

Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana
Informe de Pasantía de Grado

ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE POTENCIALES FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS CON ACCIÓN FASCIOLICIDA

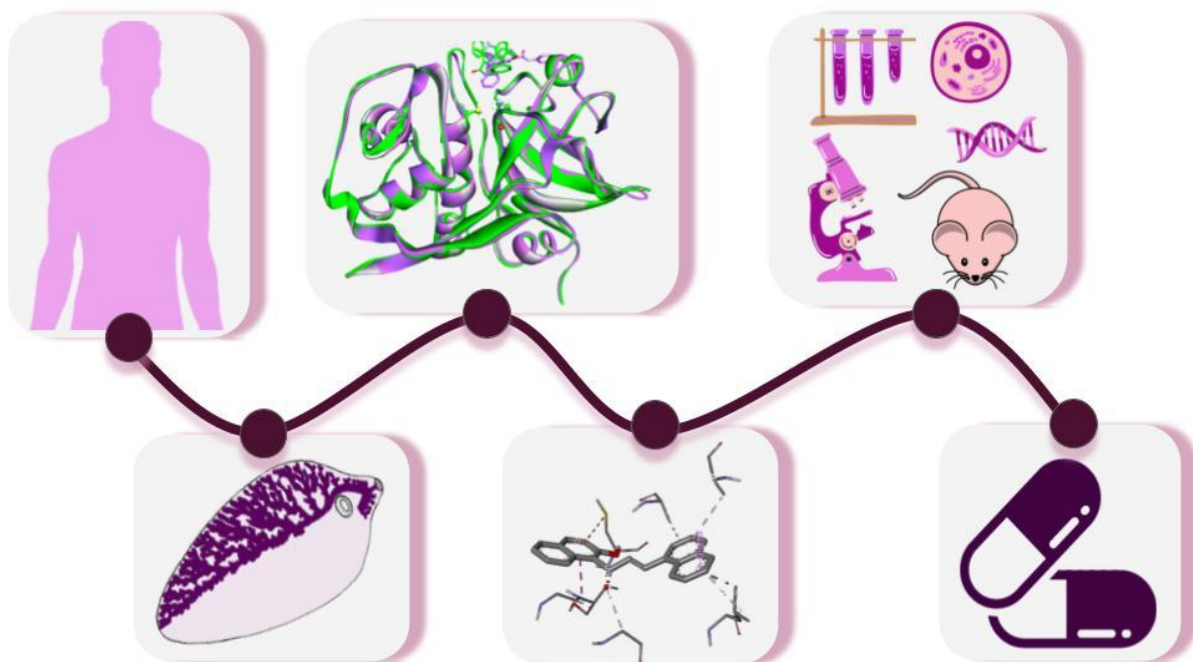
Estudiante: Br. Zoraima Artía

Orientador: Dr. Mauricio Cabrera

Co-orientadora: Dra. Ileana Corvo

Lugar de realización: Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Depto. De Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República.

Contacto: zoraimartia@gmail.com



JULIO 2022

Dedicada a mi familia: Álvaro, Chabela e Indara.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, un agradecimiento enorme a mi familia, la que me tocó y la que elegí. Los que me tocaron, que por cierto, no me podían tocar mejores, mis padres Álvaro y Chabela y mi hermana Indara, sin ellos nada de esto -ni aquello en lo que creo y sueño, que me hace ser la persona que soy- sería posible. Por siempre intentar entenderme, por apoyarme y acompañarme a lo largo de la vida y de este proceso universitario. A los que elegí, Amparo, mi incondicional e increíble amiga, la vida y el trabajo son mejores desde que los compartimos. Cada vez que la inspiración o la voluntad necesaria para culminar este proceso decayeron, Ampa, una botella de vino y nuestras charlas me volvieron al camino. A Victor, la universidad me regaló una de las mejores cosas que podía darme, un amigo para toda la vida, amistad que celebra este año una década, nunca nadie se alegró tanto de mis logros como Vic cuando salvé Álgebra Lineal! A los cinco, ¡Gracias! Por siempre estar, por siempre escuchar, por dejarme caer cuando lo necesitaba y por ayudarme a levantar cuando ya era hora, esto es, en gran parte, gracias a ustedes.

A mis amigas, imprescindibles en este proceso, por la contención en los malos momentos y la compañía en los buenos: Kati, Flor Jesús, Ceci, Gime, Vicky y Joha.

A mis compañeros de trabajo del Grupo de Moléculas Bioactivas, por recibirme tan bien, por haberme integrado, por enseñarme y acompañarme. A Cintya, Flor Ferraro (gracias por dejarme en "herencia" tu línea de trabajo, el escritorio y la tasa de flash como lapicero), a Guzmán, a Lía (que, por cierto, tengo muchísimas ganas de que seas mi tutora de posgrado!), y muy especialmente a mis tutores, Ileana y Mauricio que me acompañaron en todo este proceso, incluso cuando lo hice un poquitín demorado. Me siento muy feliz de formar parte de este grupo, de poder hacer un muy pequeño aporte al trabajo que realizan. Quiero sumar acá, a Lu Bergalli, en los cinco años que llevamos compartiendo escritorio y oficina puedo decir que me tocó de las mejores compañeras que me podían tocar. Además, las tardes de torta de manzana y los viernes con "música de viernes" hicieron este proceso mucho más bonito. Con ustedes aprendo, me desafío a mí misma y me enamoro de lo que hago. Así, vuelven realidad el proverbio de Confucio "encuentra un trabajo que ames y no volverás a trabajar en tu vida". Les agradezco a todos muchísimo.

A Ana Egaña, mi tutora de carrera, por el apoyo y el acompañamiento, por las recomendaciones y las gestiones, por entender mis cambios de perspectiva y mis tiempos, por la paciencia y por la pizca justa de presión para mantenerme en el camino, gracias.

A Coral Fernández, que fue la primera persona que me dio una oportunidad de acercarme a la Universidad desde otro lado, y lo amé, y estoy muy agradecida por eso.

A mis compañeros de carrera, Fedé, Silvia y Ana Clara. Biología Humana tiene la característica de ser una carrera bastante solitaria, aún así, supimos formar un increíble grupo! Gracias por el acompañamiento, por la genuina alegría frente a cada examen salvado, por el intercambio de bibliografía e información, por el espacio de catarsis cuando la cosa no iba tan bien, pero, sobre todo, por el tan necesario ánimo mutuo para estudiar y rendir Evolución Humana.

A todos aquellos compañeros de trabajo del CENUR litoral Norte con los que he tenido la dicha de compartir muchos momentos en los últimos años, y que, por lo tanto, han tenido que ver en este proceso: a la gente del CIO Salud, del CBB, de la UAE, de Evaluación Institucional, de METICs y del DQL, gracias.

Un agradecimiento a Marcos Colazzo, Lucía Pareja y Noel Alonzo por enseñarme a usar el HPLC-MS/MS y a interpretar los resultados que hicieron posible gran parte de este trabajo.

A Jorge Gil, por compartir las instalaciones de su laboratorio y enseñarme a usarlas y por sus excelentes explicaciones.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos actores universitarios que han sumado un granito de arena al proceso de descentralización universitaria, mismo que ha posibilitado que alguien como yo, nacida y criada en el campo, en el interior del interior, sin posibilidades reales de poder emigrar a Montevideo, haya podido elegir una carrera de ciencias, que me apasiona, que he disfrutado a cada momento y en la que pienso seguir formándome.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE	6
RESUMEN	8
PALABRAS CLAVES	10
ABREVIATURAS	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Desarrollo de fármacos	14
1.1.1. Fármaco y medicamento	14
1.1.2. Proceso de desarrollo de nuevos fármacos	15
1.1.3. Fase pre-clínica del desarrollo de fármacos	18
1.1.4. Metabolismo de fármacos	19
1.1.4.1. Absorción y distribución	19
1.1.4.2. Metabolismo hepático sistémico	22
1.1.4.3. Enzimas metabolizadoras citocromo P450	25
1.2. Fascioliasis hepática	28
1.2.1. Infecciones parasitarias producidas por helmintos	28
1.2.2. <i>Fasciola hepatica</i>	29
1.2.3. Fascioliasis hepática en humanos	32
1.2.3.1. Epidemiología	32
1.2.3.2. Manifestaciones clínicas	34
1.2.3.3. Diagnóstico	36
1.2.3.4. Tratamiento	37
1.3. Antecedentes	39
1.4. Objetivos	42
1.4.1. Objetivo general	42
1.4.2. Objetivos específicos	42
2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1. Estudio de metabolización <i>in vitro</i> por fracción hepática S9.	46
2.2. Estudios de la estabilidad química de C34 mediante análisis en HPLC-MS/MS.	48
2.2.1. Estabilidad química a diferentes pH	48
2.2.2. Estabilidad química en plasma sanguíneo	48
2.3. Determinación de citotoxicidad inespecífica	49

2.3.1. Citotoxicidad frente a la línea celular HepG-2	49
2.3.1.1. Mantenimiento	49
2.3.1.2. Criopreservación y revitalización	50
2.3.1.3. Ensayo de citotoxicidad	50
2.3.2. Citotoxicidad en espermatozoides bovinos	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1. Estudio de metabolización <i>in vitro</i> por fracción hepática S9.	56
3.1.1. Porcentaje de metabolización de los compuestos	56
3.1.2. Identificación de metabolitos	58
3.2. Estudio de la estabilidad química de C34 mediante análisis en HPLC-MS/MS.	61
3.2.1. Estabilidad a diferentes pH	61
3.2.2. Estabilidad en plasma	63
3.3. Determinación de citotoxicidad inespecífica	64
3.3.1. Citotoxicidad frente a la línea celular HepG-2	66
3.3.2. Citotoxicidad en espermatozoides bovinos	67
4. CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMEN

Cerca de un tercio de la población mundial está infectada por parásitos helmintos, quienes en forma creciente y sostenida han aumentado su incidencia sobre la salud tanto humana como animal en países en vías de desarrollo. La fascioliasis causada por *Fasciola hepatica* es endémica en la mayoría de los países a nivel mundial, estimándose infectadas más de 17 millones de personas y otros 180 millones están en riesgo de infección. El tratamiento disponible se basa en el uso de fármacos antihelmínticos, siendo el triclabendazol el fármaco de referencia y el único efectivo contra el estadio invasivo del parásito. En los últimos años se ha reportado la aparición de cepas resistentes al tratamiento con este fármaco, lo que evidencia la necesidad de desarrollar nuevas moléculas con actividad fasciolicida para controlar esta parasitosis. *F. hepatica* secreta gran cantidad de diferentes cisteína-proteasas esenciales para la migración, alimentación y evasión de la respuesta inmunitaria del hospedero, por lo que constituyen potenciales blancos moleculares para el desarrollo de fármacos. El Grupo de I+D de Moléculas Bioactivas ha identificado, mediante *screening* de actividad inhibitoria de estas enzimas, un grupo de chalconas con fuerte inhibición enzimática y actividad fasciolicida sobre larvas cultivadas *in vitro*. Este trabajo busca contribuir al desarrollo preclínico de cuatro de estas chalconas, evaluando su metabolización *in vitro*, su estabilidad a diferentes pH y en plasma sanguíneo y su citotoxicidad en dos modelos celulares complementarios. Nuestros resultados demuestran que esta serie de compuestos sintéticos derivados de flavonoides presentan buen perfil farmacocinético y de estabilidad, lo que sumado a su baja citotoxicidad, los vuelve moléculas muy prometedoras para continuar su desarrollo como nuevos fármacos fasciolicidas.

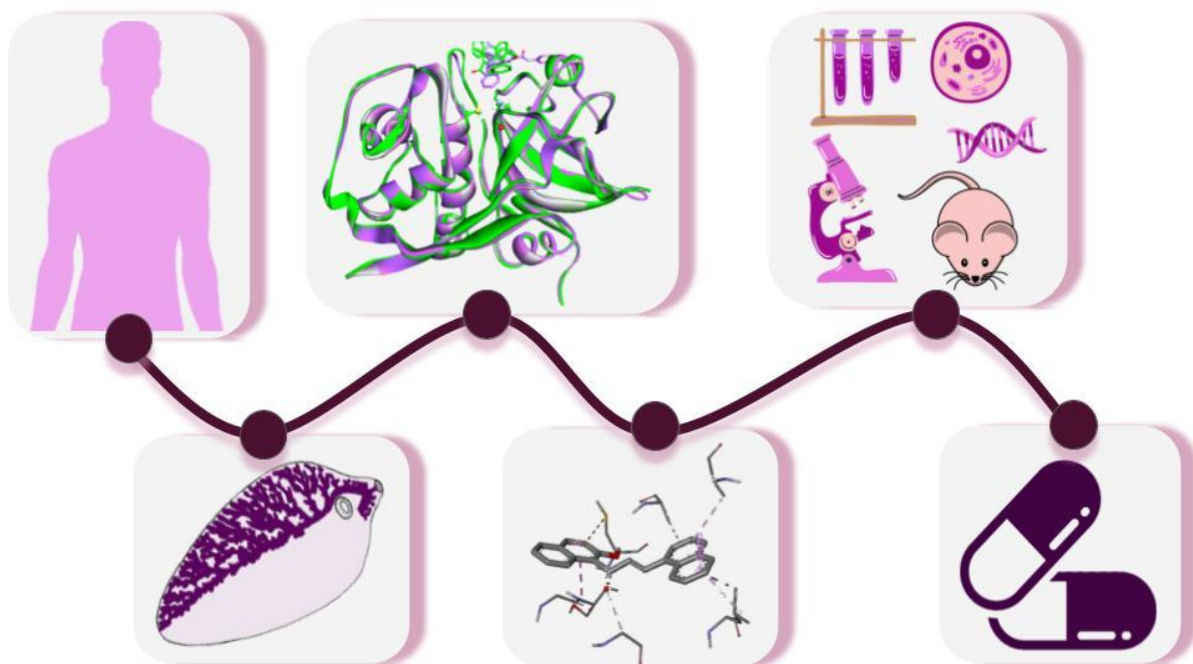
PALABRAS CLAVES

Descubrimiento y desarrollo de fármacos, antiparasitarios, *Fasciola hepatica*, metabolización de fármacos, citotoxicidad.

ABREVIATURAS

ADME/Tox: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad	NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
CDC: del inglés <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	OMS: Organización Mundial de la Salud
Cl: Aclaramiento	OPS: Organización Panamericana de la Salud
Cl _{int} : Aclaramiento Intrínseco	PBS: del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
CYP450: citocromo P450	SFB: Suero Fetal Bovino
DMEM: del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	SRB: Sulforrodamina B
DMSO: Dimetilsulfóxido	t _{1/2} : vida media
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético	TBZ: Triclabendazol
ELISA: del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	TCA: Ácido tricloroacético
FAD: flavina adenina dinucleótido	
FhCL1: Catepsina L1 de <i>Fasciola hepatica</i>	
FhCL3: Catepsina L3 de <i>Fasciola hepatica</i>	
FMN: flavina mononucleótido	
IC ₅₀ : concentración inhibitoria 50	
JRD: Juvenil Recientemente desenquistado	
MFO: oxidasa de función mixta	

1. INTRODUCCIÓN



1.1. Desarrollo de fármacos

1.1.1. Fármaco y medicamento

El proceso de descubrimiento de fármacos se inicia con la existencia de una enfermedad o condición clínica sin un tratamiento adecuado disponible. Es esta necesidad clínica insatisfecha, la motivación impulsora subyacente del proceso. La investigación inicial, que a menudo ocurre en el mundo académico, genera datos para desarrollar una hipótesis de que la inhibición o activación de una proteína o vía dará como resultado un efecto terapéutico en un estado de enfermedad (Hughes *et al.*, 2011).

Fármaco es, en sentido amplio, toda sustancia química capaz de interactuar con un organismo vivo. En sentido más restringido, es toda sustancia química, cualquiera sea su origen, utilizada en el tratamiento, la curación, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado. Un fármaco o principio activo se define como una sustancia pura, químicamente definida, extraída de fuentes naturales o sintetizada en el laboratorio, dotada de una actividad biológica que puede provocar efectos terapéuticos. La lengua castellana, a diferencia de otras, distingue entre fármaco y droga, que estrictamente significa una materia prima de origen vegetal o animal que contiene uno o varios principios activos y que no ha sufrido manipulación, salvo la necesaria para su conservación. **Medicamento** es la asociación del fármaco o fármacos con los componentes necesarios para proporcionar una forma farmacéutica adecuada, destinada a ser utilizadas en personas o animales, que tenga propiedades para prevenir, diagnosticar, tratar, aliviar o curar enfermedades, o para modificar funciones fisiológicas, es decir, el medicamento es el principio activo (o el conjunto de ellos) elaborado para su uso medicinal. Este permite la administración del fármaco al paciente, por la vía y en las dosis necesarias (Cuadrado *et al.*, 2006; Flores, 1997).

Los medicamentos son herramientas terapéuticas fundamentales de la medicina actual. Gracias a ellos la mortalidad en los países desarrollados se ha reducido espectacularmente en los últimos cien años (Cuadrado *et al.*, 2006).

La mayoría de los medicamentos que están actualmente en uso son el resultado de un proceso de investigación largo y complejo. Es por esto que se vuelve necesaria la unión de esfuerzos de diferentes disciplinas científicas para descubrir y desarrollar medicamentos con efectos clínicos benéficos y efectos secundarios mínimos (Saldívar-González *et al.*, 2017).

1.1.2. Proceso de desarrollo de nuevos fármacos

El desarrollo de fármacos es un proceso complejo que puede resumirse en cuatro grandes fases: descubrimiento, desarrollo preclínico, desarrollo clínico y registro y salida al mercado (Cuadrado *et al.*, 2006). En la **Figura 1** se presenta un resumen de las etapas de este proceso.

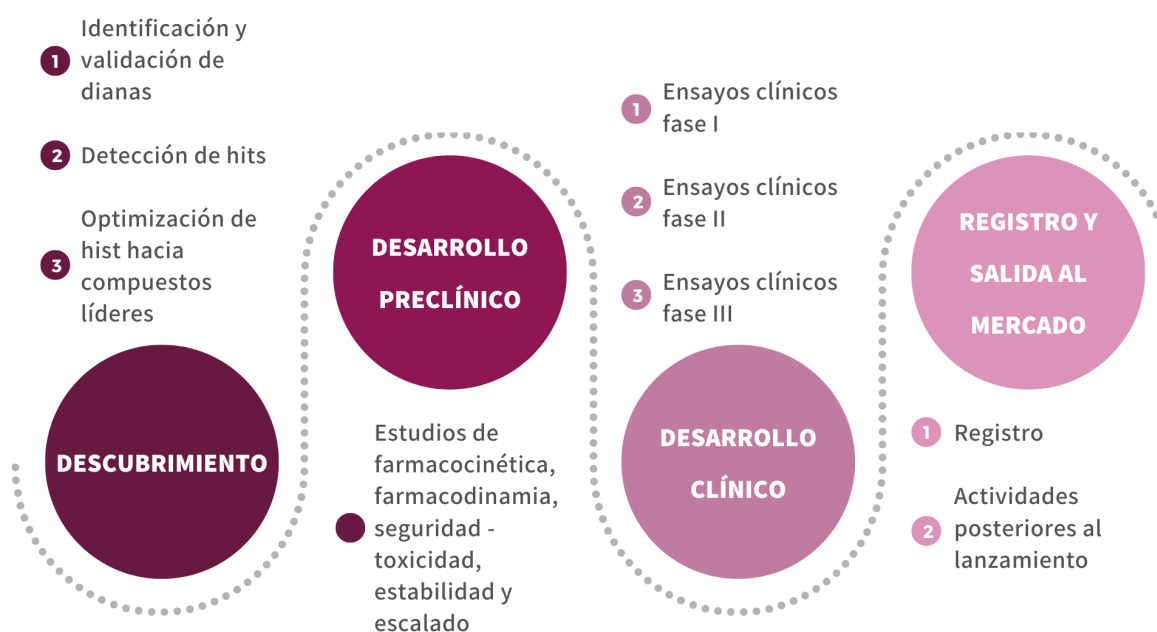


Figura 1. Fases del desarrollo de fármacos. La primera fase del desarrollo de fármacos es el descubrimiento, esta fase comprende a su vez 3 etapas: Identificación y validación de dianas, detección de *hits* y su optimización hacia compuestos líderes. En la fase siguiente, la del desarrollo preclínico, se centra principalmente en estudios de farmacocinética, farmacodinamia y seguridad. La fase de desarrollo clínico incluye tres etapas: los ensayos de fase I, II y III. Al final del proceso, en la fase de registro y salida al mercado, se continúan realizando actividades posteriores al lanzamiento (modificado de Otero, 2015).

A continuación, se describen brevemente las etapas mencionadas para luego profundizar en algunos de estos aspectos:

- **Identificación y validación de dianas:** Durante esta etapa se busca identificar nuevos blancos terapéuticos y confirmar su papel en el proceso patológico.
- **Detección de *hits*:** Consiste en la realización de ensayos robustos que permitan detectar el potencial terapéutico de moléculas.
- **Optimización de *hits* hacia compuestos líderes:** Luego de identificados los *hits* se los modifica químicamente para mejorar sus propiedades farmacológicas.
- Utilización de ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* en primeros estudios de: **farmacocinética** (absorción, distribución, metabolismo y excreción); **farmacodinamia** (mecanismo de acción de los compuestos); **seguridad y toxicidad** (efectos adversos); **estabilidad** (en diferentes condiciones fisicoquímicas) y **escalado** (optimización del proceso sintético para obtención a mayor escala).
- **Ensayos clínicos fase I:** El fármaco es administrado por primera vez en humanos para verificar la tolerancia, mecanismo de acción y eficacia. En la mayoría de los casos el fármaco se prueba en un grupo pequeño de individuos sanos.
- **Ensayos clínicos fase II:** El principal objetivo es establecer el margen de dosis del nuevo fármaco a partir del conocimiento de su farmacocinética (absorción, distribución, metabolización y excreción) y su farmacodinamia (naturaleza de la acción farmacológica y relación dosis/respuesta). Se realizan en pacientes potenciales, pero también pueden llevarse a cabo en voluntarios sanos, el grupo tratado es de mayor número de personas que en los estudios de fase II.
- **Ensayos clínicos fase III:** El objetivo principal es establecer una relación beneficio/riesgo en comparación con otras alternativas terapéuticas disponibles, establecer la eficacia del fármaco e identificar y cuantificar los efectos indeseados más frecuentes.
- **Registro:** En esta etapa se recopilan todos los estudios preclínicos y clínicos, los datos de calidad y descripción del proceso de fabricación. Estos son presentados a las autoridades reguladoras las cuales autorizan o no la comercialización del fármaco.

- **Actividades posteriores al lanzamiento:** Una vez en el mercado, es necesario continuar evaluando algunas propiedades que no pueden ser fácilmente descritas en las etapas anteriores, es por esto que surge el concepto de farmacovigilancia, para evaluar posibles nuevas indicaciones, eficacia en combinación con otros fármacos y la eficacia en las condiciones habituales de uso (Otero, 2015).

El proceso de desarrollo de un fármaco comienza con la investigación sobre las causas de una enfermedad, que en algunos casos puede llevar a la identificación de una o varias dianas moleculares asociadas con esa enfermedad. Los pasos siguientes involucran la identificación de compuestos activos frente a la diana molecular, que se unen al blanco terapéutico o que muestran actividad biológica en un ensayo de tamizaje. Aquellas moléculas que muestran actividad biológica son llamadas *hits*. Los *hits* con propiedades farmacéuticas atractivas, incluyendo baja toxicidad, solubilidad acuosa adecuada para administrarse vía oral, entre otras propiedades farmacocinéticas son llamados “líderes o cabezas de serie”. Típicamente, los *hits* son encontrados por tamizaje de un número vasto de moléculas, mientras que los compuestos “cabezas de serie” son desarrollados a partir de los *hits* a través de modificaciones químicas. Los pasos siguientes involucran la optimización de su actividad biológica, estos ensayos se hacen *in vitro* con blancos moleculares aislados o con modelos celulares. Los compuestos activos se someten a varias evaluaciones experimentales que implican ensayos en líneas celulares, en animales y pruebas clínicas en humanos. Los compuestos que pasan satisfactoriamente por todas las etapas son aprobados por un agente regulatorio para uso clínico (Saldívar-González *et al.*, 2017).

En el desarrollo de fármacos, la mayoría de los compuestos que muestran actividad frente a las dianas moleculares *in vitro* fallan en las pruebas siguientes. Esto se debe frecuentemente a que no poseen un perfil farmacocinético adecuado y a su toxicidad. Es decir, además de su actividad frente a los blancos moleculares deseados, también afecta otros procesos fisiológicos y no puede usarse en forma segura en humanos. Se estima que de cada 9,000 moléculas biológicamente activas solo una tiene uso clínico y que el

desarrollo de un fármaco tarda aproximadamente entre 10 y 15 años (Saldívar-González *et al.*, 2017).

1.1.3. Fase pre-clínica del desarrollo de fármacos

Una vez identificada la molécula, se pasa a la siguiente fase de desarrollo que se conoce como etapa pre-clínica. En los estudios pre-clínicos, el propósito primario es la evaluación de la actividad biológica. Se analizan las propiedades fisicoquímicas, se determinan sus efectos y el comportamiento del compuesto *in vitro*, utilizando modelos fisiológicos en el laboratorio, e *in vivo*, mediante ensayos en animales de laboratorio, con el objetivo de garantizar la seguridad de los productos en desarrollo antes de utilizarlos en humanos (Cuadrado *et al.*, 2006; Marovac, 2001).

En paralelo, el desarrollo químico continúa mediante la optimización y escalado de la síntesis de los compuestos activos, y la puesta a punto de métodos de análisis validados y formulaciones adecuadas para que los principios activos cumplan su función con mayor eficacia (Cuadrado *et al.*, 2006).

La estrategia de trabajo en esta fase comienza, en el área biológica, con ensayos de toxicidad, así como de identificación de parámetros farmacocinéticos de cada compuesto, estudios de propiedades ADME/Tox (**A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo, **E**xcreción y **T**oxicidad). Adicionalmente, se estudian e identifican las características farmacodinámicas de cada producto, lo que implica el reconocimiento de los efectos sobre los diferentes órganos de los animales de laboratorio utilizados (Cuadrado *et al.*, 2006; Otero, 2015).

Los estudios pre-clínicos evalúan diferentes parámetros de la molécula, e incluyen estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas. Se realizan estudios de toxicidad aguda y crónica y se evalúa el efecto en la reproducción y su progenie. Basado en los resultados de esta etapa, se evalúa el desarrollo de formulaciones para estudios clínicos y se proponen evaluaciones farmacológicas más extensas (Marovac, 2001).

En la **Figura 2** se presentan algunas de las propiedades estudiadas en esta etapa del proceso.

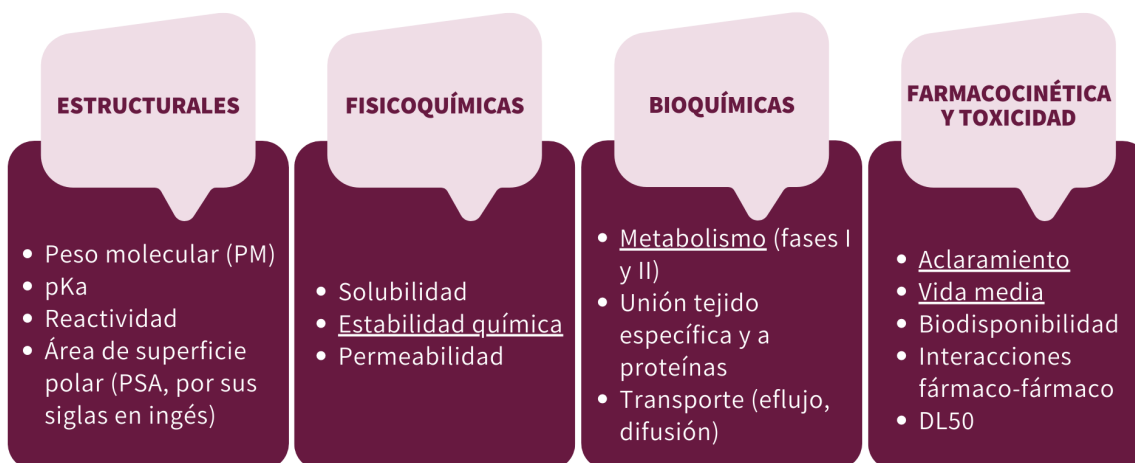


Figura 2. Clasificación de las propiedades de los compuestos candidatos a fármacos determinadas mediante ensayos pre-clínicos (modificado de Otero, 2015). Se subrayan las que estudiamos en el contexto de este trabajo.

Las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de potenciales fármacos, como solubilidad, permeabilidad y estabilidad metabólica, han sido el foco temprano de la industria farmacéutica ya que estas permiten obtener información general de los candidatos. Esto se debe a que dichas propiedades pueden determinarse relativamente rápido utilizando modelos biológicos *in vitro*, permitiendo guiar la modificación estructural de las moléculas con el objetivo de mejorar las propiedades anteriormente mencionadas (Otero, 2015).

De cientos de candidatos a fármacos que presentan interacción con el blanco terapéutico deseado, solo una pequeña fracción de éstos presenta propiedades ADME/Tox satisfactorias, lo que ha impulsado el diseño racional de fármacos. De manera habitual, esta fase dura globalmente unos 3-4 años, pero sólo 1 de 1000 compuestos avanza a la siguiente etapa, que comprende a los estudios clínicos en seres humanos (Cuadrado *et al.*, 2006; Marovac, 2001; Otero, 2015; Prentis *et al.*, 1988).

1.1.4. Metabolismo de fármacos

1.1.4.1. Absorción y distribución

Independientemente de su vía de ingreso, los fármacos deben alcanzar la circulación sistémica para poder ejercer su efecto terapéutico (Alvariza *et al.*, 2010). La ruta de entrada

al torrente sanguíneo depende de la vía de administración que se utilice (**Figura 3**). En la administración intravasal el fármaco ingresa directamente a la circulación. En las vías extravasales el fármaco deberá absorberse previamente a alcanzar el torrente sanguíneo. Una vez en la sangre el fármaco comenzará a distribuirse a todos los órganos y tejidos, incluyendo aquéllos donde se biotransforma (metaboliza) y aquéllos donde se excreta.

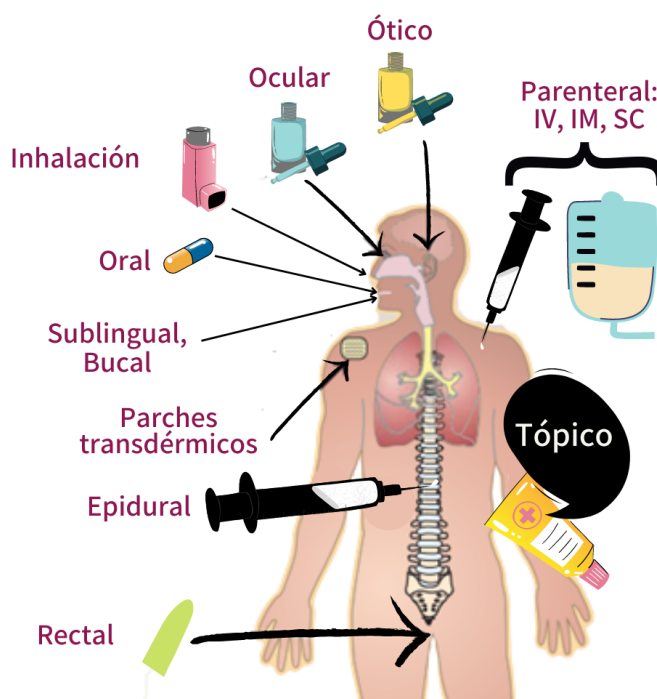


Figura 3. Vías de administración de fármacos. La vía de administración de fármacos es la ruta de entrada o los medios por los cuales los fármacos son introducidos al organismo. Influye en la latencia, intensidad y duración del efecto farmacológico y se dividen en enterales (introducción por el tracto gastrointestinal), parenterales (inyección mediante aguja) y tópicas (aplicación sobre la piel o mucosas). IV: intravenosa; IM: intramuscular; SC: subcutánea (Sánchez, 2007; Modificado de Yellepeddi, 2016).

La vía oral es la más frecuentemente utilizada para la administración de medicamentos, ya que es la menos invasiva. La absorción tiene lugar principalmente en el intestino delgado (**Figura 4**). Ocasionalmente el colon y el estómago pueden ser otros sitios de absorción de fármacos administrados por vía oral. Una vez deglutido el medicamento, en el caso de las formas farmacéuticas sólidas de administración oral, el fármaco se disuelve y se dispersa en el fluido gástrico. Al llegar al intestino la absorción del fármaco se ve condicionada por varios factores. La motilidad intestinal regula el tiempo de

tránsito y puede influir en la cantidad y velocidad con la que un fármaco se absorbe (Alvariza *et al.*, 2010).

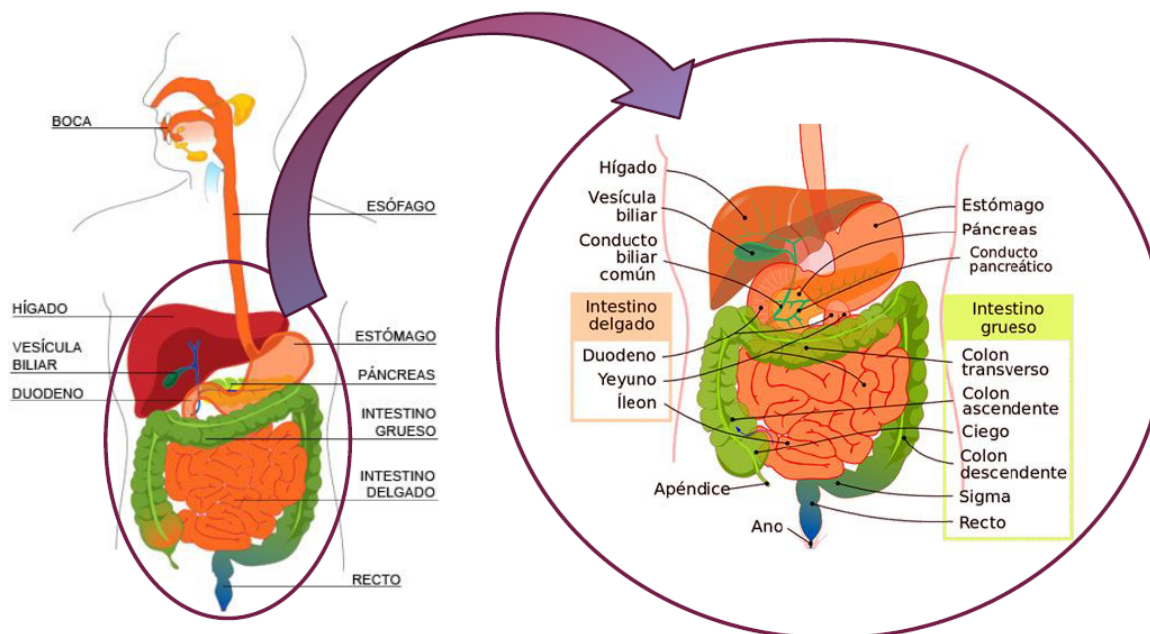


Figura 4. Tracto gastrointestinal. El aparato digestivo es el grupo de órganos encargados de la conversión de los alimentos en nutrientes y energía, así como de la eliminación de residuos no asimilados, elementos esenciales para la subsistencia del organismo. En los seres humanos, el aparato digestivo está formado por la boca, el esófago, el estómago, los intestinos delgado y grueso y el recto, asociados a las glándulas salivales, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas que colaboran en la digestión (Fernández y Tamaro, 2004).

Antes de llegar a la circulación sistémica, los fármacos administrados por vía oral pueden sufrir procesos de pérdida pre-sistémica. Los efectos de la pérdida pre-sistémica pueden producirse en el tránsito por el tracto gastrointestinal, fundamentalmente por acción del intestino y del hígado. Estos procesos son el metabolismo y secreción intestinal, y el metabolismo y secreción hepática. Las pérdidas pre-sistémicas pueden darse antes de la absorción debido a reacciones de descomposición del fármaco por efecto de las secreciones digestivas y de la flora bacteriana, disminuyendo su biodisponibilidad. Algunos fármacos sufren una descomposición no metabólica total o parcial en contacto con fluidos gástricos debido a su propia reactividad química pH-dependiente. El pH que prevalece en cada tramo de la luz intestinal condiciona la mayor o menor ionización de los fármacos que son ácidos o bases débiles o moderados, aspecto que repercute en la

lipofilia aparente de los fármacos y por lo tanto en su velocidad de absorción. La diferencia en el pH entre distintos tramos intestinales puede provocar la aparición de zonas de absorción preferente, por difusión facilitada. Estas zonas del tracto gastrointestinal constituyen para estos fármacos, ventanas de absorción. Las pérdidas pre-sistémicas, como se mencionó anteriormente, también se dan luego de la absorción. Las venas mesentéricas transportan todos los nutrientes y moléculas absorbidas en el tubo digestivo y son tributarias de la vena porta. Este hecho determina que todas las especies absorbidas en el tubo digestivo ingresen al hígado antes de llegar a la circulación sistémica. En el hígado se dan procesos de metabolización del fármaco, pudiendo generar variaciones en la dosis o estructura del fármaco que llega a la circulación sistémica. Algunas sustancias muy lipofílicas pueden sortear la circulación portal y pasar a la circulación sistémica por drenaje linfático, evitando el primer paso hepático (Alvariza *et al.*, 2010; del Arco, 1997; Wilkinson, 2002).

1.1.4.2. Metabolismo hepático sistémico

El ser humano está en permanente contacto con elementos y productos químicos extraños al organismo (xenobióticos), desde sustancias presentes en los alimentos, hasta los contaminantes ambientales. Para evitar el daño que pudieran provocarle, ha desarrollado a lo largo de la evolución distintos mecanismos para depurar y eliminar xenobióticos. Esta capacidad de biotransformar o metabolizar sustancias depende de los mismos mecanismos de transporte y vías enzimáticas que utiliza para procesar los componentes de la dieta y productos endógenos. A estas transformaciones se las denomina *metabolismo hepático sistémico* (Alvariza *et al.*, 2010).

La conversión de fármacos y otros compuestos xenobióticos en metabolitos más hidrófilos resulta esencial para eliminarlos del organismo. Desde una perspectiva general, las reacciones de biotransformación generan metabolitos inactivos más polares, que se excretan fácilmente al exterior. Sin embargo, en algunos casos se producen metabolitos con potente actividad biológica o con propiedades tóxicas (Wilkinson, 2002).

Las reacciones de biotransformación de los fármacos se clasifican en reacciones de *funcionalización* (fase I) y reacciones de *biosíntesis o conjugación* (fase II), ambas

catalizadas enzimáticamente. Más recientemente, fue incluida en esta clasificación un metabolismo de fase III. Se profundizará más en las reacciones de fase I y II.

- **Reacciones de fase I:** las reacciones de funcionalización introducen o exponen un grupo funcional del fármaco original. Son reacciones simples de oxidación, reducción, e hidrólisis, que generan grupos funcionales (-OH, -COOH, -NH₂) y les confieren a las sustancias más hidrofilia. Generalmente culminan en la pérdida de la actividad farmacológica.
- **Reacciones de fase II:** las reacciones de conjugación culminan en la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional en el compuesto original, o metabolito de fase I (electrófilos y potencialmente tóxicos), con los derivados de manera endógena: ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato. Estos conjugados fuertemente polares, suelen ser de mayor peso molecular, muy hidrosolubles e inactivos, facilitando así su eliminación de los tejidos, se excretan con rapidez por orina y heces.
- **Reacciones de fase III:** se consideran aquí las proteínas transportadoras de eflujo que ayudan en el proceso de detoxificación, exportando o transfiriendo a la circulación sistémica fármacos y sus metabolitos para la posterior eliminación renal o biliar (Alvariza *et al.*, 2010; Moreira Lima, 2015; Wilkinson, 2002).

Raramente una sustancia orgánica, sea o no un fármaco, resiste a la acción catalítica de los diversos sistemas enzimáticos del metabolismo de fase I y/o metabolismo de fase II, que se resumen en la **Figura 5**.

METABOLISMO DE FASE I	
Complejo enzimático	Localización subcelular principal
Citocromo P450 monooxigenasa	Retículo endoplasmático
Flavina monooxigenasa	Retículo endoplasmático
Aldehído deshidrogenasa	Citosol
Alcohol deshidrogenasa	Citosol
Monoaminoxidasa	Mitocondria
Xantina oxidasa	Citosol
Azo o nitroreductasa	Citosol
Aldocetoreductasas	Citosol
Oxidoreductasa	Citosol
Epóxido hidrolasa	Retículo endoplasmático
Hidrolasas (esterasas, amidasas, lipasas)	Citosol

METABOLISMO DE FASE II	
Complejo enzimático	Localización subcelular principal
Glucuroniltransferasa	Retículo endoplasmático
Glutationtransferasa	Citosol
Sulfottransferasa	Citosol
Metiltransferasas no específicas	Citosol
Catecol o-metiltransferasa	Citosol
Acetiltransferasa	Citosol

Figura 5. Complejos enzimáticos involucrados en el metabolismo de fase I y de fase II y su principal localización subcelular. Los sistemas enzimáticos que intervienen en las reacciones de fase I están situados en el retículo endoplásmico y en el citosol, en tanto que las enzimas que participan en la conjugación (fase II) son principalmente citosólicas (modificado de Moreira Lima, 2015; Wilkinson, 2002).

Las transformaciones químicas, metabolismo dependientes, determinadas por la estructura de los fármacos pueden modificar completamente la respuesta biológica. De esta forma, un fármaco originalmente activo puede generar metabolitos inactivos, en un proceso conocido como bioinactivación. En otros casos, las modificaciones producidas pueden generar metabolitos activos, este proceso se llama bioactivación. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que el estudio del metabolismo de fármacos sea parte integrante obligatoria de todos los programas de evaluación pre-clínica y clínica de cualquier nuevo medicamento. De forma resumida, el estudio del metabolismo de fármacos permite: a) determinar la estabilidad metabólica; b) establecer

la cinética de formación y las estructuras químicas de los metabolitos; c) determinar los niveles de concentración, plasmático y tisular, tanto del fármaco como de sus metabolitos, permitiendo establecer la vida media; d) determinar la principal vía de eliminación; e) determinar los sitios moleculares metabólicamente vulnerables y correlacionarlos con los grupos farmacofóricos y auxofóricos del fármaco original; f) establecer la eventual capacidad activadora o inhibidora del fármaco y sus metabolitos sobre enzimas del metabolismo, anticipando eventuales problemas de interacciones medicamentosas; g) determinar la actividad y la toxicidad de los metabolitos y correlacionar con la estructura química; h) establecer bases racionales para el diseño de nuevos prototipos de fármacos; i) establecer bases racionales para la optimización de las propiedades farmacocinéticas de fármacos y compuestos prototipos (Moreira Lima, 2015).

El estudio del metabolismo de fármacos es una etapa imprescindible en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Puede ser realizado por medio de métodos *in vivo* e *in vitro*, los cuales exigen un empleo de técnicas analíticas sensibles y eficaces, sumadas a procedimientos de extracción eficiente y cuantitativas - de pequeñas cantidades de sustancias a partir de fluidos biológicos o de fracciones subcelulares (por ejemplo S9 y microsomas) o cultivo de células (por ejemplo hepatocitos) - complementados con métodos de caracterización estructural, de modo de permitir la elucidación inequívoca de la estructura química de los metabolitos formados. Métodos de predicción metabólica *in silico* vienen siendo incorporados al estudio del metabolismo de fármacos y tienen como ventaja el bajo costo y la rapidez con que se llevan a cabo. La principal desventaja es la baja correlación entre el resultado teórico y el determinado experimentalmente (Moreira Lima, 2015).

1.1.4.3. Enzimas metabolizadoras citocromo P450

El análisis de los complejos enzimáticos involucrados en el metabolismo de fase I revela un predominio de enzimas oxidativas, entre las cuales el CYP450 tiene un lugar destacado, dado su papel fundamental en el metabolismo hepático de fármacos. CYP450 es el nombre genérico dado a una superfamilia de enzimas hemoproteínas -así llamado porque al combinarse con monóxido de carbono tiene un máximo de absorción a una

longitud de onda de 450 nm-, encontradas en células procariotas y eucariotas. En humanos, este complejo enzimático está presente en casi todas las células del cuerpo, pero es en el hígado y en el intestino delgado donde se expresan mayoritariamente (Alvariza *et al.*, 2010; Moreira Lima, 2015).

En humanos, fueron identificados 57 genes funcionales de CYP450, codificando 18 familias y 44 subfamilias de CYP. La nomenclatura oficial para este complejo enzimático fue propuesta en 1987 y recomienda la abreviación CYP para denominar las proteínas P450; uso de un dígito arábico para indicar la familia genética; empleo de una letra para señalar la subfamilia genética; y finalmente otro número para designar gen específico o isoenzima. Son consideradas de la misma familia genética proteínas CYP que poseen más del 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos; mientras valores de identidad mayores al 55% codifican proteínas de la misma subfamilia. A pesar de la diversidad, sólo 3 de las 18 familias de CYP están relacionadas al metabolismo de fármacos. Las CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 Y CYP3A4 (**Figura 6**), en conjunto, corresponden a cerca del 90% del metabolismo oxidativo de los fármacos disponibles en el mercado farmacéutico mundial (Alvariza *et al.*, 2010; Moreira Lima, 2015).

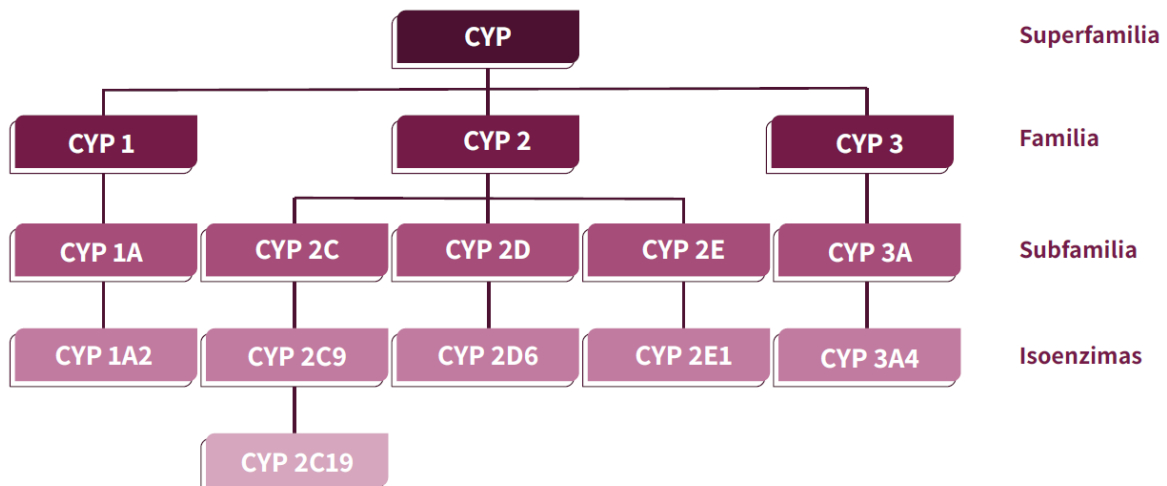


Figura 6. Principales familias, subfamilias e isoenzimas de CYP450 involucradas en el metabolismo de fármacos (modificado de Moreira Lima, 2015) .

Los CYPs de células eucariotas se agrupan, con base en su localización subcelular en tres grandes categorías: a) microsomal, encontrada en la membrana del retículo

endoplasmático; b) mitocondrial, insertas en la membrana de las mitocondrias; c) citosólica, única categoría conocida para CYPs de procariontes, rara en eucariotes. Los CYPs microsomales corresponden, mayoritariamente, a enzimas de mamíferos localizadas en la membrana del retículo endoplásmico de hepatocitos y están involucradas en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos. La actividad enzimática de los CYPs microsomales depende de la acción de una flavoproteína, conteniendo cantidades equimolares de flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenina dinucleótido (FAD), denominada NADPH-CYP450 reductasa. Esta enzima es responsable de la transferencia de electrones del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) hacia el CYP450, promoviendo su reducción. A nivel molecular, el CYP está constituido por un grupo prostético (el hemo) y por una parte proteica (**Figura 7. A.**). El hemo consiste en un macrociclo tetrapirrólico conectado por grupos CH, que contiene como sustituyentes cuatro radicales metilo, dos radicales vinilo y dos ácidos propiónicos. En el centro del macrociclo se encuentra un átomo de hierro (II o III), coordinando los cuatro nitrógenos del anillo pirrólico y a un quinto ligando axial que define el tipo de hemoproteína (**Figura 7. B.**) (Moreira Lima, 2015).

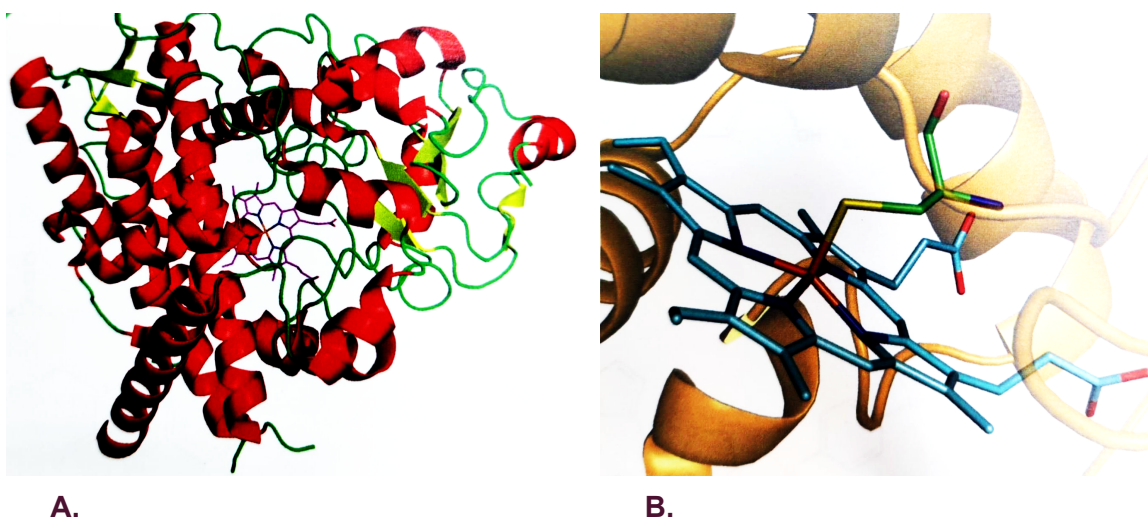


Figura 7. A. Estructura cristalográfica del CYP3A4 (PDB 4K9W). Unidad prostética representada por el grupo hemo (en magenta), parte proteica representada por las α -hélices (en rojo), hojas β (en amarillo) y asas (en verde) (Moreira Lima, 2015). **B. Estructura del grupo hemo del CYP450.** El CYP450 se distingue por la coordinación de un átomo de azufre del residuo del aminoácido cisteína y por la presencia de hierro en estado de oxidación +3 (Moreira Lima, 2015).

En forma resumida, el CYP450 contiene, como muchas de las proteínas que utilizan O_2 como sustrato, un grupo hemo inserto de manera no covalente en la cadena polipeptídica. Al asociarse con flavoproteína reductasa forman un sistema *oxidasa de función mixta* (MFO). Actúan como oxidasa terminal en la cadena de transferencia de electrones, desde el punto de vista bioquímico, son monooxigenasas que promueven la oxidación a partir de la inserción de un átomo de oxígeno en un sustrato orgánico (RH), por ejemplo, en la estructura de un fármaco, en el proceso, el otro átomo de oxígeno se reduce a agua (**Figura 8**) (Moreira Lima, 2015).



Figura 8. Ejemplo esquemático de reacción catalizada por monooxigenasas (modificado de Moreira Lima, 2015).

1.2. Fascioliasis hepática

1.2.1. Infecciones parasitarias producidas por helmintos

Siempre ha existido a nivel mundial un gran número de infecciones parasitarias producidas por helmintos, con gran incidencia tanto a nivel de salud humana como en el ámbito de la producción ganadera. Según los últimos estudios realizados se estima que son responsables de más de un 60% de las infecciones humanas, así como de un 75% de las enfermedades infecciosas emergentes en humanos. Los helmintos parásitos de relevancia clínica y veterinaria pueden clasificarse según su morfología general externa, en nematodos (gusanos redondos), cestodos y trematodos (gusanos planos). Dentro de este último grupo se encuentran cinco parásitos considerados como los principales implicados en las trematodiasis por transmisión alimentaria: *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* y *Paragonimus spp*, estimándose que cerca de 56 millones de personas se infectaron con alguno de estos trematodos en 2005,

causando 200000 casos de enfermedad y más de 7000 muertes al año, lo que supone más 2 millones de años de vida perdidos por discapacidad y muerte en todo el mundo cada año (OMS, 2021).

Dentro de las regiones más afectadas por las trematodiasis se encuentran el altiplano boliviano, África, el sudeste asiático y en menor medida países europeos como España y Portugal. El desinterés en estas enfermedades, sumado al hecho de que no se ha priorizado la investigación en la búsqueda de nuevas estrategias para su control y prevención, hace que las mismas sean consideradas como enfermedades desatendidas por la OMS (Keiser y Utzinger, 2007).

1.2.2. *Fasciola hepatica*

La especie *F. hepatica* es un helminto, perteneciente al filo de los platelmintos, clase trematoda, subclase Digenea (Hotez *et al.*, 2008). Parásito lanceolado aplanado y con forma de hoja, el estado adulto presenta una forma plana y sin segmentos, de aproximadamente 2 - 3,5 centímetros de largo y 1 - 1,5 centímetros de ancho. Es de color rosa pálido o grisáceo (**Figura 9. A.**) (Brossard, 2017), con el extremo anterior saliente en forma de cono, posee una ventosa oral y otra ventral, son hermafroditas y ambas gónadas se encuentran bien desarrolladas con forma ramificada. El aparato digestivo se encuentra formado por la faringe, el esófago y el ciego, este último dividido en dos tubos ramificados (**Figura 9. B.**) (Martínez *et al.*, 2012). Desde un punto de vista biológico estricto, *F. hepatica* es un parásito complejo y “avanzado”: el cuerpo foliáceo es bilateralmente simétrico, muestra cefalización en la porción anterior, por la incorporación de dos ganglios cerebroides. El aumento en la función nerviosa motora le ha permitido sobrevivir y reproducirse exitosamente en gran variedad de nichos ecológicos (Carrada-Bravo, 2007).

Es un parásito hematófago que posee un ciclo heteroxeno que necesita de dos huéspedes, un hospedero intermediario, un caracol del género *Lymnaea* y un hospedero definitivo. Este último, también actúa como reservorio, y en general es un mamífero, con mayor frecuencia el ganado ovino y bovino, lo que causa pérdidas económicas masivas estimadas a nivel mundial en 3200 millones de dólares (Carmona y Tort, 2017). Se han

reportado casos de infección en otros animales domésticos como cabras, cerdos, caballos, llamas, alpacas, emúes, cuyes, etc. (Mas-Coma *et al.*, 1997) y en fauna autóctona y/o salvaje de las distintas regiones como ñandúes, nutrias, carpinchos, chinchilla patagónica, guanacos, ciervos, conejillos de indias, liebres y pudúes, convirtiéndolo en un parásito de difícil control. El humano también es huésped definitivo de *F. hepatica* (Álvarez *et al.*, 2009; Bravo Antilef, 2013; Cuervo *et al.*, 2015; Dittmar, 2002; Fugassa, 2015; Gayo *et al.*, 2011; Hernández y González, 2011; Issia *et al.*, 2009; Ménard *et al.*, 2001; Santarem *et al.*, 2006).

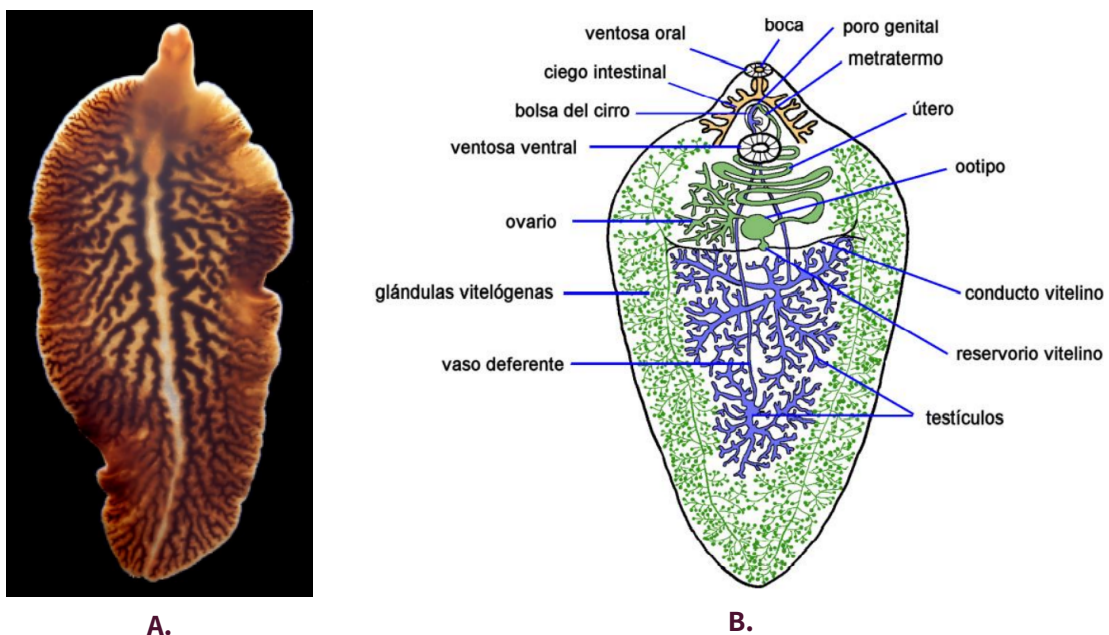


Figura 9. A. Foto de *F. hepatica* (tomada de Giao, 2008). B. Dibujo esquemático de la anatomía de *F. hepatica*, vista ventral (tomado de García *et al.*, 2011).

F. hepatica tiene un ciclo de vida típico de trematodos digeneanos, que comprende estadios de adulto, huevo, miracidios, esporoquistes, redias y cercarias (Rehbein *et al.*, 2021). Se puede ver en la **Figura 10** el ciclo de *F. hepatica*, donde la infección de su hospedero definitivo inicia cuando éste ingiere alimentos o agua contaminada con metacercarias, la forma quística del parásito, que resiste hasta 6 meses en adecuadas condiciones climáticas. Una vez que llegan al intestino, cada metacercaria desenquista dando lugar a un juvenil recientemente desenquistado (JRD), larva móvil que puede alcanzar entre 100 y 170 μm , capaz de atravesar la mucosa intestinal a nivel del duodeno y

migrar hacia el hígado por la cavidad peritoneal. Esta forma puede obtenerse mediante un protocolo de desenquiste *in vitro* de las metacercarias en el laboratorio, y permite realizar tamizaje de compuestos para evaluar actividad fasciolicida (Ferraro *et al.* 2016, Ferraro, 2019).

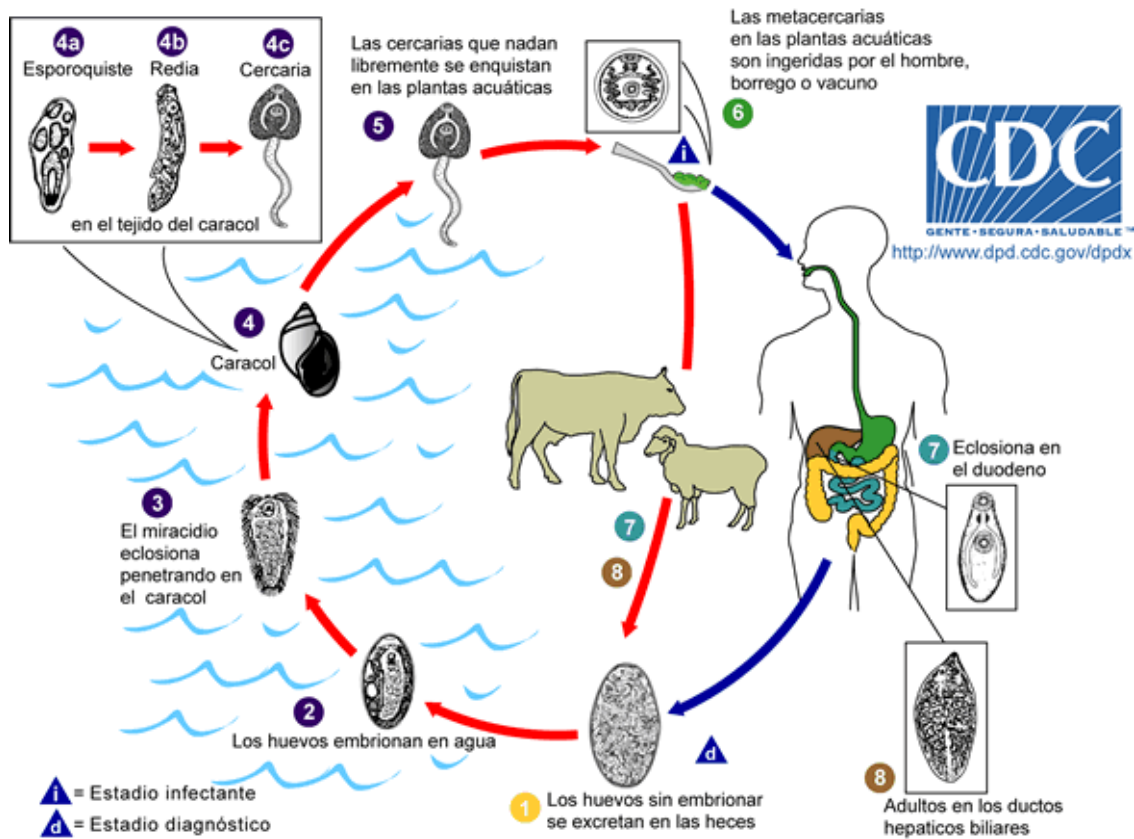


Figura 10. Ciclo vital de *Fasciola hepatica*. Los huevos inmaduros pasan a los ductos biliares y las heces (1). Los huevos se vuelven embrionados en agua (2), y liberan miracidios (3), que invaden un caracol adecuado como hospedador intermediario, incluyendo muchas de las especies del género *Lymnaea* (4). El parásito pasa por varios estadios de desarrollo (esporoquistes (4a), redias (4b) y cercarias (4c). Las cercarias se liberan del caracol (5) y se enquistan como metacercarias en la vegetación acuática o en otras superficies. Los mamíferos adquieren la infección al ingerir la vegetación que contiene las metacercarias. Los humanos se infectan por ingerir las metacercarias en plantas de agua dulce como el berro (6). Después de la ingestión, las metacercarias eclosionan en el duodeno (7) y migran a través de la pared intestinal, hacia la cavidad peritoneal y al parénquima hepático, así como los ductos biliares, en donde se desarrollan en adultos (8). En los humanos, la maduración desde metacercarias hasta adultos toma aproximadamente de 3 a 4 meses. Los adultos de *F. hepatica* tienen una dimensión de hasta 30 mm por 13 mm; residen en los ductos biliares grandes de los hospedadores mamíferos (Modificado de CDC, 2019).

1.2.3. Fascioliasis hepática en humanos

1.2.3.1. Epidemiología

La fascioliasis (fasciolosis, fasciolosis o distomatosis hepatobiliar) es una infección zoonótica parasitaria endémica causada por trematodos del género *Fasciola*, *F. hepatica* y *F. gigantica*. La especie más frecuente a nivel mundial es *F. hepatica*, que se encuentra distribuida en todos los continentes y los expertos la señalan como la enfermedad infecciosa parasitaria con la más amplia distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal a nivel mundial (Gil *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012; Recalde-Reyes *et al.*, 2014; Zafra *et al.*, 2021). La OMS incluye a la fascioliasis en la lista de las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs del inglés *Neglected Tropical Diseases*) (Mas-Coma *et al.*, 2018), además, se incluyó en la lista de importantes helmintiasis con un gran impacto en el desarrollo humano, en la Tercera Reunión Mundial de los Socios para el Control de Parásitos celebrada en la sede de la OMS en Ginebra en 2004 (Mas-Coma *et al.*, 2005).

Lamentablemente la información acerca de la distribución y prevalencia de fasciolosis es escasa y todavía insuficiente. La recolección de pocos estudios sistemáticos no permite conocer la tasa de infección (Malandrini *et al.*, 2011), lo que es un hecho es que, como se observa en la **Figura 11**, esta trematodosis se encuentra emergiendo en todos los continentes y tiene una importancia reconocida por su implicación en la salud humana con una alta morbilidad en determinados territorios, particularmente en las regiones rurales andinas. En América Latina, se ha descrito en Bolivia, Perú, Brasil, Venezuela, Chile, Argentina, Ecuador, Cuba, Colombia, Uruguay y el Caribe, entre otros. En los 2 primeros países con prevalencias tan altas como 65-92% (Bargues *et al.*, 2017; Recalde-Reyes *et al.*, 2014). La situación epidemiológica y por tanto la concepción de la fasciolosis humana como zoonosis ha cambiado en los últimos años, habiéndose reportado zonas de alta prevalencia alrededor de todo el mundo. Desde 1980 el número de notificaciones sobre personas infectadas por *F. hepatica* ha aumentado considerablemente en varias zonas geográficas, y se ha señalado la existencia de verdaderas endemias humanas (Martínez *et al.*, 2012; Recalde-Reyes *et al.*, 2014). Revisiones de la década del 90 comunicaron más de 2.600 casos humanos notificados por 42 países (Chen y Mott, 1990). En una revisión más

reciente se compilan un total de 7071 casos humanos reportados de 51 países en los últimos 25 años, distribuidos en: África (487), América (3.267), Asia (354), Europa (2.951) y Oceanía (12), aunque se estiman infectadas 17 millones de personas y otros 180 millones están en riesgo de infección. Estos datos demuestran el grave peligro a la salud humana (Cwiklinski *et al.*, 2016; Martínez *et. al*, 2012; McManus, 2020), siendo los niños en edad escolar (5 a 16 años) el grupo más expuesto y cuyas tasas de infección son las más altas (Miranda, 2017). El incremento observado en el número de casos durante los últimos años probablemente es debido a mayor sensibilidad en el diagnóstico y mejor acceso a centros de referencia que implementan inmunodiagnóstico. La enorme diferencia entre los casos reportados y las estimaciones está influenciada por distintos factores; la enfermedad no es de denuncia obligatoria; no todos los centros de salud cuentan con técnicas de diagnóstico, el conocimiento sobre la enfermedad en la práctica clínica es escaso y probablemente no todos los casos diagnosticados se han publicado (Malandrini *et al.*, 2011). Por los motivos antes mencionados, la gran distribución global e incidencia, la fascioliasis humana no debe considerarse simplemente como una enfermedad zoonótica secundaria, sino como una enfermedad parasitaria humana importante.

Las características epidemiológicas requeridas para completar el ciclo biológico y transmisión de la enfermedad son diversas, complejas y únicas. Se han identificado múltiples factores climáticos, biológicos, topográficos y humanos que favorecen la perpetuación del ciclo vital del parásito. Dentro de ellos cabe destacar que la temperatura y humedad ambiental, los numerosos reservorios de agua, la viabilidad del hospedero intermediario y la presencia de animales infectados (principalmente ganado), son factores determinantes para la diseminación de la enfermedad en la población. Dentro de los factores humanos se han señalado algunos como el consumo de vegetales crudos de tallo corto y agua no pasteurizada de manantiales, canales o acequias (Marcos *et al.*, 2007, Martínez *et. al*, 2012). La pobreza crónica, la falta de educación sanitaria eficaz y la convivencia próxima con rumiantes domésticos contribuyen a reforzar el peligro de infectarse por *Fasciola*, principalmente los niños (Carrada-Bravo, 2007).

F. hepatica tiene una vía de entrada digestiva al organismo, se contrae por la ingesta accidental de las metacercarias enquistadas difíciles de lavar presentes en los vegetales de tallo corto como berros, lechugas, achicoria, diente de león, alfalfa, etc., o en el agua (Jave *et al.*, 1999). También, aunque en raras ocasiones, se han producido infecciones en humanos por comer hígado de oveja o cabra crudo o mal cocido que contenía el estado inmaduro del parásito (CDC, 2018). No se transmite directamente de animal a persona o de persona a persona, porque los huevos presentes en las heces frescas de los hospedadores no son infecciosos.

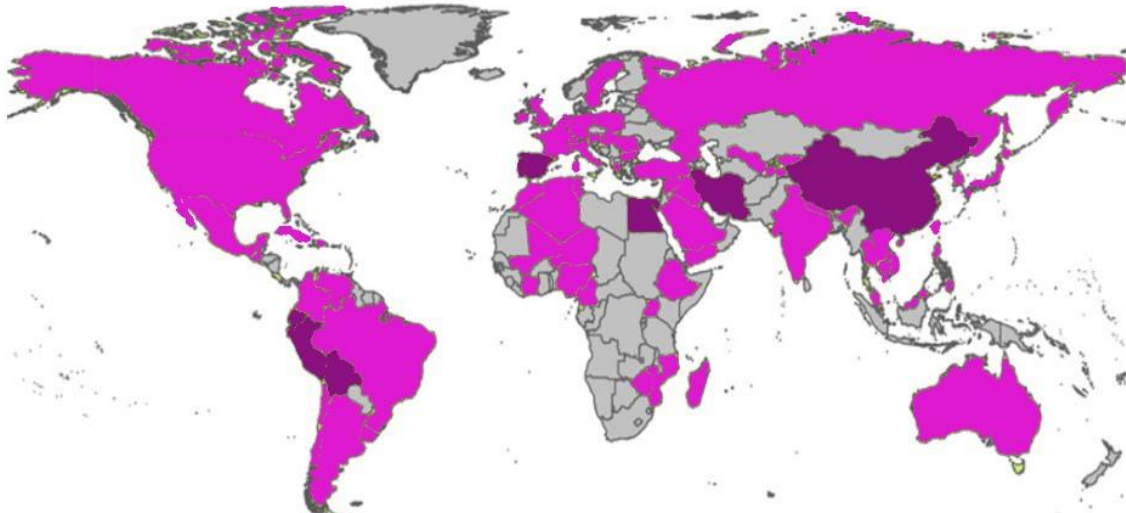


Figura 11. Mapa de distribución de casos autóctonos de infección por *Fasciola spp* reportados en humanos. El color violeta oscuro indica los países en los que se pudieron identificar en la bibliografía estimaciones fiables de la prevalencia nacional de infecciones humanas después de 1980 y que, por lo tanto, se incluyeron en las estimaciones más recientes de la carga mundial de morbilidad. El violeta más claro indica países en los que no se pudieron identificar en la bibliografía estimaciones fiables de la prevalencia nacional de infecciones en humanos después de 1980, pero en los que, no obstante, se notificaron casos en humanos (Fürst *et al.*, 2012).

1.2.3.2. Manifestaciones clínicas

Los adultos de *F. hepatica* viven en los conductos hepatobiliares desde donde pueden migrar al conducto hepático común, al colédoco o a la vesícula biliar y, en ocasiones, al conducto pancreático (Namsanor *et al.*, 2020). Ocasionalmente pueden darse

localizaciones ectópicas de la infección (fasciolosis ectópica), por ejemplo: en la pared intestinal, en los pulmones, en el tracto genitourinario, en el cerebro, en el tejido subcutáneo o en la mucosa faríngea. La gravedad de la enfermedad depende de la cantidad de metacercarias ingeridas. Se ha comprobado que el tiempo de vida de *F. hepatica* adulta en el hombre es de 9 a 13,5 años (Mas-Coma *et al.*, 2005).

La fascioliasis hepática se puede presentar de forma aguda, latente o crónica. Las manifestaciones clínicas que ocasiona esta entidad generalmente son inespecíficas y varían de acuerdo con la fase de la enfermedad. La **forma aguda** está asociada con la tríada de fiebre, hepatomegalia y eosinofilia. La **forma latente** se puede comportar de forma asintomática; en ocasiones pueden aparecer escasas manifestaciones gastrointestinales, y la **fase crónica** sintomática se caracteriza por malestar general, cólico biliar, ictericia, colangitis, pancreatitis y fibrosis hepática, fiebre, dolor hipocondrial derecho, diarrea persistente y vómito (Marcos *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2012).

En la patogenia de esta enfermedad se denotan dos períodos principales: el primero, denominado inicial o de invasión, que comienza desde el momento de la ingestión de las metacercarias hasta la implantación de los parásitos en los conductos biliares, y el segundo período, que se conoce como de estado y es cuando los parásitos alcanzan la madurez sexual y comienzan a eliminar huevos en la materia fecal del hombre o animales infectados (Martínez *et al.*, 2012).

Durante el **período inicial**, los parásitos juveniles, al migrar por el peritoneo y el parénquima hepático, inducen reacción tisular a cuerpo extraño y producen inflamación del peritoneo con exudado e infiltrado leucocitario, principalmente de eosinófilos; el hígado aumenta de tamaño, con presencia de microabscesos y necrosis. Durante el **período de estado**, y una vez que los parásitos se localizan en los conductos biliares, estos aparecen dilatados y esclerosados, con reacción inflamatoria crónica en la periferia de los conductos biliares de tipo fibrosis. El epitelio puede presentar hiperplasia pseudoglandular. Cuando el número de parásitos es muy grande, se presenta atrofia en el

parénquima hepático por compresión y cirrosis periportal (Marcos *et al.*, 2007; Martínez *et. al*, 2012).

1.2.3.3. Diagnóstico

Debido a la naturaleza asintomática de la mayoría de las infecciones leves y moderadas, la desinformación del personal médico sobre esta patología y la diversidad de manifestaciones clínicas y otros problemas en la mayoría de los pacientes, la infección por trematodos hepáticos se confunde fácilmente con otras enfermedades médicas (Hu, 2013; Liang y Wu, 2008). Los exámenes de laboratorio se realizan por métodos directos, cuando se encuentra el parásito adulto o sus huevos, o indirectos, al detectar anticuerpos u otros signos de sensibilización del hospedero (Martínez *et. al*, 2012).

En los **métodos directos** el diagnóstico parasitológico se efectúa por el hallazgo de huevos en la bilis, en las materias fecales o en el fluido duodenal. Dado que el parásito elimina los huevos de forma intermitente, el examen de heces presenta serias dificultades, se debe realizar en forma seriada, mediante la realización de diferentes métodos. Además, los análisis son negativos en el período de invasión de *F. hepatica*, ya que el parásito aún no ha llegado a la madurez sexual. El parásito adulto puede observarse macroscópicamente y extraerse mediante cirugía biliar o colangiografía endoscópica retrógrada (Gil *et al.*, 2014; Martínez *et. al*, 2012).

Las dificultades en el diagnóstico coproparasitológico, ha originado que los sistemas inmunoenzimáticos de determinación de antígenos de excreción-secreción (AgES) del parásito constituyan una alternativa necesaria e indispensable para lograr este objetivo (Martínez *et. al*, 2012).

Entre los **métodos indirectos** de diagnóstico, la serología es la herramienta de elección para la detección de anticuerpos específicos. En la actualidad la prueba de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) es una de las herramientas diagnósticas más empleadas y aplicable a gran escala, cuya sensibilidad y especificidad depende de la fuente del antígeno utilizado. Otros de los métodos indirectos utilizados son prueba de

fijación del complemento, inmunodifusión, contraelectroforesis e inmunofluorescencia para detectar anticuerpos específicos contra *F. hepatica* (Martínez *et al.*, 2012).

Para realizar el diagnóstico clínico es importante tener presente el hemograma con eosinofilia elevada como signo fundamental para la sospecha de fasciolosis humana. En ocasiones también puede observarse leucocitosis con anemia de magnitud variable y alteraciones del perfil hepático. La resonancia magnética y/o tomografía abdominal en fase aguda muestran hematomas subcapsulares y en fase crónica se puede apreciar nódulos, pseudotumores y defectos de llenado compatibles con la silueta del parásito. La eosinofilia elevada, la procedencia de una zona endémica y el antecedente de consumo de berro u otras plantas acuáticas, son factores que deben tenerse en cuenta para realizar un correcto diagnóstico de esta enfermedad (Gil *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2012).

1.2.3.4. Tratamiento

En la actualidad, no existen vacunas comerciales contra *Fasciola spp.* (Lalrinkima *et al.*, 2021; Siles-Lucas *et al.*, 2021), principalmente porque los mecanismos de evasión inmune de estos parásitos y los mecanismos de regulación inmune del huésped contra los parásitos no están del todo claros. Uno de los problemas importantes en el desarrollo de tales vacunas es la complejidad del ciclo de vida del tremátodo y su capacidad para evadir la inmunidad del huésped. Además, los parámetros experimentales varían mucho entre diferentes ensayos. Estos parámetros incluyen principalmente la selección del huésped, la medida de la infección, el adyuvante o portador utilizado, el tiempo de infección y la determinación de los resultados. En particular, los protocolos experimentales realizados en roedores pueden no ser adecuados para rumiantes, especialmente ovejas. Por lo tanto, en la actualidad, el desarrollo de una vacuna aún debe incluir estudios de eficacia de especies individuales. Finalmente, en comparación con algunas otras vacunas con suficientes gastos de investigación y desarrollo, como las vacunas contra el VIH, el COVID-19 y la malaria, la financiación para la investigación de la vacuna contra *F. hepatica* es relativamente insuficiente (Zhang *et al.*, 2021).

La fascioliasis impone una gran carga a las poblaciones humanas empobrecidas, y el triclabendazol (TBZ) es el único medicamento recomendado por la OMS para el tratamiento de *F. hepatica* (Morales *et al.*, 2021), así como para la mayoría de las infecciones por trematodos transmitidas por los alimentos (Maggioli *et al.*, 2020). El TBZ es altamente eficaz tanto en humanos como en animales, dejando a un lado productos también eficaces, como la dehidroemetina y el bitionol, pero con mayores efectos colaterales en humanos (Gil *et al.*, 2014).

Debido a la alta incidencia de esta parasitosis y el uso de TBZ como droga de elección, se han descrito casos de resistencia al fármaco en el viejo mundo y en América, inicialmente reportados en animales, posteriormente y en menor proporción en humanos. La disminución de la eficacia del TBZ es una amenaza para la salud pública y la industria ganadera en regiones endémicas (Gil *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Se ha propuesto que la supervivencia de parásitos juveniles que migran a través del hígado es una causa de infección persistente después del tratamiento. En modelos de infección de fascioliasis, los parásitos juveniles han reducido la susceptibilidad al TBZ en comparación con la infección establecida con parásitos maduros (Morales *et al.*, 2021).

El tratamiento de fasciolosis hepática ha sido siempre un problema ya sea por su eficacia como por su toxicidad, clásicamente se usaba el clorhidrato de emetina durante la fase aguda y cloroquina en la fase crónica, y los resultados no fueron del todo satisfactorios. También se ha usado en algunos países el Bitionol con tasas de curaciones muy altas, aunque se ha reportado hasta 60% de recurrencias. A finales de los 90 aún se promocionaba al Praziquantel como terapia en tenias y fasciola con éxitos muy relativos. Otras drogas que se describen como alternativas son el metronidazol y el niclofolan con casuísticas pequeñas (Jave *et al.*, 1999).

La aparición de resistencia a este fármaco en varias partes del mundo ha hecho que en la actualidad se tengan que buscar alternativas para el tratamiento, la nitazoxanida se ha utilizado en algunos estudios con pacientes que fracasaron repetidamente en el tratamiento con TBZ, pero no fue eficaz (Morales *et al.*, 2021). También se ha ensayado

combinar este imidazol con derivados de la artemisina con resultados satisfactorios. Aun así, no existen alternativas establecidas al TBZ para el tratamiento de la fascioliasis (Martínez *et. al*, 2012).

Por no ser la fascioliasis una parasitosis de alta prevalencia en el humano, la industria farmacéutica discontinuó la producción masiva de TBZ para uso humano, fabricando sólo lotes aislados y ocasionales para la OMS, OPS y con destino a países con mayor incidencia de esta zoonosis en humanos y animales de abasto (Gil *et al.*, 2014). Esto último sumado a lo antes mencionado sobre la disminución de la eficacia del tratamiento ha llevado a que exista una necesidad urgente de medidas efectivas, como identificar las moléculas clave en la invasión de cercarias y la formación de metacercarias para examinarlas como moléculas candidatas para vacunas para prevenir la infección por trematodos hepáticos (Liu *et al.*, 2019). La identificación de enzimas clave que difieren de las presentes en sus huéspedes ha proporcionado un marco novedoso en el que buscar estrategias para el diseño de fármacos antifasciolícos (Carmona y Tort, 2017). En resumen, se necesita más investigación para comprender las relaciones de los parásitos susceptibles y resistentes con los huéspedes intermediarios, ganaderos y humanos. Además, se necesita urgentemente investigación sobre fármacos alternativos para tratar la infección humana y/o superar la resistencia al TBZ (Caravedo y Cabada, 2020).

1.3. Antecedentes

Muchos factores de virulencia han sido identificados como objetivos primarios para el control de parásitos, ya que pueden ser utilizados para desarrollar terapias basadas en fármacos o inmunógenos. Las cisteína proteasas juegan papeles esenciales y se han explorado como blancos moleculares antiparasitarios. Los trematodos hepáticos secretan grandes cantidades de cisteína proteasas, que son esenciales en la interacción huésped-parásito en todas las etapas de su ciclo de vida. La *FhCL3* se expresa en los juveniles recién desenquistados y, en consecuencia, participa en los primeros pasos de la infección del huésped mamífero. Un conjunto diferente de catepsinas L, entre otras la

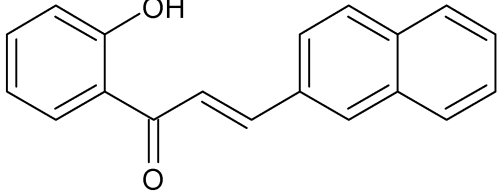
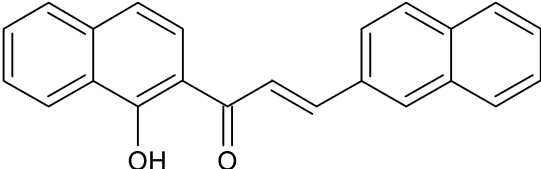
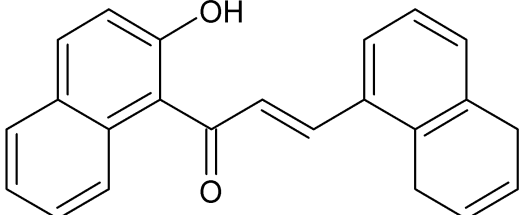
FhCL1, son producidas por trematodos adultos que residen en los conductos biliares y están involucradas principalmente en la digestión de nutrientes y en el desarrollo de mecanismos de respuesta inmune. Por lo tanto, en *F. hepatica* las catepsinas son objetivos interesantes para el desarrollo de fármacos que eviten la infección o reduzcan la carga parasitaria y los efectos patogénicos de la infección (Ferraro *et al.*, 2016).

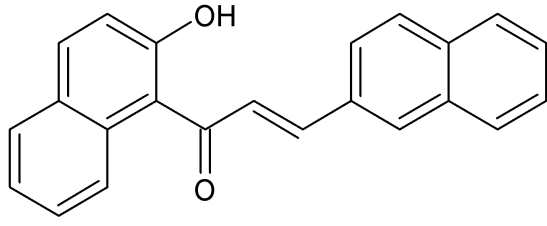
La búsqueda de fasciolicidas es una línea de investigación instaurada en el Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas del CENUR Litoral Norte, en la que, en colaboración con otros grupos de investigación se han realizado diversos trabajos previos. La misma inició con la tesina de grado “Búsqueda de inhibidores de cisteína proteasas esenciales del parásito *Fasciola hepatica* como potenciales fármacos”, donde se identificaron inhibidores de las catepsinas del estadio juvenil y adulto con potencial blanco farmacológico para el control de la fascioliasis (Ferraro, 2015). Este proyecto continuó con la tesis de maestría “Caracterización bio-estructural de inhibidores de catepsinas de *F. hepatica* como potenciales fármacos antihelmínticos”, donde se evaluaron una serie de compuestos de la familia de 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina y compuestos híbridos flavonoides-quinoxalinas como inhibidores de dichas enzimas. Mediante estrategias experimentales y computacionales se caracterizó la inhibición de los mejores compuestos, se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀), y se estudió la cinética de unión, reversibilidad y selectividad utilizando catepsina L humana. Finalmente, se estudió la citotoxicidad *in vitro* en diferentes modelos celulares y la actividad fasciolicida sobre parásitos en cultivo de los compuestos que ofrecieron mejor porcentaje de inhibición (Ferraro *et al.*, 2016, Ferraro, 2019).

Estos estudios mostraron que los flavonoides con aromaticidad extendida del tipo naftilchalconas, identificados con los códigos **C31**, **C33**, **C34** y **C35** (**Tabla 1**), presentan la mejor actividad dentro de los compuestos ensayados como inhibidores de estas catepsinas. Además, la actividad inhibitoria de *FhCL1* y *FhCL3* se correlacionó con actividad fasciolicida *in vitro* y con disminución de la migración *ex vivo* a través de la pared del duodeno de rata (Ferraro *et al.*, 2016). Por otro lado, los flavonoides son estructuras

privilegiadas como compuestos biológicamente activos con diversas propiedades reportadas, presentándose como antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos, antiinflamatorios, antiprotozoarios, antiVIH, antituberculosos, entre muchas otras (Batovska y Todorova, 2010; Sahu, *et al.*, 2012; Singh, *et al.*, 2014). Además, varios flavonoides, particularmente las chalconas, han mostrado un buen potencial farmacológico y han sido aprobados para uso clínico o probados en humanos (Batovska y Todorova, 2010). También se han descrito derivados de flavonoides con actividad inhibidora de catepsina L de otros organismos (Baek *et al.*, 2013; Burger *et al.*, 2014; de Sousa *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013; Troeberg *et al.*, 2000), así como algunos derivados naturales con actividad fasciolicida (del Rayo Camacho *et al.*, 1991; Toner *et al.*, 2008).

Tabla 1. Código y estructura de los cuatro compuestos, porcentaje de inhibición sobre las Catepsinas L1 y L3 de *F. hepatica*.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	% INHIBICIÓN <i>FhCL1</i>	% INHIBICIÓN <i>FhCL3</i>
C31		61	41
C33		65	29
C34		65	29

C35		67	44
-----	---	----	----

Estos resultados dieron lugar al registro de la patente nacional “Naftilchalconas para el control de fascioliasis y otras trematodiasis mediante inhibición de catepsinas” (Cabrera *et. al.*, 2017). Teniendo en cuenta estos antecedentes es que este trabajo propone continuar con la caracterización de estos cuatro compuestos, contribuyendo así a la etapa preclínica del desarrollo de potenciales fármacos fasciolicidas.

1.4. Objetivos

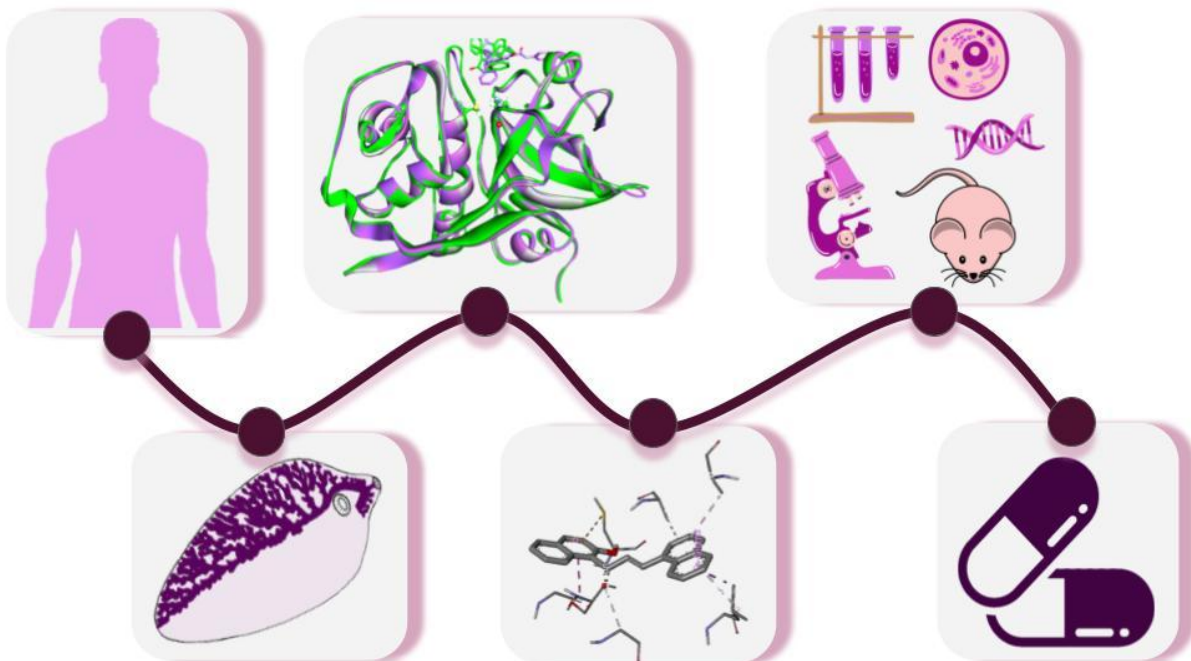
1.4.1. Objetivo general

Contribuir al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la fascioliasis, realizando estudios preclínicos de naftilchalconas sintéticas con actividad fasciolicida.

1.4.2. Objetivos específicos

- 1.4.2.1. Estudiar la metabolización *in vitro* por fracción S9 mediante HPLC-MS/MS de cuatro compuestos *hits*.
- 1.4.2.2. Estudiar la estabilidad química del compuesto con mejor perfil farmacológico (**C34**) a diferente pH y en plasma sanguíneo mediante HPLC-MS/MS.
- 1.4.2.3. Determinar la citotoxicidad inespecífica frente a la línea celular Hep-G2 y espermatozoides bovinos para los cuatro compuestos *hits*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS



Los cuatro compuestos (**C31**, **C33**, **C34** y **C35**) utilizados en los siguientes ensayos fueron sintetizados y caracterizados en el marco de estudios previos del grupo y actualmente integran la quimioteca propia del Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas.

2.1. Estudio de metabolización *in vitro* por fracción hepática S9.

La fracción hepática S9 se define como la fracción sobrenadante obtenida de un homogeneizado de órgano (generalmente hígado) mediante centrifugación durante 20 minutos en un medio adecuado; esta fracción contiene citosol y microsomas (Duffus *et al.*, 2007). La S9 utilizada en este trabajo fue adquirida comercialmente, producida por MOLTOX[®] (lote N° 3818) a partir de hígado de rata macho, cepa *Sprague Dawley*, 5 - 6 semanas de edad y peso entre 175 - 199 g. La misma es suministrada liofilizada en KCl y se reconstituye en agua destilada según indicaciones del proveedor. Esta fracción de hepatocitos murinos contiene tanto enzimas metabolizadoras microsomales como citosólicas, por lo que permite evaluar un amplio rango de posibles reacciones de metabolización.

El ensayo se realizó adaptando el protocolo de Kerns y Di (2008). Se partió de un stock 10 mM de los compuestos en 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluó un volumen de 500 µL con una concentración de 15 µM de los compuestos en la mezcla de incubación, no superando 1% de DMSO. La mezcla de incubación consta de la fracción hepática S9, con una concentración final de proteína de 2.5 mg/ml, en *buffer* Tris-HCl 0.05 M, pH 7,4 (EDTA 5 mM, NADPH 1 mM y MgCl₂ 5 mM). La incubación se realizó a 37°C y se detuvo a tiempos 15, 30 y 60 minutos con 500 µL de acetonitrilo frío, que inactiva las enzimas y precipita el material microsomal. El incubado se centrifugó y el sobrenadante se inyectó en un sistema de cromatografía líquida acoplado a un detector de masas en tándem (HPLC-MS/MS) para cuantificar el porcentaje remanente del compuesto de prueba después de la incubación.

Para la determinación analítica se empleó un HPLC-MS/MS equipado con un equipo HPLC Agilent 1200[®] (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) con una bomba binaria y una

columna de fase reversa Agilent Eclipse XDB-C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para el análisis mediante espectrometría de masas se usó un analizador 4000 QTRAP[®] (AB SCIEX[™]; Concord, Canadá) en modo triple cuadrupolo y modo Q1. Se utilizó una ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. La fase móvil consistió en ácido fórmico 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B). Se equilibró la columna con 50% de B durante 1 minuto, seguido de un gradiente de 50% a 100% de B de 10 minutos y se mantuvo en 100% de B durante 5 minutos, finalmente se reequilibró la columna con 50% de B durante 5 minutos previo a la siguiente inyección. El tiempo total de corrida fue de 21 minutos, se utilizó un flujo constante de 600 μ L/min y el volumen de inyección fue de 5 μ L. La celda y la columna se mantuvieron a temperatura ambiente. La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software analítico v 1.5.1 (SCIEX) (Souza *et al.*, 2016).

Para cada corrida se estimó la cantidad remanente del compuesto mediante la determinación del área bajo la curva (AUC) y se calculó el porcentaje (%) de metabolización en relación al AUC del compuesto a tiempo 0 (AUC t_0) como:

$$\% \text{ de metabolización} = 100 - \left(\frac{AUC t_x}{AUC t_0} \times 100 \right)$$

donde t_x corresponde a 30 y 60 minutos.

Del gráfico de (AUC t_x /AUC t_0) en función del tiempo se determina la pendiente de la recta (P). Se define una constante de eliminación (k) como - P y a partir de ella se calculan los parámetros **vida media ($t_{1/2}$)** y **aclaramiento intrínseco (Cl_{int})** con las siguientes ecuaciones:

$$t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{0,693}{k}$$

$$Cl_{int} = \frac{0,693 \times V}{t_{1/2}}$$

donde V = (volumen de incubación (μ L)/proteína (mg)), en nuestro caso V = 470,6 μ L/mg.

Las unidades para Cl_{int} son μ L/min/mg de proteína (Houston, 1994).

Para la obtención de los cromatogramas UV se utilizó un equipo HPLC Shimadzu Prominence[®] (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) con un detector UV-Vis de arreglo de

diodos SPD-M20A y se empleó la misma columna y condiciones cromatográficas detalladas anteriormente.

2.2. Estudios de la estabilidad química de C34 mediante análisis en HPLC-MS/MS.

2.2.1. Estabilidad química a diferentes pH

Este ensayo se realizó adaptando el protocolo de Kerns y Di (2008). La estabilidad química de **C34** se evaluó a una concentración de 100 µM incubando a 37°C durante 3 horas en cuatro valores diferentes de pH de la siguiente manera: en *buffer* ácido fórmico/formiato 0,1 M pH 3, *buffer* ácido acético/acetato de sodio 0,1 M pH 5 y dos *buffer* Tris 0,1 M pH 7,4 y pH 8,3. Para cada pH se realizó una curva de calibración de **C34** de 5 puntos (50, 100, 200, 500 y 750 µg/L). Las diluciones se obtuvieron a partir de un stock de **C34** de 1 mg/L en metanol y llevando a volumen final en acetonitrilo. Todas las muestras, tiempo cero, incubadas y curva de calibración para cada uno de los pH fueron analizadas en un sistema HPLC-MS/MS por duplicado. Para ello se utilizaron los equipos y el método descrito en la sección 2.1.

Se calculó el porcentaje (%) de descomposición del compuesto luego de 3 horas de incubación a cada pH en relación al AUC del compuesto a tiempo 0 (AUC t_0) según la ecuación:

$$\% \text{ descomposición} = 100 - \left(\frac{AUC \ t3h}{AUC \ t0} \times 100 \right)$$

2.2.2. Estabilidad química en plasma sanguíneo

La sangre bovina para la obtención del plasma utilizado en estos ensayos fue adquirida en una colaboración con el Laboratorio de Reproducción Animal Dr. Alfredo Ferraris di Perna de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, a partir de sangrados realizados inmediatamente *post mortem* de animales sacrificados en frigoríficos locales.

Para estudiar la estabilidad de **C34** se utilizó plasma bovino obtenido mediante centrifugación a 5000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar las células sanguíneas y el debris celular y obtener el plasma. El plasma se filtró con jeringa x 0,22 µm. Se evaluó el compuesto a una concentración de 40 µM, partiendo de un stock 10 mM en 100% DMSO. Se incubó durante 3 horas a 37 °C en 200 µL de una mezcla 50% plasma y 50% *buffer* Tris 0,1 M pH 7,4. La concentración final luego de la dilución fue de 2,5% DMSO. La incubación se detuvo con 600 µL de acetonitrilo frío y se centrifugó previo a la inyección en el HPLC-MS/MS para cuantificar el porcentaje de compuesto remanente. En paralelo se realizó una curva de calibración con 5 puntos correspondientes a concentraciones de **C34** de 20, 40, 80, 120, 160 µM, diluciones que se obtuvieron a partir de un stock de 10 mM del compuesto en DMSO. Se inyectaron en un sistema HPLC-MS/MS los tiempos cero, la incubación y la curva de calibración, en todos los casos se realizaron cuadruplicados. Para ello se utilizaron los equipos y el método descrito en la sección 2.1. (Kerns y Di, 2008).

Se calculó el porcentaje (%) **remanente** del compuesto luego de 3 horas de incubación en plasma en relación al AUC del compuesto a tiempo 0 (AUC t₀) según la ecuación:

$$\% \text{ remanente} = \frac{AUC \ t3h}{AUC \ t0} \times 100$$

2.3. Determinación de citotoxicidad inespecífica

2.3.1. Citotoxicidad frente a la línea celular HepG-2

2.3.1.1. Mantenimiento

La línea HepG-2 (ATCC® HTB-8065, derivada de carcinoma hepatocelular humano) fue adquirida comercialmente en ATCC y se mantuvo a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El cultivo se mantuvo en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, por sus siglas en inglés) alto en glucosa (4,5 g/L), suplementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB) en presencia de 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina.

La descomplementación del SFB empleado para suplementar los medios se efectuó durante 40 minutos en un baño de agua termostatzado a 56 °C. La línea posee crecimiento en adherencia y para el mantenimiento en cultivo se emplearon botellas de 25-75 cm² realizando pasajes de las mismas mediante tripsinización cada vez que alcanzaron la confluencia y por un máximo de 20 pasajes. Para despegar las células mediante tripsinización se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa con *Buffer Fosfato Salino* (PBS, de sus siglas en inglés) y se adicionó Tripsina-EDTA 0,25%. Las células fueron incubadas durante 5 a 10 min a 37 °C, se adicionó medio de cultivo completo y se transfirió la dilución adecuada a una nueva botella de cultivo (Freshney, 2010).

2.3.1.2. Criopreservación y revitalización

Para la conservación se utilizó como mezcla crioprotectora 10% DMSO y 90% SFB utilizando una cámara que utiliza isopropanol y permite realizar un enfriamiento progresivo de 1 °C/minuto (Nalgene®). Los cultivos celulares que estaban en fase de crecimiento exponencial fueron tripsinizados, y las células fueron contadas y centrifugadas a 200 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el volumen necesario de mezcla crioprotectora para obtener una concentración de entre 2 y 3 millones de células/mL. Se dispensaron entre 1-1,5 mL de la suspensión celular por criotubo, los cuales fueron almacenados en la cámara de congelación en un freezer de -80 °C (Freshney, 2010).

Para el descongelado y revitalización de la línea celular criopreservada se colocó un criotubo en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo cónico que contenía 10 mL de medio de cultivo a 37 °C y se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo y se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar cantidad y viabilidad de las células recuperadas. Finalmente, las células fueron sembradas en botellas de 25-75 cm² según el caso (Freshney, 2010).

2.3.1.3. Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar citotoxicidad frente a la línea celular HepG-2 se empleó el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), este ensayo se basa en la determinación del contenido proteico de las células, tras haber sido fijadas las células vivas y removidas las células no viables. Tiene la ventaja de ser altamente sensible y no depende de ninguna actividad enzimática intrínseca (Monks *et al.*, 1991).

Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano, se sembraron 10.000 células por pocillo en 100 µL de medio. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO₂. A las 24 horas se agregó 125 µL de medio fresco y 24 horas después se añadió 25 µL de una solución del compuesto a 10X para obtener la concentración final deseada sin sobrepasar 0,5% DMSO final. Para la determinación de valores de IC₅₀ (concentración a la cual se obtiene 50% de citotoxicidad), se ensayaron concentraciones de 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 µM de los compuestos y de TBZ como control positivo. No se observó ningún efecto sobre el crecimiento celular por la presencia de DMSO al 0,5%. La duración del tratamiento fue de 24 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Una vez tratadas las células, se eliminó el medio junto con el producto y se lavaron los pocillos dos veces con 200 µL de PBS a 37 °C. Las células se fijaron con 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50 % v/v y 200 µL de medio de cultivo (sin suero fetal bovino) durante una hora a 4 °C. Posteriormente se decantaron y se lavaron 5 veces con agua destilada. A continuación se añadió a cada pocillo 100 µL de una solución de SRB al 0,4 % v/v en ácido acético al 1% y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se lavaron las placas 5 veces con 200 µL de ácido acético al 1% v/v y se dejaron secar durante toda la noche. El colorante que permanece en el pocillo debido a la presencia de proteínas de origen celular se disolvió en 100 µL de Tris base 10 mM, pH 10, se agitaron las placas para total disolución y se midió absorbancia a 540 nm (Cabrera *et al.*, 2007).

El porcentaje de supervivencia (**% supervivencia**) se calculó como se muestra debajo y se determinó el IC₅₀ utilizando el software GraphPad Prism 6®:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Absorbancia células tratadas}}{\text{Absorbancia células control}} \times 100$$

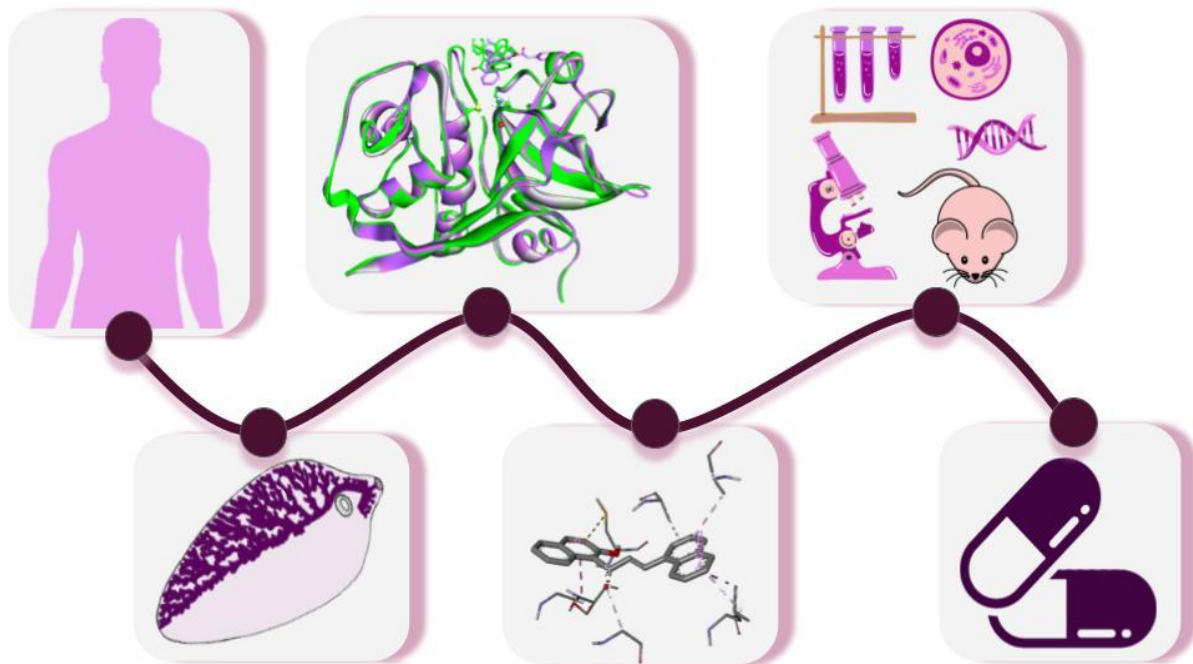
2.3.2. Citotoxicidad en espermatozoides bovinos

Se utilizó semen de toro adquirido comercialmente a la empresa GENSUR Ltda.[®] (*National Association of Animal Breeders*, código de comercialización asignado N° 240). Se trató de un donante de la raza Hereford, de nombre Taurino, lote N° 0321. Los experimentos de citotoxicidad en espermatozoides se realizaron en colaboración con el Dr. Jorge Gil del Laboratorio de Reproducción Animal, Dr. Alfredo Ferraris di Perna de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Se descongelaron muestras de tres pajuelas y se preparó un *pool* de esperma en PBS a una concentración de 40 millones de espermatozoides por mL. Luego, se mezclaron cuidadosamente 50 μ L de esta suspensión de esperma en medio X-Cell con 50 μ L de cada compuesto a evaluar disuelto en una mezcla de PBS-DMSO, de modo de obtener una concentración de ensayo de 50 μ M y no superando 1% de DMSO final. Se mezcló por pipeteo y cuidando de no introducir aire en la muestra. Cada condición y los controles se analizó por triplicado en placas de 96 pocillos, incubando a 37°C durante 1 hora con agitación orbital (100 rpm). El análisis de motilidad se llevó a cabo utilizando un sistema *Computer Assisted Semen Analyzer* (CASA, por sus siglas en inglés) Androvision[®] (Minitube, Tiefenbach, Alemania) con un microscopio Olympus BX 41 (Olympus[®], Japón) equipado con una platina precalentada a 37°C. Cada muestra (10 μ L) se colocó en una cámara de conteo Makler (profundidad 10 μ m, Sefi-Medical Instruments, Israel). Se evaluó el porcentaje de motilidad progresiva (% prog), definido como el porcentaje de células móviles que son capaces de describir un desplazamiento hacia adelante, y el resultado se expresó como **porcentaje (%) motilidad remanente**. Se analizaron un mínimo de 400 espermatozoides de cada muestra de al menos cuatro campos del microscopio (Ferraro *et al.*, 2016; Vicente-Carrillo *et al.*, 2015).

$$\% \text{ motilidad remanente} = \left(\frac{\% \text{ prog condición ensayada}}{\% \text{ prog control negativo}} \times 100 \right)$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1. Estudio de metabolización *in vitro* por fracción hepática S9.

3.1.1. Porcentaje de metabolización de los compuestos

Es importante comprender y optimizar el perfil metabólico y de eliminación de los compuestos prometedores desde el principio del proceso de descubrimiento de fármacos. Las biotransformaciones metabólicas influyen tanto en la eficacia como en la seguridad de los candidatos a fármacos. La rápida metabolización, la vida media corta y la baja biodisponibilidad oral debido a un efecto rápido de primer paso hacen que un compuesto sea ineficaz *in vivo*, mientras que un metabolismo lento o pobre, puede resultar en una acumulación tóxica que lleve a efectos secundarios no deseados. Los diferentes grupos funcionales presentes en cada molécula determinan el comportamiento del fármaco, por lo que su modificación permite manipular el perfil metabólico de un nuevo fármaco para adecuarlo a la aplicación en la que será empleado (Veale, 2021). En este sentido, los datos de estabilidad metabólica *in vitro* permiten orientar las siguientes etapas de la investigación y planificar los estudios de eficacia *in vivo* (Kerns y Di, 2008).

Debido a que el hígado es uno de los órganos más importantes responsables del metabolismo sistémico de los fármacos, se han desarrollado diferentes enfoques para predecir el aclaramiento hepático utilizando metodologías *in vitro*. Por ejemplo, la fracción hepática S9 y los microsomas hepáticos se han utilizado ampliamente para obtener datos de aclaramiento intrínseco y vida media para la predicción del aclaramiento hepático humano (Chao *et al.*, 2015). Como se puede observar en la **Tabla 2**, la evaluación de la estabilidad metabólica de los compuestos mostró que **C31** es el que presenta la mayor tasa de metabolización alcanzando el 94% luego de una hora de incubación mientras que **C34** y **C35** presentan una metabolización entre el 50% y 70% respectivamente. Finalmente, **C33** mostró la menor tasa de metabolización, con 22% al finalizar los 60 minutos de incubación en la fracción S9.

Tabla 2. Porcentaje de metabolización, vida media ($t_{1/2}$) y aclaramiento intrínseco (Cl_{int}) para cada compuesto.

Compuesto	Tiempo de incubación (minutos)	% de metabolización	k	$t_{1/2}$ (minutos)	Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)
C31	0	0	0,0157	44,1	7,4
	30	33			
	60	94			
C33	0	0	0,0036	192,5	1,7
	30	6			
	60	22			
C34	0	0	0,0117	59,2	5,5
	30	63			
	60	70			
C35	0	0	0,0093	74,5	4,4
	30	25			
	60	56			

A partir del porcentaje de metabolización se estimaron otros dos parámetros farmacocinéticos: la **vida media ($t_{1/2}$)** y el **aclaramiento intrínseco (Cl_{int})**. La $t_{1/2}$ es el tiempo que tarda la concentración de un fármaco en el plasma en reducirse a un 50 %. El Cl_{int} es la capacidad de los hepatocitos para eliminar una sustancia sin influencia del flujo sanguíneo, refleja la capacidad máxima de extracción de las células hepáticas y puede estimarse teóricamente. Este, se correlaciona con el **aclaramiento (Cl)** del fármaco, el cual indica la capacidad de un órgano para eliminarlo y se expresa mediante el número de mililitros de plasma que el órgano aclara (elimina totalmente el fármaco) por unidad de tiempo (Armijo, 1997; van de Waterbeemd y Gifford, 2003).

En la determinación de las tasas de aclaramiento hepático *in vivo* a partir de datos del aclaramiento intrínseco *in vitro* se realizan varias suposiciones que pueden no ser confiables en determinadas circunstancias debido a la complejidad del metabolismo, la

variabilidad interindividual y la poca comprensión de ciertos procesos que no están modelados en los sistemas *in vitro* (Houston, 1994; Iwatsubo *et al.* 1997, Wilkinson y Shand, 1975). Por consiguiente, la predicción de la farmacocinética de un compuesto utilizando el Cl_{int} debe interpretarse cuidadosamente. Además, el metabolismo mediante enzimas de la fracción S9 puede no ser el único mecanismo de eliminación de un compuesto y el Cl_{int} también puede verse afectado por el aclaramiento renal, la extracción biliar y la hidrólisis en plasma o intestino (Kerns y Di, 2008).

Si se analiza la **Tabla 2**, se puede observar que, si bien todos los compuestos tienen diferente $t_{1/2}$, para todos ellos el Cl_{int} estimado es menor a 13, lo que permite clasificarlo como bajo (**Tabla 3**). Con la excepción de los profármacos, los compuestos con alto aclaramiento (≥ 72) generalmente se consideran desfavorables, pues *in vivo* se eliminarían rápidamente y tendrían una acción de corta duración (Wilkinson y Shand, 1975). Dado que el Cl_{int} de los compuestos evaluados es bajo, los resultados sugieren que este parámetro farmacocinético es adecuado para continuar el desarrollo farmacológico.

Tabla 3. Clasificación de los rangos utilizados para categorizar el aclaramiento de los compuestos en bajo, medio y alto.

Categorías de aclaramiento	Aclaramiento intrínseco <i>in vitro</i> por fracción hepática S9 de rata ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
bajo	≤ 13
medio	13 - 72
alto	≥ 72

Modificado de Houston 1994 por Cyprotex Europe®

3.1.2. Identificación de metabolitos

Debido a que en estudios previos del grupo (Ferraro *et al.*, 2016), el compuesto **C34** mostró el mejor perfil como potencial fasciolicida, se decidió realizar una aproximación a la identificación de metabolitos generados en nuestras condiciones de ensayo. En ese sentido, del espectro UV obtenido luego de la incubación de **C34** con 10% de S9 fue posible identificar un pico con un tiempo de retención de 10,28 minutos cuya AUC

aumenta de manera tiempo dependiente con la incubación (15, 30 y 60 minutos) (**Figura 12**). Este dato evidencia la formación de un metabolito más polar que el compuesto padre (tiempo de retención 13,18 minutos) dado que se utilizó una columna de fase reversa C-18. Para confirmar esta observación, se corroboró mediante HPLC-MS/MS, que luego de 1 h de incubación de **C34** con 10% de S9 también se observa un pico a 10,28 min que no se aprecia en la matriz blanco (**Figura 13**).

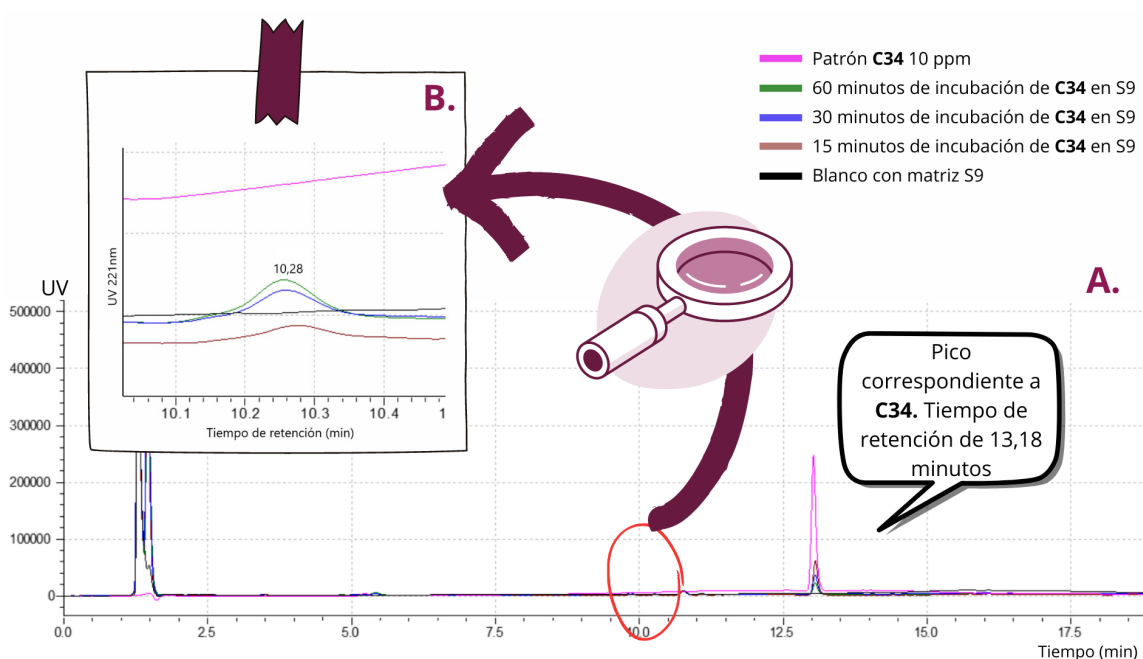


Figura 12. Cromatograma HPLC-UV a 221 nm. A. C34 incubado con 10% de fracción S9 durante 15, 30 y 60 min; **B.** Ampliación del espectro entre 10 y 10,5 min.

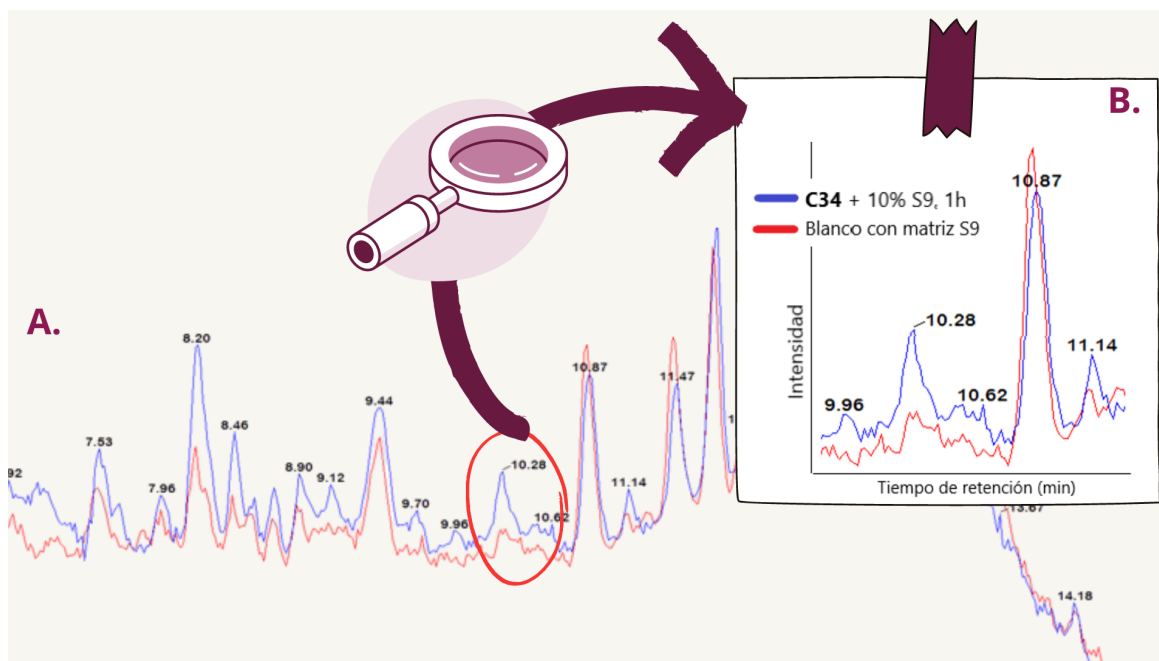


Figura 13. Cromatograma HPLC-MS/MS. A. C34 incubado con 10% de fracción hepática S9 durante 60 min; **B.** Ampliación del espectro entre 9,95 y 11,14 min.

Las hidroxilaciones constituyen un tipo clásico de reacciones metabólicas oxidativas catalizadas por los CYPs. Dependiendo de la naturaleza del carbono oxidado se clasifican en aromáticas, benzílicas, alílicas, alfa-heteroátomo y alifáticas. Dado que la mayoría de los fármacos disponibles en el mercado tienen al menos un anillo aromático en su estructura, las hidroxilaciones aromáticas constituyen una de las transformaciones metabólicas más frecuentes y mejor caracterizadas (Moreira Lima, 2015; Wu *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado y la estructura de **C34**, se propone como hipótesis primaria que podría tratarse de un compuesto monohidroxilado. Es así que decidimos buscar el ión con relación m/z 341 (**C34** + -OH) en modo Q1, que busca todos los iones que ionizan en la fuente de ionización (**Figura 14**). En la misma se puede observar un pico de mayor intensidad a tiempo 10,28 minutos que nos permite concluir con alta probabilidad que se trate del compuesto hidroxilado.

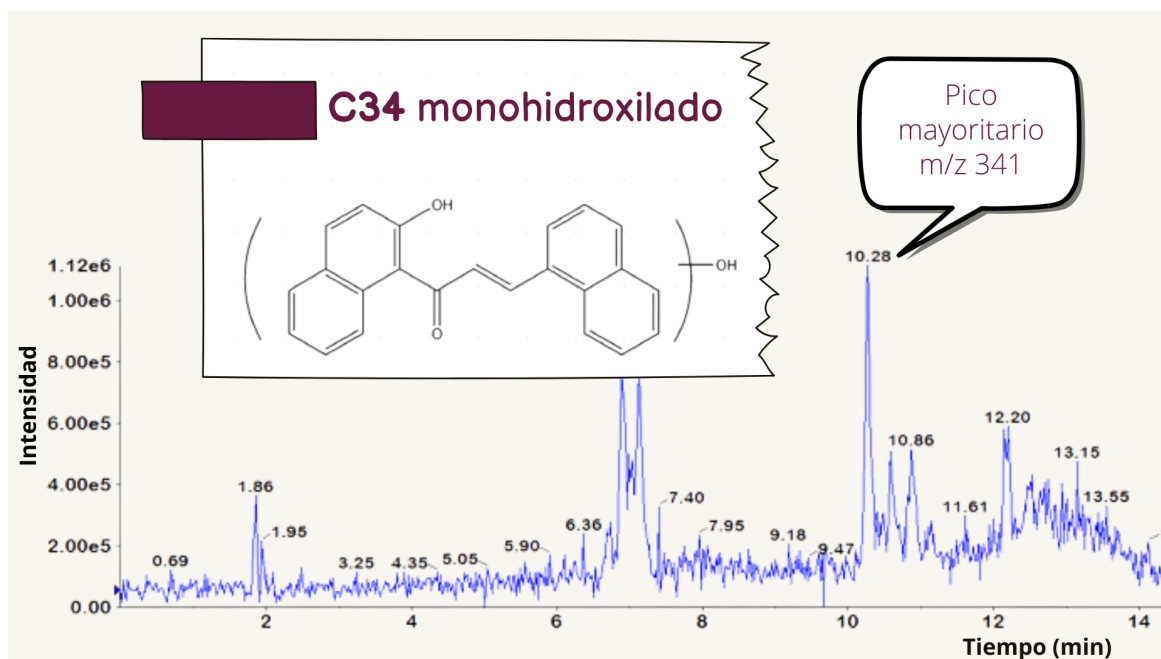


Figura 14. Cromatograma HPLC-MS/MS en modo Q1. Hallazgo de un ión mayoritario con relación (m/z) de 341 con tiempo de retención de 10,28 min.

Más estudios son necesarios para identificar la posición de hidroxilación. Surge como perspectiva de este trabajo, que una vez elucidada la estructura de este metabolito mayoritario, se lleve adelante la síntesis del mismo para evaluar su eficacia como agente fasciolicida así como también ensayar la toxicidad asociada.

3.2. Estudio de la estabilidad química de C34 mediante análisis en HPLC-MS/MS.

3.2.1. Estabilidad a diferentes pH

Durante su paso por el organismo, los compuestos se enfrentan a una amplio rango de pH. Muchos *buffers* de ensayo y fluidos fisiológicos tienen un pH de 7,4. La dosificación oral, vía de administración deseada para los compuestos que estamos desarrollando en este caso, los expone a un pH de 1 a 2 en el estómago, un pH de 4,5 en el duodeno, un pH de 6,6 como pH promedio en el intestino delgado y un pH de 5 a 9 en el colon. Se utilizaron valores de pH en este rango para evaluar el comportamiento de **C34**. En la Figura 12

observamos que, luego de 3h de incubación, el porcentaje de descomposición del compuesto es menor al 50% en todos los pH evaluados, siendo similar y alrededor del 30% en pH cercanos al rango fisiológico (entre 5-8,3) y un poco más elevado (42%) a pH más ácido.

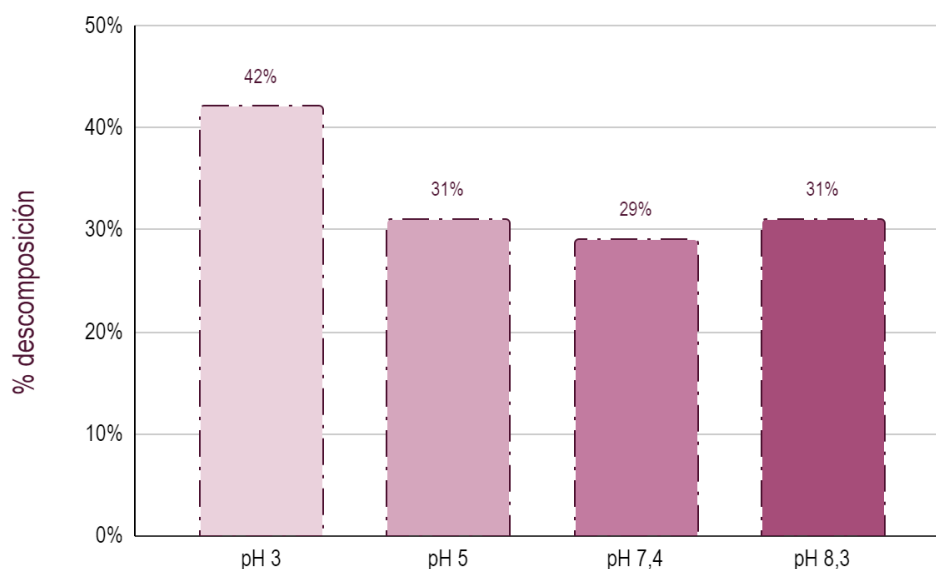


Figura 12. Porcentaje de descomposición de C34 a diferentes pH.

Los estudios de estabilidad de los compuestos en solución se utilizan en el proceso de descubrimiento de fármacos con muchos propósitos: (1) Proporcionan **información** temprana de la **labilidad** de los compuestos: la obtención de perfiles de estabilidad de los compuestos en solución generalmente se realiza durante la fase exploratoria inicial para ayudar a priorizar diferentes series químicas y alertar sobre posibles problemas en etapas posteriores. La información sobre la estabilidad de los compuestos a diferentes valores de pH contribuye a seleccionar las mejores condiciones de bioensayo, diseñar estrategias sintéticas, desarrollar formulaciones óptimas y predecir la absorción oral. (2) Selección de **condiciones para la purificación** de compuestos: el acceso temprano a la información sobre la estabilidad de un compuesto a varios pH puede sugerir las condiciones de purificación en las que es estable. (3) Determinar **relaciones estructura-estabilidad**: las pruebas de estabilidad en solución de varias series análogas pueden proporcionar relaciones estructura-estabilidad, esto puede indicar posibles modificaciones a la serie

que mejoran este parámetro. **(4) Diagnosticar el rendimiento deficiente del bioensayo *in vitro*:** un compuesto no producirá una actividad fiable *in vitro* si es inestable en el *buffer* de bioensayo, así, las condiciones del ensayo se pueden modificar para permitir una medición precisa de la actividad. **(5) Diagnosticar un rendimiento *in vivo* deficiente:** puede ocurrir *in vivo* un rendimiento farmacológico o farmacocinético deficiente si el compuesto no es estable en el sistema gastrointestinal, el pH bajo puede reducir la exposición *in vivo* porque se absorbe una pequeña parte de la dosis si el compuesto se degrada en el estómago o el intestino, las pruebas *in vitro* con fluidos gástrico e intestinal simulado pueden ayudar a determinar si un compuesto no es estable en el estómago o el intestino. **(6) Priorizar compuestos para estudios en animales *in vivo*:** el conocimiento de la estabilidad de los compuestos en fluidos fisiológicos simulados puede ayudar a evaluar si deben probarse *in vivo*, la estabilidad comparativa proporciona una base para las decisiones sobre qué compuestos dosificar *in vivo*. **(7) La elucidación estructural de los compuestos en solución guía la optimización de la síntesis:** evidencia de la estructura de los productos de degradación de un compuesto en solución puede obtenerse fácilmente utilizando HPLC-MS/MS.

3.2.2. Estabilidad en plasma

Los compuestos con ciertos grupos funcionales pueden descomponerse en el torrente sanguíneo. Los compuestos inestables a menudo tienen un área bajo la curva pequeña, depuración alta y una $t_{1/2}$ corta, lo que da como resultado una farmacocinética *in vivo* deficiente y un escaso rendimiento farmacológico. La degradación en plasma puede pasarse por alto si las investigaciones se centran en la estabilidad microsomal. Las enzimas microsomales son diferentes de las enzimas plasmáticas y la estabilidad en microsomas hepáticos no implica estabilidad en plasma. La sangre contiene una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, como colinesterasa, aldolasa, lipasa, deshidropeptidasa, fosfatasa alcalina y ácida. Si el compuesto tiene afinidad por una de estas enzimas y tiene un grupo hidrolizable en la posición correcta, puede descomponerse en el plasma. Muchos de estos grupos se utilizan para mejorar la actividad farmacológica del compuesto en la

proteína diana; por lo tanto, los químicos medicinales pueden ser reacios a eliminarlos o reemplazarlos. Sin embargo, la hidrólisis en el plasma puede ser una de las principales causas de eliminación del compuesto, y es posible que no se alcancen concentraciones farmacológicamente eficaces *in vivo*. Por esta razón, es importante evaluar los compuestos potencialmente inestables durante una etapa temprana y modificar o quitar propiedades a los mismos antes de que se invierta una gran cantidad de esfuerzo en la optimización de su actividad. Así, la información sobre la estabilidad plasmática de los compuestos se suma al conjunto de datos con los que los investigadores toman decisiones informadas. Generalmente, no se desarrollan candidatos clínicos que sean inestables en plasma, a menos que sean profármacos o antifármacos (Kerns y Di, 2008).

La estabilidad de los compuestos en plasma puede variar mucho entre las especies, lo que dificulta la predicción de los resultados clínicos humanos de los fármacos a partir de datos en animales. Típicamente, los compuestos son menos estables en roedores que en humanos (Kerns y Di, 2008).

Por ser **C34** el compuesto que presenta el mejor perfil farmacológico (Ferraro *et al.*, 2016), se ha evaluado su estabilidad en plasma a una concentración de 40 μM en plasma bovino con una incubación de 3 horas, obteniéndose un porcentaje remanente del compuesto de 99%, resultando éste con una alta estabilidad en plasma.

3.3. Determinación de citotoxicidad inespecífica

Los estudios de toxicología evalúan la toxicidad potencial de un candidato a fármaco, buscando minimizar el riesgo de efectos adversos para el paciente. Al igual que con los efectos farmacológicamente beneficiosos, los efectos tóxicos siguen una relación dosis-respuesta. Por lo tanto, es necesario maximizar la ventana de seguridad de un fármaco (índice terapéutico) entre eficacia y toxicidad (Kerns y Di, 2008).

La toxicidad de los candidatos a fármacos es la segunda causa clave de la alta tasa de fracaso en los programas de descubrimiento de fármacos, siendo el principal desafío desarrollar una molécula con las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas

adecuadas (Kar y Leszczynski, 2020). El porcentaje de candidatos a fármacos que no continúan su desarrollo por presentar toxicidad es variable, reportándose que constituyen desde el 20% - 30% (Kola y Landis, 2004) hasta un 44% (KMR Group, 2003). Además, muchos medicamentos se han retirado del mercado debido a la toxicidad humana observada durante el uso clínico en la población en general. La detección temprana y la minimización de la toxicidad de un candidato a fármaco pueden reducir el fracaso preclínico y clínico. Esto también puede mejorar la eficiencia del descubrimiento de fármacos al reducir el tiempo y el esfuerzo dedicado a los líderes de series que luego pueden resultar tóxicos (Kerns y Di, 2008).

Actualmente, la industria farmacéutica evalúa la toxicidad de nuevos candidatos a fármacos por métodos *in vivo* e *in vitro*. Anualmente se utilizan entre 40 y 100 millones de animales para investigación experimental en todo el mundo, de los cuales más del 80% son utilizados por la industria farmacéutica para evaluar la toxicidad de los candidatos a fármacos antes de las pruebas clínicas (Diario Oficial de la Unión Europea, 2010). Así, la creciente preocupación por el bienestar animal junto con el elevado costo económico y temporal de los ensayos *in vivo*, hacen necesaria la búsqueda de ensayos alternativos para reducir estos números (Vicente-Carrillo *et al.*, 2015; Vicente-Carrillo, 2018), y promueven que los científicos desarrollen continuamente nuevos métodos *in vitro*, lo cual ha conseguido reducir el uso de animales un 40 % desde 2009 (Pérez-Albaladejo, 2017).

Los efectos citotóxicos de un compuesto se pueden evaluar en células cultivadas *in vitro*. Se entiende por citotoxicidad los efectos adversos de los agentes químicos que se evidencian por la alteración de la morfología celular y/o propiedades esenciales para la supervivencia, proliferación y función celular (Walum, 1998). Estos efectos pueden ser evaluados por medio de la pérdida de la capacidad de adhesión celular a las superficies y por los cambios en la tasa de crecimiento y supervivencia celular frente a la exposición a un compuesto. De esta manera, este tipo de ensayos son un medio rápido, estandarizado, sensible y económico para determinar si un compuesto presenta citotoxicidad (Miret *et al.*, 2006).

3.3.1. Citotoxicidad frente a la línea celular HepG-2

Un caso particular de los ensayos *in vitro* es el empleo de cultivos celulares, sistemas formados por células aisladas de un tejido sano o tumoral, que se mantienen *in vitro* en un medio de cultivo nutritivo, en condiciones controladas (Pérez-Albaladejo, 2017). Los mismos pueden ser primarios o líneas celulares establecidas. *A priori*, los cultivos primarios parecen más apropiados para realizar ensayos de toxicidad, puesto que conservan la mayor parte de sus características metabólicas y funcionales de origen. Sin embargo, al igual que sucede dentro de un organismo, su tiempo de vida es limitado. Por este motivo, las líneas celulares establecidas se presentan como un modelo alternativo atractivo que permite un crecimiento ilimitado del cultivo a pesar de perder algunas características propias del tejido de origen por un proceso de desdiferenciación que afecta fundamentalmente al metabolismo secundario. Comparados con los ensayos *in vivo*, los cultivos celulares son de fácil mantenimiento y manipulación. Esto, sumado a la posibilidad de controlar las condiciones de crecimiento del cultivo y del ensayo (temperatura, pH, humedad, composición del medio de cultivo, concentración de droga y tiempo de exposición), posibilitan la obtención de resultados reproducibles (Fernández, 2008).

La adaptación de las técnicas de cultivos celulares al campo de la toxicología lleva utilizándose de manera más o menos extensiva desde los años 80 (Zucco *et al.*, 2004). Numerosos estudios muestran una buena correlación entre pruebas de citotoxicidad y valores de toxicidad aguda clásicos determinados con estudios *in vivo* (Walum, 1998; Worth *et al.*, 2002). Así, los valores de EC_{50} (concentración que produce el 50% del efecto observado, incluyendo la inhibición del cultivo - IC_{50}) tienen buena correlación con los datos de LD_{50} (dosis que produce la muerte del 50% de los individuos) para roedores y humanos (Clemedson *et al.*, 2000; Gennari *et al.*, 2004).

En este ensayo se evaluó la citotoxicidad de los cuatro compuestos y del TBZ como control positivo, frente a la línea celular Hep-G2. Como se observa en la **Tabla 4**, para **C31** se obtuvo un IC_{50} de 25 μ M, siendo el único compuesto con un IC_{50} inferior al del TBZ y resultando, en este ensayo, el compuesto más citotóxico. Para **C33** y **C34** se obtuvieron

valores de IC_{50} entre dos y tres veces mayores que el control positivo. Finalmente, **C35** resultó el compuesto menos citotóxico con un IC_{50} mayor a 100 μM . Los resultados obtenidos con esta línea celular evidencian que la mayoría de los compuestos desarrollados muestran toxicidad moderada, resultando incluso menos citotóxicos que el TBZ, fármaco de referencia empleado actualmente en el mercado. Es interesante destacar que si bien todos los compuestos evaluados tienen alta similitud estructural se registran diferencias marcadas en su citotoxicidad. Este hecho pone de manifiesto la importancia de incluir en el desarrollo preclínico la evaluación de varios compuestos con la actividad biológica deseada, en este caso fasciolicida, para aumentar la probabilidad de éxito de continuar con el desarrollo clínico.

Tabla 4. IC_{50} (μM) frente a la línea celular HepG-2 para los cuatro compuestos y el control positivo (TBZ).

Compuesto	IC_{50} (μM)*
TBZ	32
C31	25
C33	92
C34	70
C35	>100

* La desviación estándar es menor al 10% en todos los casos.

3.3.2. Citotoxicidad en espermatozoides bovinos

Uno de los principales mecanismos por los cuales un fármaco puede causar toxicidad es mediante la disrupción de la función mitocondrial, generando habitualmente hepato y cardiotoxicidad y, por lo tanto, la toxicidad mitocondrial inducida por fármacos se ha evaluado tradicionalmente en mitocondrias aisladas obtenidas de tejidos vivos de animales sacrificados. Es por esto que ha surgido la necesidad de un sistema rápido, fiable y libre de animales para la detección de toxicidad mitocondrial (Vicente-Carrillo, 2018).

Los espermatozoides poseen una gran dependencia energética para la homeostasis y la motilidad de la membrana, son de fácil obtención y bajo costo. Los eyaculados de animales domésticos muestran un alto número total de espermatozoides, más de 100 billones, que se pueden recolectar rutinariamente sin causar daños, lo que significa el suministro de numerosas células de prueba sin sacrificar animales de experimentación. La viabilidad y la cinemática de los espermatozoides se pueden observar bajo el microscopio y, por lo tanto, los cambios inducidos por compuestos que afectan a las mitocondrias son apreciables, tanto cualitativa como cuantitativamente. Además, se han desarrollado *software* que permiten evaluar y estandarizar parámetros cinemáticos que pueden correlacionarse con la actividad mitocondrial, lo que convierte a los ensayos de evaluación de citotoxicidad en espermatozoides en un modelo interesante como medida indirecta de la toxicidad mitocondrial inducida por fármacos (Vicente-Carrillo *et al.*, 2015).

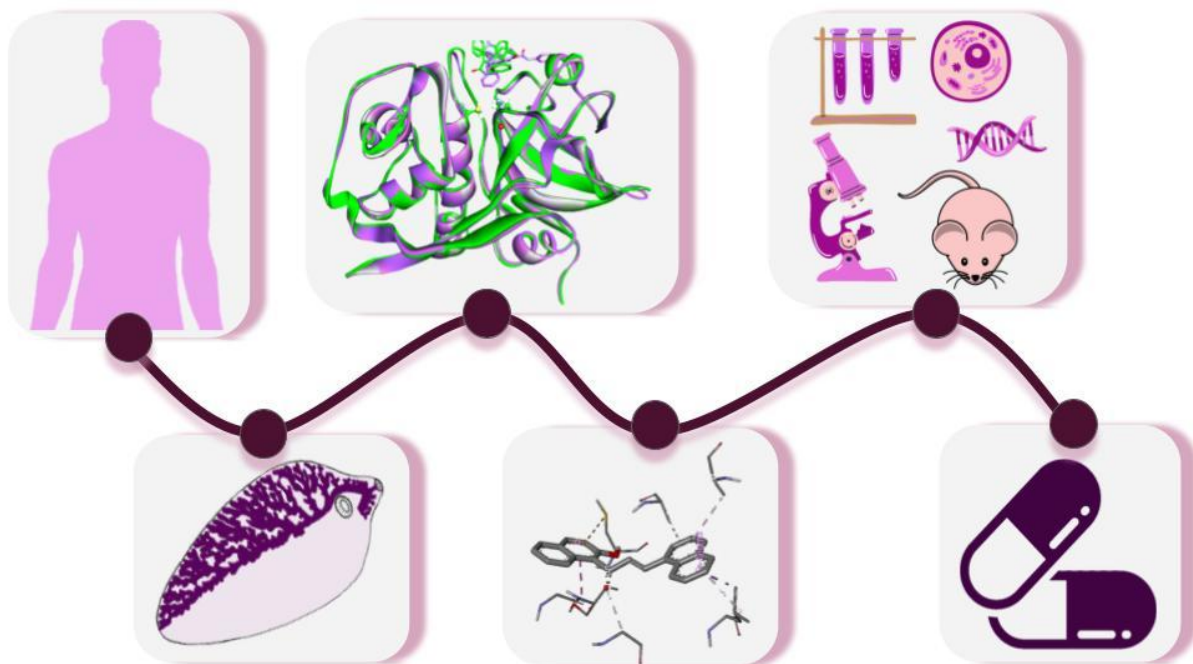
En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de los cuatro compuestos frente a espermatozoides de bovinos, utilizando como parámetro cinemático el porcentaje de motilidad remanente. Como se observa en la **Tabla 5**, **C34** y **C35** resultaron ser los compuestos más tóxicos, presentando porcentajes de motilidad remanentes de 35% y 45%, respectivamente, afectando ambos la motilidad en más de un 50%. Por el contrario, **C31** y **C33** obtuvieron porcentajes de motilidad remanente de 98% y 92%, respectivamente, afectando ambos la motilidad en menos de un 10%.

Tabla 5. Porcentaje de motilidad remanente de los espermatozoides bovinos luego de 1 hora de incubación con 50 μ M de los compuestos.

Compuesto (50 μ M)	% motilidad remanente
TBZ	81 \pm 11
C31	98 \pm 3
C33	92 \pm 7
C34	35 \pm 1
C35	45 \pm 2

Comparando los resultados entre los dos modelos utilizados, se puede apreciar que los compuestos presentan diferente grado de citotoxicidad en las distintas células ensayadas. Así, el compuesto **C31** resultó ser el más tóxico en Hep-G2 y el menos en espermatozoides, sugiriendo *a priori*, que el mecanismo por el cuál afecta a las células no estaría relacionado con la disfunción mitocondrial. Por su parte, **C34** y **C35** muestran baja toxicidad en Hep-G2, con valores de IC_{50} dos veces mayores que los del control positivo, pero, sin embargo, son los que disminuyen en mayor medida la motilidad remanente de los espermatozoides. Finalmente, para **C33** resultó concordante su baja toxicidad en los dos modelos utilizados. Estos resultados evidencian la necesidad de evaluar la citotoxicidad potencial de un compuesto empleando diferentes modelos celulares complementarios, lo que permite una mejor aproximación a los resultados esperados *in vivo* (Miret *et al.*, 2006).

4. CONCLUSIONES



En este trabajo se realizaron una serie de ensayos con el fin de contribuir al desarrollo preclínico de cuatro compuestos prometedores (**C31**, **C33**, **C34** y **C35**) como potenciales fármacos antiparasitarios con actividad fasciolicida.

Se determinó la tasa de metabolización *in vitro* incubando con fracción hepática S9, obteniéndose $t_{1/2}$ de 44 a 193 min con valores de aclaramiento intrínseco bajos (<13 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) para todos los compuestos. Estos resultados se consideran favorables y sugieren eliminaciones lentas y acción duradera *in vivo*. Además, en el caso del compuesto más relevante desde el punto de vista de su mecanismo de acción y actividad fasciolicida, el **C34**, fue posible identificar el metabolito mayoritario en las condiciones de ensayo, correspondiente a la naftilchalcona monohidroxilada. Por otro lado, se corroboró que **C34** posee alta estabilidad en plasma, obteniéndose un 99% de compuesto remanente luego de 3 horas. Se ensayó la estabilidad a diferentes pH (entre 3 - 8,3) y se determinó que el porcentaje de descomposición es menor al 50% en todos los casos, por lo que no se identifican alertas de sitios lábiles que merezcan especial atención en la etapa de formulación. En conjunto, los datos farmacocinéticos obtenidos: Cl_{int} bajo, estabilidad plasmática alta y estabilidad de moderada a alta en el rango de pH evaluado, permiten *a priori*, estimar concentraciones farmacológicamente eficaces *in vivo*.

Por último, se evaluó la citotoxicidad de todos los compuestos mediante dos métodos complementarios, ensayo de SRB en células Hep-G2 y análisis de la motilidad espermática mediante un sistema CASA. El compuesto que más se destaca por su baja toxicidad en ambos modelos fue **C33**, con valores de IC_{50} y porcentaje de motilidad progresiva superiores a los determinados para TBZ, fármaco comercial de referencia.

Estos resultados, en conjunto con los obtenidos previamente por el grupo y sumados a ensayos de evaluación *in vivo* actualmente en curso (datos no presentados en este trabajo) son muy prometedores y alientan a seguir con la búsqueda y desarrollo de fármacos fasciolicidas. En suma, se trata de una serie de compuestos sintéticos derivados de flavonoides con actividad inhibitoria de *FhCL1* y *FhCL3*, con actividad fasciolicida *in vitro* en dos estadios del parásito (Ferraro *et al.*, 2016), con baja citotoxicidad, y buen perfil farmacocinético y de estabilidad.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, J. D., Moriena, R. A., Ortiz, M. I., y Racioppi, O. (2009). Hallazgo de *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) en un carpincho (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*, 20, 132–134. <http://.doi.org/10.30972/vet.2021865>
- Alvariza, S., Bentancur, C., Eiraldi, R., y Fagiolino, P. (2010). *Guía de Farmacocinética*. Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Química, Universidad de la República. ISBN: 978-9974-0-0659-1
- Armijo, J. A. (1997). Absorción, distribución, y eliminación de los fármacos. En Flores, J., *Farmacología humana* (pp. 47-72). Barcelona: MASSON, S. A. ISBN: 84-458-0613-0
- Baek, K. H., Karki, R., Lee, E. S., Na, Y., y Kwon, Y. (2013). Synthesis and investigation of dihydroxychalcones as calpain and cathepsin inhibitors. *Bioorganic chemistry*, 51, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.09.002>
- Bargues, M. D., Gayo, V., Sanchis, J., Artigas, P., Khoubbane, M., Birriel, S. y Mas-Coma, S. (2017). DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(2), e0005352. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005352>
- Batovska, D. I., y Todorova, I. T. (2010). Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current clinical pharmacology*, 5(1), 1–29. <https://doi.org/10.2174/157488410790410579>
- Bravo Antilef, M. J. (2013). *Probables causas de muerte y principales hallazgos en la necropsia de pudúes (Pudu puda) examinados durante 20 años en el sur de Chile* [Tesis de grado]. Universidad Austral de Chile, Chile. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fvb826p/doc/fvb826p.pdf>
- Brossard, N. (2017). *Caracterización de glicoproteínas de Fasciola hepatica y evaluación de su capacidad inmunomoduladora sobre células dendríticas* [Tesis de maestría].

- Universidad de la República, Montevideo. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/10236>
- Burger, M. C., Fernandes, J. B., da Silva, M. F., Escalante, A., Prudhomme, J., Le Roch, K. G., ... Vieira, P. C. (2014). Structures and bioactivities of dihydrochalcones from *Metrodorea stipularis*. *Journal of natural products*, 77(11), 2418–2422. <https://doi.org/10.1021/np500453x>
- Cabrera, M., Corvo, I., Ferraro, F., Merlino, A., González, M., Cerecetto, H., y Tort, J. (2017). *Naftilchalconas para el control de fasciolosis y otras trematodiasis mediante inhibición de catepsinas*. Patente de invención Acta N° 37045, Uruguay.
- Cabrera, M., Simoens, M., Falchi, G., Lavaggi, M. L., Piro, O. E., Castellano, E. E., ... González, M. (2007). Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(10), 3356–3367. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.031>
- Caravedo, M. A., y Cabada, M. M. (2020). Human Fascioliasis: Current Epidemiological Status and Strategies for Diagnosis, Treatment, and Control. *Research and reports in tropical medicine*, 11, 149–158. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S237461>
- Carmona, C., y Tort, J. F. (2017). Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of helminthology*, 91(2), 99–109. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000560>
- Carrada-Bravo, T. (2007). Fasciola hepatica: Ciclo biológico y potencial biótico. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 54(1), 21-27. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=12002>
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). (2018). *About Fasciola, Epidemiology & Risk Factors*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/epi.html> [consultado 7 de julio de 2022]
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). (2019). *Fascioliasis, Causal Agent*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html> [consultado 10 de junio 2022]

- Chen, M. G., y Mott, K. E. (1990). Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical diseases bulletin*, 87(4), 1-38. ISSN : 0041-3240
- Clemedson, C., Barile, F. A., Chesne, C., Cottin, M., Curren, R., Ekwall, B., ... Ekwall, B. (2000). MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part VII: prediction of human toxicity by results from testing the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays. *Alternatives to Laboratory Animals*, 28(suppl. 1), 161-200. ISSN 0261-1929
- Cuadrado, A. M., Burgos, C. y Alvarez-Builla, J. (2006). El fármaco y su desarrollo: diez preguntas y una consideración. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 3, 13-21. ISSN 1575-3417.
- Cuervo, P. F., Di Cataldo, S., Fantozzi, M. C., Deis, E., Díaz Isenrath, G., Viberti, G., ... Mas-Coma, S. (2015). Liver fluke (*Fasciola hepatica*) naturally infecting introduced European brown hare (*Lepus europaeus*) in northern Patagonia: phenotype, prevalence and potential risk. *Acta parasitologica*, 60(3), 536–543. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0076>
- Cwiklinski, K., O'Neill, S. M., Donnelly, S., y Dalton, J. P. (2016). A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite immunology*, 38(9), 558–568. <https://doi.org/10.1111/pim.12343>
- del Arco, C. (1997). Metabolismo de los fármacos. En Flores, J., *Farmacología humana* (pp. 73-86). Barcelona: MASSON, S. A. ISBN: 84-458-0613-0
- Del Rayo Camacho, M., Sanchez, B., Quiroz, H., Contreras, J. L., y Mata, R. (1991). Pinoembrine: a bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. *Journal of ethnopharmacology*, 31(3), 383–389. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90022-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90022-6)
- de Sousa, L. R., Wu, H., Nebo, L., Fernandes, J. B., da Silva, M. F., Kiefer, W., ... Vieira, P. C. (2015). Natural products as inhibitors of recombinant cathepsin L of *Leishmania mexicana*. *Experimental parasitology*, 156, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.016>

- Diario Oficial de la Unión Europea. (2010). DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Recuperado de https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2010.276.01.0033.01.SPA&toc=OJ%3AL%3A2010%3A276%3ATOC [consultado 4 de julio 2022]
- Dittmar K. (2002). Arthropod and helminth parasites of the wild guinea pig, *Cavia aperea*, from the Andes and the cordillera in Peru, South America. *The Journal of parasitology*, 88(2), 409–411. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0409:AAHPOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0409:AAHPOT]2.0.CO;2)
- Duffus, J. H., Nordberg, M., y Templeton, D. M. (2007). Glossary of terms used in toxicology, (IUPAC Recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry*, 79(7), 1153-1344. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200779071153>
- Fernández, T., y Tamaro, E. (2004). El aparato digestivo. *Biografías y Vidas: La enciclopedia biográfica en línea*. Recuperado de https://www.biografiasyvidas.com/tema/aparato_digestivo.htm [Consultado 22 de febrero de 2022].
- Fernández, P. (2008). *Aplicación de un modelo celular para la evaluación de la citotoxicidad de compuestos químicos* [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de Madrid, España. Recuperado de <https://repositorio.uam.es/handle/10486/1834>
- Ferraro, F. (2015). *Búsqueda de inhibidores de cisteína proteasas esenciales del parásito Fasciola hepatica como potenciales fármacos* [Tesis de grado]. Universidad de la República, Uruguay. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/26795>
- Ferraro, F., Merlino, A., Dell Oca, N., Gil, J., Tort, J. F., Gonzalez, M., ... Corvo, I. (2016). Identification of Chalcones as *Fasciola hepatica* Cathepsin L Inhibitors Using a Comprehensive Experimental and Computational Approach. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(7), e0004834. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004834>

- Ferraro, F. (2019). *Caracterización bio-estructural de inhibidores de catepsinas de Fasciola hepatica como potenciales fármacos antihelmínticos* [Tesis de maestría]. Universidad de la República, Uruguay. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/32055>
- Flores, J. (1997). La Farmacología: concepto y objetivos. En Flores, J., *Farmacología humana* (pp. 1-4). Barcelona: MASSON, S. A. ISBN: 84-458-0613-0
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. New Jersey: WILEY-BLACKWELL. ISBN: 978-0-470-52812-9
- Fugassa M. H. (2015). Checklist of helminths found in Patagonian wild mammals. *Zootaxa*, 4012(2), 271–328. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4012.2.3>
- Fürst, T., Duthaler, U., Sripa, B., Utzinger, J., y Keiser, J. (2012). Trematode infections: liver and lung flukes. *Infectious disease clinics of North America*, 26(2), 399–419. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.008>
- García, A., Outerelo, R., Ruiz, E., Aguirre, J., Almodóvar, A., Alonso, J., ... Cano, J. (2011). Prácticas de Zoología Estudio y diversidad de los Platelminetos, Nematodos, Nematomorfos y Acantocéfalos . *Reduca (Biología)*, Serie Zoología, 4(2), 37-60. ISSN: 1989-3620
- Gayo, V., Cuervo, P., Rosadilla, D., Birriel, S., Dell'Oca, L., Trelles, A., ... Sierra, R. (2011). Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 42(2), 354–356. <https://doi.org/10.1638/2010-0226.1>
- Gennari, A., van den Berghe, C., Casati, S., Castell, J., Clemedson, C., Coecke, S., ... Ryan, M. (2004). Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50. *Alternatives to laboratory animals*, 32(4), 437–459. <https://doi.org/10.1177/026119290403200417>
- Giao, C. (2018). A Guide to Liver Fluke. *Moocall, connecting you to your animals*. Recuperado de <https://www.moocall.com/liver-fluke/> [consultado 10 de junio 2022].

- Gil, L. C., Díaz, A., Rueda, C., Martínez, C., Castillo, D., y Apt, W. (2014). Fascioliasis hepática humana: resistencia al tratamiento con triclabendazol. *Revista médica de Chile*, 142(10), 1330–1333. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001000014>
- Hernández, Z. y Gonzalez, S. (2011) Parasitological survey of the Uruguayan populations of wild Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* L. 1758). *Animal Production Science*, 52, 781–785. ISSN: 1836-0939
- Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., y Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>
- Houston J. B. (1994). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochemical pharmacology*, 47(9), 1469–1479. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90520-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90520-7)
- Hu, Y. (2013). Analysis and treatment of cases of *Ganoderma lucidum* spores misjudged as *Clonorchis sinensis* infection. *Laboratory Medicine and Clinic*, 15, 2017–2018. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-9455.2013.15.054>
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., y Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- Issia, L., Pietrokovsky, S., Sousa-Figueiredo, J., Stothard, J. R., y Wisnivesky-Colli, C. (2009). *Fasciola hepatica* infections in livestock flock, guanacos and coypus in two wildlife reserves in Argentina. *Veterinary parasitology*, 165(3-4), 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.011>
- Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., ... Sugiyama, Y. (1997). Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacology & therapeutics*, 73(2), 147–171. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(96\)00184-2](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(96)00184-2)
- Jave O, J. A., Alban O, M., Sagastegui P, C., y Soriano Y, S. (1999). Tratamiento de la Fascioliasis Hepática Humana con Triclabendazole. *Revista de gastroenterología del*

- Peru : organo oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Peru*, 19(3), 216–220.
PMID: 12207208
- Kar, S., y Leszczynski, J. (2020). Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert opinion on drug discovery*, 15(12), 1473–1487.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1798926>
- Keiser, J., y Utzinger, J. (2007). Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. *Trends in parasitology*, 23(11), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.012>
- Kerns, E. H., y Di, L. (2008). *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. California, USA: ELSEVIER. ISBN: 978-1236-9520-8
- Kim, S. H., Lee, E., Baek, K. H., Kwon, H. B., Woo, H., Lee, E. S., ... Na, Y. (2013). Chalcones, inhibitors for topoisomerase I and cathepsin B and L, as potential anti-cancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(11), 3320–3324.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.106>
- KMR Group. (2003). *KMR benchmark survey* (pp. 98–101). Chicago, IL: KMR Group.
- Kola, I., y Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(8), 711–715. <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
- Lalrinkima, H., Lalchhandama, C., Jacob, S. S., Raina, O. K., y Lallianchhunga, M. C. (2021). Fasciolosis in India: An overview. *Experimental parasitology*, 222, 108066.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108066>
- Liang, S. D., y Wu, Y. R. (2008). Report on a misdiagnosed case infected with liver fluke. *China Tropical Medicine*, 10, 1787.
<https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-9727.2008.10.066>
- Liu, X., Zhu, G., Cai, C., Lv, Z., y Li, J. (2019). Clonorchiasis sinensis detected by laparoscopic exploration of biliary tracts in two patients with obstructive jaundice. *BMC infectious diseases*, 19(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3679-y>

- Maggioli, G., Salazar, C., Fossa, F., y Carmona, C. (2020). Liver Fluke Vaccine Assessment in Cattle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2137, 205–212. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0475-5_15
- Malandrini, J. B., Carnevale, S., Soria, C. C., Velásquez, J. N., y Molina, V. E. (2011). Búsqueda Bibliográfica de Casos Humanos con Fasciola Hepatica en Argentina. *Ciencia*, 6(21), 59-68.
- Marcos, L. A., Terashima, A., Leguia, G., Canales, M., Espinoza, J. R., y Gotuzzo, E. (2007). La infección por Fasciola hepatica en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de gastroenterología del Peru : organo oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Peru*, 27(4), 389–396. PMID: 18183272
- Marovac J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista médica de Chile*, 129(1), 99–106. PMID: 11265215
- Martínez, R., Domenech, I., Millán, J. C., Pino, A. (2012). Fascioliasis, revisión clínico-epidemiológica y diagnóstico. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 50(1), 88-96. ISSN 1561-3003
- Mas-Coma, S., Rodriguez, A., Bargues, M. D., Valero, M. A., Coello, J. R., y Angles, R. (1997). Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, 57(1): 39-46.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D., y Valero, M. A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International journal for parasitology*, 35(11-12), 1255–1278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.010>
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D., y Valero, M. A. (2018). Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. *Parasitology*, 145(13), 1665–1699. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000914>
- McManus D. P. (2020). Recent Progress in the Development of Liver Fluke and Blood Fluke Vaccines. *Vaccines*, 8(3), 553. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030553>

- Ménard, A., Agoulon, A., L'Hostis, M. L., Rondelaud, D., Collard, S., y Chauvin, A. (2001). Myocastor coypus as a reservoir host of Fasciola hepatica in France. *Veterinary research*, 32(5), 499–508. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001141>
- Miranda, R. W. (2017). *Prevalencia de Fasciola hepatica en humanos de edad escolar en el distrito de Asillo, Puno-2017* [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Cajamarca, Perú. Recuperado de <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/2985>
- Miret, S., De Groene, E. M., y Klaffke, W. (2006). Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(2), 184–193. <https://doi.org/10.1177/1087057105283787>
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., ... Vaigro-Wolff, A. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757–766. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>
- Morales, M. L., Tanabe, M. B., White, A. C., Jr, Lopez, M., Bascope, R., y Cabada, M. M. (2021). Triclabendazole Treatment Failure for Fasciola hepatica Infection among Preschool and School-Age Children, Cusco, Peru. *Emerging infectious diseases*, 27(7), 1850–1857. <https://doi.org/10.3201/eid2707.203900>
- Moreira Lima, L. (2015). Fundamentos do metabolismo de fármacos. En Barreiro, E., Fraga, C., *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos* (pp. 43-103). Porto Alegre: Artmed. ISBN: 978-85-8271-117-0
- Namsanor, J., Pitaksakulrat, O., Kopolrat, K., Kiatsopit, N., Webster, B. L., Gower, C. M., ... Sithithaworn, P. (2020). Impact of geography and time on genetic clusters of Opisthorchis viverrini identified by microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *International journal for parasitology*, 50(14), 1133–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.011>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Trematodiasis de transmisión alimentaria*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/foodborne-trematode-infections> [Consultado 20 de marzo 2022].

- Otero, G. (2015). *Estudios preclínicos del flavonoide sintético CH38 con potencial uso para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)* [Tesis de grado]. Universidad de la República, Uruguay. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/23346>
- Pérez-Albaladejo, E. (2017). *Uso de líneas celulares como modelos in vitro para la evaluación de toxicidad y mecanismos de acción de contaminantes ambientales* [Tesis de doctorado]. Universitat de Barcelona, España. Recuperado de <https://www.tdx.cat/handle/10803/456812#page=1>
- Prentis, R. A., Lis, Y., y Walker, S. R. (1988). Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *British journal of clinical pharmacology*, 25(3), 387–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1988.tb03318.x>
- Recalde-Reyes, D., Sanabria, L., Giraldo, M. I., Toro, L., González, M. M., y Castaño, J. C. (2014). Prevalencia de *Fasciola hepatica*, en humanos y bovinos en el departamento del Quindío-Colombia 2012-2013. *Infectio*, 18(4), 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.09.001>
- Rehbein, S., Visser, M., Hamel, D., y Reindl, H. (2021). Occurrence of the giant liver fluke, *Fascioloides magna*, in sympatric wild ungulates in one area in the Upper Palatinate Forest (northeastern Bavaria, Germany). *Parasitology research*, 120(2), 553–561. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06996-7>
- Sahu, N. K., Balbhadra, S. S., Choudhary, J., y Kohli, D. V. (2012). Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Current medicinal chemistry*, 19(2), 209–225. <https://doi.org/10.2174/092986712803414132>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F., y Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación química*, 28(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
- Sánchez, Y. (2007). Vías de Administración de Fármacos. *Revista Electrónica de PortalesMedicos.com*. Recuperado de <https://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/775/1/Vias-de-Administracion-de-Farmacos.html> [Consultado 15 de febrero de 2022]. ISSN 1886-8924

- Santarém, V. A., Tostes, R. A., Alberti, H., y Sanches, O. (2006). Fasciola hepatica in capybara. *Acta tropica*, 98(3), 311–313. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.004>
- Siles-Lucas, M., Becerro-Recio, D., Serrat, J., y González-Miguel, J. (2021). Fascioliasis and fasciolopsiasis: Current knowledge and future trends. *Research in veterinary science*, 134, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.011>
- Singh, P., Anand, A., y Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *European journal of medicinal chemistry*, 85, 758–777. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.033>
- Souza, R., Pareja, L., Cesio, V., y Heinzen, H. (2016). Development of a Straightforward and Cheap Ethyl Acetate Based Method for the Simultaneous Determination of Pesticides and Veterinary Drugs Residues in Bovine Liver and Muscle. *Chromatographia*, 79, 1101-1112. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3026-z>
- Toner, E., Brennan, G. P., Wells, K., McGeown, J. G., y Fairweather, I. (2008). Physiological and morphological effects of genistein against the liver fluke, Fasciola hepatica. *Parasitology*, 135(10), 1189–1203. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004630>
- Troeberg, L., Chen, X., Flaherty, T. M., Morty, R. E., Cheng, M., Hua, H., ... Cohen, F. E. (2000). Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured Trypanosoma brucei brucei. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 6(8), 660–669. PMID: 11055585
- van de Waterbeemd, H., y Gifford, E. (2003). ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(3), 192–204. <https://doi.org/10.1038/nrd1032>
- Veale C. (2021). Into the Fray! A Beginner's Guide to Medicinal Chemistry. *ChemMedChem*, 16(8), 1199–1225. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000929>
- Vicente-Carrillo A. (2018). The Usefulness of Sperm Kinematics in Drug-Induced Toxicity Assessment. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 123(1), 3–7. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12994>
- Vicente-Carrillo, A., Edebert, I., Garside, H., Cotgreave, I., Rigler, R., Loitto, V., ... Rodríguez-Martínez, H. (2015). Boar spermatozoa successfully predict

- mitochondrial modes of toxicity: implications for drug toxicity testing and the 3R principles. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 29(3), 582–591. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.01.004>
- Walum, E. (1998). Acute oral toxicity. *Environmental health perspectives*, 106 Suppl 2(Suppl 2), 497–503. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106497>
- Yellepeddi, V. (2016). Farmacocinética. En Whalen, K., Finkel, R., y Panavelil, T., *Farmacología Ilustrada* (pp. 1-24). Porto Alegre : Artmed. ISBN 978-85-8271-323-5
- Wilkinson, G. R., y Shand, D. G. (1975). Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 18(4), 377–390. <https://doi.org/10.1002/cpt1975184377>
- Wilkinson G. R. (2002). Farmacocinética: dinámicas de absorción, distribución y eliminación de fármacos. En Hardman, J. G., Limbird, L. E., *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (pp. 5-119). México: McGraw-Hill. ISBN 970-10-3881-9
- Worth, A., Balls, M., Bogni, A., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., ... Spielmann, H. (2002). Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects a report prepared by ECVAM and the ECVAM Working Group on Chemicals. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(suppl. 1), 27–33. <https://doi.org/10.1177/026119290203001S04>
- Wu, J., Zhong, Q. Q., Wang, T. Y., Wang, C. X., Du, Y., Ji, S., ... Tang, D. Q. (2021). MS-based metabolite analysis of two licorice chalcones in mice plasma, bile, feces, and urine after oral administration. *Biomedical chromatography: BMC*, 35(3), e4998. <https://doi.org/10.1002/bmc.4998>
- Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Caballero, R., Molina-Hernández, V., Ruiz-Campillo, M. T., Pérez, J., ... Martínez Moreno, F. J. (2021). Efficacy of a multivalent vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary research*, 52(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00895-0>
- Zhang, J., Sun, Y., y Zheng, J. (2021). Prospects for liver fluke vaccines. *Experimental parasitology*, 230, 108170. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108170>

Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E., y Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 18(2), 153–163.
[https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(03\)00147-4](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(03)00147-4)