estas moléculas podrían solubilizarse adecuadamente al entrar al organismo y no tener acción en el sistema nervioso central, evitando posibles efectos secundarios en el cerebro. A modo de ejemplo se visualiza en la **Figura 61** los resultados completos para la molécula **16**, en la salida original del software utilizado.



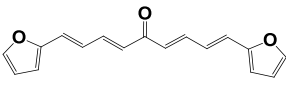
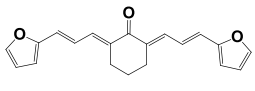
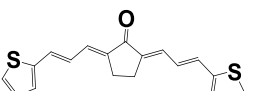
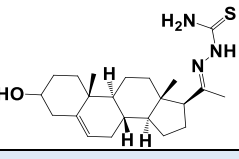
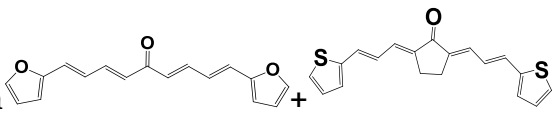
**Figura 61.** Análisis de la molécula **16** en el programa computacional SwissADME.

## **Conclusiones y Perspectivas**

Se sintetizaron y caracterizaron 11 nuevas arilidenonas en condiciones amigables con el ambiente, obtenidas en general con rendimientos altos a excepción del compuesto 18 (33%). También se caracterizaron biológicamente 11 nuevas moléculas esteroideas y 14 pirazolininas. De las 11 arilidenonas caracterizadas biológicamente 10 presentaron actividad frente a *T. cruzi* menor con una  $CI_{50}$  menor a 25  $\mu$ M, destacándose el compuesto **16** con un  $CI_{50}$  de 40 nM, 200 veces más activo que el fármaco de referencia **Nfx** (Tabla 18). Además, se obtuvieron índices de selectividad excelentes con respecto a las células de mamífero. En cuanto a las moléculas esteroideas, los derivados arilidencetónicos no fueron activos contra *T. cruzi*, sin embargo, los derivados de tiosemicarbazonas precursoras de los análogos esteroideos al **LÍDER II** fueron más activos que los anteriores, destacándose la molécula **27** con eficacia y baja toxicidad *in vivo*. En cuanto a las pirazolininas, no hay una clara relación estructura-actividad como se observa con las demás moléculas. Sin embargo, en la mayoría de las mismas fueron inactivas (a excepción de los compuestos **33**, **40**, **41** y **42**).

De las combinaciones ensayadas *in vitro* se obtuvieron excelentes resultados para las combinaciones **2+16**; **2+11**; **2+LIDERII**; **16+LIDERII**, ya que las mismas resultaron sinérgicas al ser evaluadas en la forma epimastigote de *T. cruzi*. También se ensayaron algunas combinaciones con la mínima cantidad de **Bnz** posible (de acuerdo al modelo *in vivo* de diferentes dosis de **Bnz** ensayadas para el modelo agudo de Chagas, la dosis mínima donde comienza a disminuir la cantidad de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* es 38  $\mu$ moles/kg/día). La única combinación ensayada que tuvo efectos sinérgicos fue la combinación de **2+Bnz**. Ninguna combinación ensayada con el compuesto **27** tuvo efectos positivos al combinarla con las arilidenonas (**2**, **11** y **16**).

**Tabla 18.** Perfil farmacológico de los compuestos más relevantes.

2	11	16	27
			
<b>Actividad <i>In vitro</i> anti-<i>T. cruzi</i> (múltiples cepas)</b>			
CI <sub>50</sub> 5 μM epimastigotes	CI <sub>50</sub> 0.6 μM epimastigotes	CI <sub>50</sub> 0.04 /7.2 μM epi/tripomastigotes	CI <sub>50</sub> 1.2/0.1 μM epi/amastigotes
Índice de selectividad > 10 (CI <sub>50</sub> células de mamífero/CI <sub>50</sub> parásitos)			
<b>Inhibición Triosafosfato isomerasa</b>			
CI <sub>50</sub> 3 μM	CI <sub>50</sub> 86 nM	CI <sub>50</sub> 4.7 μM	No inhibición
<b>Inhibición Cruzipaina</b>			
CI <sub>50</sub> 100 μM	CI <sub>50</sub> 37 μM	CI <sub>50</sub> 42 μM	No inhibición
<b>Inhibición biosíntesis de esteroides de membrana</b>			
Si	No	no	Nd
<b>Estabilidad metabólica <i>in vitro</i></b>			
Baja	Baja	moderada	Alta
<b>Toxicología y Eficacia</b>			
<p>Test Ames negativo (no mutagénicos)</p> <p>Test de micronúcleos negativo (no genotóxico)</p> <p>LD<sub>50</sub> 2000 mg/kg peso en ratón</p> <p>Efectos teratogénicos a más de 7 dosis de la efectiva (compuestos 2 y 11)</p>			
<b>Control de la parasitemia <i>in vivo</i> en el modelo murino de la Enfermedad de Chagas (expresado como disminución del máximo de parasitemia respecto al grupo sin tratamiento)</b>			
50 % a 192 μmoles/kg	75 % a 384 μmoles/kg	80 % a 1.5 μmoles/kg	82 % a 127 μmoles/kg
<p>Mejor combinación </p> <p>90 % a 192+1.5 μmoles/kg</p>			

Con la combinación de **2+16** (192  $\mu$ moles/kg/día para **2** y 1.5  $\mu$ moles/kg/día para **16**) se mejoró casi el doble la acción tripanosomicida de **2**. En el análisis histopatológico, no se encuentran diferencias significativas entre el control (animales sin tratar) y la combinación **2+16** en hígado, bazo y riñones. Sin embargo, en el tejido cardíaco de los animales sin tratamiento se observa una importante inflamación (dado la visualización de infiltrado linfocitario) y nidos de amastigote, sin observarse esta situación en tejido cardíaco de los animales que recibieron dicha combinación. Los resultados *in vivo* para las combinaciones sinérgicas *in vitro*, **2+11** y **16+LIDERII**, no fueron buenos. En la mayoría de los casos donde se ensayaron proporciones molares no óptimas según los resultados obtenidos de los isobogramas *in vitro*, se obtuvieron peores resultados que en la monoterapia *in vivo*, de la misma forma que cuando se respetó la proporción óptima se obtuvieron buenos resultados *in vivo*, mejor que en la monoterapia. Podemos concluir que el método *in vitro* es bueno para identificar combinaciones sinérgicas (proporción óptima) con eficacia *in vivo*.

Las moléculas con mejor actividad tripanosomicida (**Tabla 18**), tienen un perfil farmacológico adecuado, ya que no son mutagénicas, teratogénicas, ni clastogénicas a las dosis efectivas, además de la baja toxicidad oral aguda. Tienen parámetros farmacocinéticos comparables con otros medicamentos. Todas presentaron acción tripanosomicida *in vivo*, siendo la molécula **16** la de mejor actividad (a una dosis de 1.5  $\mu$ moles/kg que reduce 80 % el pico de parasitemia) con 100 % de sobrevida; le sigue la molécula **27** que reduce un 82% el pico de parasitemia a 127  $\mu$ moles/kg, el compuesto **11** que reduce un 75 % el pico de parasitemia a 384  $\mu$ moles/kg y con una sobrevida del 100 % y por último la molécula **2** que reduce aproximadamente un 50 % el pico de parasitemia de los animales infectados con una sobrevida del 83 % a una dosis de 192  $\mu$ moles/kg.

Con respecto al mecanismo de acción de los compuestos en estudio de esta tesis se ha encontrado que estas moléculas son inhibidoras de la *TcTIM*, no inhibiendo a la TIM humana. Se encontró al mejor inhibidor descrito hasta el momento que fue la molécula **11**, con un  $CI_{50}$  = 86 nM. Además, el compuesto **11** no fue activo contra la TIM de *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* y la humana, demostrando la alta selectividad a la *TcTIM*. Esto correlaciona con observaciones de los estudios de metabolómica por  $^1H$ -RMN, donde se observa grandes cambios en la producción de lactato. El compuesto **16** fue un moderado inhibidor de *TcTIM*, por lo que la inhibición de este sistema no explica por sí sola su potente acción tripanosomicida. Además, se destaca que la molécula **11** y **16** son inhibidores moderados de cruzipaina. Respecto al cambio en el metabolismo del parásito no se observa (respecto al control de los parásitos sin tratamiento), mediante la medida de los metabolitos excretados por  $^1H$ -



RMN, cambios importantes con las combinaciones **2+16** y **2+Bnz**. Sin embargo, se observa cambios en la glicina excretada por los parásitos tratados con **Bnz**, sugiriendo modificaciones en la actividad de la enzima acetil-CoA: glicina C-acetiltransferasa. Para el compuesto **16** se observan cambios para la glicina y el succinato excretados al medio, sugiriendo además de cambios en la actividad en la acetil-CoA:glicina C-acetiltransferasa al igual que el **Bnz**, cambios en la fumarato reductasa glicosomal y mitocondrial dependiente de NADH.

Para el compuesto **2** tanto los estudios por  $^1\text{H}$ -RMN como los estudios por citometría de flujo mostraron que los parásitos murieron por apoptosis tardía, la señal de la colina desaparece y además se observa que la relación  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  de los lípidos móviles de la membrana aumenta, concluyendo que los parásitos están muriendo por apoptosis tardía al igual que en la citometría de flujo donde claramente se observa que los parásitos marcados con AV e IP son positivos. Los resultados por  $^1\text{H}$ -RMN sugieren que el mecanismo de muerte celular para el compuesto **11** sería por necrosis ya que la señal de la colina desaparece y no hay incremento entre el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ . Esto también se refleja por citometría de flujo ya que si bien hay una leve marcación a las 24 horas del 11% de los parásitos por  $\text{CA}^+/\text{IP}^+$ , al ser tratados con AV y IP cerca de un 40% son positivos para IP. No fue posible, por ambas técnicas, determinar el mecanismo de muerte asociado al **Bnz** ni a la molécula **16**. Para la combinación de **2+16** sucede un cambio en cuanto el mecanismo de muerte en los parásitos, ya que los parásitos comienzan a morir por apoptosis en vez de hacerlo por apoptosis tardía/necrosis, como sucedió en presencia del compuesto **2**. Esto resulta interesante ya que es preferible que los parásitos mueran por apoptosis que por necrosis ya que es menos nocivo para el huésped. Además, estos resultados concuerdan con los estudios de histopatología en el tejido cardíaco donde claramente se observa una disminución de la inflamación (ausencia de infiltrado linfocitario) concordante con este mecanismo de muerte.

En el estudio de microscopia de fluorescencia se observa claramente que las moléculas en la combinación ingresan más rápidamente (a los 30 minutos ya se los observa dentro del parásito). Se observa además que las moléculas **2** y **11** se metabolizan más rápidamente tanto sea en fracción citosólica como microsomal de hepatocitos de rata (más rápido en fracción microsomal que citosólica) con tiempos de vida media menores a 10 minutos en microsomal y entre 0-40 minutos en citosólica. Sin embargo, el compuesto **16** inclusive a tiempos mayores a 4 horas muestra una metabolización mucho menor. Por todo lo antes dicho podemos concluir que el compuesto **16** es un fuerte candidato a fármaco para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Como perspectiva de este trabajo, se podría profundizar los estudios farmacocinéticos de la molécula **16**; continuar ajustando dosis de las moléculas en monoterapia o combinaciones sinérgicas más relevantes *in vitro* e *in vivo*; para las moléculas de la **Familia B** ensayar estudios con liposomas *in vitro* para mejorar su acción tripanosomicida; estudio enzimático específicos de posibles blancos para estas moléculas como CYP51, fumarato reductasa NADH dependiente glicosomal como mitocondrial, acetil-CoA: glicina C-acetiltransferasa; y lo más importante encontrar dosis efectivas en el modelo murino agudo como crónico de la enfermedad de Chagas en monoterapia o en combinación.

“No estalla como las bombas, ni suena como los tiros. Como el hambre mata, callando.

Como el hambre mata a los callados: los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido.

Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende.

El mal de Chagas no es un negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es un tema de interés a los políticos ni periodistas.

Elije a sus víctimas en el pobrerió. Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas.

Sus víctimas no tienen derecho ni dinero para comprar los derechos que no tienen.

Ni siquiera tienen derecho de saber de qué mueren”

Eduardo Galeano

Tesis de Doctorado en Química

Anexo de la tesis titulada:

DESARROLLO PRECLÍNICO DE COMPUESTOS TRIPANOSOMICIDAS SIN EFECTOS TÓXICOS NI MUTAGÉNICOS: OPTIMIZACIÓN DE SU ACTIVIDAD *IN VIVO*.

Lic. Elena Aguilera

Tutores: Dr. Guzmán Álvarez y Dra. Mercedes González

Grupo de Química Orgánica Medicinal/Facultad de Ciencias y Laboratorio de Moléculas Bioactivas/CenUR Litoral Norte

Facultad de Química/PEDECIBA  
Universidad de la República  
2020

Resultados para el Test de Ames

**Tabla A1. Test de Ames utilizando la cepa TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 de Salmonella thymimunum en ausencia de activación metabólica para los compuestos 1, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 y 18.**

Compuesto	Dosis (µg/placa)	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
1	0	6±1				
	400	12±4				
	133	12±2				
	44	5±2				
	14	20±5				
	4	6±0				
5	0	6±1	109±5	204±8	11±3	31±7
	500	5±1	69±1	222±6	20±1	30 ± 3
	166	3 ± 1	58±3	203±2	18±1	28± 3
	55	3±1	74±6	194±3	14± 3	24± 4
	18	9±3	76±5	176±1	12±1	18±1
	6	5±2	89±3	171±1	8±1	16 ± 1
6	0	6±1	60±5	204±8	11±3	31±7
	800	7±2	125±4	243±1	22±1	40.5±1.5
	266	6±3	113±3	237±1	16±1	36±1
	88	11±2	101±3	231±2	9±1	32±1
	29	25±1	90±3	222 ±2	8±1	28 ±2
	9	4±1	80±1	216±1	3±1	25±3
8	0	15±2	109±5	204±8	11±3	31±7
	400	24 ± 3	81 ± 3	230±2	15±1	60 ± 2
	133	20 ± 1	74±6	217±3	17±1	51± 3
	44	19 ± 2	62±11	207±2	14±1	44 ± 1
	14	27 ±7	79±2	201±2	14± 2	36± 3
	4	15 ±1	60±5	187±2	9± 1	29± 1
10	0	20±4	109±5	204±8	11±3	31±7
	500	25±6	60±6	201±3	18±2	44±1
	167	17±5	87±2	187±4	10± 1	33± 4
	83	10±1	65±7	176±1	6 ± 1	33± 2
	55	13±4	70±3	164 ±2	5 ± 1	27 ± 0
	42	18±2	78±1	151±3	3± 1	16± 3
11	0	6±1	155±5	204±8	11±3	31±7
	40	2±1	114±14	192±3	24± 2	54 ± 1
	13	8±3	61±3	178±4	17 ± 1	52± 4
	4	20±2	142±5	170±3	15 ± 2	45 ± 2
	1.5	4±1	146±2	160±1	12± 2	40 ± 1
	0.5	6±3	155±5	152±3	6±1	36±1
12	0	6±1				
	500	8±4				
	166	14±8				
	55	13±9				
	18	11±5				

	6	13±4				
13	0	17±7	60±6	205±9	11±3	31±7
	1000	36 ±7	92±3	271±3	29±2	52±2
	333	32 ±1	77±3	266±1	21±3	46±1
	167	13 ±5	71±6	263±3	14±1	37±1
	111	11 ±4	68±2	258±1	13±1	25±1
	83	15 ± 5	63±1	250±1	9±2	23±2
15	0	21±4	61±6	205±9	11±3	31±7
	500	15±3	80±3	185±3	9±1	63±2
	166	22±1	95±3	186±2	6±1	60±3
	55	20±1	71±6	170±1	6±1	54±1
	18	15±0	68±2	191±1	68±2	42±1
	6	23±7 °	63±1	171±1	1±0	34±3
16	0	14±2	90±2	205±9	24 ± 1	31±7
	500	10±4	29±3	220±4	15 ± 2	30± 3
	166	20±5	120±1	215±3	20 ± 2	20 ± 1
	55	22±6	112±5	190±3	11± 2	20± 3
	18	15 ±3	110±3	180±2	8±3	15 ± 2
	6	10±3	90±2	204±2	10 ± 1	18 ± 3
17	0	15±2	100±2	205±9	24 ± 1	31±7
	500	9±4	21±4	213±1	17 ± 1	27± 3
	166	22±5	121±6	210±1	15 ± 2	20 ± 1
	55	20±6	114±4	199±3	12± 2	16± 1
	18	21±3	101±2	194±1	6±2	12 ± 1
	6	16±3	94±1	191±1	11 ± 1	10 ± 1
18	0	17±7	90±2	205±9	24±1	31±7
	1000	31 ± 3	117±1	189±3	17±1	28±1
	333	43 ±1	105±2	186±2	13±0	23±1
	167	20 ±2	93±2	177±1	10±1	16±1
	111	12±1	85±3	171±1	7±2	14.5±1
	83	15±4	84±4	170±1	2±1	11±1

Control positivo sin activación metabólica de las siguientes cepas TA98; TA100 y TA1537 o-nitrofenildiamina.

Número de colonias: 738±11

Control positivo sin activación metabólica de las siguientes cepas TA1535 y TA102: Azida de sodio.

Número de colonias: 670±44

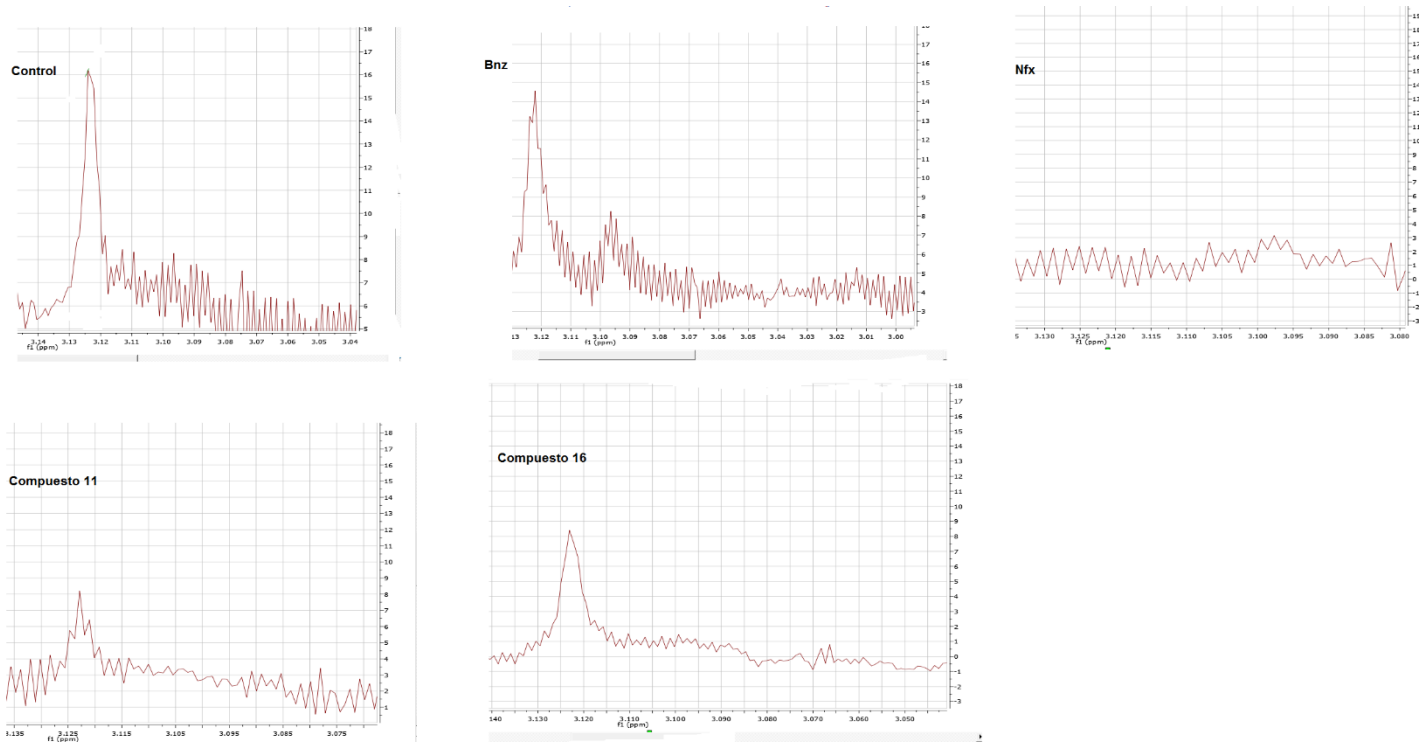
**Tabla A2. Test de Ames utilizando la cepa TA98 *Salmonella thyphimunum* en presencia de activación metabólica (S9) para los compuestos 2, 11 y 16.**

Compuesto	Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	TA98 <sup>a</sup>
<b>2</b>	0	8 $\pm$ 1
	200	8 $\pm$ 2
	67	12 $\pm$ 2
	22	11 $\pm$ 3
	7	7 $\pm$ 1
	2	15 $\pm$ 8
<b>11</b>	0	17 $\pm$ 3
	5000	11 $\pm$ 1
	1666	16 $\pm$ 9
	555	18 $\pm$ 1
	185	16 $\pm$ 6
	62	16 $\pm$ 4
<b>16</b>	0	17 $\pm$ 3
	5000	18 $\pm$ 5
	1666	17 $\pm$ 1
	555	11 $\pm$ 4
	185	13 $\pm$ 1
	62	15 $\pm$ 2

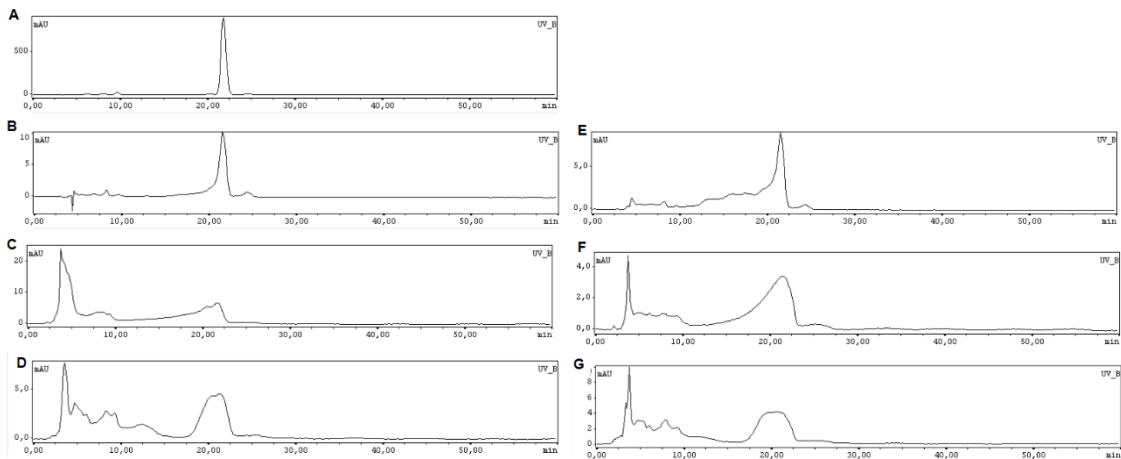
<sup>a</sup> En presencia de S9

Control positivo para la cepa TA98 en presencia de S9: 2-aminofluorano.

Número de colonias: 100 $\pm$ 5.

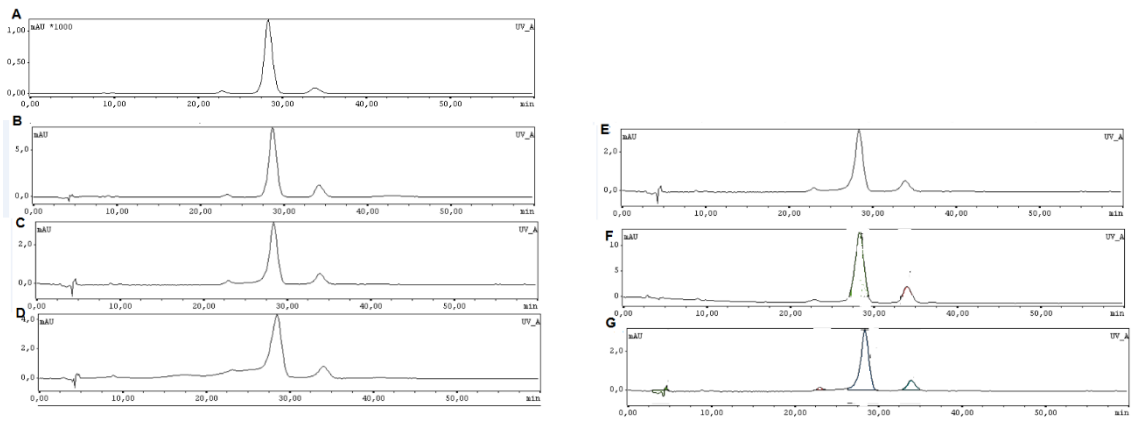


**Figura A1.** Estudio de muerte celular por RMN. Se observa el control del ensayo donde se visualiza la señal de la colina (parásitos sin tratamiento) y los parásitos tratados con el compuesto **Bnz**, **Nfx**, **11** y **16**.



**Figura A2.** Estudio de metabolización del compuesto **11** mediante HPLC. **A)** **11** (disolución en DMSO a una concentración de 0.4 mM) medido de 430 nm de absorción y 550 nm de emisión, utilizando como fase móvil agua (H<sub>2</sub>O) y ácido trifluoroacético (0.05%):Acetonitrilo, 50:50. **B)** FC+**11** a 0.4 mM (tiempo de incubación: 0 min). **C)** FC+**11** a 0.4 mM (tiempo de incubación: 30 minutos). **D)** FC+**11** a 0.4 mM (tiempo de incubación 60 min hora). **E)** FM + **11** a 0.4 mM (tiempo de incubación 0 min). **F)** FM+**11** a 0.4 mM (tiempo de incubación a 30 minutos). **G)** FM+**11** a 0.4 mM (tiempo de incubación 60 min).





**Figura A3.** Estudio de metabolización del compuesto **16** mediante HPLC. **A)** **16** (disolución en DMSO a una concentración de 0.4 mM) medido de 450 nm de absorción y 570 nm de emisión, utilizando como fase móvil agua (H<sub>2</sub>O) y ácido trifluoroacético (0.05%):Acetonitrilo, 50:50. **B)** FC+**16** a 0.4 mM (tiempo de incubación: 0 min). **C)** FC+**16** a 0.4 mM (tiempo de incubación: 30 minutos). **D)** FC+**16** a 0.4 mM (tiempo de incubación 60 min hora). **E)** FM + **16** a 0.4 mM (tiempo de incubación 0 min). **F)** FM+**16** a 0.4 mM (tiempo de incubación a 30 minutos). **G)** FM+**16** a 0.4 mM (tiempo de incubación 60 min).