



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Diseño, síntesis y optimización de nuevos fármacos antihelmínticos.

Q.F. Ramiro Teixeira

Maestría en Química
Facultad de Química
Universidad de la República

Montevideo-Uruguay

Octubre de 2021



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Diseño, síntesis y optimización de nuevos fármacos antihelmínticos.

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Química

Director de tesis:

Dra. Laura Domínguez

Codirector de tesis:

Dr. Eduardo Manta

Montevideo-Uruguay

Octubre de 2021

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República (CAP-CSIC) por el financiamiento de la beca de posgrado.

A PEDECIBA Química por el apoyo económico durante los estudios de posgrado, y a sus secretarías Laura Segredo y Gabriela García por facilitar todas las tareas administrativas.

A las entidades financiadoras CSIC (Proyecto CSIC Grupos, Grupo de Química Farmacéutica), INIA, ANII, AUGM, las que permitieron con sus apoyos económicos la realización de esta tesis.

A mis directores de tesis, Laura Domínguez y Eduardo Manta, por su dedicación en mi formación como estudiante de posgrado, y por su afecto. A mis compañeros de Farmacología-LEA, Beatriz Munguía, Elisa Melián, Manuela Ferrer, Jenny Carolina Saldaña e Inés Cerrera. Por todo lo que me han enseñado, y por el cariño que me han brindado en todos estos años compartidos.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Farmacéutica, por recibirme afectuosamente y ayudarme en todas las tareas referentes a la síntesis de compuestos.

A Mónica Marín y a todos los integrantes del área Bioquímica de la Facultad de Ciencias, por permitirnos usar las instalaciones y los equipos del área, y por brindarnos su apoyo en las tareas referentes al intento de aislar tubulinas de helmintos.

A Horacio Pezzaroglo y Gonzalo Hernández, por haber realizado los espectros de RMN.

A Madelón Portela, del laboratorio de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur Montevideo, por la realización de los espectros de masas de péptidos.

A Alan Talevi, director del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB) de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar una pasantía en dicho laboratorio, con el fin de aprender sobre herramientas de química *in silico*. A Luciana Gavernet, integrante del LIDeB, por instruirme en la temática y supervisar mi trabajo durante la pasantía.

A la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), por financiar mi pasantía realizada en la Universidad Nacional de La Plata.

A todos los docentes, funcionarios y estudiantes de la Facultad de Química, por todo lo que me han enseñado.

A todos los maestros y docentes que han participado en mi formación, tanto académica como humana.

A mi familia y mis amigos, que me han acompañado en todo el proceso de formación profesional, y han sabido disculpar muchas ausencias de mi parte.

RESUMEN

El trabajo desarrollado en la presente tesis de maestría se enmarcó en un programa de investigación interdisciplinario entre los grupos de Farmacología y Química Farmacéutica, de la Facultad de Química, UdelaR, que tiene como objetivo la búsqueda de nuevos antihelmínticos.

Inicialmente se trabajó en la síntesis de nuevos compuestos potencialmente antihelmínticos, utilizando como modelo de diseño, los derivados híbridos valerolactama-benzimidazólicos, que habían sido diseñados previamente por los grupos de investigación mencionados. En esta instancia se sintetizaron nuevas moléculas realizando modificaciones estructurales a nivel del linker de unión y del anillo lactámico, además de aplicar estrategias de simplificación estructural.

La actividad biológica de los nuevos compuestos fue evaluada utilizando un ensayo fisiología guiado, basado en el nematodo de interés productivo *Haemonchus contortus*. Los resultados del ensayo de actividad permitieron direccionar la síntesis de los nuevos compuestos.

Por otra parte se buscó ahondar en la comprensión del mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados que presentaron actividad antihelmíntica. Para ello se exploró la posible implicancia del mecanismo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos, en la actividad biológica de los nuevos compuestos sintetizados, considerando la presencia de este dominio estructural en los compuestos híbridos.

En este sentido, se estudió la interacción de las moléculas activas con la proteína β tubulina, mediante dos aproximaciones complementarias. Por un lado, se implementó un ensayo *in vitro* de polimerización de tubulinas, buscando evaluar si las nuevas moléculas sintetizadas podrían interferir en este proceso. El segundo abordaje consistió en el estudio *in silico* de la interacción entre los nuevos compuestos activos y la β tubulina, utilizando docking molecular.

ÍNDICE

Capítulo introductorio

Introducción general **pág. 01**

Capítulo 1

Síntesis de nuevos compuestos **pág. 29**

Anexo 1 (determinación de relaciones enantioméricas) **pág. 67**

Anexo 2 (espectros de resonancia magnética nuclear) **pág. 75**

Capítulo 2

Ensayos *in vitro* de actividad antihelmíntica **pág. 93**

Capítulo 3

Instalación de un bioensayo blanco-guiado para la comprensión del posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados **pág. 119**

Capítulo 4

Aplicación de ensayos *in silico* para la comprensión del posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados **pág. 149**

Conclusiones generales y perspectivas **pág. 183**

Publicaciones realizadas en el marco de la presente tesis **pág. 187**

CAPÍTULO INTRODUCTORIO

Introducción General

Introducción pág. 03

Bibliografía pág. 23

INTRODUCCIÓN

Las helmintiasis y su tratamiento farmacológico

Las helmintiasis son enfermedades causadas por agentes parásitos denominados helmintos, también conocidos como vermes o gusanos. Esta denominación no constituye una clasificación taxonómica, sino que hace referencia a un conjunto de organismos invertebrados, de cuerpo blando y forma alargada, que tienen la capacidad de infestar otras especies [1].

Los helmintos parásitos pertenecen a dos filos: *nematodo* y *platelmintos*. Los *nematodos* corresponden a gusanos redondos pseudocelomados, y es un filo constituido por más de 25.000 especies [2]. Pese a ello, la mayor parte de sus especies no son parasitarias. Los *platelmintos* son un filo de gusanos planos acelomados, constituidos por alrededor de 30.000 especies. Tienen una gran proporción de especies parásitas, las cuales están agrupadas en dos clases principales: *cestodos* y *tremátodos* [3].

Los helmintos se reproducen por medio de huevos, los cuales eclosionan originando estadios larvarios, que luego de sucesivas transformaciones, darán lugar a los ejemplares adultos. Estos ciclos difieren entre las distintas especies, en cuanto a su complejidad, pudiendo presentar diversos estadios parasitarios, y la presencia de hospederos intermediarios hasta alcanzar el hospedador final. Muchos helmintos, tienen ciclos de vida complejos, que incluyen hasta dos intermediarios, como el caso de los parásitos del género *Diphyllobothrium* [4]. Con excepción de las clases *Strongyloides* y *Echinococcus*, los helmintos no completan su ciclo de vida dentro del huésped. Esto implica que la relación del hospedero con el medio externo, es un factor clave para el desarrollo de las helmintiasis. La transmisión puede ser a través del contacto directo con algún estadio del parásito, o mediante el contagio a través de la picadura de un artrópodo, como moscas o mosquitos.

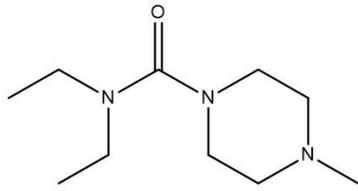
Las infecciones causadas por helmintos pueden afectar diversos órganos. Los daños generados al hospedero derivan principalmente de la obstrucción y deterioro de dichos órganos debido a la multiplicación y crecimiento de los parásitos, pero también debido a la desnutrición ocasionada a partir de la utilización de los nutrientes del hospedero, por parte de los helmintos. Por esta razón, las helmintiasis representan un problema sanitario importante, tanto para los seres humanos, como para los animales [5].

Se estima que alrededor de 2.000 millones de personas padecen de enfermedades parasitarias causadas por helmintos [6]. Las enfermedades de mayor prevalencia corresponden con Ascariasis, Anquilostomiasis, Trichuriasis y Filariasis. Si bien los índices de mortalidad de las helmintiasis son bajos, afectan severamente la calidad de vida de las personas que las padecen, con especial gravedad en niños, en donde la mal nutrición y el daño tisular causado por estas enfermedades, puede afectar el normal desarrollo, generando daños permanentes [7].

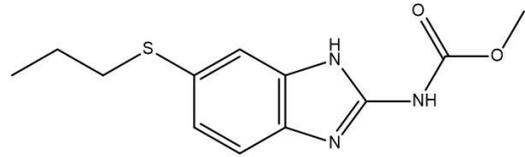
Las helmintiasis en seres humanos están consideradas dentro del grupo denominado *enfermedades tropicales desatendidas* [8]. Estas son un conjunto de enfermedades que ocurren con mayor prevalencia en zonas tropicales y subtropicales, principalmente en países subdesarrollados, en las cuales están incluidas enfermedades causadas por tripanosomas, como la enfermedad de chagas, o enfermedades de origen bacteriano como la lepra [9]. El presupuesto destinado a estudiar estas patologías es menor al 1% del presupuesto global de investigación de enfermedades [7, 8], lo que ha condicionado el desarrollo de herramientas terapéuticas para su tratamiento.

Esto ha implicado que se cuente con un escaso número de fármacos para tratar dichas enfermedades [10]. Pese a ello, el tratamiento farmacológico de las helmintiasis en humanos es efectivo contra la mayor parte de las especies. Un grupo de cinco fármacos son los que se usan principalmente en el tratamiento de estas afecciones [11], cuyas estructuras se muestra en la *figura 1*. La neurocisticercosis y la equinococosis son quizás las excepciones a esta observación, dado que muestran una respuesta parcial a los tratamientos farmacológicos disponibles, siendo la prevención de su contagio la principal herramienta para combatir estas enfermedades.

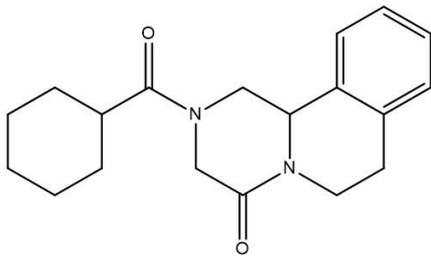
Figura 1. Estructura química de los principales fármacos utilizados para tratar las helmintiasis en seres humanos.



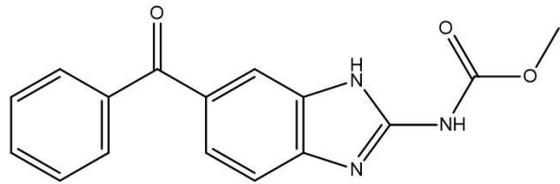
Ditetilcarbamacina



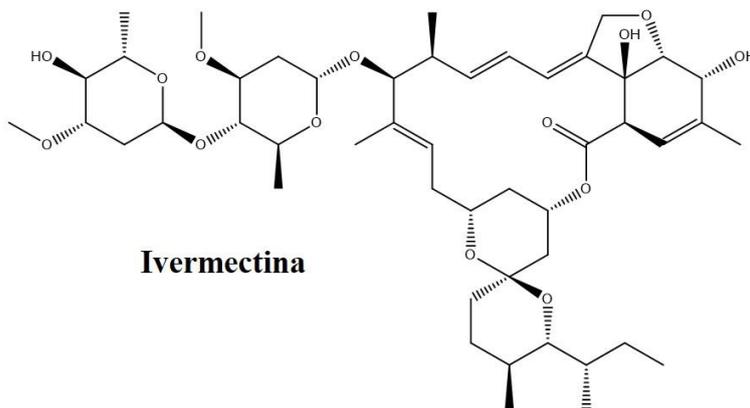
Albendazol



Praziquantel



Mebendazol



Ivermectina

A pesar de contar con tratamientos farmacológicos eficaces, el acceso a los mismos no es universal en países subdesarrollados [9]. Parece ser que la clave para el combate de las helmintiasis en seres humanos, radicaría principalmente en promover el desarrollo de infraestructuras sanitarias adecuadas y el acceso oportuno a la medicación, en aquellos países donde estas enfermedades representan un gran problema para la salud de su población.

Si bien está reportada la resistencia a fármacos antihelmínticos en seres humanos [12], son hechos aislados que no han puesto en juego la eficacia de los tratamientos a nivel global. De todas formas está presente la amenaza de la propagación de la resistencia, teniendo en cuenta los diversos planes de administración masiva de antihelmínticos que se han llevado a cabo, con el fin de disminuir el impacto de estas enfermedades [13]. En este escenario es muy posible que en el futuro sean necesarios nuevos fármacos antihelmínticos para uso humano

La situación es bastante distinta si consideramos las helmintiasis en los animales. Estas enfermedades han tomado gran trascendencia por el impacto económico que generan, sobre todo si tenemos en cuenta las parasitosis que afectan a las especies productivas. La rentabilidad de la producción ganadera se ve seriamente afectada por estas infecciones, dado los efectos adversos que tienen sobre la salud del hospedero, ocasionando pérdida de peso, disminución de la producción de lana y leche, disminución de la fertilidad, y naturalmente un aumento en la tasa de mortalidad [14]. El sistema de alimentación mediante pastoreo (producción extensiva), convierte al ganado en un blanco fácil para la propagación de estas infecciones, sobre todo aquellas causadas por nematodos gastrointestinales.

El tratamiento farmacológico ha sido una de las estrategias más eficientes para el combate de las helmintiasis en animales de producción. Como consecuencia, la comercialización de antihelmínticos representa el mayor sector de la industria farmacéutica veterinaria, en cuanto a volumen y valor de ventas [15]. Quizás sea uno de los pocos ejemplos en donde la investigación de productos veterinarios ha superado la investigación realizada en productos con la misma función, destinados a la salud humana. Con excepción de la dietilcarbamazina, todos los fármacos antihelmínticos de primera línea para uso en humanos, han sido desarrollados en la industria veterinaria [13].

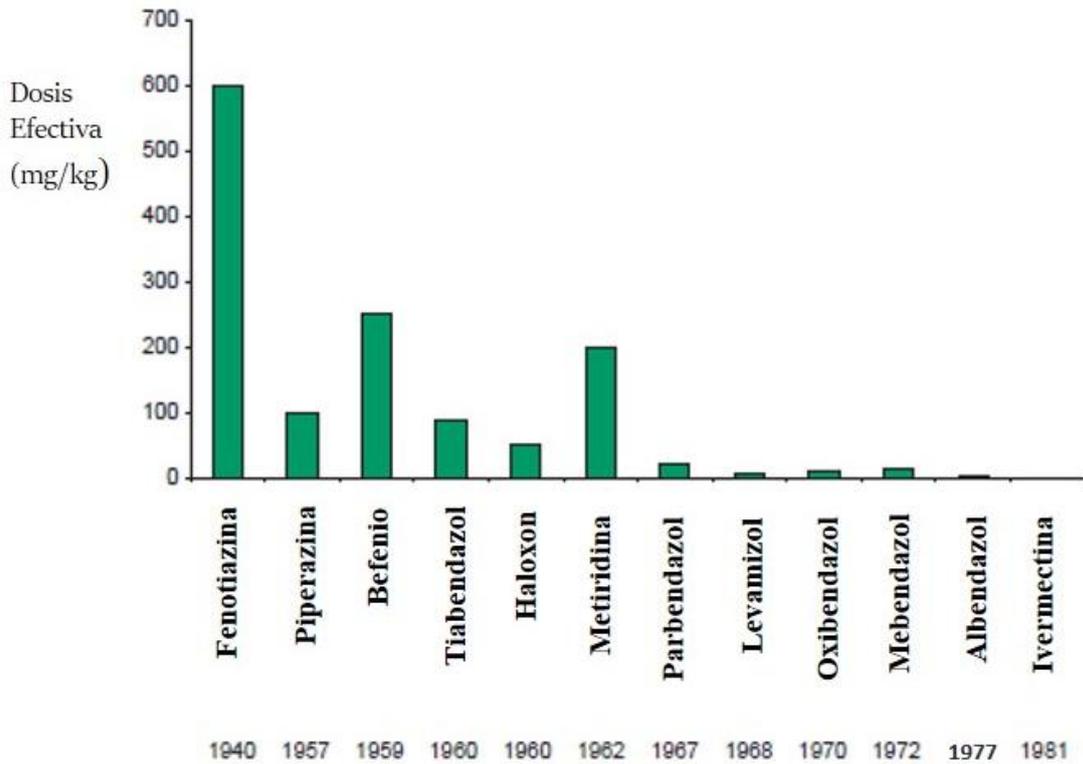
El tratamiento farmacológico de las helmintiasis en los animales de producción, ha sido un factor clave en el desarrollo de esta industria, y se remonta desde larga data. En 1826, se realiza el primer registro académico de tratamientos antihelmínticos para caballos [16]. Los mismos consistían principalmente en compuestos metálicos, como el hierro en polvo, arsénico, estaño, calomelanos, o algunas especies de plantas como la *Juniperus sabina*. Estos compuestos tenían actividad local, generando la remoción de los parásitos del tracto digestivo. En los años siguientes se realizaron pequeños avances, con la inclusión de sales de cobre, sulfato de nicotina, o tetracloruro de carbono, pero estos compuestos presentaban un limitado espectro de acción, y alta toxicidad [15].

La introducción de la **fenotiazina** (1940) y de la **piperazina** (1954), significó un gran avance en la terapia farmacológica de las helmintiasis del ganado, siendo compuestos que presentaban una actividad selectiva frente a los parásitos y eran bien tolerados por los animales. El período comprendido entre 1960 y 1980 representó la época más fructífera en el desarrollo de nuevos antihelmínticos para uso veterinario [17]. El **tiabendazol**, desarrollado en 1960, fue el fármaco pionero de esta etapa, considerado como fármaco modelo, siendo el primer compuesto antihelmíntico de amplio espectro, que además dio lugar a una nueva familia de compuestos: los benzimidazoles antihelmínticos [15].

El **levamisol**, lanzado en 1970, fue otro gran hito en este proceso, que dio lugar a una nueva familia de compuestos (los imidazotiazoles), con actividad en el orden mg por kg de peso del animal [17]. El punto cúlpe de este período se registró con el surgimiento de la familia de las lactonas macrocíclicas, que presentaban actividades del orden de μg . La **ivermectina**, introducida en 1981, es el ejemplo más destacado de esta familia, presentando un amplio espectro de acción, incluso frente a artrópodos [18].

Esta etapa se caracterizó por el descubrimiento de fármacos cada vez más potentes y seguros, con amplio espectro de acción, que permitieron contar con un importante arsenal terapéutico para el tratamiento de helmintiasis en especies productivas. En la *figura 2* se muestran los principales fármacos antihelmínticos lanzados al mercado entre los años 1940 y 1981, indicando sus dosis efectivas. Se observa un gran aumento en la potencia de los sucesivos fármacos, que varía desde el orden cercano al gramo para la fenotiazina, hasta el μg para la ivermectina. Otra contribución importante, fue el descubrimiento de fármacos como el **praziquantel** (1975), o el **closantel** (1977), que si bien presentan

espectros de acción limitados, tienen excelente actividad cestocida, representando una alternativa terapéutica interesante para esta clase de helmintos.



Fármaco antihelmíntico y año de introducción al mercado

Figura 2. Cronología de la introducción al mercado de algunos antihelmínticos para uso veterinario, y dosis efectiva correspondiente a cada uno, para tratar gastroenteritis parasítica en ovejas. Se observa un aumento sucesivo en la potencia de los fármacos, a lo largo del tiempo. Dosis efectiva indicada como mg de fármaco utilizado por kg de peso del hospedero. Adaptado de McKellar et al., 2004 [15].

En las décadas siguientes, la industria farmacéutica veterinaria enfocó sus esfuerzos principalmente en el refinamiento de compuestos ya registrados, en lo que respecta al mejoramiento de los sistemas de liberación, o al estudio del uso combinado de fármacos [15]. El cambio en las coyunturas económicas del sector farmacéutico, condujo a una

reducción en los planes de investigación de nuevos fármacos antihelmínticos, que derivó en un estancamiento en el lanzamiento de nuevos principios activos al mercado. A su vez, los fenómenos de resistencia farmacológica, producto de un uso extensivo, y muchas veces incorrecto, de los fármacos disponibles, comenzaron a presentar niveles cada vez más alarmantes [19]. Esto condujo a una situación de vacío terapéutico, que comenzó a agudizarse a partir de la década de los 90.

En el año 2007 se registró el nuevo antihelmíntico **emodepside**; un compuesto perteneciente a la familia de los octadepsipéptidos, aunque su uso se restringió a animales domésticos, como perros y gatos [20]. Recién en el año 2008, el surgimiento del **monepantel** [21] puso fin a un período de casi 30 años, sin nuevos fármacos antihelmínticos para animales de producción. Este compuesto ha sido popularizado por su uso principalmente en ovejas, para combatir nematodos gastrointestinales. El **derquantel** fue el último antihelmíntico en ser registrado hasta la fecha. En el 2010 se aprobó su uso en combinación con abamectina, mostrando buen perfil de actividad, principalmente frente a estadíos larvarios de nematodos gastrointestinales de rumiantes [20].

En la *tabla 1* se resumen los principales grupos farmacológicos utilizados como antihelmínticos en medicina veterinaria, indicando sus principios activos más representativos y su mecanismo de acción [15, 22, 23].

Tabla 1. Principales grupos farmacológicos utilizados como antihelmínticos en medicina veterinaria. Se indican los principios activos más representativos para cada grupo, así como su mecanismo de acción.

Grupos Farmacológicos	Principios activos más representativos	Mecanismo de acción
Fenotiazinas	Fenotiazina	Antagonismo de receptores nicotínicos
Piperazinas	Piperazina	Agonismo de receptores GABA
Benzimidazoles	Tiabendazol, Albendazol, Fenbendazol, Mebendazol, Triclabendazol, Flubendazol	Inhibición de la polimerización de tubulinas
Organofosforados	Haloxon, Diclorvos	Inhibición de acetilcolinesterasa
Tetrahidropirimidinas	Pirantel, Morantel, Oxantel	Agonismo de receptores nicotínicos
Imidazotiazoles	Levamisol, Butamisol	Agonismo de receptores nicotínicos
Pirazinaisoquinolinas	Praziquantel	Aumento de permeabilidad a iones Ca^{2+}
Bencenodisulfonamida	Clorsulon	Inhibición de fosfoglicerato quinasa y mutasa
Salicilanilidas	Closantel, Rafoxanide	Desacople de la fosforilación oxidativa
Aminas terciarias/cuaternarias	Tribendimidina, Befenio	Agonismo de receptores nicotínicos
Lactonas Macrocíclicas	Ivermectina, Abamectina, Moxidectina, Milbemicina oxima	Activación de canales de Cl^- sensibles a glutamato (GluCl)
Ciclooctadepsipéptidos	Emodepside	Activación de canales de potasio SLO-1
Derivados de amino acetonitrilo	Monepantel	Agonismo de receptor nicotínico exclusivo de nematodos (DEG-3)
Espiroindoles	Derquantel	Antagonismo de receptores nicotínicos

Resistencia farmacológica en las helmintiasis de animales de producción y perspectivas terapéuticas

La resistencia farmacológica ocurre cuando hay una disminución (o falta) en la respuesta de un tratamiento quimioterápico para combatir una infección, a las dosis recomendadas de uso. La falla en la respuesta puede ser identificada como una disminución en la eficacia farmacológica para eliminar una población de helmintos, o también como una disminución en el tiempo de efectividad de un tratamiento, teniendo que efectuar administraciones más seguidas que las realizadas previamente [24]. El fenómeno de resistencia es, sin dudas, uno de los principales obstáculos en la actualidad para el control de las helmintiasis en los animales de producción.

La resistencia a antihelmínticos está mundialmente descrita, para los principales grupos terapéuticos utilizados, e involucra diversas especies de helmintos [25, 26]. Es una problemática, que ha afectado inclusive a países desarrollados como EEUU [27], Canadá [28] y Australia [29], convirtiendo el problema de la helmintiasis del ganado en un fenómeno que trasciende el contexto socio económico. Si bien la resistencia ha sido reportada en la mayor parte de los animales de producción, se ha acentuado sobre todo en pequeños rumiantes, como cabras y ovejas [17, 25, 30].

El consenso general es que la resistencia a los antihelmínticos parece ser un fenómeno hereditario preadaptativo, y el gen o genes que confieren resistencia están presentes en la población del parásito, incluso antes de que se utilice el fármaco por primera vez [24]. El uso de antihelmínticos, selecciona las poblaciones resistentes, eliminando la competencia de las poblaciones susceptibles [26], permitiendo la expansión del fenotipo de resistencia en el medio ambiente.

El uso inadecuado de los fármacos antihelmínticos es una de las principales causas de la expansión de la resistencia, y es donde se pueden realizar más acciones correctivas al respecto [31]. Diversos procedimientos operacionales llevados a cabo por parte de los productores rurales constituyen malas prácticas, que fomentan el desarrollo de resistencia. El uso prolongado de un mismo grupo terapéutico, es quizás uno de los ejemplos más frecuentes. Un fármaco efectivo es utilizado por largos períodos de tiempo, hasta que comienza a dejar de funcionar [24]. Esto se agudiza en aquellos establecimientos que tienen planes de administración masiva de antihelmínticos, de forma profiláctica [32]. La

subdosificación de antihelmínticos es otro factor importante en el desarrollo de la resistencia. El uso de dosis subterapéuticas permite la supervivencia de parásitos resistentes heterocigotos, permitiendo la expansión de alelos que configuran para el genotipo de resistencia [24].

Uno de los puntos clave de este problema, es la falta de diagnóstico oportuno de la resistencia a antihelmínticos. La falta de eficacia de un fármaco antihelmíntico se detecta de forma tardía, lo que implica muchas veces que el fenómeno de resistencia ya se haya esparcido. Algunas metodologías como el Ensayo de Eclosión de Huevos (EHA), el Test de Conteo de Reducción de Huevos en Heces (FERCT), o el test de desarrollo larvario, son utilizadas como herramientas para el diagnóstico precoz de la resistencia [30], si bien su uso no está instaurado en la rutina de la producción agropecuaria. Las técnicas de diagnóstico molecular son metodologías mucho más sensibles que las anteriores, sin embargo su aplicación requiere conocer los mecanismos moleculares por los que ocurre la resistencia. Este ha sido un gran obstáculo para el desarrollo de estas técnicas, dado que las bases moleculares de la resistencia a antihelmínticos todavía es desconocida para muchos fármacos [33]

Parecería no haber dudas acerca de la imperiosa necesidad de contar con nuevos fármacos, para hacerle frente a un fenómeno de resistencia en constante expansión. Sin embargo, este parece ser un camino errático, si no se tienen determinadas consideraciones. Tras la introducción de un nuevo compuesto antihelmíntico, la aparición de resistencia contra ese fármaco en particular, aparece bastante pronto después de su comercialización [26]. En la *tabla 2* se indican algunos ejemplos que incluyen las principales familias de fármacos utilizadas en la producción agropecuaria. De hecho, para el caso del monepantel, uno de los últimos antihelmínticos lanzados al mercado, fue reportado un evento de resistencia, tan sólo cuatro años después de su lanzamiento al mercado, en un estudio realizado en Nueva Zelanda [34]. Este hecho también fue constatado posteriormente en otros países [35, 36], e inclusive en Uruguay se detectó resistencia al monepantel en el año 2014 [37], cuatro años después de su ingreso al mercado Uruguayo.

Tabla 2. Año de lanzamiento al mercado y primer reporte de resistencia de algunos antihelmínticos de uso veterinario

Antihelmíntico	Año de lanzamiento al mercado	Año del primer reporte de resistencia	Referencia
Tiabendazol	1961	1964	[38]
Levamisol	1968	1979	[39]
Ivermectina	1981	1988	[40]
Monepantel	2009	2013	[34]
Derquantel	2010	2012	[41]

El uso exclusivo de fármacos como estrategia para combatir las helmintiasis en animales de producción parece ser una opción insostenible y destinada al fracaso. Hay un consenso creciente de que la alternativa más viable para combatir esta problemática consiste en sistemas integrados de control, que incluyan la aplicación de metodologías no farmacológicas en conjunto con el uso responsable de los antihelmínticos disponibles [42, 43].

Las metodologías alternativas y/o complementarias e integradas, se enmarcan en tres grandes conceptos [44]: 1) el correcto manejo de pasturas para disminuir la infección del ganado; 2) el fortalecimiento del hospedero para hacer frente a las infecciones, mediante planes nutricionales, uso de vacunas, o estrategia de mejoramiento genético del ganado; y 3) uso de antihelmínticos no convencionales, como los productos naturales.

El uso responsable de los antihelmínticos disponibles actualmente, así como de aquellos nuevos compuestos que puedan ser lanzados en un futuro, parece ser un factor clave para implementar con éxito el control químico de las helmintiasis en la producción agropecuaria. A pesar de los últimos descubrimientos realizados, referentes al monepantel y derquantel, sigue siendo escaso e insuficiente el desarrollo de nuevos compuestos. Los fármacos antihelmínticos son herramientas terapéuticas sofisticadas, que implican la utilización de gran cantidad de recursos económicos y humanos para su desarrollo, por lo que deben ser manejados en el marco de planes integrales, que aseguren su uso de manera responsable y sostenible en el tiempo.

Mecanismos de resistencia a antihelmínticos

La resistencia farmacológica es un problema emergente en muchos campos de la biología, que tiene como resultado la disminución o pérdida total del efecto ejercido por los fármacos quimioterápicos. Los tratamientos farmacológicos para combatir las enfermedades causadas por agentes microbianos, las parasitosis, e inclusive la quimioterapia del cáncer, se ven seriamente afectados por este fenómeno.

El conocimiento de los mecanismos de resistencia farmacológica ha derivado principalmente del estudio del desarrollo de resistencia en la quimioterapia del cáncer. [46]. Mecanismos similares han sido constatados en los patógenos bacterianos, sugiriendo la existencia de mecanismos celulares universales y comunes en procariontes y eucariontes. En líneas generales, los mecanismos de resistencia logran impedir efectivamente la unión entre el fármaco y su blanco de acción, ya sea mediante la modificación en la estructura o en el nivel de expresión de un blanco de acción farmacológico, o bien, mediante la disminución de la concentración intracelular del fármaco.

La modificación del blanco farmacológico puede tener como consecuencia la pérdida de afinidad del principio activo por su diana. Esto ocurre a raíz de modificaciones en la secuencia genética que codifica para ese blanco proteico. El **polimorfismo de un único nucleótido único** (SNP), consiste en la variación en la secuencia de ADN, que afecta una única base, para un determinado gen. Los SNPs están directamente relacionados con los fenómenos de resistencia [46]. Muchas veces la modificación de un sólo aminoácido es suficiente para generar un cambio estructural en la proteína blanco que implique la pérdida de actividad de un fármaco. En otros casos los fenómenos de resistencia son más complejos, y responden a diversas modificaciones, que pueden involucrar a más de un gen.

La disminución de la expresión de un receptor farmacológico, es un proceso quizás menos comprendido, no tan asociado a mutaciones genéticas puntuales, sino a procesos adaptativos, que tienen como consecuencia la menor expresión del gen que codifica para un determinado blanco. [23]. En algunos casos inclusive, se puede observar la delección completa de un gen involucrado en la codificación de un blanco [47].

Por otra parte, la disminución en la concentración intracelular de un fármaco se logra principalmente por dos vías: mediante su expulsión al medio extracelular a través de

transportadores de eflujo, o mediante la metabolización efectiva del fármaco. Los transportadores de eflujo pertenecen a la superfamilia ABC de proteínas transmembrana, que se encargan de transportar moléculas endógenas o exógenas, mediante transporte activo. Constituyen un mecanismo importante de detoxificación celular, que ha jugado un papel clave en el desarrollo de resistencia farmacológica [48]. La proteína P-gp es un transportador de membrana dedicado a la expulsión de xenobióticos, y es quizás el ejemplo más destacado de esta familia, dada la relevancia que ha tenido en el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos, en la terapia del cáncer.

Por su parte, el metabolismo de fármacos es un mecanismo de detoxificación llevado a cabo gracias a diversos sistemas enzimáticos, que tiene como objetivo disminuir la posible toxicidad de xenobióticos y facilitar su eliminación. Se ha visto que esta actividad enzimática puede verse aumentada frente a la exposición de un fármaco, contribuyendo a la eliminación del mismo, y por ende a la resistencia farmacológica [45].

El estudio de los procesos resistencia a antihelmínticos ha sido escasamente estudiado en estos parásitos. Pese a que la mayoría de estos fármacos utilizados en medicina veterinaria han presentado resistencia, solamente para algunos grupos farmacológicos se conocen las bases moleculares de dicho fenómeno, a los cuales referiremos brevemente a continuación.

La resistencia a los benzimidazoles (BZs) data desde 1964, y desde entonces ha sido ampliamente estudiada. En los nematodos parásitos se ha determinado que la resistencia a estos fármacos está relacionada con SNPs en el gen que codifica para su blanco, la β tubulina isotipo 1. Se han identificado tres SNPs principales, en las posiciones 167 (sustitución de fenilalanina por tirosina), 198 (sustitución de glutamato por alanina) y 200 (sustitución de fenilalanina por tirosina), que ocasionarían la pérdida de afinidad de los BZs por su blanco de acción [23]. Por otra parte se ha observado que en cepas de *Fasciola hepática* resistentes a triclabendazol, ocurre una mayor sulfoxidación de este fármaco, en comparación con las cepas susceptibles, sugiriendo un mecanismo de resistencia basado en un aumento de la metabolización del fármaco [49]. En esta línea, estudios recientes realizados en nuestro grupo por la Dra. Munguía, han constatado un mayor porcentaje de sulfoxidación del antihelmíntico Fenbendazol, en cepas del nematodo *Haemonchus contortus* resistentes a BZs, en comparación con las cepas susceptibles [50].

Para el caso de levamisol, si bien las bases moleculares de la resistencia farmacológica, no se han comprendido aún de manera exacta, y parecen diferir entre los distintos nematodos estudiados, está claro que en todos los casos ocurre una disminución en el número de receptores nicotínicos sensibles a este principio activo [23]. Algo similar ocurre con el monepantel, donde se ha evidenciado, tanto en *C.elegans* como en *H.contortus*, que diversas mutaciones podrían tener como consecuencia una disminución en el número de receptores sensibles a este fármaco [23, 51, 52].

Finalmente haciendo referencia a las lactonas macrocíclicas, diversos SNPs, presentes en los genes que codifican para los canales GluCl, han sido identificados en helmintos resistentes, y al parecer están asociados a la expresión de receptores que presentan menor afinidad por este grupo de fármacos. Otra evidencia importante en el mecanismo de resistencia a las lactonas macrocíclicas, apuntaría a la participación de transportadores de eflujo, mediante un aumento en la expresión de la proteína Pgp. [52].

Comprender los mecanismos moleculares de la resistencia a antihelmínticos es un factor crucial para poder monitorear la expansión de este fenómeno y buscar preservar la eficacia de los tratamientos disponibles. A su vez, es un insumo de gran importancia en el diseño de nuevos agentes terapéuticos que sean efectivos contra parásitos resistentes.

Desarrollo de nuevos antihelmínticos para uso veterinario: un gran desafío

El desarrollo de la resistencia a antihelmínticos ha hecho evidente la necesidad de contar con nuevos fármacos para el combate de las helmintiasis en animales de producción. Sin embargo esta necesidad parece no haber sido acompañada por la industria farmacéutica veterinaria. Desde principios de la década de los 80, el lanzamiento de nuevos fármacos antihelmínticos ha sido interrumpido de manera drástica, con algunas excepciones en los últimos años [25], como fuera mencionado. Si tenemos en cuenta la dimensión económica del rubro ganadero a nivel mundial, y en particular en países cuya economía se sustenta en la producción ganadera, resulta claro la contribución que significaría para el sector, el desarrollo de nuevos antihelmínticos que permitan recuperar el control farmacológico de las helmintiasis en la salud animal

Se ha descrito que la resistencia a antihelmínticos ha ocurrido con mayor severidad en pequeños rumiantes [17, 25, 30]. Países líderes en producción ovina, como Australia, Sudáfrica o Uruguay han reportado pérdidas millonarias en este sector, principalmente debido a infecciones causadas por nematodos gastrointestinales [17]. Sin embargo la industria ovina insume una pequeña parte del comercio de fármacos para uso veterinarios, a nivel mundial. En 2004 se estimaba que las ventas de productos de la industria farmacéutica veterinaria para salud animal en ovejas, representaba tan sólo la onceava parte de los montos destinados al ganado bovino en el mismo rubro [53]. Si bien está reportada resistencia a antihelmínticos en bovinos y caballos, este fenómeno todavía es de menor severidad para estos animales [25], lo que ha contribuido al poco interés por la investigación de nuevos fármacos antihelmínticos [15].

Por otra parte, la propia dinámica de la industria farmacéutica a nivel mundial, ha condicionado el desarrollo de fármacos, para diversas áreas terapéuticas, como los antihelmínticos de uso veterinario. Los costos en investigación y desarrollo (I+D) son cada vez mayores, producto de las exigencias establecidas por las autoridades sanitarias para el registro de nuevos fármacos. Estas exigencias están enfocadas a garantizar la eficacia del fármaco, minimizando los efectos adversos, tanto para el hospedero, como para el personal responsable de aplicarlo. Algunos autores estiman que el costo en I+D para la obtención de un nuevo antihelmíntico es superior a los 100 millones de dólares americanos en un proceso que insumiría no menos de 10 años de trabajo, desde que se comienza con la investigación, hasta que el fármaco sale al mercado [54, 55, 56].

La industria farmacéutica, incluyendo la industria dedicada a la salud animal, ha ido consolidando una postura económica que busca minimizar el riesgo de las inversiones realizadas, procurando generar mayor rentabilidad en el menor tiempo posible, sobre todo especulando con los períodos que duran las patentes de los nuevos productos lanzados [17].

La industria farmacéutica veterinaria ha ido sufriendo reestructuraciones, que han conducido a la fusión de un gran número de compañías pequeñas, para dar lugar a grandes corporaciones, con el objetivo de lograr mayor rentabilidad [54]. Esto sin duda tiene un impacto negativo en el proceso de búsqueda de nuevos fármacos, dado que la investigación se reduce a un pequeño número de empresas que controlan el mercado de la salud animal, disminuyendo la competencia, y las probabilidades de éxito en nuevas

investigaciones. En 2004 se estimaba que tan sólo diez empresas dedicadas a la salud animal invertían en I+D para el desarrollo de nuevos antiparasitarios [54]. Este número descendió a ocho en el año 2010 [56]. En la *figura 3* se muestra el proceso de consolidación de las principales empresas dedicadas a este rubro entre el año 1990, donde había 35 compañías, y el año 2004, donde el número había descendido a 10.

Resulta evidente que los imperativos económicos del mercado no siempre acompañan las necesidades de la sociedad. Es necesario cambiar el paradigma que mantiene a la industria como único motor de la búsqueda de antihelmínticos, apostando a otros actores de la sociedad como la academia, las organizaciones estatales, o las agencias privadas sin fines de lucro. Un ejemplo es la Australian Wool Innovation (AWI), una agencia formada por productores rurales australianos en el año 2002, con el fin de financiar investigaciones para el sector ovino, enfocados principalmente en promover la industria de la lana [57]. Será necesario buscar soluciones sanitarias para el sector agropecuario a través de perspectivas integrales, que tengan entre sus objetivos, la investigación de nuevos fármacos, entre otras herramientas terapéuticas complementarias, para el combate de las helmintiasis.

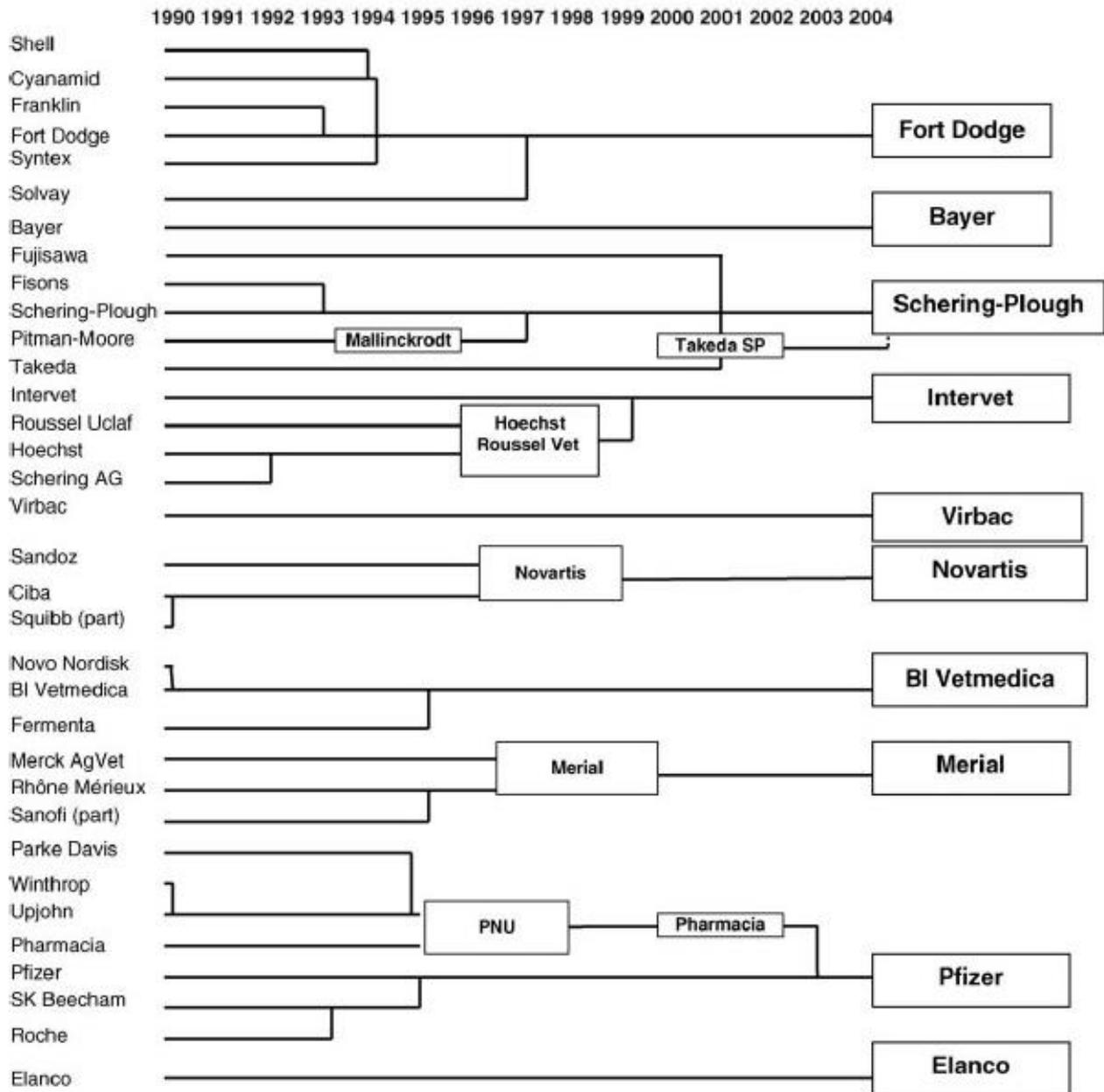


Figura 3. Evolución de la industria farmacéutica veterinaria entre los años 1990 y 2004. Extraído de Waller et al., 2006 [17].

Búsqueda de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica

Uno de los principales desafíos en el proceso de investigación de nuevos antihelmínticos, consiste en hallar moléculas que al mismo tiempo sean tóxicas para el parásito, y seguras para el hospedero. Esto se logra mediante la selectividad de acción de fármacos, actuando

sobre blancos específicos presentes solamente en el parásito, o actuando sobre blancos moleculares que también estén presentes en el hospedero, modulando la actividad molecular para lograr mayor afinidad de acción por el blanco del parásito [56]. Sin dudas no es una tarea sencilla, si consideramos que los helmintos son organismo eucariotas, aumentando la probabilidad de la homología con el hospedero, en comparación con otros tratamientos quimioterápicos, como los tratamientos antibacterianos [58].

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica ha ido variando a lo largo de los años, desde la exploración rudimentaria de extractos de origen vegetal, conteniendo mezclas desconocidas de compuestos, hasta al diseño de moléculas específicas para un blanco molecular [59]. La síntesis orgánica de nuevas moléculas ha sido la principal estrategia utilizada para la obtención de la mayor parte de los antihelmínticos comercializados en la actualidad.

Sin embargo los productos naturales también han tenido su gran contribución, siendo una fuente interesante de moléculas potencialmente antihelmínticas. De hecho, el grupo de las avamectinas y las milbemicinas (lactonas macrocíclicas), las cuales constituyen uno de los principales grupos de antihelmínticos utilizados actualmente, son metabolitos secundarios, obtenidos a partir de bacterias del género *Streptomyces* [60, 61]. Otro ejemplo interesante es el antihelmíntico emodeposido, un producto de semi síntesis, cuyo precursor estructural es obtenido a partir del hongo *Mycelia sterile* [62]. El desafío de trabajar con productos naturales consiste en lograr aislar y caracterizar un compuesto activo, que sea dosificable. Muchas veces la actividad observada se debe a una sinergia de productos, de difícil cuantificación, cuyo contenido puede ser variable en la matriz biológica que la contiene, lo cual no puede ser extrapolable para el desarrollo de un fármaco [58].

Una herramienta clave, es la metodología elegida para evaluar la potencial actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos obtenidos, de forma de dirigir el proceso de búsqueda. Todos los antihelmínticos utilizados en la actualidad han sido descubiertos ensayando su actividad en modelos de animales o parásitos [56]. La investigación directa en los hospederos infectados, es muy costosa, sobre todo trabajando con rumiantes. En este sentido son más comunes los ensayos *in vitro* trabajando con algún estadio del parásito aislado.

Esta es una aproximación aún válida para el desarrollo de nuevas moléculas antiparasitarias, pese a que no acompaña las grandes dimensiones de la industria farmacéutica actual. Los ensayos realizados sobre organismos parasitarios enteros son costosos, insumen mucho tiempo y requieren personal especialmente entrenado [58]. Sin embargo estos ensayos fisiología-guiados, permiten evaluar la toxicidad de los productos a ensayar sobre los organismos íntegros, pudiendo además sugerir implícitamente nuevos blancos moleculares desconocidos a explorar, responsables de la actividad, entre otras ventajas que discutiremos en profundidad en el *capítulo 2* de la presente tesis.

En las últimas décadas y en consonancia con algunos avances en el conocimiento la biología molecular de helmintos, se han podido desarrollar ensayos de actividad antihelmíntica utilizando blancos moleculares aislados (blanco-guiados) [59]. Estos ensayos permiten un mayor nivel de automatización, haciendo posible la evaluación masiva de compuestos. Estrategias de síntesis como la química combinatoria [63], permiten la obtención de gran cantidad de compuestos, en cortos períodos de tiempo, lo que ha dado lugar a una exploración más amplia del espacio químico. Los ensayos de actividad blanco-guiados son herramientas muy útiles para acompasar estas metodologías masivas de síntesis, dando lugar al concepto de cribado de alta eficiencia (*high throughput screening*). [64]. Sin embargo, hasta el presente, no ha surgido ningún nuevo antihelmíntico utilizando esta estrategia.

Pese a ser muy promisorios, los ensayos de actividad blanco-guiados no han tenido la repercusión esperada, en el proceso de diseño de nuevos antihelmínticos. Estas metodologías de ensayo requieren un conocimiento profundo de la biología de los helmintos, siendo esta un área que ha quedado rezagada en la investigación básica [58]. Es necesario conocer con mayor profundidad la biología de estos parásitos, para elucidar nuevos blancos de acción y poder implementar técnicas moleculares avanzadas, que permitan llevar la investigación de nuevos antihelmínticos a la altura de la investigación farmacéutica moderna.

Se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos en los ensayos de actividad *in vitro* no siempre se correlacionan con la actividad *in vivo* de las moléculas analizadas. En el proceso de transferencia de un modelo *in vitro*, hacia la actividad *in vivo*, entran en juego factores farmacocinéticos y farmacodinámicos, que condicionarán el éxito del proceso.

Tener una buena comprensión de estos parámetros es un requisito indispensable en la investigación de un nuevo fármaco.

En el presente trabajo se expondrán los resultados obtenidos en el marco de la tesis de Maestría en Química, realizada en el área de Farmacología de la Facultad de Química, UdelaR. Las actividades llevadas a cabo estuvieron centradas en la síntesis de nuevos fármacos antihelmínticos, enfocados principalmente para uso veterinario.

La búsqueda de nuevos compuestos activos se realizó mediante la síntesis química de moléculas orgánicas, y su actividad fue evaluada mediante un ensayo *in vitro* del estadio adulto del nematodo *Haemonchus contortus*. A su vez se buscó ahondar en la comprensión del mecanismo de acción de las nuevas moléculas activas, mediante ensayos *in vitro* e *in silico*, enfocados en el estudio de la proteína β tubulina, como posible blanco molecular de acción.

Los resultados se describen organizados en los siguientes capítulos:

Capítulo 1: Síntesis de nuevos compuestos

Capítulo 2: Ensayos *in vitro* de actividad antihelmíntica

Capítulo 3: Instalación de un bioensayo blanco-guiado para la comprensión del posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados

Capítulo 4: Aplicación de ensayos *in silico* para la comprensión del posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados

BIBLIOGRAFÍA

- [1]- Castro, G. A. (2011). *Helminths: structure, classification, growth, and development*. Galveston, EEUU: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- [2]- Bird, A. F., & Bird, J. (2012). *The structure of nematodes*. San Diego, EEUU: Academic Press.
- [3]- Rohde, K. (1994). The origins of parasitism in the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*, 24(8), 1099-1115.
- [4]- Scholz, T., Garcia, H. H., Kuchta, R., & Wicht, B. (2009). Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 146-160.
- [5]- Manke, M. B., Dhawale, S. C., & Jamkhande, P. G. (2015). Helminthiasis and medicinal plants: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 175-180.
- [6]- Al Amin, A. S. M., & Wadhwa, R. (2020). Helminthiasis. *StatPearls*. Recuperado el 15 de septiembre de 2020 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560525>.
- [7]- Awasthi, S., Bundy, D. A., & Savioli, L. (2003). Helminthic infections. *British Medical Journal*, 327(7412), 431-433.
- [8]- Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., & Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1311-1321.
- [9]- Hotez, P., Ottesen, E., Fenwick, A., & Molyneux, D. (2006). The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 582:23–33.
- [10]- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M. A., & Bendig, M. (2005). Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(9), 727-740.
- [11]- de Silva, N., Guyatt, H., & Bundy, D. (1997). Anthelmintics. *Drugs*, 53(5), 769-788.
- [12]- Geerts, S., & Gryseels, B. (2001). Anthelmintic resistance in human helminths: a review. *Tropical Medicine & International Health*, 6(11), 915-921.
- [13]- Geary, T. G. (2012). Are new anthelmintics needed to eliminate human helminthiasis?. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(6), 709-717.
- [14]- Dyary, H. O. (2016). Veterinary anthelmintics and anthelmintic drug resistance. *J Zankoy Sulaimani Part A*, 18(1), 191-206.
- [15]- McKellar, Q. A., & Jackson, F. (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *TRENDS in Parasitology*, 20(10), 456-461.

- [16]- Blane, D. (1826). *The Outlines of the Veterinary Art*. Londres, Inglaterra: Compton and Ritchie Printers.
- [17]- Waller, P. J. (2006). From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 1-14.
- [18]- Campbell, W. C. (Ed.). (2012). *Ivermectin and Abamectin*. Rahway, USA: Springer Science & Business Media.
- [19]- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20(10), 477-481.
- [20]- Epe, C., & Kaminsky, R. (2013). New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology*, 29(3), 129-134.
- [21]- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., & Gauvry, N. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452(7184), 176-180.
- [22]- Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 154(1), 11-34.
- [23]- Robertson, A. P., Buxton, S. K., Puttachary, S., Williamson, S. M., Wolstenholme, A. J., Neveu, C., & Martin, R. J. (2012). Antinematodal drugs—modes of action and resistance: and worms will not come to thee (Shakespeare: Cymbeline: IV, ii). *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, 233-249.
- [24]- Shalaby, H. A. (2013). Anthelmintics resistance; how to overcome it?. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1), 18-32.
- [25]- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186(1-2), 70-78.
- [26]- Dyary, H. O. (2016). Veterinary anthelmintics and anthelmintic drug resistance. *J Zankoy Sulaimani Part A*, 18(1), 191-206.
- [27]- Kaplan, R. M., Klei, T. R., Lyons, E. T., Lester, G., Courtney, C. H., French, D. D. & Zhao, Y. (2004). Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(6), 903-910.
- [28]- Falzon, L. C., Menzies, P. I., Shakya, K. P., Jones-Bitton, A., Vanleeuwen, J., Avula, J. & Peregrine, A. S. (2013). Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), 150-162.
- [29]- Cotter, J. L., Van Burgel, A., & Besier, R. B. (2015). Anthelmintic resistance in nematodes of beef cattle in south-west Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 207(3-4), 276-284.

- [30]- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, 6(1), 153.
- [31]- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M. N., & Afaq, M. (2006). Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sciences*, 79(26), 2413-2431.
- [32]- Dorny, P., Claerebout, E., Vercruyse, J., Sani, R., & Jalila, A. (1994). Anthelmintic resistance in goats in peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology*, 55(4), 327-342.
- [33]- Kotze, A. C., Gilleard, J. S., Doyle, S. R., & Prichard, R. K. (2020). Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 264-273.
- [34]- Scott, I., Pomroy, W. E., Kenyon, P. R., Smith, G., Adlington, B., & Moss, A. (2013). Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 198(1-2), 166-171.
- [35]- Sales, N., & Love, S. (2016). Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel/abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Veterinary Parasitology*, 228, 193-196.
- [36]- Cintra, M. C. R., Teixeira, V. N., Nascimento, L. V., & Sotomaior, C. S. (2016). Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 216, 4-6.
- [37]- Mederos, A. E., Ramos, Z., & Banchemo, G. E. (2014). First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*, 7(1), 598.
- [38]- Conway, D. P. (1964). Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 25(106), 844-846.
- [39]- Sangster, N. C., Whitlock, H. V., Russ, I. G., Gunawan, M., Griffin, D. L., & Kelly, J. D. (1979). *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. *Research in Veterinary Science*, 27(1), 106-110.
- [40]- Van Wyk, J. A., & Malan, F. S. (1988). Resistance of field strains of *haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *The Veterinary Record*, 125, 226-228.
- [41]- Sager, H., Bapst, B., Strehlau, G. A., & Kaminsky, R. (2012). Efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against adult stages of a multi-resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Parasitology Research*, 111(5), 2205-2207.

- [42]- Molento, M. B. (2009). Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, 163(3), 229-234.
- [43]- Jackson, F., Bartley, D., Bartley, Y., & Kenyon, F. (2009). Worm control in sheep in the future. *Small Ruminant Research*, 86(1-3), 40-45.
- [44]- Hoste, H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2011). Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2), 144-154.
- [45]- James, C. E., Hudson, A. L., & Davey, M. W. (2009). Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. *Trends in Parasitology*, 25(7), 328-335.
- [46]- Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W. J., & Geary, T. G. (2007). Foreword: towards markers for anthelmintic resistance in helminths of importance in animal and human health. *Parasitology*, 134(8), 1073.
- [47]- Driscoll, M., Dean, E., Reilly, E., Bergholz, E., & Chalfie, M. (1989). Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. *The Journal of Cell Biology*, 109(6), 2993-3003.
- [48]- Jones, P. M., & George, A. M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Science*, 61(6), 682-699.
- [49]- Alvarez, L. I., Solana, H. D., Mottier, M. L., Virkel, G. L., Fairweather, I., & Lanusse, C. E. (2005). Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology*, 131(4), 501.
- [50]- Munguía, B. (2014). Síntesis, caracterización y evaluación biológica de nuevos agentes antiparasitarios. (Tesis Doctoral). Facultad de Química, Universidad de la Republica.
- [51]- Fru, M. F., & Puoti, A. (2014, September). Acquired resistance to monepantel in *C. elegans*: What about parasitic nematodes? *Worm*, 3(3), e959416.
- [52]- Beech, R. N., Skuce, P., Bartley, D. J., Martin, R. J., Prichard, R. K., & Gilleard, J. S. (2011). Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility?. *Parasitology*, 138(2), 160.
- [53]- Besier, B. (2007). New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology*, 23(1), 21-24.
- [54]- Geary, T. G., & Thompson, D. P. (2003). Development of antiparasitic drugs in the 21st century. *Veterinary Parasitology*, 115(2), 167-184.
- [55]- Woods, D. J., & Williams, T. M. (2007). The challenges of developing novel antiparasitic drugs. *Invertebrate Neuroscience*, 7(4), 245-250.

- [56]- Woods, D. J., & Knauer, C. S. (2010). Discovery of veterinary antiparasitic agents in the twenty-first century: a view of the industry. *Point Vétérinaire*, 43(Special), 138-143.
- [57]- AWI (20 de agosto de 2020). AWI's History. Recuperado de <https://www.wool.com/about-awi/who-we-are/awis-history/>.
- [58]- Nixon, S. A., Welz, C., Woods, D. J., Costa-Junior, L., Zamanian, M., & Martin, R. J. (2020). Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 8-16.
- [59]- Geary, T. G., Thompson, D. P., & Klein, R. D. (1999). Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *International Journal for Parasitology*, 29(1), 105-112.
- [60]- Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., & Tunac, J. B. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3), 361-367.
- [61]- Takiguchi, Y., Mishima, H., Okuda, M., Terao, M., Aoki, A., & Fukuda, R. (1980). Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. *The Journal of Antibiotics*, 33(10), 1120-1127.
- [62]- Sasaki, T., TAKAGI, M., YAGUCHI, T., MIYADOH, S., OKADA, T., & KOYAMA, M. (1992). A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *The Journal of Antibiotics*, 45(5), 692-697.
- [63]- Liu, R., Li, X., & Lam, K. S. (2017). Combinatorial chemistry in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 38, 117-126.
- [64]- Armstrong, J. W. (1999). A review of high-throughput screening approaches for drug discovery. *American Biotechnology Laboratory*, 17(1), 26-28.

CAPÍTULO 1

Síntesis de nuevos compuestos

Introducción	pág. 31
Discusión de resultados	pág. 37
Metodología	pág. 51
Conclusiones	pág. 63
Bibliografía	pág. 64
Anexo 1	pág. 67
Anexo 2	pág. 75

INTRODUCCIÓN

Los grupos de Farmacología y Química Farmacéutica de la Facultad de Química, de la UdelaR, trabajan desde hace tiempo, de manera interdisciplinaria, en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica. Esta colaboración ha implicado el abordaje de diversas actividades de investigación, entre ellas, la síntesis de nuevas estructuras químicas, y la evaluación biológica de los productos sintetizados mediante la instalación de ensayos de actividad antihelmíntica.

El laboratorio de Química Farmacéutica ha trabajado desde larga data en la simplificación molecular basada en metabolitos bioactivos de origen marino, como por ejemplo el Micotiazol [1], el Bengazol [2], o el Forboxazol [3]. En el marco de la tesis doctoral de Gordon [4], se comenzó a trabajar en la simplificación molecular de una familia de compuestos denominada **bengamidas**, con el objetivo de buscar nuevas moléculas con actividad antihelmíntica. La bengamidas (*Figura 1*), son productos naturales de origen marino, que se encuentran en esponjas del género *Jaspis* [5]. Esta familia de compuestos demostró poseer actividad antitumoral [6], antibacteriana [7] y antihelmíntica [8]. Desde el punto de vista estructural consiste en un anillo lactámico de siete miembros (caprolactama), unido a una cadena carbonada polihidroxilada.

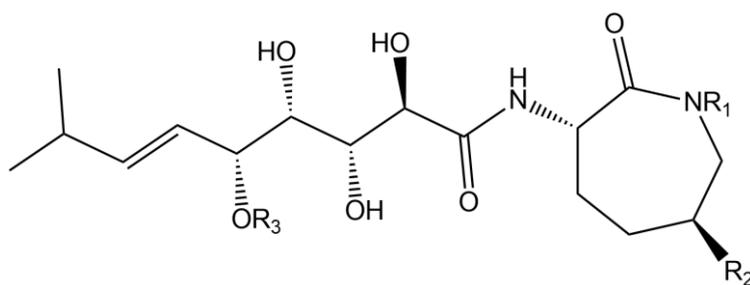


Figura 1. Estructura genérica de las bengamidas

La obtención de las bengamidas desde su reservorio natural, no es una tarea sencilla, dada la acotada distribución geográfica de esta especie de esponjas. Por otra parte, la síntesis *de novo* de estos metabolitos, es una tarea bastante laboriosa, debido a la complejidad de

su estructura química. En este sentido los trabajos realizados por Gordon; *et al.*, en el laboratorio de Química Farmacéutica, de Facultad de Química [4], consistieron en la utilización de metodologías de simplificación molecular, con el objetivo de sintetizar análogos estructurales con potencial actividad antihelmíntica. Como resultado se obtuvieron una serie de derivados δ -valerolactámicos sustituidos, los cuales presentaron excelentes resultados de actividad antihelmíntica *in vitro*, contra el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis*.

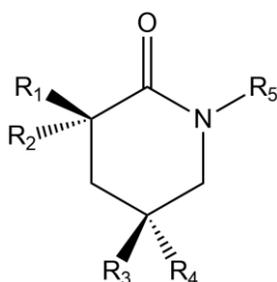


Figura 2. Estructura de los derivados δ -valerolactámicos sustituidos, obtenidos por Gordon.

La exploración de los derivados δ -valerolactámicos, arrojó resultados muy interesantes, que se han enmarcado en diversos artículos académicos y tesis doctorales. En el trabajo realizado por Mendina [9], se continuó con la exploración estructural de estos compuestos. Se constató, que a pesar de presentar gran actividad antihelmíntica *in vitro*, carecían de actividad en ensayos *in vivo*, tanto en modelos murinos, como ovinos. Estudios farmacocinéticos permitieron comprender que los derivados δ -valerolactámicos tenían un tiempo de vida media muy corta, eliminándose rápidamente del hospedero. Además, estudios *ex vivo* de difusión intraparasitaria, demostraron que estos compuestos presentaban muy baja capacidad de difundir al interior del parásito. La rápida eliminación sistémica en el hospedero, junto con la baja capacidad de difusión intraparasitaria, conformaron la hipótesis para explicar la falta de actividad *in vivo*.

Con el fin de mejorar las propiedades fisicoquímicas, y por ende potenciar la actividad antihelmíntica *in vivo* de los compuestos δ -valerolactámicos, se planificaron cambios

estructurales basados en la aplicación de una estrategia de **hibridación molecular** [10]. Esta estrategia de diseño de fármacos, consiste en la identificación de las subunidades activas (farmacóforos), de dos o más fármacos, y la unión de las mismas para construir una nueva estructura molecular, en donde se mantienen las características de interés de sus precursores. La finalidad es poder superar las limitaciones que pudieran presentarse en cada componente por separado. En este sentido se pueden mejorar aspectos de los fármacos precursores estructurales, como por ejemplo aumentar la potencia, superar mecanismos de resistencia a la actividad, mejorar perfiles fisicoquímicos y/o farmacocinéticos, cambiar el perfil metabólico, disminuir toxicidad [11].

La hibridación molecular se llevó a cabo utilizando dos subunidades estructurales distintas. Por un lado, el derivado δ -valerolactámico, para el cual fue elegido el compuesto 2-Boc-amino- δ -valerolactama. Este compuesto había presentado valores de actividad antihelmíntica *in vitro* significativamente superiores a los patrones antihelmínticos comerciales utilizados como referencia [12]. Además su metodología de síntesis es relativamente sencilla [13] lo que resulta una ventaja desde el punto de vista metodológico. El otro componente estructural se obtuvo a partir de una familia de fármacos comerciales antihelmínticos: los benzimidazoles carbamatos (**BZ**) [14]. Este grupo terapéutico posee un amplio espectro de acción antiparasitaria, además de propiedades fisicoquímicas de particular interés, por lo cual fue seleccionado. En la *figura 3* se muestra la estructura general de las moléculas híbridas obtenidas, así como también la estructura de los precursores utilizados.

A través de la utilización de esta metodología de hibridación molecular, se buscaba en primer lugar, poder mejorar las propiedades fisicoquímicas de los derivados lactámicos. La inclusión del residuo benzimidazólico pretendía aumentar la lipofilia de los compuestos lactámicos, de forma de mejorar sus perfiles de difusión intraparasitaria. Por otra parte, la inclusión de un residuo farmacofórico con potencial actividad antihelmíntica, permitía la posibilidad de explorar un nuevo blanco de acción molecular, pudiendo potenciar la actividad de la molécula obtenida, a través de la sinergia lograda por la unión de dos fragmentos activos [15].

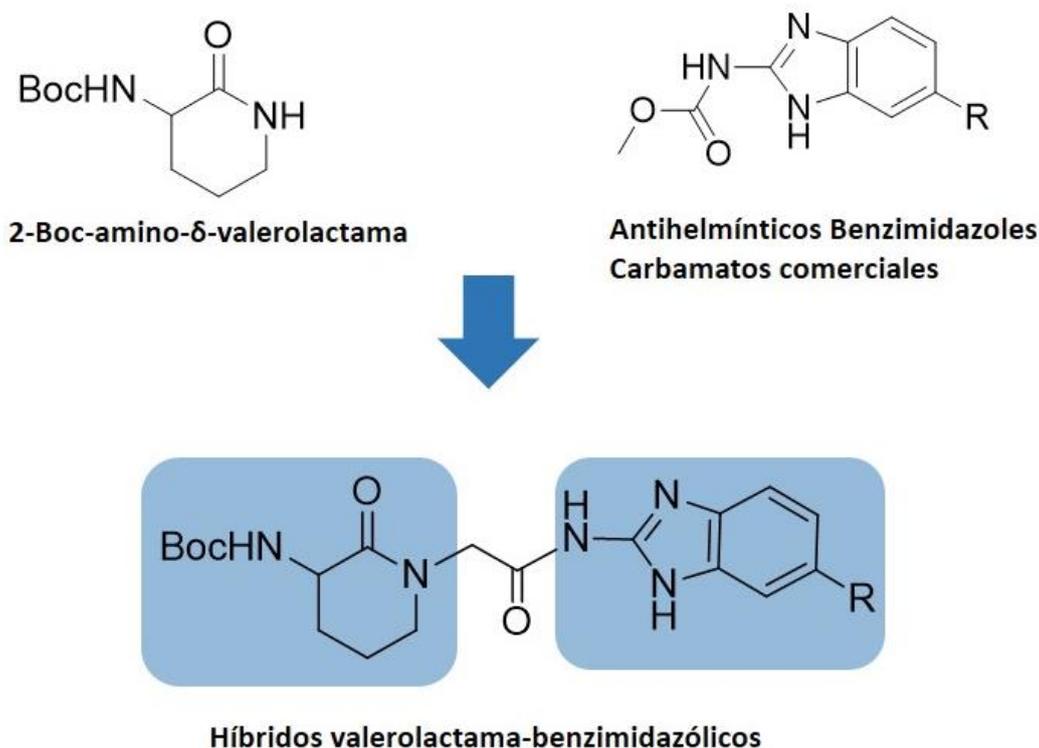


Figura 3. Estructura de los precursores estructurales utilizados en la estrategia de hibridación molecular (margen superior derecho e izquierdo). Estructura general de los compuestos híbridos valerolactama-benzimidazólicos (margen inferior).

Como resultado se diseñaron una serie de compuestos híbridos (*figura 4*) que demostraron tener gran actividad antihelmíntica *in vitro* contra el nematodo *N. brasiliensis*, de orden similar a la actividad presentada por sus precursores δ -valerolactámicos. Además se pudo demostrar un aumento en la difusión intraparasitaria de los nuevos compuestos, trabajando sobre el mismo nematodo [16], observándose perfiles de difusión similares a los obtenidos para los BZ.

Estudios posteriores realizados en el marco de la tesis doctoral de Munguía [17], lograron demostrar que los compuestos híbridos también poseían actividad antihelmíntica *in vivo*, trabajando con un modelo de ratas infectadas con *N. brasiliensis*. Por otra parte, se ampliaron los ensayos de difusión y metabolización intraparasitaria, incluyendo el céstodo *Mesocostoides vogae* (parásito murino), y el nematodo *Haemonchus contortus* (parásito ovino). Todos los híbridos presentaron excelente capacidad de difusión

intraparasitaria, siendo el compuesto 1a el más estable frente a la metabolización parasitaria [18].

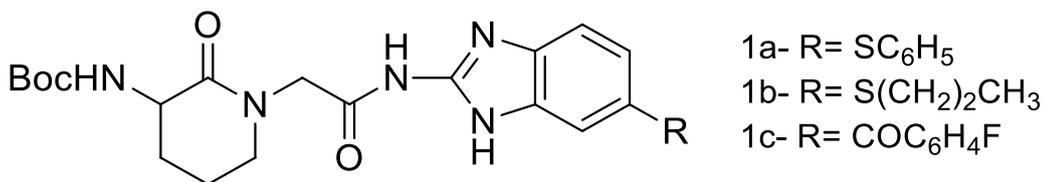


Figura 4. Estructura de los principales híbridos valerolactama-benzimidazólicos sintetizados por nuestro grupo de trabajo. Fueron ampliamente evaluados en ensayos de difusión y metabolización parasitaria, y de actividad antihelmíntica.

Dado los perfiles fisicoquímicos y de actividad observados para el compuesto 1a, el mismo fue seleccionado como cabeza de serie para continuar con el proceso de diseño y optimización de nuevas moléculas potencialmente antihelmínticas. Uno de los objetivos del presente trabajo es poder ampliar la biblioteca de compuestos creada por nuestro grupo de investigación, con la finalidad de contribuir en la búsqueda de nuevos fármacos antihelmínticos. Por otra parte, contar con una biblioteca de compuestos de actividad conocida, es un insumo fundamental para el proceso de instalación y desarrollo de los modelos de ensayo de actividad biológica.

En la *figura 5*, se muestra la estructura base utilizada para el diseño de los nuevos compuestos sintetizados en el presente trabajo. En la misma se conserva el anillo lactámico y el residuo benzimidazólico, unidos a través de un grupo de unión, denominado *linker*. Se utilizó un único componente benzimidazólico, derivado del antihelmíntico comercial Fenbendazol. Este bloque estructural está presente en el compuesto 1a, y demostró ser resistente a los procesos de sulfoxidación parasitaria, en las condiciones ensayadas [18].

Los nuevos compuestos se obtuvieron a partir de modificaciones estructurales a nivel del anillo lactámico y el linker. Se propuso variar el tamaño de anillo, incorporando estructuras ϵ -caprolactámicas, de siete miembros. En cuanto al linker, se buscó explorar estructuras heterocíclicas para las cuales el grupo ya contaba con experiencia de síntesis [2, 19, 20] Por otra parte se realizaron simplificaciones estructurales, de forma de poder comprender la influencia de los distintos fragmentos moleculares, en la actividad biológica observada.

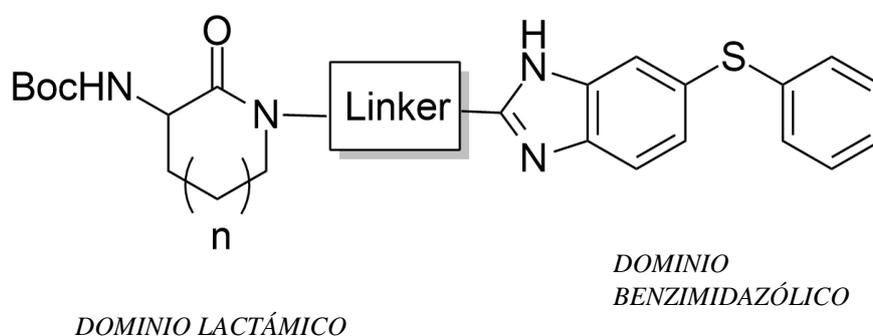


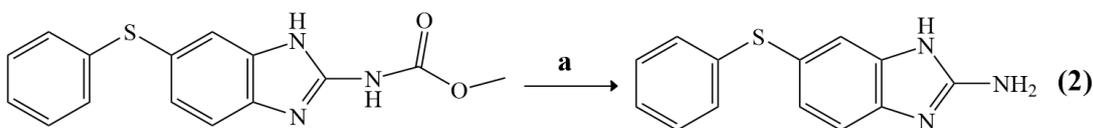
Figura 5. Estructura genérica utilizada en la síntesis de nuevos compuestos

El diseño de los nuevos compuestos fue orientado en base a los resultados de los ensayos de actividad antihelmíntica, que se describen en el capítulo 2. El modelo de actividad biológica utilizado está centrado en el nematodo ovino *H. contortus*, a diferencia de los resultados de actividad antihelmíntica previamente obtenidos por nuestro grupo de trabajo, que fueron realizados utilizando un modelo basado en el nematodo *N. brasiliensis*. El parásito *H. contortus* es un blanco objetivo para la búsqueda de nuevos antihelmínticos, por lo tanto contar con un modelo de actividad antihelmíntica basado en este nematodo, implica sin dudas una ventaja para la estrategia de diseño de nuevos compuestos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como mencionáramos en la introducción, los nuevos compuestos fueron obtenidos utilizando como base la estructura genérica mostrada en la *figura 5*. La estrategia de síntesis se basó en la obtención de bloques de construcción, que luego son unidos para dar lugar a las moléculas de interés.

Uno de los principales bloques de construcción es el dominio benzimidazólico, el cual es obtenido a partir del antihelmíntico comercial Fenbendazol, mediante hidrólisis ácida del grupo carbamato, aplicando la metodología descrita por Gyurik y colaboradores [21]. Como resultado se obtiene el derivado amino-fenbendazol (**2**). En el *esquema 1* se muestra la reacción de obtención. El compuesto **2** fue sintetizado, a escala de multigramo, en el Laboratorio Química Fina, Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), a cargo del Prof. Eduardo Manta y colaboradores.



Esquema 1. Síntesis del compuesto **2**. Condiciones de reacción: a) Reflujo en HBr 24%, 19 horas.
R= 87 %.

El primer compuesto sintetizado fue el compuesto **6**. En el mismo se incorpora un anillo lactámico de siete miembros (ϵ -caprolactama), homologando en un carbono el tamaño del anillo valerolactámico presente en el precursor **1a**. Por otra parte se conserva el grupo acetomida como *linker*. En el *esquema 2* se presenta la metodología utilizada para la obtención del compuesto **6**.

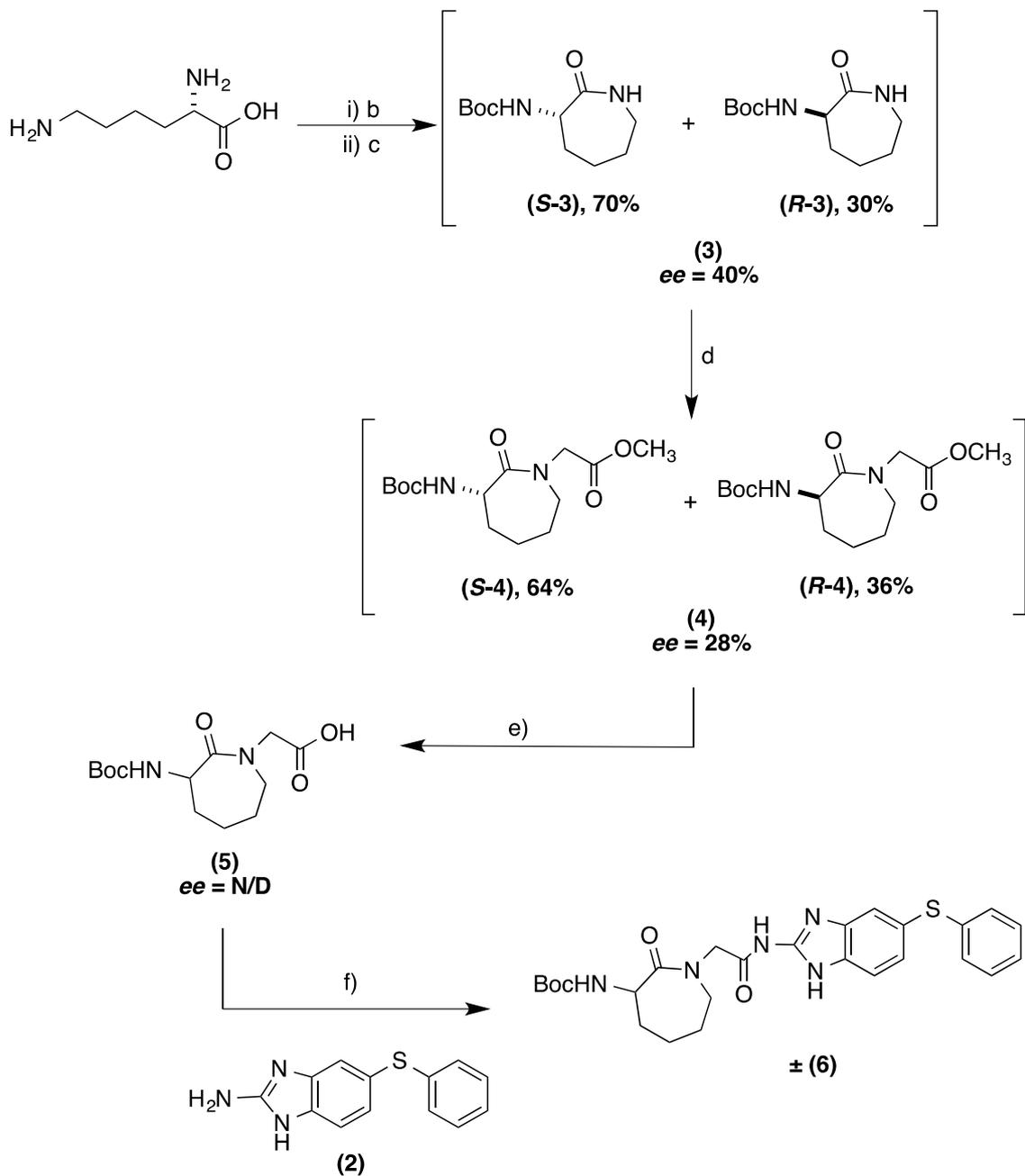
La ruta de síntesis se inicia con la construcción del resto caprolactámico (**3**), mediante la ciclodeshidratación del aminoácido L-lisina utilizando alúmina básica, aplicando la

metodología descrita por Bladè-Font [13] y posterior protección del amino libre, con el grupo ter-butoxicarbonilo (Boc) en condiciones habituales (Boc₂O/TEA/CH₂Cl₂/Tamb).

Si bien partimos de un precursor enantioméricamente puro (L-lisina), las condiciones de la reacción de ciclación utilizadas, generan la epimerización parcial del carbono quiral presente en la L-lisina. El grado de epimerización es dependiente del tiempo de reacción, según se describe en la metodología original, llegando incluso a la racemización del aminoácido de partida. [13]. En el *anexo 1* del presente capítulo, se presenta en detalle, los estudios realizados en este sentido, mediante la aplicación de técnicas de cromatografía de HPLC quiral y a través de la medición de la actividad óptica. La proporción de enantiómeros para el compuesto 3, luego de 72 horas de reacción, es 70:30 (S: R). El porcentaje de racemización aumenta en las sucesivas etapas, como consecuencia de las condiciones de reacción utilizadas, obteniéndose finalmente mezclas racémicas en todos los productos finales que contienen el resto caprolactámico y que se sometieron a ensayos biológicos.

A partir del bloque caprolactámico, se continúa con la construcción del linker, la cual se realiza en dos etapas: primero a partir de la alquilación del nitrógeno del grupo lactama del compuesto 3, mediante la reacción con bromoacetato de etilo, utilizando hidruro de sodio como base, para dar el compuesto 4 [22]; posteriormente se hidroliza en medio básico el grupo éster, conduciendo al ácido 5.

El paso final para la obtención del compuesto 6, consiste en la unión del bloque benzimidazólico al lactámico, mediante la formación de un enlace amida. Puntualmente el grupo amino del compuesto 2 reacciona con el grupo ácido del compuesto 5. El compuesto 6 se obtiene como una mezcla racémica (ver *anexo 1*)

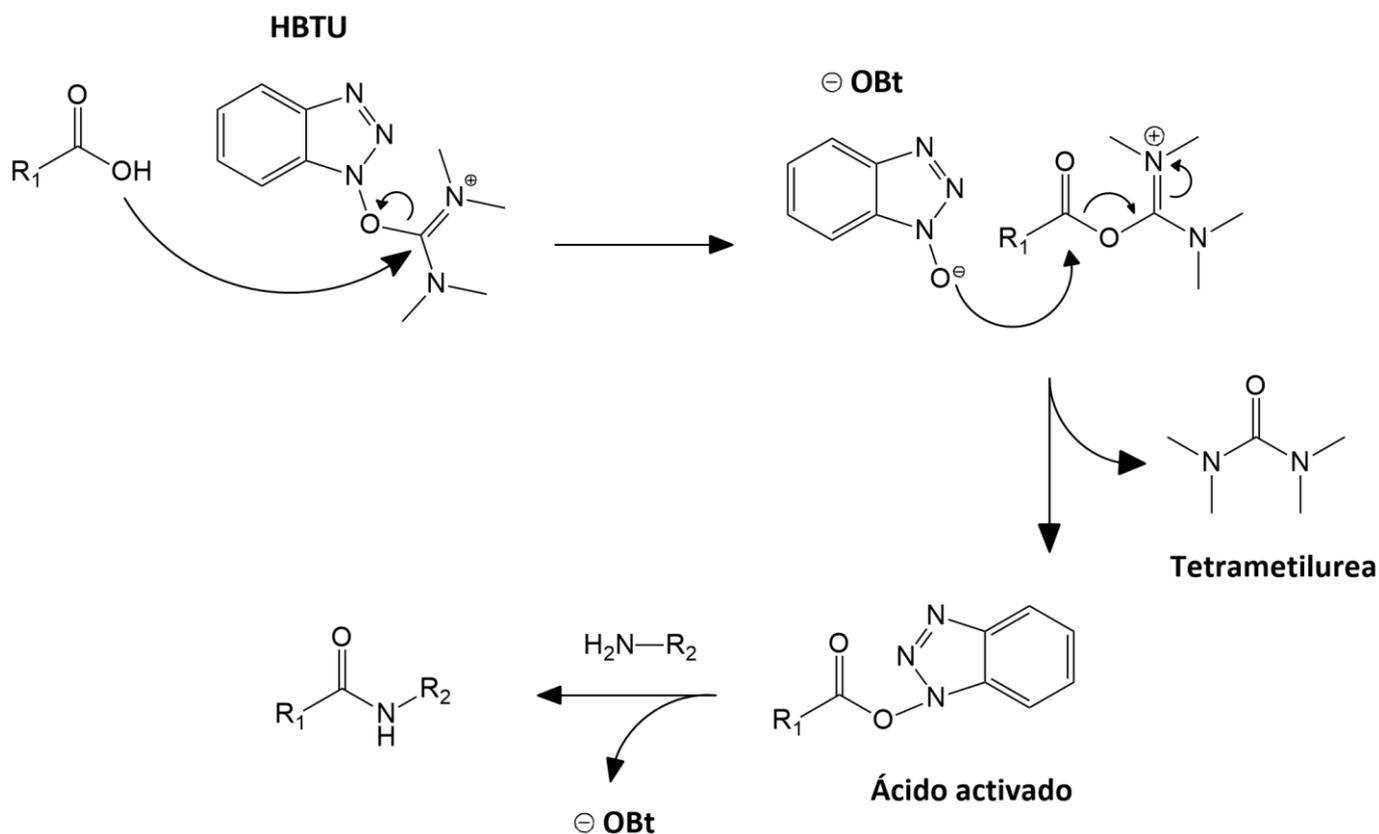


Esquema 2. Síntesis del compuesto 6. Condiciones de reacción: b) alúmina básica, tolueno, reflujo, 72 horas. c) Boc_2O , TEA, CH_2Cl_2 , 4 horas. R= 32%. d) NaH, bromoacetato de etilo, THF, 20 horas. R= 65%. e) KOH, metanol: agua (1:1), 3 horas. R= 95%. f) HBTU, DMAP, DIPEA, **2**, CH_2Cl_2 , 20 horas. R= 63%

La formación del enlace amida es una reacción de condensación con alta energía de activación, por lo que necesita condiciones drásticas de temperaturas para poder llevarse a cabo [23]. Una alternativa es la utilización de agentes acoplantes, los cuales generan una activación del grupo ácido, haciéndolo más favorable al ataque nucleofílico del grupo amino [24]. En la etapa final de síntesis del compuesto 6, se utilizó el agente acoplante HBTU. En el *esquema 3* se muestra el mecanismo para la formación del enlace amida, utilizando este agente acoplante.

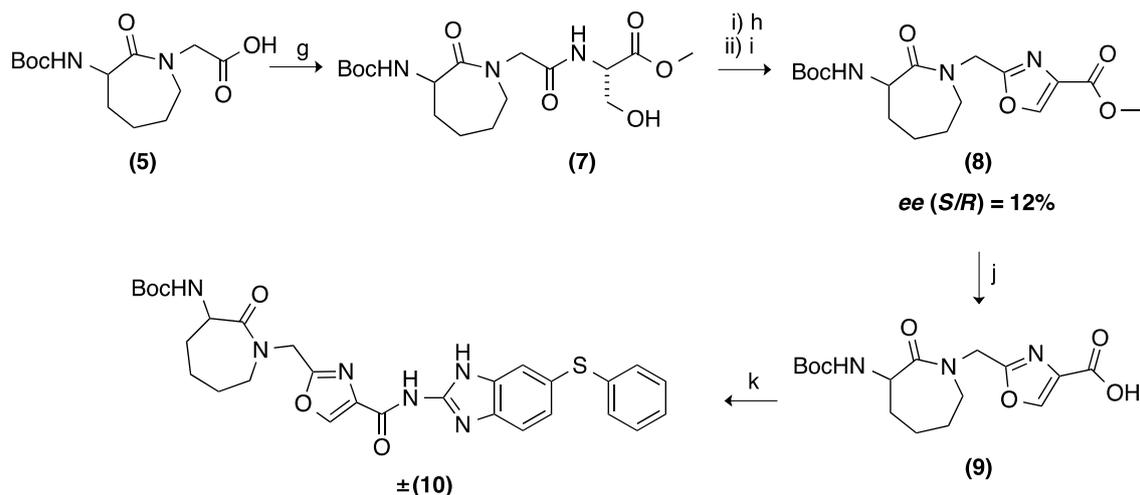
Uno de los inconvenientes de esta última etapa de reacción, es el débil carácter nucleofílico del compuesto 2. Su grupo amino libre presenta una menor densidad electrónica, debido al efecto resonante dador hacia el anillo benzimidazólico, lo que disminuye la efectividad del ataque nucleofílico sobre el grupo ácido activado. Trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, en el escalado del compuesto 1a, demostraron que el HBTU es un agente apropiado para realizar reacciones de acoplamiento, que involucren el compuesto 2. En esta instancia se ratificó la utilidad del HBTU, obteniendo un rendimiento aceptable para la formación del enlace amida.

Sin embargo, se debe considerar que una de las desventajas de la utilización de HBTU, es la formación del producto secundario tetrametilurea (ver *esquema 3*). La eliminación total de esta impureza resulta bastante laboriosa, permaneciendo en cantidades significativas, aún después de realizar etapas de purificación por cromatografía flash. Como se indica en la metodología de síntesis, la eliminación de la tetrametilurea se logra luego de sucesivas etapas de extracción en AcOEt: H₂O.



Esquema 3. Mecanismo de reacción para la formación de enlaces amida, utilizando HBTU como agente acoplante

Posteriormente se sintetizó el compuesto 10. En esta molécula se conserva el anillo caprolactámico, y se incorpora el grupo 4-carboxi-2-metilenoxazol como *linker*. En el *esquema 4* se muestra la ruta de síntesis utilizada. Sobre el compuesto 5 se realiza la construcción del *linker* en una secuencia que involucra tres pasos: amidación, ciclodeshidratación y oxidación. Finalmente el compuesto 10 es obtenido de manera convergente a través del acoplamiento con el resto benzimidazólico.



Esquema 4. Síntesis del compuesto 10. Condiciones de reacción: g) L-serina metil éster, EDCI, DIPEA, DMAP, CH₂Cl₂, 16 horas. R= 69%. h) deoxofluor, CH₂Cl₂, -20 °C. 1 hora. i) BrCCl₃, DBU, CH₂Cl₂, 0°C, 20 horas. R= 38%. j) KOH, metanol: agua (1:1), 3 horas. R= 91%. k) HBTU, DMAP, DIPEA, 2, CH₂Cl₂, 20 horas. R= 58%.

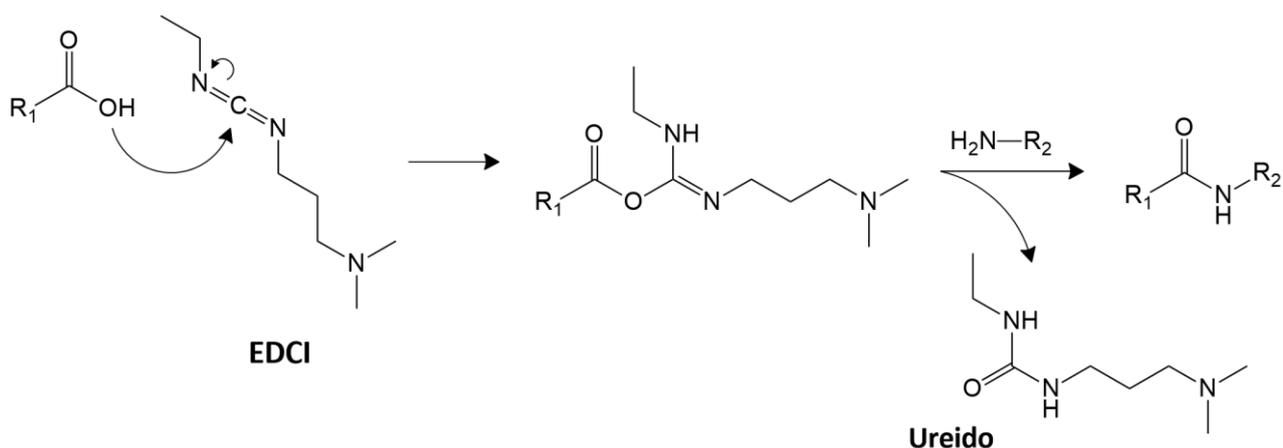
En la primera etapa se realiza una reacción de amidación entre el ácido (5) y el éster metílico de la L-serina, obteniéndose el compuesto 7. El agente acoplante utilizado fue EDCI. En el *esquema 5* se muestra el mecanismo de reacción involucrado. El EDCI demostró ser poco efectivo en las reacciones de acoplamiento que involucraban al compuesto 2, sin embargo en esta instancia se obtuvo un rendimiento satisfactorio (69%), superior al obtenido utilizando HBTU (53%) para el mismo paso de reacción. Una ventaja en la utilización de EDCI, es que el subproducto de reacción generado (ureido), se elimina fácilmente en las etapas de *work up*.

La construcción del *linker* se continuó con la formación del derivado oxazólico (8), aplicando la metodología descrita por Phillips y colaboradores [25]. Esta estrategia consiste en la ciclodeshidratación de sistemas β hidroxí amida, utilizando el reactivo deoxo fluor, obteniéndose la oxazolina correspondiente, la cual es oxidada con BrCCl₃ conduciendo al oxazol.

Posteriormente se realiza la hidrólisis básica del grupo éster, originando el derivado ácido 9. La última etapa de la síntesis consiste en la formación del enlace amida, entre el los

compuestos 9 y 2, utilizando HBTU como agente acoplante. El compuesto 10 se obtiene como mezcla racémica (ver *anexo 1*)

El *ee* del compuesto 8 fue determinado utilizando HPLC quiral (ver *anexo 1*) resultando ser de un 12 % (*S/R* = 56/44). Esto nos permite sugerir, por un lado, que el *ee* del compuesto 5 (que no logró determinarse experimentalmente) este muy cercano a este valor. Por otro lado, la reacción de hidrólisis básica sobre el éster metílico del compuesto 8 (utilizando KOH), nos acercaría aún más a una mezcla racémica en el ácido 9, justificando de esta manera la obtención de 10 como racemato.



Esquema 5. Mecanismo de reacción para la formación de enlaces amida, utilizando EDCI como agente acoplante

En función del análisis realizado de los resultados de actividad antihelmíntica obtenidos para los compuestos sintetizados (los cuales se discuten en detalle en el *capítulo 2*), se decidió aplicar una estrategia de deconstrucción molecular (ingeniería inversa) sobre los compuestos 10 y 1a, a los efectos de poder aproximarnos a interpretar los mismos. De esta manera se planteó estudiar la influencia de los distintos fragmentos estructurales en la actividad biológica observada para estos compuestos. Para ello se desacoplaron

analíticamente diferentes dominios, generando variantes estructurales más simples, que contengan sólo uno de los dos dominios originales.

En la *figura 6* se muestra la estrategia diseñada para el compuesto 10. Como resultado se propusieron 4 posibles estructuras químicas, para evaluar en los ensayos de actividad antihelmíntica. Tres de ellas corresponden a los compuestos 2, 3 y 8, lo cuales habían sido previamente sintetizados como intermediarios de reacción del compuesto 10. Los compuestos 3 y 8 son variantes del dominio lactámico, mientras que el compuesto 2 es una variante del dominio benzimidazólico. El cuarto compuesto propuesto (número 15), es un derivado del dominio benzimidazólico, unido al *linker* oxazol. La ruta de síntesis se muestra en el *esquema 6*.

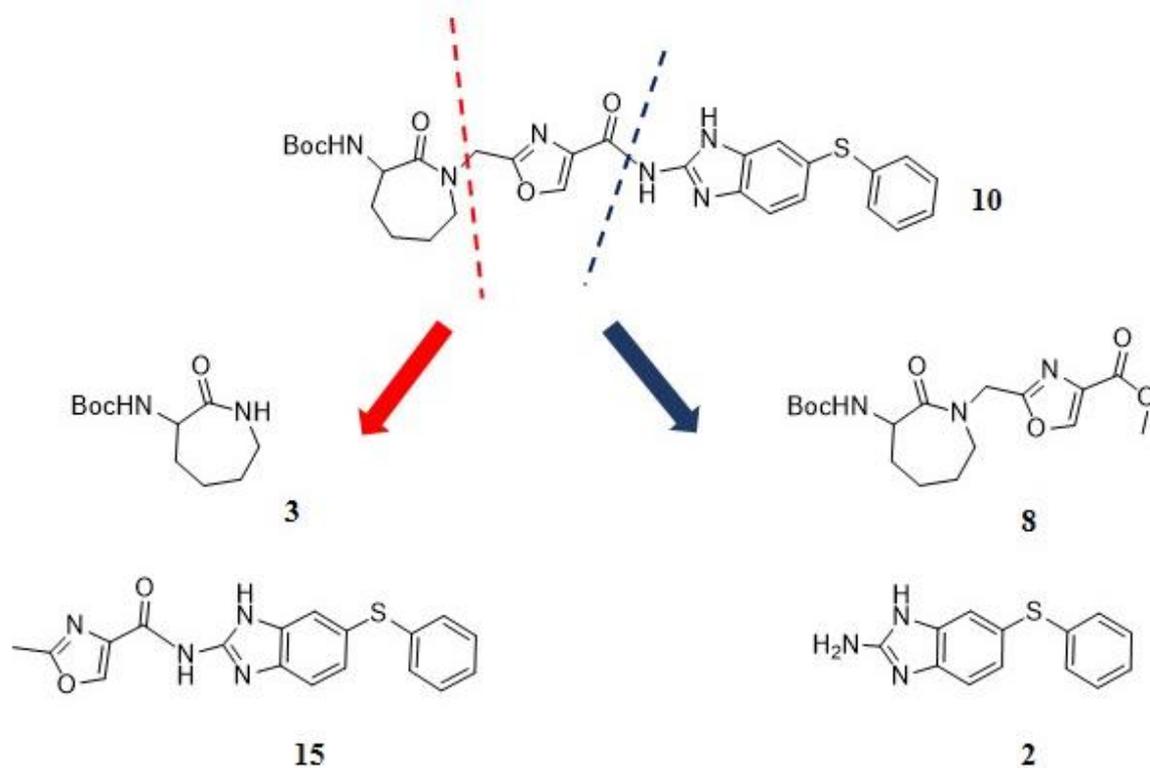
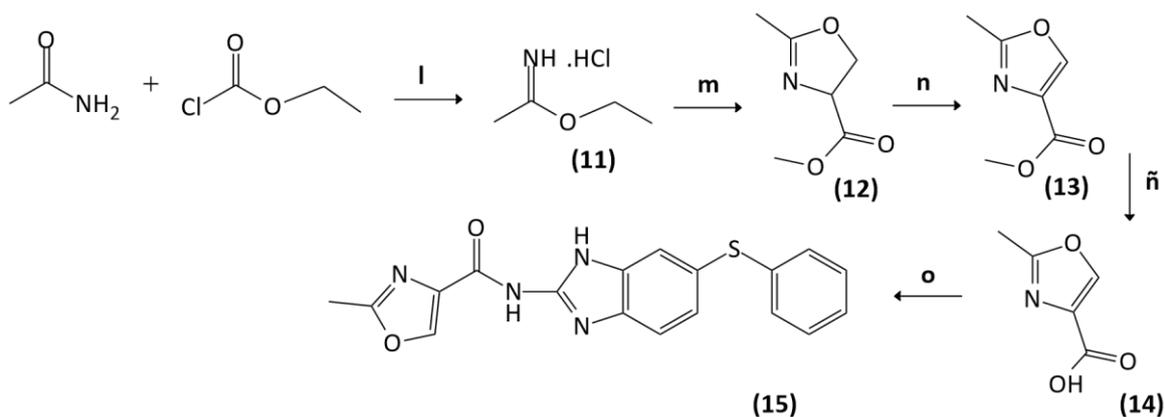


Figura 6. Estrategia de deconstrucción molecular (ingeniería inversa) aplicada al compuesto 10.

La estrategia de obtención del compuesto 15, consistió en la síntesis del bloque estructural metil oxazol carboxílico y su posterior acoplamiento al compuesto 2. En la primera etapa, se sintetizó el reactivo acetoimidato de etilo (compuesto 11) [26]. Posteriormente el compuesto 12 fue obtenido mediante la aplicación de la metodología descrita por Chattopadhyay [27]. El éster metílico de la serina, reacciona con el acetoimidato de etilo, en medio básico, para dar la oxazolina. La síntesis del compuesto 13, se obtiene por oxidación de la oxazolina, aplicando la misma metodología de oxidación descrita para el compuesto 8. Posteriormente se realiza la hidrólisis básica del grupo éster, obteniéndose el ácido 14. La última etapa de la síntesis consiste en la formación del enlace amida, entre el los compuestos 14 y 2, utilizando HBTU como agente acoplante.



Esquema 6. Síntesis del compuesto 15. Condiciones de reacción: l) reflujo, 3 horas. R= 32%. m) clorhidrato de L-serina metil éster, TEA, CH₂Cl₂, 20 horas. R= 61%. n) CBCl₃, DBU, CH₂Cl₂, 0°C, 6 horas. R= 62%. ñ) KOH, metanol: agua (1:1), 3 horas. R= 95%. o) HBTU, DMAP, DIPEA, 2, CH₂Cl₂, 24 horas. R= 55%.

La deconstrucción del compuesto 1a (ver *figura 7*), mediante la separación en sus dominios lactámico y benzimidazólico, dio origen a los compuestos 16 y 17. Ambas secuencias de reacción se muestran en el *esquema 7*. El compuesto 16 ha sido ampliamente trabajado por nuestro grupo de trabajo, y se obtiene aplicando la misma metodología de síntesis del compuesto 3. El mismo fue sintetizado en el Laboratorio

Química Fina, IPTP. La proporción de enantiómeros determinada para este compuesto fue 55:45 (ver *anexo 1*). Por otra parte, el compuesto 17 deriva de la reacción de acetilación del compuesto 2.

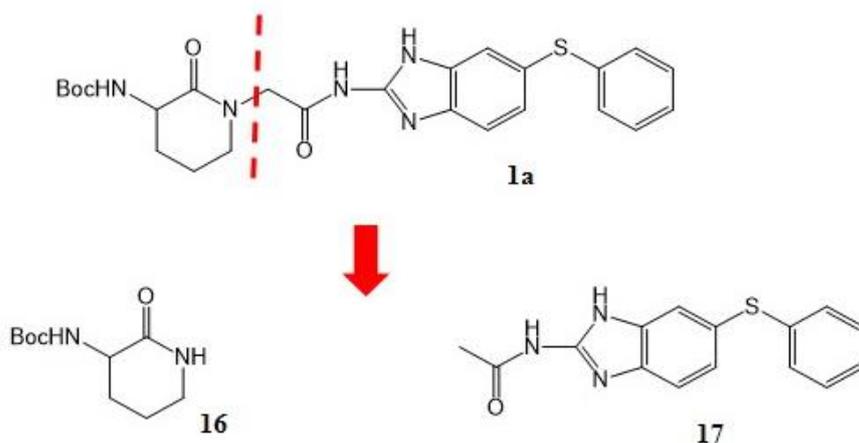
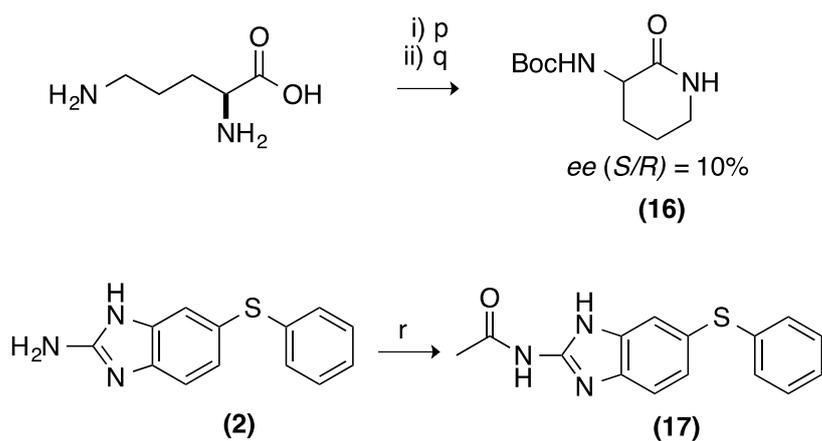


Figura 7. Estrategia de simplificación molecular aplicada para el compuesto 1a.

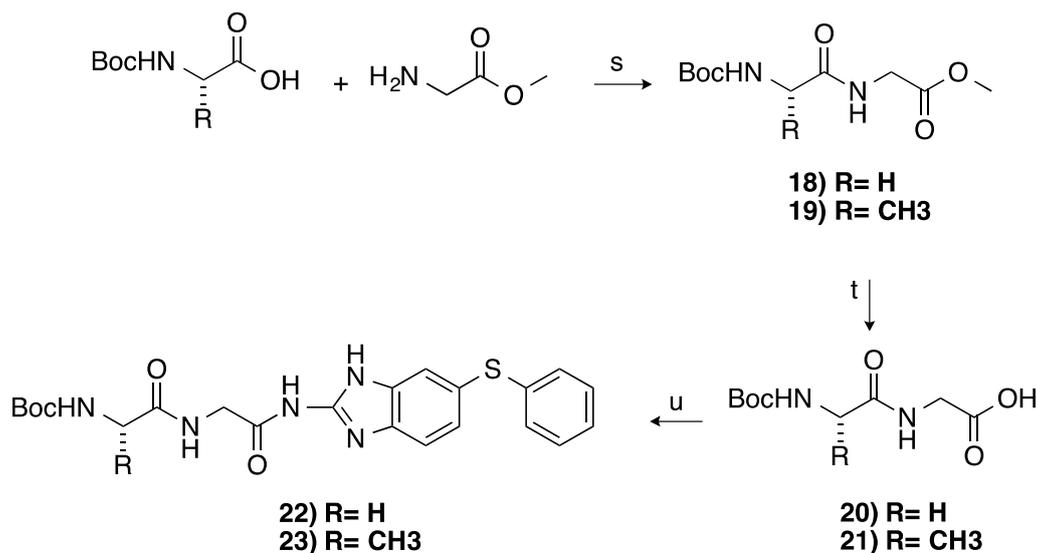


Esquema 7. Síntesis del compuesto 16, condiciones de reacción: p) alúmina neutra, tolueno, reflujo, 4 horas. q) Boc_2O , TEA, Dioxano: H_2O (1:1), 20 horas R= 53%. Síntesis de compuesto 17, condiciones de reacción: r) Ac_2O , Piridina, 15 horas. R= 42%

Uno de los aspectos que se discutirá en el *capítulo 2*, es la diferencia de actividad observada entre los compuestos 1a y 6. El compuesto 1a constituye nuestro modelo de diseño para las nuevas estructuras químicas. El mismo demostró ser activo en un modelo *in vitro* frente al nematodo *H.contortus*, mostrando buen perfil de actividad biológica, similar a los patrones benzimidazoles antihelmínticos. El compuesto 6 en cambio, demostró ser inactivo, trabajando con el mismo modelo de ensayo. Un aumento correspondiente a un carbono, en el tamaño del anillo lactámico, significó la pérdida de actividad en el modelo ensayado.

Se buscó entonces estudiar la influencia del anillo lactámico sobre la variabilidad en la actividad antihelmíntica. Un estrategia interesante sería modificar el tamaño de las estructuras lactámicas, trabajando con anillos de 5 y 8 miembros. Esto apuntaría a explorar un aumento y una disminución en el tamaño de las estructuras lactámicas utilizadas en los compuestos 6 y 1a respectivamente. Sin embargo, la obtención de estos intermediarios lactámicos no pudo realizarse, dado que resulta muy compleja desde el punto de vista de su síntesis química.

Como alternativa, se propuso la sustitución de las estructuras cíclicas lactámicas, por análogos de cadena abierta, buscando explorar un menor volumen molecular y mayor libertad de rotación, en la zona modificada. Se sintetizaron dos análogos de cadena abierta (compuestos 22 y 23), cuya ruta de síntesis se muestra en el *esquema 8*. El grupo lactámico es sustituido por un grupo amida, derivado de la unión de dos aminoácidos. Ambos compuestos se diferencian en la cadena lateral de uno de los aminoácidos utilizados.



Esquema 8. Síntesis de compuestos 22 y 23. Condiciones de reacción: s) EDCI, DIPEA, DMAP, CH₂Cl₂, 6 horas. R: 18= 60%; 19= 90%. t) KOH, metanol: agua (1:1), 3 horas. R: 20= 93%; 21= 96%. u) HBTU, DMAP, DIPEA, 2, CH₂Cl₂, 20 horas. R: 22= 25%; 23= 23%.

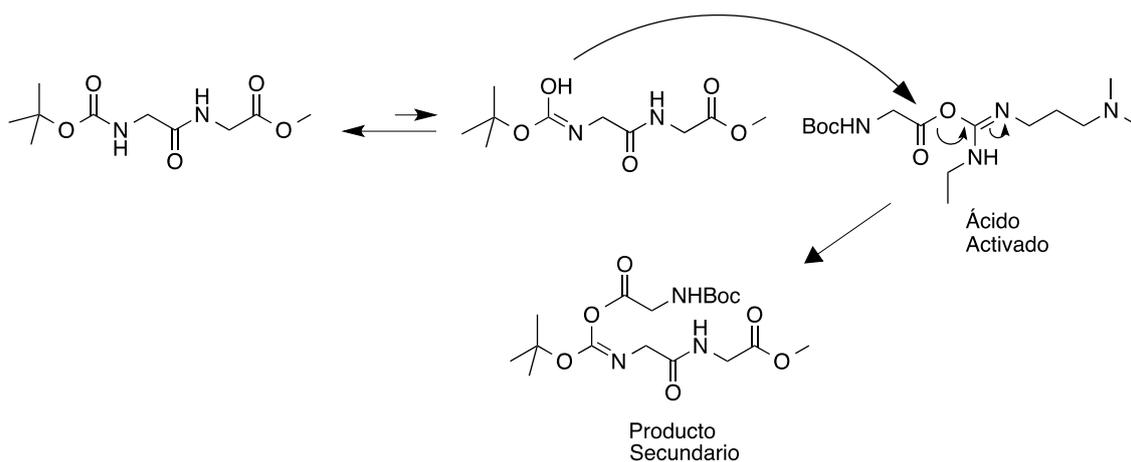
La primera etapa de síntesis consiste en la reacción de acoplamiento entre el éster metílico de la serina, y un aminoácido protegido con el grupo Boc. Se utilizaron los derivados N-Boc Glicina (compuesto 18) y N-Boc L-alanina (compuesto 19). Como agente acoplante se utilizó EDCI.

En la reacción de obtención de 18, se observó que cuando el agregado de EDCI se realiza previo a al agregado del éster metílico de la serina, ocurre la formación de un producto secundario mayoritario (compuesto 18i). Analizando el espectro de RMN (ver *anexo 2 espectroscopia RMN*, compuesto 18i), se propuso una posible estructura y mecanismo de formación para el mismo (*esquema 9*). El agregado previo de EDCI genera la activación de los grupos ácidos de la N-Boc glicina. Con el posterior agregado del éster metílico de la serina, comenzaría la formación del dipéptido. En estas circunstancias, una posible explicación mecánica que diera lugar al producto secundario observado, sería que la forma enólica del carbamato del dipeptido formado, reaccione a través de su hidroxilo

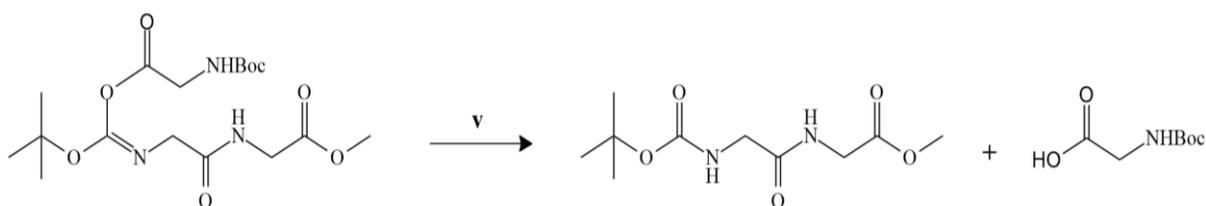
con el remanente de ácido activado, originando el producto secundario. Para confirmar la presencia del grupo éster, se realizó la hidrólisis del compuesto 18i (ver *esquema 10*). En el análisis del espectro de RMN se infiere la presencia del compuesto 18 y la N-Boc glicina en el producto de hidrólisis, confirmando la estructura del compuesto 18i.

La formación de producto secundario se eliminó, cambiando el orden de agregado de los reactivos. El EDCI (disuelto en el solvente de reacción), se agrega de manera muy lenta, a la mezcla de reacción, conteniendo glicina metil éster, y N-Boc glicina. De esta forma, los grupos ácidos activados que se originan con el agregado de EDCI, reaccionan inmediatamente con el grupo amino de la glicina metil éster. La formación del dipéptido es concomitante a la activación del grupo ácido, disminuyendo la probabilidad de reacciones secundarias. Esta estrategia también fue aplicada para la síntesis del compuesto 19.

Los derivados ácidos (20 y 21), se obtienen por hidrólisis básica del grupo éster. La última etapa de reacción consiste en el acoplamiento al compuesto 2, utilizando el agente acoplante HBTU, para la formación del enlace amida (compuestos 22 y 23). La configuración absoluta del carbono quiral de la L-alanina metil éster, parece mantenerse incambiada en la secuencia de reacciones, por lo que el compuesto 23 se obtiene como un enantiómero puro (ver *anexo 1*).



Esquema 9. Estructura química y mecanismo de reacción propuesto, para el producto secundario (18i) obtenido en la síntesis del compuesto 18.



Esquema 10. Hidrólisis del producto secundario 18i. Condiciones de reacción: ν) KOH, metanol: agua (1:1), 3 horas. Como producto de reacción se obtienen el compuesto 18 y N-Boc glicina.

METODOLOGÍA

Metodología general

Las etapas de síntesis fueron realizadas en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química, UdelaR, bajo la supervisión del Prof. Dr. Eduardo Manta.

Los reactivos empleados se adquirieron de forma comercial, y fueron utilizados sin posterior purificación salvo en aquellos casos que se indique lo contrario.

El seguimiento de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC), en placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey/Nagel Ploygram (R) SIL G/UV 254). Las placas se analizaron bajo luz UV a 254 nm, o por desarrollo de color con ninhidrina. La purificación de los productos por columna cromatográfica se realizó utilizando Sílica Gel Flash 60 (JT Baker, con un diámetro de partícula promedio de 40 nm).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se realizaron en un equipo Bruker Avance Neo 400. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) y son relativos al estándar interno TMS. Las constantes de acoplamiento (J) se informan en Hertz (Hz). Las siguientes abreviaciones se utilizan para indicar la multiplicidad de las señales de RMN: s (singulete), d (doblete), t (triplete), q (quadriplete), m (multiplete).

Los espectros de masa de baja resolución (LRMS) se realizaron en un espectrómetro de masas Shimadzu QP 1100-EX, por inyección directa, trabajando a 70 eV.

La espectroscopia infrarroja se realizó en un espectrofotómetro infrarrojo con Transformada de Fourier, IR Prestige 21 Shimadzu, utilizando pastillas de KBr.

La cromatografía HPLC se realizó en un equipo Waters, con bomba binaria modelo Waters 1525 y detector de arreglo de diodos modelo Waters 2996. Se utilizó una columna quiral Cellulose DMP (Supelco, ALLSCIENCE), 250mm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla Hexano: Isopropanol (90:10). El flujo utilizado fue 1 mL/min, y la absorbancia fue medida a 210 nm.

Síntesis de productos

3) *tert*-Butil (2-oxoazepan-3-il)carbamato

i) A un balón conteniendo alúmina básica seca (8 g), se agrega una suspensión de L-lisina (22 mmol) y NaOH (44 mmol) en Tolueno (140 mL), con agitación y bajo atmósfera de N₂. La reacción se lleva a reflujo, utilizando una trampa de Dean Stark para recolectar el agua formada. Se deja reaccionar 72 horas. La mezcla de reacción se filtra y se lava con 10 x 10 mL de CH₂Cl₂: MeOH (9:1). Las aguas madres y los lavados se juntan, se secan con Na₂SO₄, y se elimina el solvente a vacío. Se obtiene un aceite amarillo (2.2 g).

ii) El aceite obtenido se retoma en 100 mL de una solución H₂O: Terbutanol (1:1). Se agregan trietilamina (TEA) (25.1 mmol), di-*tert*-butil-dicarbonato (Boc₂O) (20.6 mmol) y se deja reaccionando a temperatura ambiente, con agitación, por 4 horas. Se evapora el *tert*-butanol a vacío y se extrae con 3 x 50 mL de AcOEt. Las fases orgánicas se juntan y se lavan con solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, y se elimina el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de Petróleo (2:1). Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 29%. IR (ν_{\max} , KBr) cm⁻¹: 3392.72 (estiramiento N-H lactama), 2978,09 (Estiramiento asimétrico C-H metilo) 2931,80 (Estiramiento asimétrico C-H metileno) 1687.71 (estiramiento C=O carbamato), 1654,92 (estiramiento C=O lactama), 1163.08 (estiramiento C-O carbamato). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.39 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.52 (m, 1H), 1.82 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 3.25 (m, 2H), 4.30 (d, J= 11.1 Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 6.48 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 28.09, 28.40, 28.85, 32.22, 42.20, 53.23, 79.47, 155.19, 175.97 ppm.

4) Etil 2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-oxoazepan-1-il)acetato

Una solución de **3** (1.8 mmol) y NaH (7.3 mmol) en 15 mL de THF seco, con agitación, bajo atmósfera de N₂, y a temperatura ambiente, se deja reaccionar por 30 minutos. Luego se agrega bromoacetato de etilo (7.3 mmol) gota a gota y se deja reaccionar por 20 horas. Se corta la reacción con 15 mL de solución saturada de NaHCO₃, y se extrae con 3 x 15 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (1:1). Se obtiene sólido blanco amorfo. Rendimiento 65%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):

δ 1.29 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.62 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 2.04 (m, 2H), 3.20 (dd, $J=15.4, 5.3$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J=15.4, 11.5$ Hz, 1H), 4.20 (m, 4H), 4.44 (dd, $J=11.0, 6.1$ Hz, 1H), 5.94 (d, $J=5.6$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 14.16, 27.8, 27.96, 28.40, 32.40, 50.68, 50.92, 53.46, 61.33, 79.37, 155.37, 169.18, 173.71 ppm.

5) **Ácido 2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-oxoazepan-1-il)acético**

A una solución de **4** (1.2mmol) en 10 mL de metanol, se agrega 2.4 mmol de KOH disuelto en 10 mL de H_2O . Se deja reaccionar 3 horas con agitación, a temperatura ambiente. Se evapora el metanol a vacío, y se ajusta el pH de la fase acuosa a 3, utilizando una solución de HCl 5% v/v. Se extrae con 3 x 10 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 96%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.44 (s, 9H), 1.61 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 2.00 (m, 2H), 3.21 (dd, $J=15.3, 4.8$ Hz, 1H), 3.71 (dd, $J=15.3, 11.6$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.47 (dd, $J=10.6, 6.5$ Hz, 1H), 5.95 (d, $J=6.3$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 26.87, 27.83, 28.39, 32.20, 50.78, 50.84, 53.41, 79.73, 155.33, 173.14, 174.20 ppm.

6) ***tert*-Butil (2-oxo-1-(2-oxo-2-((5-(*feniltio*)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)amino)etil)azepan-3-il)carbamato**

A una solución de **5** (0.2 mmol) en 5 mL de CH_2Cl_2 seco, con agitación y bajo atmósfera de N_2 , se agregan DIPEA (0.4 mmol), HBTU (0.3 mmol), DMAP (0.04 mmol) y **2** (0.35 mmol). Se deja reaccionando por 20 horas, a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 10 mL de solución saturada de NaHCO_3 . Se extrae con 3 x 10 mL de CH_2Cl_2 . Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (4:1). El sólido obtenido se disuelve en 50 mL de AcOEt y se extrae con 3 x 50 mL de H_2O . Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 63%. IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3414.00 (estiramiento N-H de amida secundaria), 3057.17 (estiramiento C-H aromático), 2929.87 y 2856.58 (estiramiento C-H metilénico), 1712.79 (estiramiento C=O carbamato),

1643.35 (estiramiento C=O amida), 1581.63 y 1456.26 (estiramiento C=C-C anillo aromático), 1168.86 (estiramiento C-O carbamato), 871.25 y 810.10 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo benzimidazol), 740.67 y 690.52 (deformación fuera del plano C-H aromático). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.43 (s, 9H), 1.59 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 2.02 (m, 2H), 3.25 (d, $J=14.5$ Hz, 1H), 3.71 (t, $J=13.4$ Hz, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.48 (m, 1H), 5.97 (d, $J=5.27$ Hz, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.22 (m, 5H), 7.30 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 26.94, 27.85, 28.40, 29.70, 32.25, 51.12, 53.48, 79.61, 126.28, 127.84, 127.94, 129.05, 129.19, 137.85, 147.80, 155.23, 169.48, 174.60 ppm. MS (LMRS): m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ (M) $^+$ calculado: 509.21, encontrado 509.20.

7) Metil 2-(2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-oxoazepan-1-il)acetamido)-3-hidroxiopropanoato

A una solución de **5** (1.47 mmol) en 8 mL de CH_2Cl_2 seco, con agitación y bajo atmósfera de N_2 , se agregan TEA (1.47 mmol), EDCI (2.94 mmol), HOBT (1.47 mmol) y se deja reaccionando por 30 minutos. Luego se agrega una solución de L-serina metil éster (2.2 mmol) y TEA (2.2 mmol) en 7 mL de CH_2Cl_2 . Se deja reaccionando por 16 horas, a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 30 mL de solución saturada de NaHCO_3 . Se extrae con 3 x 30 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, primero fase móvil AcOEt, y luego AcOEt: MeOH (98:2). Se obtiene un aceite incoloro. Rendimiento 69%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.44 (s, 9H), 1.57 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.99 (m, 2H), 3.34 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.89 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 5.83 (dd, $J=11.6, 6.5$ Hz, 1H), 7.11 (dd, $J=21.3, 7.7$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 26.77, 27.00, 27.77, 27.83, 31.62, 31.99, 50.74, 50.83, 52.69, 52.71, 53.21, 53.52, 54.71, 62.66, 62.71, 79.78, 155.41, 168.72, 168.84, 170.72, 170.81, 174.50 ppm.

8) Metil 2-((3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-oxoazepan-1-il)metil)oxazol-4-carboxilato

A una solución de **7** (0.6 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ seco, con agitación, bajo atmósfera de N₂, a -20° C, se agrega gota a gota deoxofluor (0.76 mmol). Se deja reaccionar por 1 hora. Se agrega lentamente CBrCl₃ (2.4 mmol). Se deja alcanzar 0° C y se agrega gota a gota DBU (2.4 mmol). La reacción se lleva a temperatura ambiente y se deja reaccionando 20 horas. La reacción se corta con el agregado de 10 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 10 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (1:1). Se obtiene sólido blanco amorfo. Rendimiento 38%. IR (ν_{\max} , KBr) cm⁻¹: 3431.36 (estiramiento N-H amida secundaria), 2935,66 y 2856,58 (Estiramiento simétrico/asimétrico C-H metileno), 1753.29 (Estiramiento C=O éster), 1705.07 (estiramiento C=O carbamato), 1651,07 (estiramiento C=O amida secundaria), 1639.49 (estiramiento C=O lactama N sustituida), 1587.42 (estiramiento C=N oxazol) 1456.26 (estiramiento C=C-C aromático), 1261.45 y 1062.78 (estiramiento O-C-O éster), 1163.08 (estiramiento C-O carbamato), 871.82 y 840.96 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo benzimidazol), 775.38 (deformación fuera del plano C-H aromático). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.54 (m, 1H), 1.80 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 4.45 (dd, J=9.8, 6.4 Hz, 1H), 4.70 (d, J=15.6 Hz, 1H), 4.91 (d, J=15.6 Hz, 1H), 5.94 (d, J=5.9 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): 26.99, 27.76, 28.27, 28.39, 32.50, 44.34, 48.75, 52.27, 53.40, 79.51, 133.39, 144.70, 155.11, 160.83, 161.29, 173.64 ppm. MS (LRMS): m/z C₁₇H₂₅N₃O₆ (M)⁺ calculado: 367.17, encontrado 367.15.

9) Ácido 2-((3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-oxoazepan-1-il)metil)oxazol-4-carboxílico

A una solución de **8** (0.22 mmol) en 3 mL de metanol, se agrega 0.45 mmol de KOH disuelto en 3 mL de H₂O. Se deja reaccionar 3 horas con agitación, a temperatura ambiente. Se evapora el metanol a vacío, y se ajusta el pH de la fase acuosa a 3, utilizando una solución de HCl 5% v/v. Se extrae con 3 x 5 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 91%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (m, 1H), 1.45 (s,

9H), 1.52 (m, 1H), 1.80 (m, 2H), 1.93 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 3.40 (dd, J= 15.2, 4.4 Hz, 1H), 3.60 (dd, J= 15.2, 11.9 Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.71 (d, J= 15.7 Hz, 1H), 4.94 (d, J= 15.7 Hz, 1H), 5.96 (d, J= 6.3Hz, 1H), 8.28 (s, 1H) ppm.

10) *tert*-Butil (2-oxo-1-((4-((6-(feniltio)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)carbamoil)oxazol-2-il)metil)azepan-3-il)carbamato

A una solución de **9** (0.2 mmol) en 5 mL de CH₂Cl₂ seco, con agitación y bajo atmósfera de N₂, se agregan DIPEA (0.4 mmol), HBTU (0.3 mmol), DMAP (0.04 mmol) y **2** (0.3 mmol). Se deja reaccionando por 20 horas, a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 10 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 10 mL de CH₂Cl₂. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (2:1). El sólido obtenido se disuelve en 50 mL de AcOEt y se extrae con 3 x 50 mL de H₂O. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 58%. IR (ν_{\max} , KBr) cm⁻¹: 3057.17 (estiramiento C-H aromático), 2929,87 y 2856,58 (estiramiento simétrico/asimétrico C-H metileno), 1703.14 (estiramiento C=O carbamato), 1691.57 (estiramiento C=O amida secundaria), 1649.14 (estiramiento C=O lactama N sustituida), 1562.34 (estiramiento C=N oxazol), 1454.33 (estiramiento C=C-C aromático), 1168.86 (estiramiento C-O carbamato), 871.82 y 848.68 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo bencimidazol), 740 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo fenol). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.37 (s, 9H), 1.47 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.78 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.76 (q, J= 16.0 Hz, 2H), 6.65 (d, J= 7.2 Hz, 1H), 7.14 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.24 (dd, J= 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.28 (m, 3H), 7.51 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 8.85 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 27.22, 27.79, 28.41, 32.47, 44.88, 49.47, 53.50, 79.56, 126.20, 127.59, 127.84, 129.03, 129.10, 134.97, 138.02, 143.50, 155.11, 159.68, 160.86, 173.79 ppm. MS (LRMS): m/z C₂₉H₃₂N₆O₅S (M)⁺ calculado: 576.22, encontrado: 576.25.

11) Clorhidrato de etil acetimidato.

20 mmol de cloroformiato de etilo se mezclan con 20 mmol de acetamida. Se mantiene bajo agitación, en baño de aceite a 50° C, con refrigerante. Se continúa la reacción hasta finalizar desprendimiento de CO₂. (3 horas). El sólido obtenido se lava con dietiléter. Luego disuelve en CHCl₃, se filtra y se evapora el solvente. Se obtiene sólido blanco amorfo. Rendimiento 30%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.47 (t, J= 5.3 Hz, 3H), 2.47 (s, 3H), 4.61 (d, J= 6.28 Hz, 2H), 11.41 (s, 1H), 12.33 (s, 1H) ppm.

12) (S)-2-metil-4,5-dihidrooxazol-4-carboxilato de metilo

A una suspensión de **11** (3.4 mmol) y clorhidrato de L-serina metil éster (2.4 mmol) en 6mL de CH₂Cl₂ seco, se agrega gota a gota una solución de trietilamina (6.0 mmol) en 4 mL de CH₂Cl₂, con agitación y bajo atmósfera de N₂. Se deja reaccionar 20 horas a temperatura ambiente. Se evapora el solvente y se lava el residuo sólido con 3 x 10mL de dietiléter. Se juntan los lavados y se evapora el dietiléter. Se obtiene un aceite amarillo. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt. Se obtiene un aceite amarillo. Rendimiento 58%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.05 (d, J= 1.3 Hz, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.42 (dd, J=10.6, 8.8 Hz, 1H), 4.50 (t, J=8.3 Hz, 1H), 4.74 (m, 1H) ppm.

13) 2-metiloxazol-4-carboxilato de metilo

Una solución de **12** (1.38 mmol) en 15mL de CH₂Cl₂ seco, con agitación y bajo atmósfera de N₂, se enfría a -20°C. Se agrega gota a gota CBrCl₃ (5.5 mmol). Se deja alcanzar 0°C y se agrega gota a gota DBU (5.5 mmol). Se deja reaccionar 6 horas. La reacción se corta agregando 15 mL de solución saturada de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae con 3 x 15mL de CH₂Cl₂. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil CHCl₃: MeOH (98:2). Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 62%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.53 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 8.16 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 13.82, 52.09, 133.24, 143.78, 161.71, 162.42 ppm.

14) Acido 2-metiloxazol-4-carboxílico

A una solución de **13** (0.82 mmol) en 6 mL de metanol, se agrega 1.64 mmol de KOH disuelto en 6 mL de H₂O. Se deja reaccionar 3 horas con agitación, a temperatura ambiente. Se evapora el metanol a vacío, y se ajusta el pH de la fase acuosa a 3, utilizando una solución de HCl 5% v/v. Se extrae con 3 x 10 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 95%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.58 (s, 3H), 8.24 (s, 1H) ppm.

15) 2-metil-N-(5-(feniltio)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)oxazol-4-carboxamida

A una solución de **14** (0.23 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ seco, con agitación y bajo atmósfera de N₂, se agregan DIPEA (0.69 mmol), HBTU (0.35 mmol), DMAP (0.04 mmol) y **2** (0.35 mmol). Se deja reaccionando por 24 horas, a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 10 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 10 mL de CH₂Cl₂. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil CHCl₃: AcOEt (2:1). El sólido obtenido se disuelve en 30 mL de AcOEt y se extrae con 3 x 30 mL de H₂O. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 55%. IR (ν_{max}, KBr) cm⁻¹: 1676.14 (estiramiento C=O amida secundaria), 1550.77 (estiramiento C=N oxazol), 1450.47 (estiramiento C=C-C aromático), 877.61 y 813.96 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo bencimidazol) 738.74 y 688.59 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo aromático). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.47 (s, 3H), 7.15 (m, 1H), 7.22 (m, 5H), 7.34 (dd, J=8.3, 1.6 Hz, 1H), 7.47 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 8.28 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 13.77, 126.10, 127.28, 127.84, 128.95, 129.00, 134.78, 138.19, 142.78, 147.11, 160.28, 162.19 ppm. MS (LRMS): m/z C₁₈H₁₄N₄O₂S (M)⁺ calculado: 350.08, encontrado: 350.10.

17) N-(6-(feniltio)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)acetamida

A una solución de **2** (0.5 mmol) y DMAP (0.1 mmol) en 3mL de CH₂Cl₂, con agitación y bajo atmósfera de N₂, se agrega lentamente una solución de anhídrido acético (1.17 mmol) y TEA (1.5 mmol) en 2mL de CH₂Cl₂. Se deja reaccionando 15 horas a temperatura ambiente. Se corta la reacción con 10 mL de HCl 5% v/v. Se extrae con 3 x 10 mL de CH₂Cl₂. Se juntan las fases orgánicas y se lavan con 20 ml de solución Brine. Se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: MeOH (98:2). Se obtiene un sólido blanco amorfo. R= 42%. IR (ν_{\max} , KBr) cm⁻¹: 2960,73 y 2883,58 (Estiramiento simétrico/asimétrico C-H metilo), 1685.79 (estiramiento C=O amida secundaria), 1269.16 (estiramiento C-N amida secundaria), 1450.47 (estiramiento C=C-C anillo aromático) 759.95 (deformación fuera del plano C-H benzimidazol) 732.95 (deformación fuera del plano C-H aromático). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.17 (s, 3H), 7.20 (m, 6H), 7.57 (m, 2H), 11.61 (s, 1H), 12.17 (d, J=23.7 Hz, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 23.71, 126.29, 127.71, 128.07, 129.65, 138.98, 148.16, 170.24 ppm. MS (LRMS): m/z C₁₅H₁₃N₃OS (M)⁺ calculado: 283.08, encontrado: 283.10.

18) 2-(2-((tert-Butoxicarbonil)amino)acetamido)acetato de etilo

Se prepara una solución de Boc glicina (1 mmol), clorhidrato de glicina etil éster (1.2 mmol), HOBT (1 mmol) y TEA (1.5 mmol) en 8 mL de CH₂Cl₂ seco, con agitación y bajo atmósfera de N₂. Se agrega gota a gota una solución de EDCI (2 mmol) y TEA (2 mmol), en 2 mL de CH₂Cl₂ seco. Se deja reaccionando 6 horas a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 15 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 15 mL de AcOEt. Se lava la fase orgánica con HCl 5% v/v. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (1:1). Se obtiene aceite incoloro. Rendimiento 60%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (t, J= 7.2 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 3.86 (d, J= 5.9 Hz, 2H), 4.05 (d, J= 5.3 Hz, 2H), 4.22 (q, J= 7.2 Hz, 2H), 5.18 (s, 1H), 6.64 (s, 1H) ppm.

19) 2-(2-((*tert*-Butoxicarbonil)amino)propanamido)acetato de etilo

Se prepara una solución de Boc L-alanina (1.5 mmol), clorhidrato de glicina etil éster (1.8 mmol), HOBT (1.5 mmol) y TEA (2.2 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ seco, con agitación y bajo atmósfera de N₂. Se agrega gota a gota una solución de EDCI (3 mmol) y TEA (3 mmol), en 5 mL de CH₂Cl₂ seco. Se deja reaccionando 6 horas a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 15 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 15 mL de AcOEt. Se lava la fase orgánica con HCl 5%. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (2:1). Se obtiene aceite incoloro. Rendimiento 90%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J= 7.2 Hz, 3H), 1.38 (d, J= 7.1 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 4.03 (dd, J= 5.3, 2.4 Hz, 2H), 4.22 (q, J= 7.1 Hz, 3H), 5.00 (s, 1H), 6.67 (s, 1H) ppm.

20) Ácido 2-(2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)acetamido)acético

A una solución de **18** (0.6 mmol) en 4 mL de metanol, se agrega 1.2 mmol de KOH disuelto en 4 mL de H₂O. Se deja reaccionar 3 horas con agitación, a temperatura ambiente. Se evapora el metanol a vacío, y se ajusta el pH de la fase acuosa a 3, utilizando una solución de HCl 5% v/v. Se extrae con 3 x 5 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 93%. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.39 (s, 9H), 3.57 (d, J= 6.1 Hz, 2H), 3.76 (d, J= 5.8 Hz, 2H), 6.98 (t, J= 6.1 Hz, 1H), 8.04 (t, J= 5.8 Hz, 1H), 12.53 (s, 1H) ppm.

21) Ácido 2-(2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)acético

A una solución de **19** (1.3 mmol) en 10 mL de metanol, se agrega 2.6 mmol de KOH disuelto en 10 mL de H₂O. Se deja reaccionar 3 horas con agitación, a temperatura ambiente. Se evapora el metanol a vacío, y se ajusta el pH de la fase acuosa a 3, utilizando una solución de HCl 5% v/v. Se extrae con 3 x 15 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 96%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.38 (d, J= 6.6 Hz, 3H), 1.44 (s, 9H), 4.12 (m, 3H), 5.30 (s, 1H), 7.05 (s, 1H) ppm.

22) *ter*-Butil (2-oxo-2-((2-oxo-2-((6-(feniltio)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)amino)etil)amino)etil)carbamato

A una solución de **20** (0.43mmol) en 5mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de N₂, se agregan DIPEA (1.09 mmol), DMAP (0.09 mmol) y **2** (0.52 mmol). A continuación se agrega gota a gota, una solución de HBTU (0.65 mmol) en 5mL de CH₂Cl₂ seco. Se deja reaccionando 20 horas a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 10 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 10 mL de AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt: Eter de petróleo (9:1). Se realiza una segunda purificación por cromatografía flash, fase móvil CHCl₃: MeOH (9:1). El sólido obtenido se disuelve en 50 mL de AcOEt y se extrae con 3 x 50 mL de H₂O. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 25%. IR (ν_{\max} , KBr) cm⁻¹: 3387.00 (estiramiento N-H amida secundaria), 2929,87 (Estiramiento asimétrico C-H metileno), 1695.43 (estiramiento C=O carbamato), 1654.00 (estiramiento C=O amida secundaria), 1453.16 (estiramiento C=C-C aromático), 1166.93 (estiramiento C-O carbamato), 858.32 y 817.82 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo bencimidazol), 740.43 (deformación fuera del plano C-H aromático). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.39 (s, 9H), 3.63 (d, J= 5.6 Hz, 2H), 4.0 (d, J= 5.3 Hz, 2H), 7.03 (s, 1H), 7.21 (m, 6H), 7.49 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 11.64 (s, 1H), 12.19 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 28.67, 42.81, 43.64, 78.58, 126.35, 128.18, 129.67, 138.85, 147.83, 156.26, 169.65, 170.56 ppm. MS (LRMS) m/z C₂₂H₂₅N₅O₄S (M)⁺ calculado: 455.16, encontrado 455.10.

23) (*S*)-*tert*-Butil (2-oxo-2-((2-oxo-2-((6-(feniltio)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)amino)etil)amino)etil)carbamato

A una solución de **21** (0.75mmol) en 12mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de N₂, se agregan DIPEA (1.9 mmol), DMAP (0.15 mmol), HBTU (1.13 mmol) y **2** (1.13 mmol). Se deja reaccionando 20 horas a temperatura ambiente. La reacción se corta con el agregado de 15 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrae con 3 x 15 mL de AcOEt.

Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , y se evapora el solvente a vacío. Se purifica por cromatografía flash, fase móvil AcOEt. Se realiza una segunda purificación por cromatografía flash, fase móvil CHCl_3 : MeOH (95:5). El sólido obtenido se disuelve en 50 mL de AcOEt y se extrae con 3 x 50 mL de H_2O . Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , y se evapora el solvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco amorfo. Rendimiento 23%. IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 2978,09 (Estiramiento asimétrico C-H metilo) 2931,80 (Estiramiento asimétrico C-H metileno), 1685.79 (estiramiento C=O carbamato), 1666,50 (estiramiento C=O amida secundaria), 1579.70 y 1452.40 (estiramiento C=C-C aromático), 1166.93 (estiramiento C-O carbamato), 860.25 y 810.10 (deformación fuera del plano C-H aromático grupo benzimidazol) 740.43 (deformación fuera del plano C-H aromático). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.38 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 4.22 (dd, $J= 17.1, 5.1$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J= 16.7, 5.1$ Hz, 2H), 5.77 (s, 1H), 7.13 (m, 1H), 7.21 (m, 5H), 7.34 (d, $J= 8.3$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J= 1.1$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 18.36, 28.35, 43.48, 50.12, 80.26, 126.19, 127.64, 127.78, 129.01, 129.13, 137.95, 147.63, 155.97, 170.23, 174.37 ppm. MS (LRMS) m/z $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ (M)⁺ calculado: 469.18, encontrado 469.10. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10.8^\circ$ (c 0.98, CHCl_3).

CONCLUSIONES

En este capítulo se procedió con la síntesis de nuevas estructuras químicas, para su posterior evaluación de actividad antihelmíntica frente al nematodo *H. contortus*. La búsqueda de nuevas moléculas activas, tuvo como objetivo contribuir a ampliar la biblioteca de compuestos potencialmente antihelmínticos diseñada por nuestro grupo de investigación, pero también permitir ahondar en la comprensión de la relación estructura-actividad de dichas moléculas.

En primer lugar, basados en el compuesto 1a, se sintetizaron los compuestos 6 y 10. Se realizaron modificaciones a nivel del anillo lactámico y del linker de unión de los dominios estructurales. El compuesto 6 explora la incorporación el anillo caprolactámico, manteniendo como linker el grupo acetoamida, presente en el compuesto 1a. El compuestos 10 incorpora el dominio caprolactámico y utiliza como linker el grupo 4-carboxi-2-metilenoxazol.

Aplicando estrategias de deconstrucción molecular (ingeniería inversa), a los compuestos 1a y 10, se obtuvo una nueva serie de moléculas, muchas de las cuales correspondían a intermediarios sintéticos de las secuencias de reacción utilizadas. Considerando el compuesto 10, se propusieron las moléculas 2, 3, 8 y 15, como modelos estructurales que aporten a la comprensión de los resultados biológicos obtenidos. Por otra parte considerado el compuesto 1a, se propusieron las estructuras 16 y 17.

Finalmente se sintetizaron los compuestos 22 y 23, lo cuales constituyen análogos de 1a y 6. Las estructuras lactámicas son sustituidas por cadenas abiertas, conteniendo el grupo funcional amida. Estos compuestos pretenden ser de utilidad para comprender los diferentes perfiles de actividad observados en los compuestos 1a y 6.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]- Mahler, G., Serra, G., Dematteis, S., Saldaña, J., Domínguez, L., & Manta, E. (2006). Synthesis and biological evaluation of simplified mycothiazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(5), 1309-1311.
- [2]- Sellanes, D., Scarone, L., Mahler, G., Manta, E., Baz, A., Dematteis, S., & Serra, G. (2006). Synthesis and evaluation of anthelmintic and cytotoxic properties of bis-1, 3-azole analogs of natural products. *Letters in Drug Design & Discovery*, 3(1), 35-43.
- [3]- Fontana, C., Incerti, M., Moyna, G., & Manta, E. (2008). Conformational analysis of phorboxazole bis-oxazole oxane fragment analogs by NMR spectroscopy and molecular modeling simulations. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46(1), 36-41.
- [4]- Gordon, S. (1998). Nuevos antihelmínticos derivados de la 2-amino- δ -valerolactama. Síntesis y evaluación biológica. (Tesis Doctoral). Facultad de Química, Universidad de la Republica.
- [5]- White, K. N., Tenney, K., & Crews, P. (2017). The Bengamides: A Mini-Review of natural sources, analogues, biological properties, biosynthetic origins, and future prospects. *Journal of Natural Products*, 80(3), 740-755.
- [6]- García-Ruiz, C., & Sarabia, F. (2014). Chemistry and biology of bengamides and bengazoles, bioactive natural products from Jaspis sponges. *Marine Drugs*, 12(3), 1580-1622.
- [7]- Quinoa, E., Adamczeski, M., Crews, P., & Bakus, G. J. (1986). Bengamides, heterocyclic anthelmintics from a Jaspidae marine sponge. *The Journal of Organic Chemistry*, 51(23), 4494-4497.
- [8]- Crews, P., & Hunter, L. M. (1993). The search for antiparasitic agents from marine animals. In *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (pp. 343-389). Springer, Boston, MA.
- [9]- Mendina, P. (2009). Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. (Tesis Doctoral). Facultad de Química, Universidad de la Republica.
- [10]- Viegas-Junior, C., Danuello, A., da Silva Bolzani, V., Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. M. (2007). Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(17), 1829-1852.
- [11]- Walsh, J. J., & Bell, A. (2009). Hybrid drugs for malaria. *Current Pharmaceutical Design*, 15(25), 2970-2985.
- [12]- Gordon, S., Costa, L., Incerti, M., Manta, E., Saldaña, J., Domínguez, L., & Suescun, L. (1997). Synthesis and in vitro anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy- δ -valerolactam derivatives. *Farmaco*, 52(10), 603.

- [13]- Blade-Font, A. (1980). Facile synthesis of γ -, α -, and ϵ -lactams by cyclodehydration of ω -amino acids on alumina or silica gel. *Tetrahedron Letters*, 21(25), 2443-2446.
- [14]- McKellar, Q. A., & Scott, E. W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13(3), 223-247.
- [15]- Morphy, R., Kay, C., & Rankovic, Z. (2004). From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today*, 9(15), 641-651.
- [16]- Munguía, B., Mendina, P., Espinosa, R., Lanz, A., Saldaña, J., Andina, M. J., Ures, X., López, A., Manta, E., and Domínguez, L. (2013). Synthesis and anthelmintic evaluation of novel valerolactam-benzimidazole hybrids. *Letters in Drug Design and Discovery*, 10(10), 1007-1014.
- [17]- Munguía, B. (2014). Síntesis, caracterización y evaluación biológica de nuevos agentes antiparasitarios. (Tesis Doctoral). Facultad de Química, Universidad de la Republica.
- [18]- Munguia, B., Michelena, M., Melian, E., Saldana, J., Ures, X., Manta, E., and Dominguez, L. (2015). Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Exp. Parasitol*, 153, 75–80.
- [19]- Peña, S., Scarone, L., Manta, E., & Serra, G. (2011). An efficient synthesis of 2, 4'-bi-1, 3-oxa (thia) zoles as scaffolds for bioactive products. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 47(6), 703.
- [20]- Scarone, L., Sellanes, D., & Manta, E. (2004). Use of deoxo-fluor for double cyclization to bis-thiazolines. Limitations of this agent for the synthesis of oxazolines. *Heterocycles*, 63(4), 773-778.
- [21]- Gyurik, R. J., Chow, A. W., Zaber, B. E. V. E. R. L. Y., Brunner, E. L., Miller, J. A., Villani, A. J., & Parish, R. C. (1981). Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 9(6), 503-508.
- [22]- Sreenivasan, U., Mishra, R. K., & Johnson, R. L. (1993). Synthesis and dopamine receptor modulating activity of lactam conformationally constrained analogs of Pro-Leu-Gly-NH₂. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36(2), 256-263.
- [23]- Jursic, B. S., & Zdravkovski, Z. (1993). A simple preparation of amides from acids and amines by heating of their mixture. *Synthetic Communications*, 23(19), 2761-2770.
- [24]- Voynikov, Y., Peikov, P., Tencheva, J., Zlatkov, A., & Stavrakov, G. (2012). Synthesis and pharmacological properties of glutamic acid amides: A review. *Farmacia*, 59, 85-95.
- [25]- Phillips, A. J., Uto, Y., Wipf, P., Reno, M. J., & Williams, D. R. (2000). Synthesis of functionalized oxazolines and oxazoles with DAST and Deoxo-Fluor. *Organic Letters*, 2(8), 1165-1168.

[26]- Suydam, F. H., Greth, W. E., & Langerman, N. R. (1969). Synthesis of imidate hydrochlorides by reaction of ethyl chloroformate with amides and thionamides. *The Journal of Organic Chemistry*, 34(2), 292-296.

[27]- Chattopadhyay, S. K., Kempson, J., McNeil, A., Pattenden, G., Reader, M., Rippon, D. E., & Waite, D. (2000). Towards a total synthesis of ulapualide A. Concise synthetic routes to the tris-oxazole ring system and tris-oxazole macrolide core in ulapualides, kabiramides, halichondramides, mycalolides and halishigamides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (15), 2415-2428.

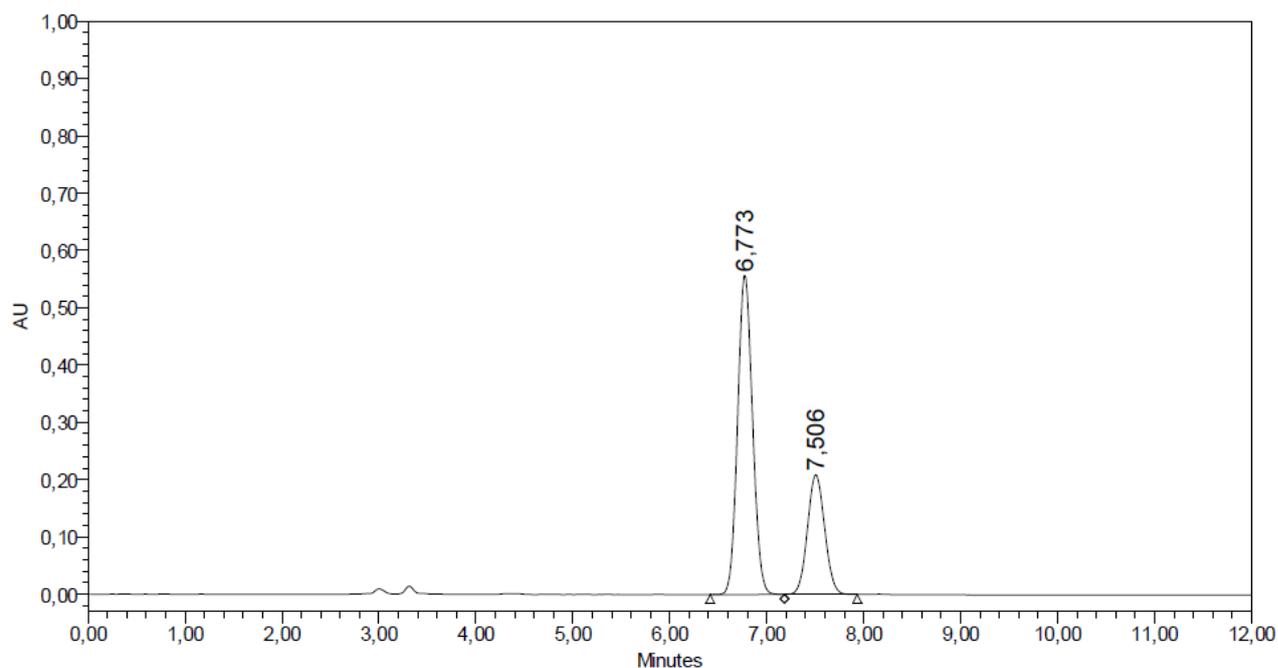
ANEXO 1

Determinación de relaciones enantioméricas

En este apartado se detalla el estudio de la relaciones enantioméricas de aquellos compuestos que presentaban carbonos quirales, mediante cromatografía HPLC, utilizando columna quiral, y a través de la medición de la actividad óptica.

En primer lugar se analizó el compuesto 3, cuyo cromatograma se muestra a continuación. Como se observa la relación de enantiómeros es 70:30. La actividad óptica fue medida arrojando un valor de $[\alpha]_D^{25} = 19.9^\circ$ (c 0.90, CHCl₃).

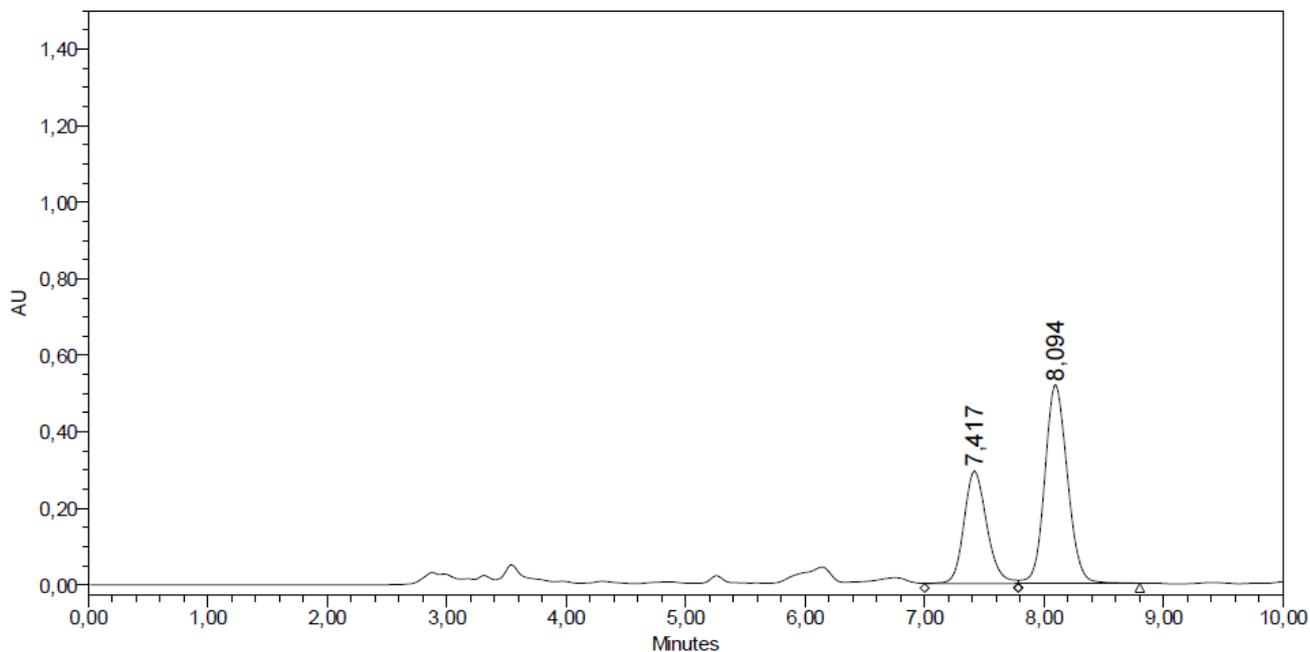
Cromatograma compuesto 3



Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
6.773	558997	5962144	69,77
7.506	209677	2583643	30,23

El proceso de racemización continúa en la siguiente etapa de síntesis. El compuesto 4 presenta una relación enantiomérica 64:36.

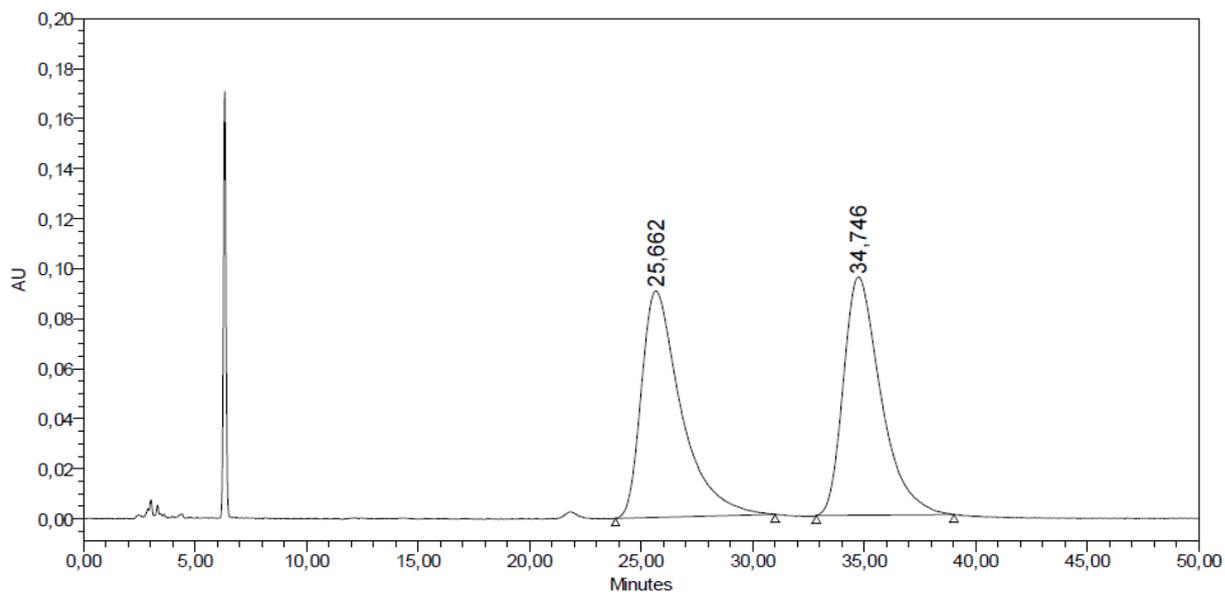
Cromatograma compuesto 4



Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
7,417	294155	3911058	36,39
8,094	519473	6836582	63,61

El compuesto 6, presenta una relación enantiomérica 50:50. No presentó actividad óptica

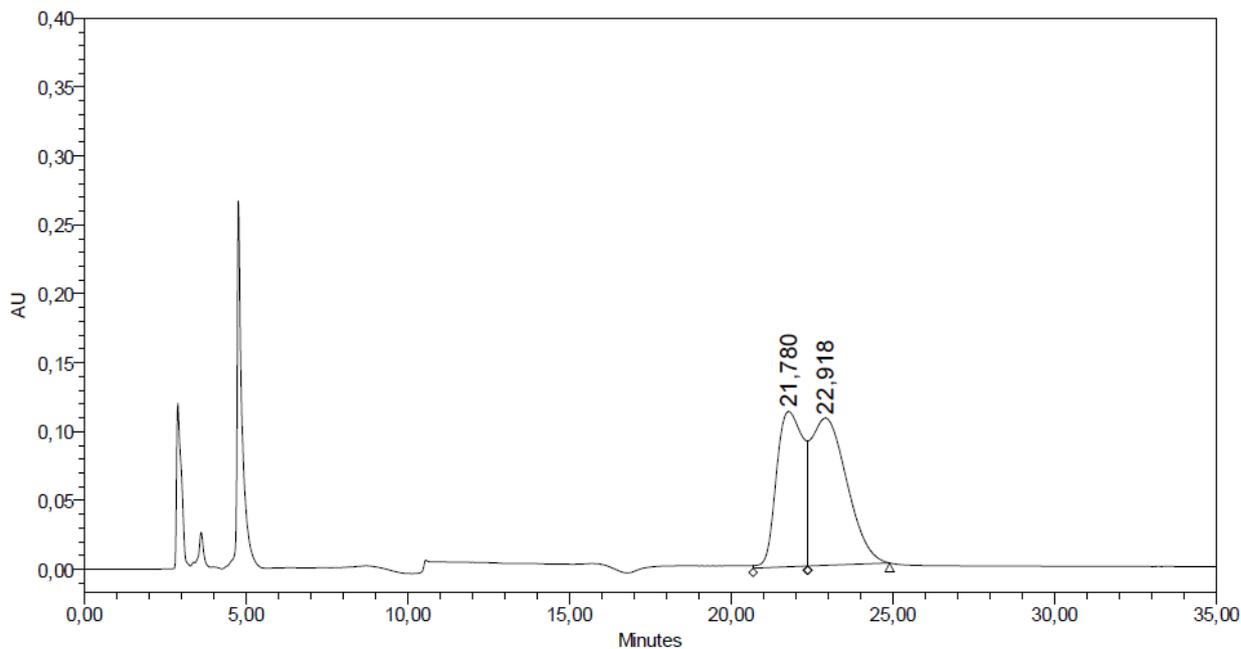
Cromatograma compuesto 6



Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
25,662	90494	11188871	50,15
34,746	95156	11124125	49,85

El compuesto 8 no pudo ser analizado de manera satisfactoria. En el cromatograma se observa que los enantiómeros no pudieron ser separados correctamente. Se probó modificar la composición de la fase móvil, variando la proporción Hexano: Isopropanol, sin lograr mejores resultados. De todas formas en el cromatograma se observa una proporción similar de ambos enantiómeros. El cálculo realizado en base a una integración aproximada (debido a la mala resolución de ambos picos), arrojó una proporción 56:44. Esta proporción de enantiómeros coincide con la ausencia de actividad óptica medida para este compuesto.

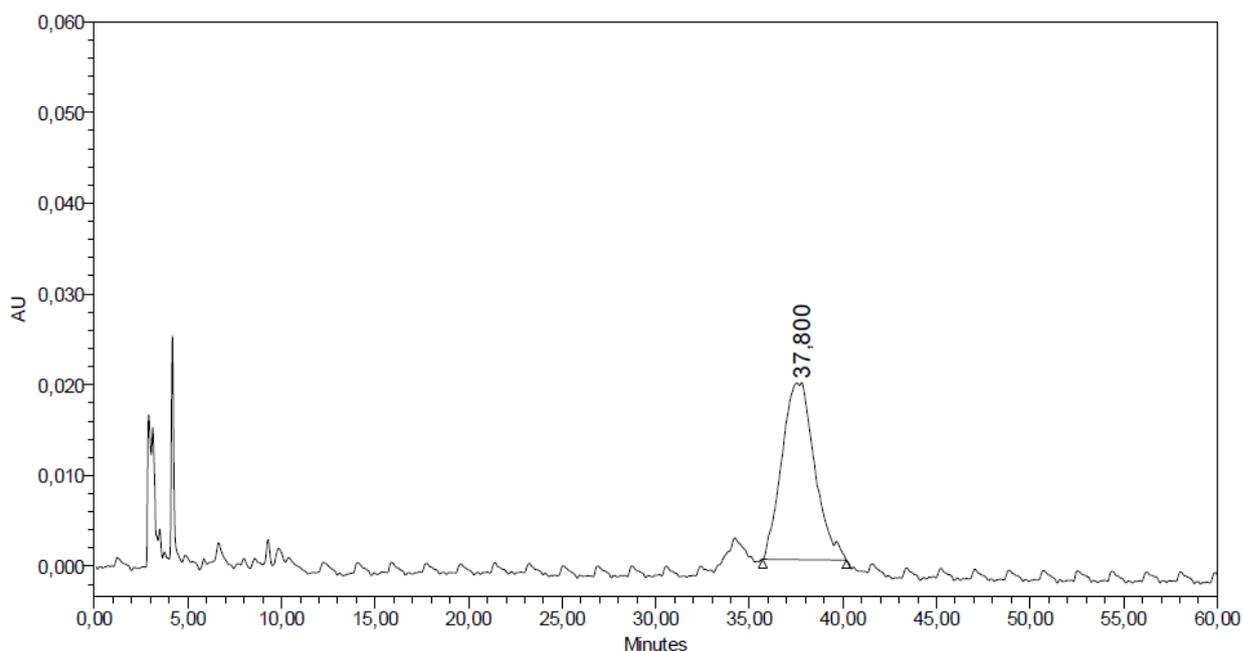
Cromatograma compuesto 8



Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
21,780	112658	6497371	43.97
22,918	106897	8278593	56.03

Para el compuesto 10 se observa solamente un pico en el cromatograma. Sin embargo esto no se debe a la presencia de único enantiómero, sino a una imposibilidad del sistema cromatográfico para separar ambos isómeros. La composición reacémica de su precursor estructural (compuesto 8), sugiere que no sería posible estar en presencia de un enantiómero puro. La ausencia de actividad óptica confirma esta observación, sugiriendo que estamos en presencia de una mezcla racémica. Al igual que con el compuesto 8, se probó modificar la composición de la fase móvil, variando la proporción Hexano: Isopropanol, sin lograr mejores resultados.

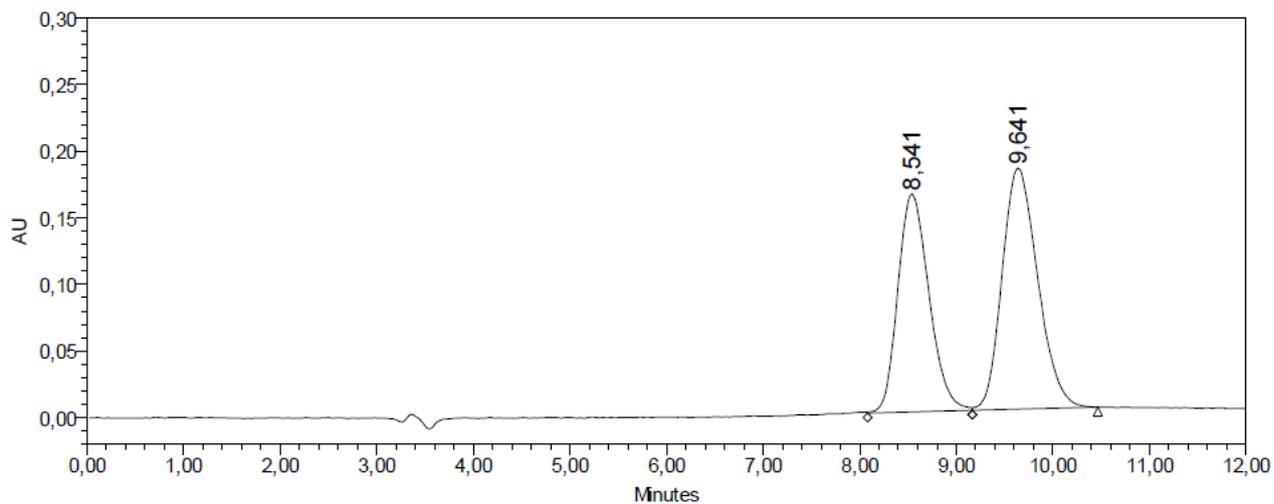
Cromatograma compuesto 10



Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
37,800	112658	2374680	100,00

El compuesto 16, fue sintetizado en el Instituto de Química Fina, IPTP. Presentó una relación enantiomérica 55:45. No presentó actividad óptica.

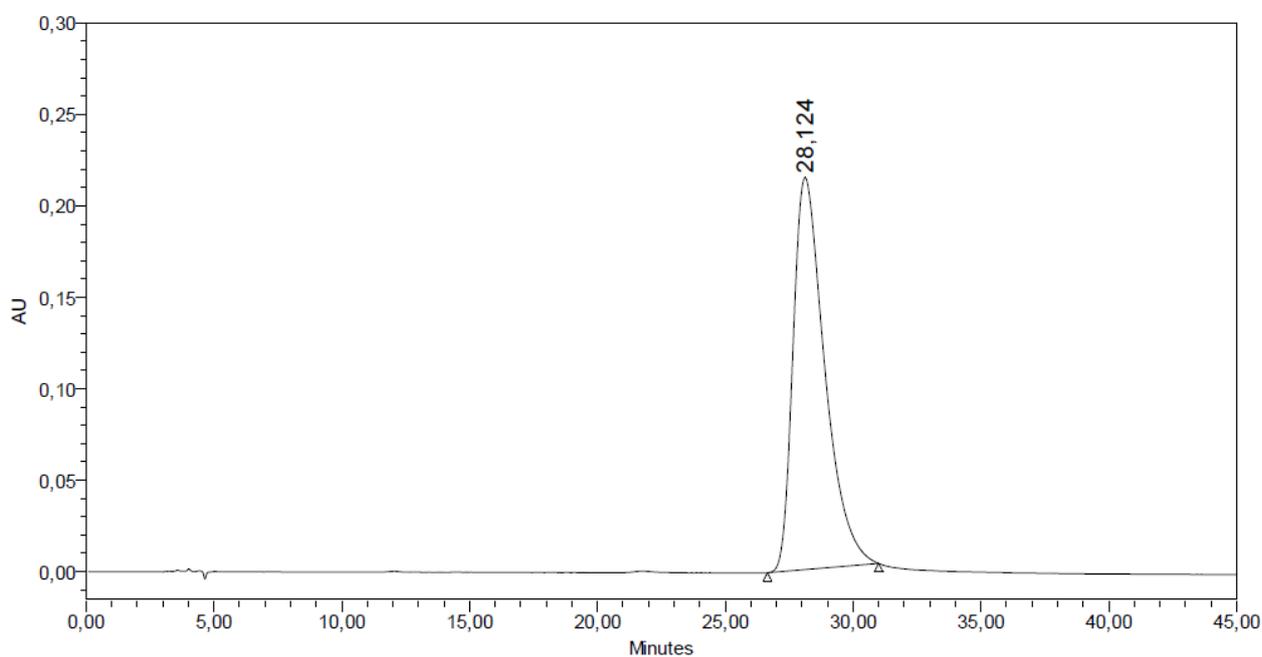
Cromatograma compuesto 16



Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
8,541	163656	3666582	44,14
9,641	181049	4640589	55,86

El compuesto 23, deriva del aminoácido L-alanina, el cual presenta un carbono quiral. La configuración absoluta de este centro quiral parece no sufrir racemización en las sucesivas etapas de síntesis, que dieron lugar al compuesto 23. En el cromatograma se observa solamente un pico, por lo que podríamos estar en presencia de un compuesto enantioméricamente puro. Dicho compuesto presentó actividad óptica, arrojando un valor de $[\alpha]_D^{25} = -10.8^\circ$ (c 0.98, CHCl₃).

Cromatograma compuesto 23

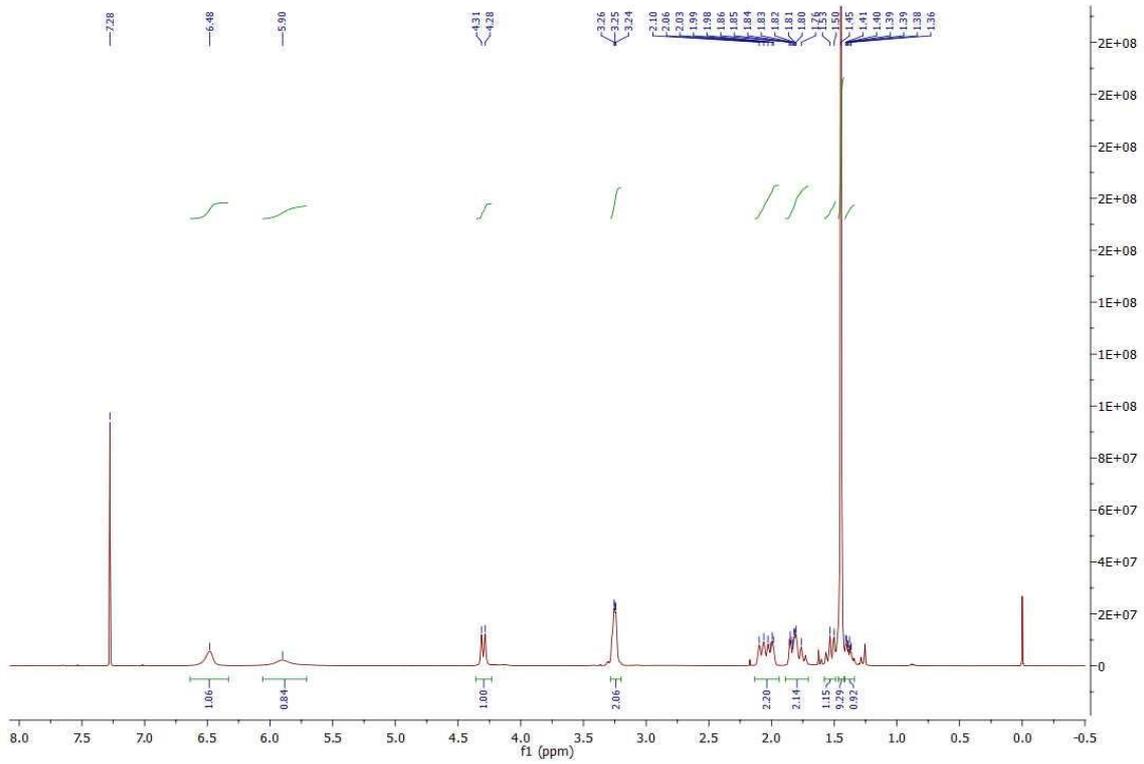


Tiempo de retención	Altura	Área	Área porcentual
28,124	214338	18444296	100,00

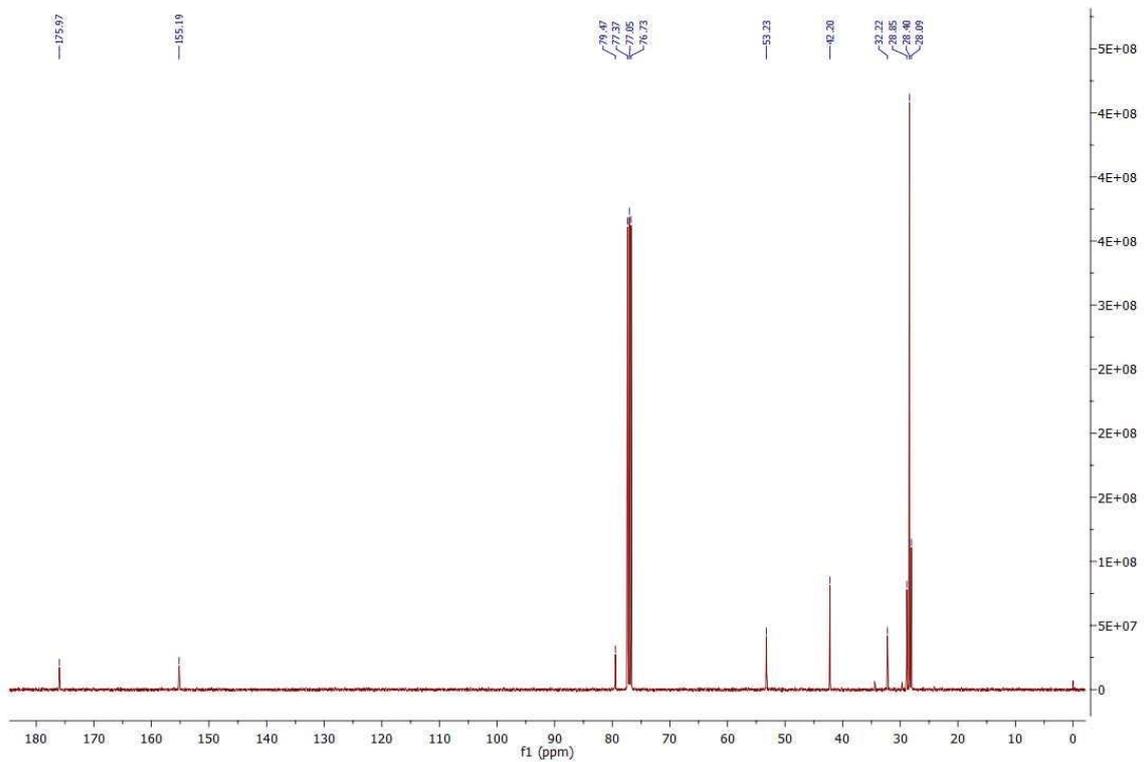
ANEXO 2

Espectros de resonancia magnética nuclear

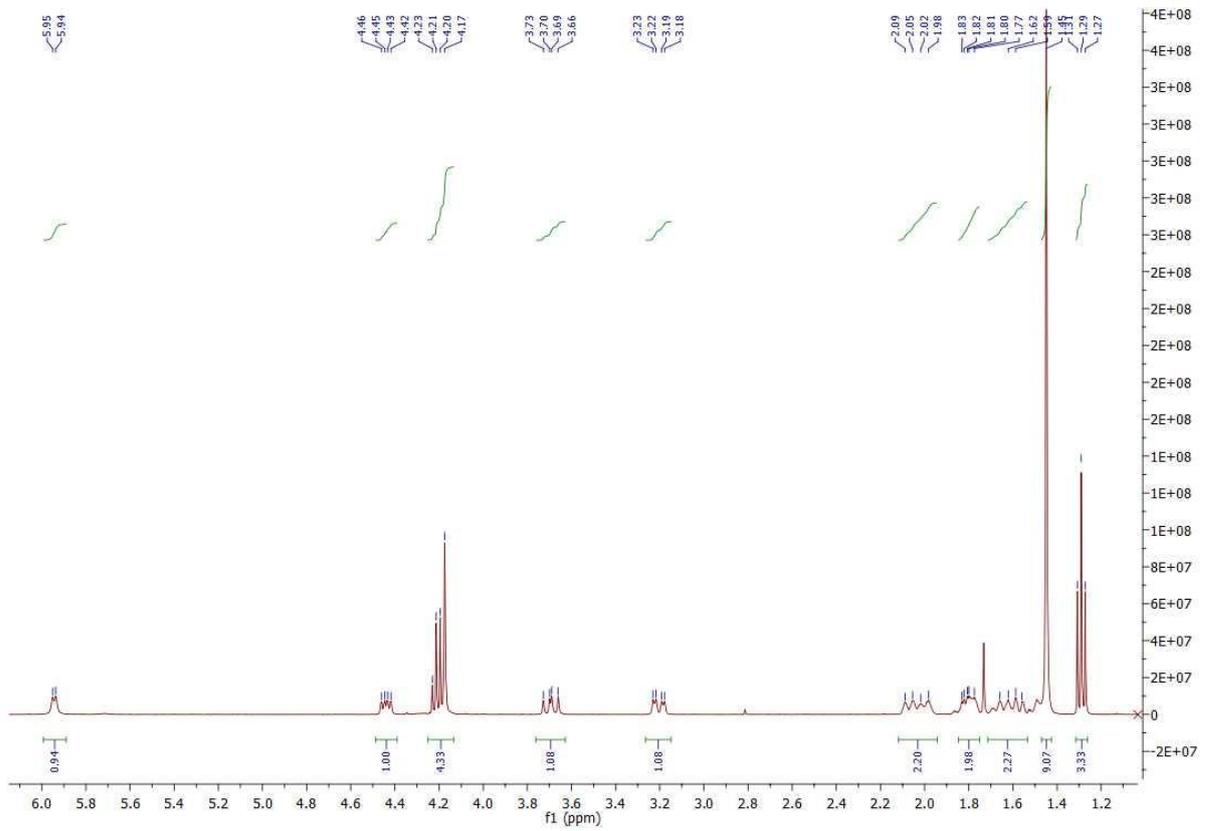
3- H^1 $CDCl_3$



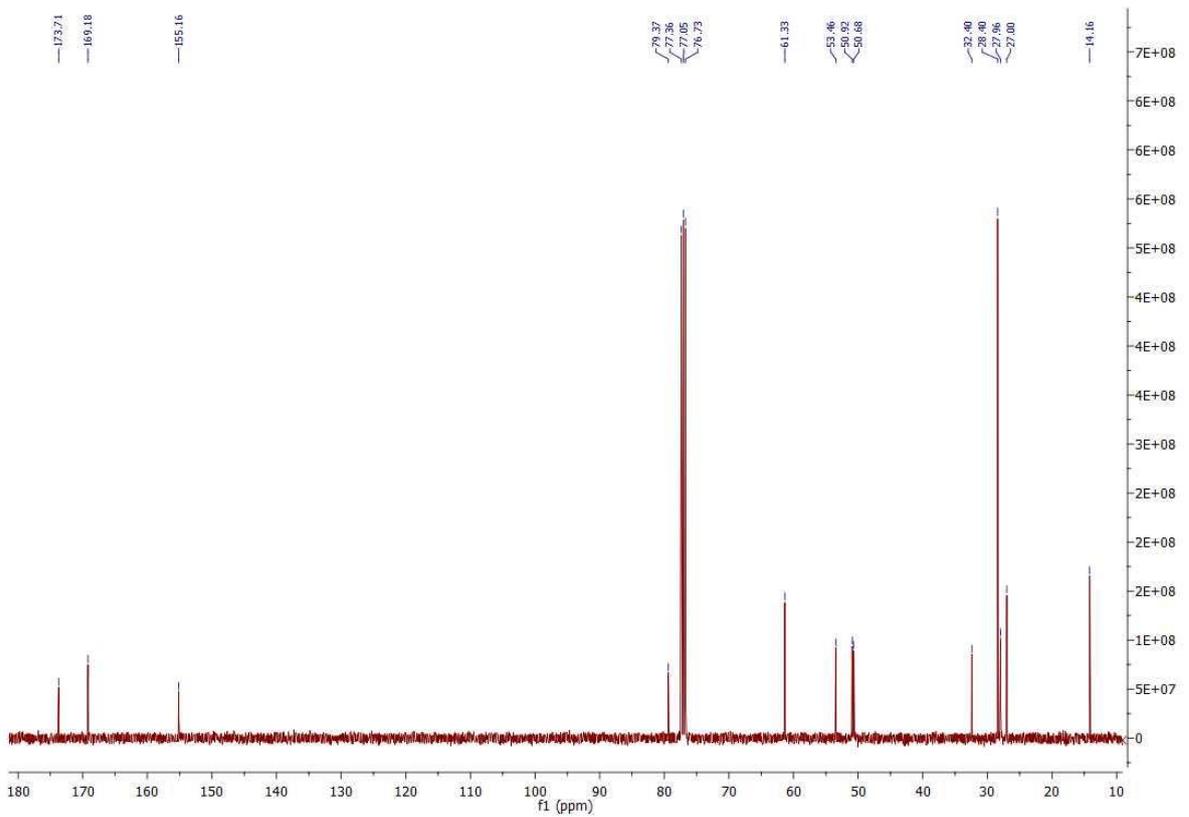
3- C^{13} $CDCl_3$



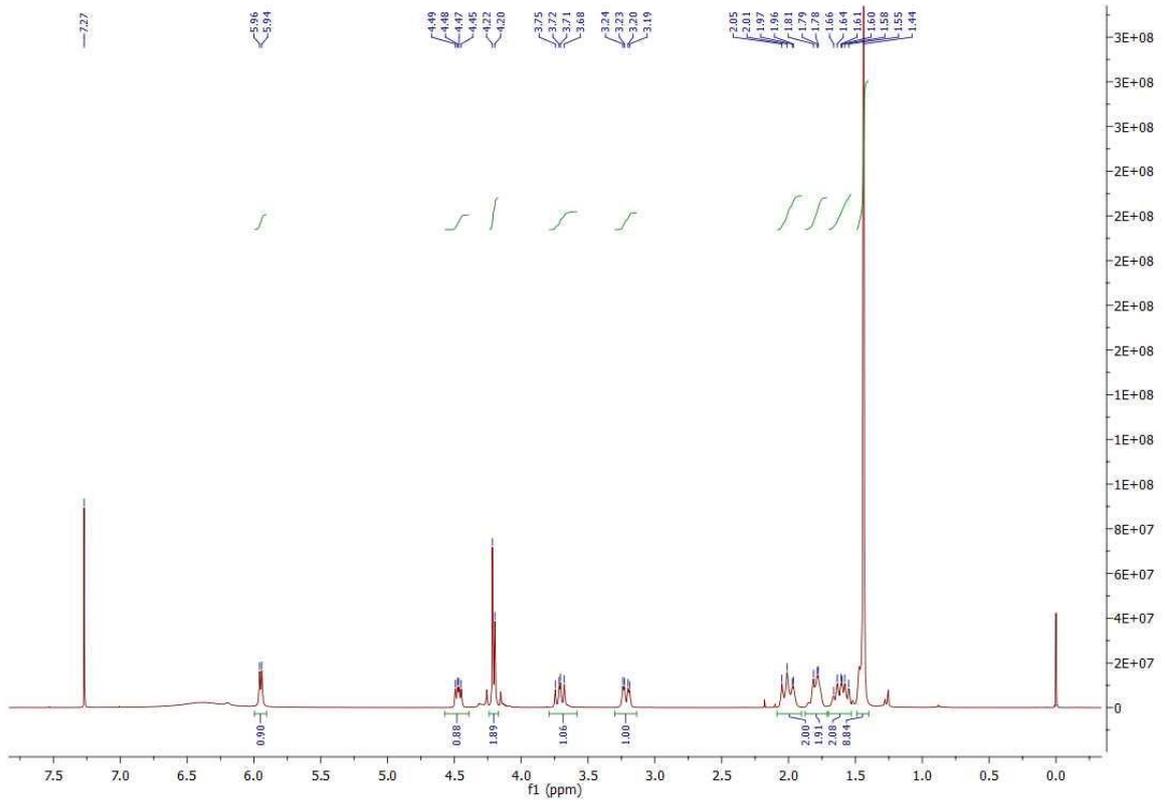
4- H^1 $CDCl_3$



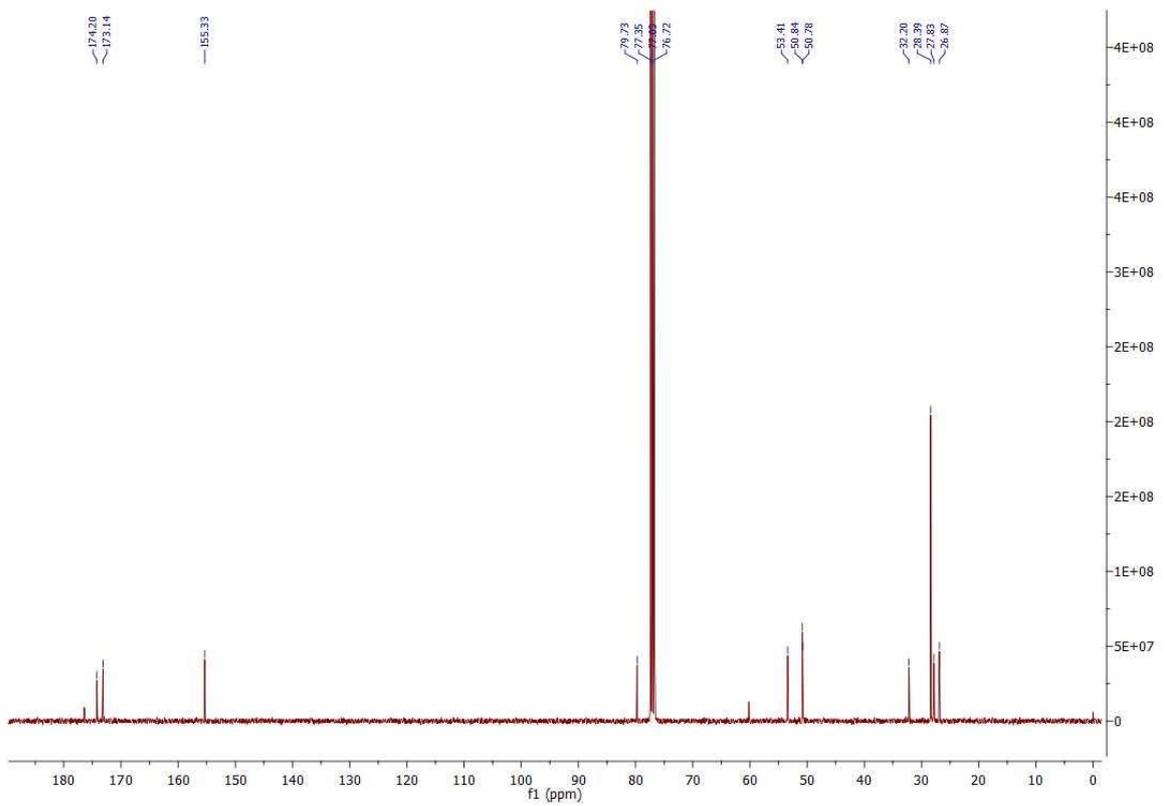
4- C^{13} $CDCl_3$



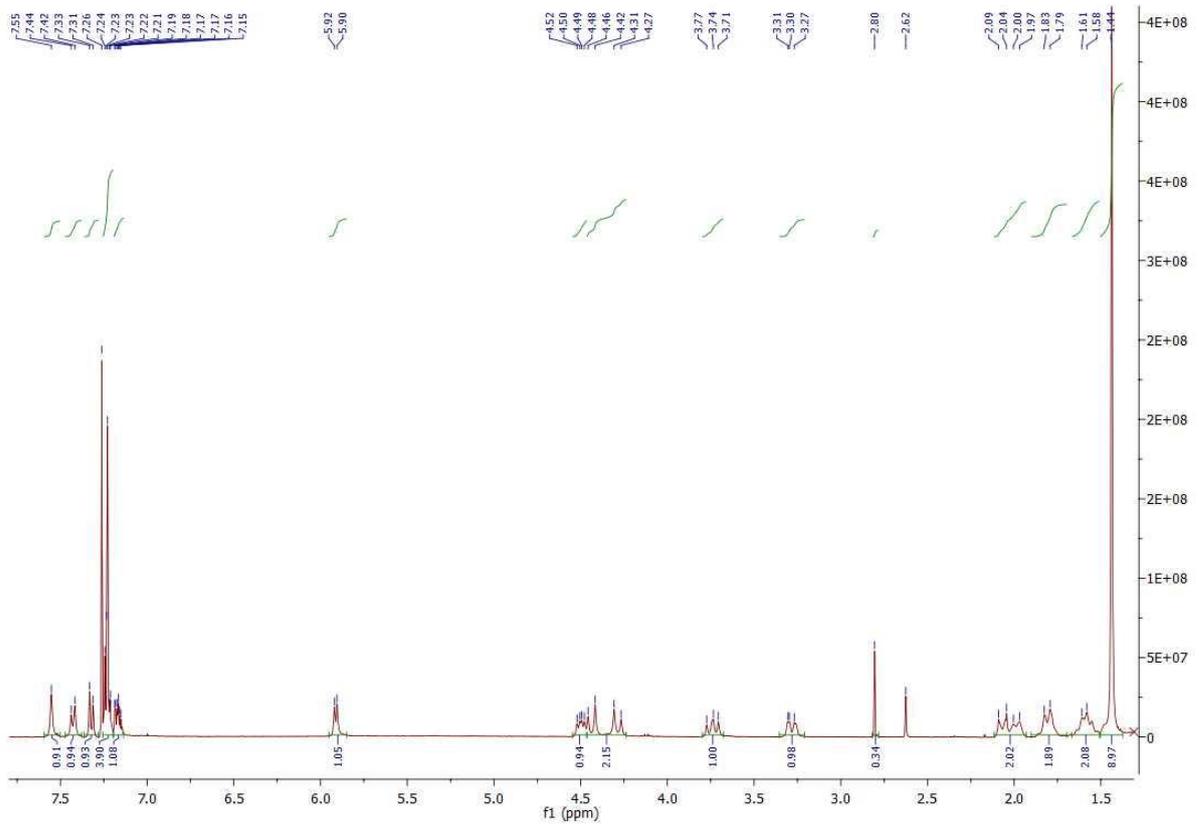
5- H^1 $CDCl_3$



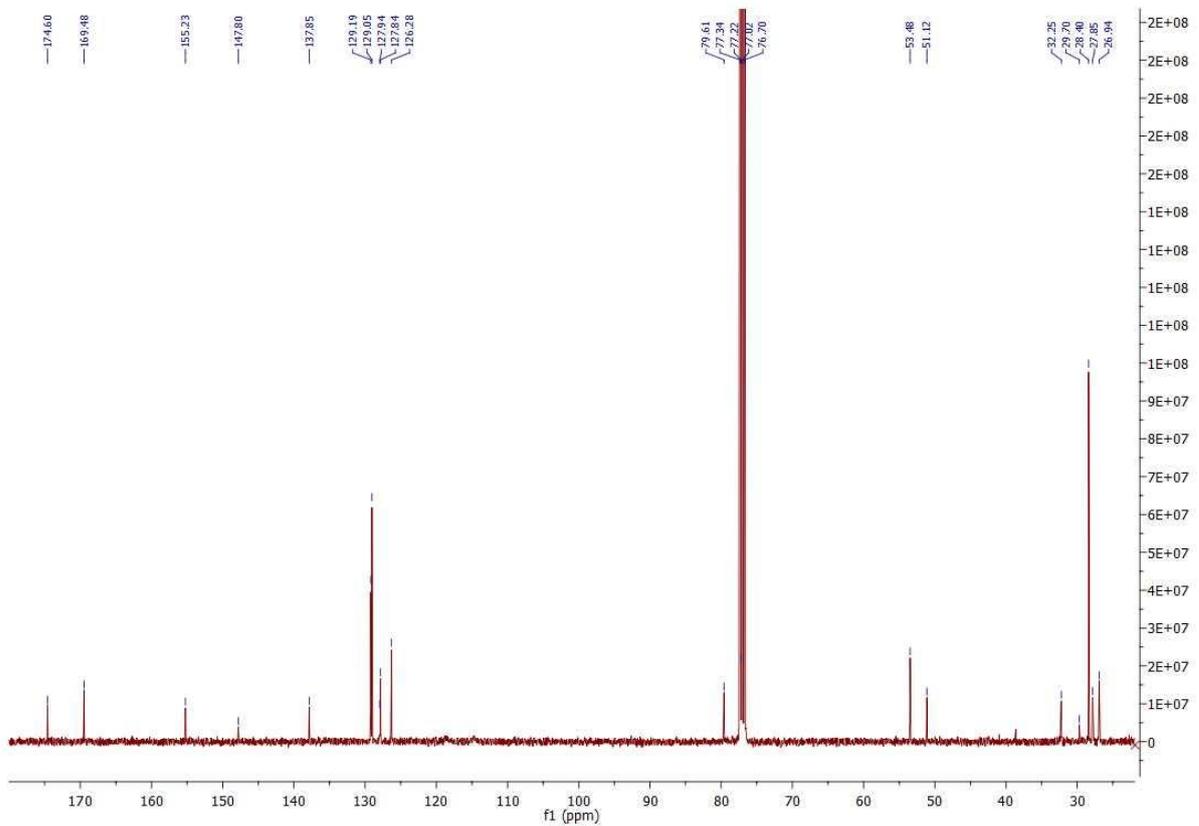
5- C^{13} $CDCl_3$



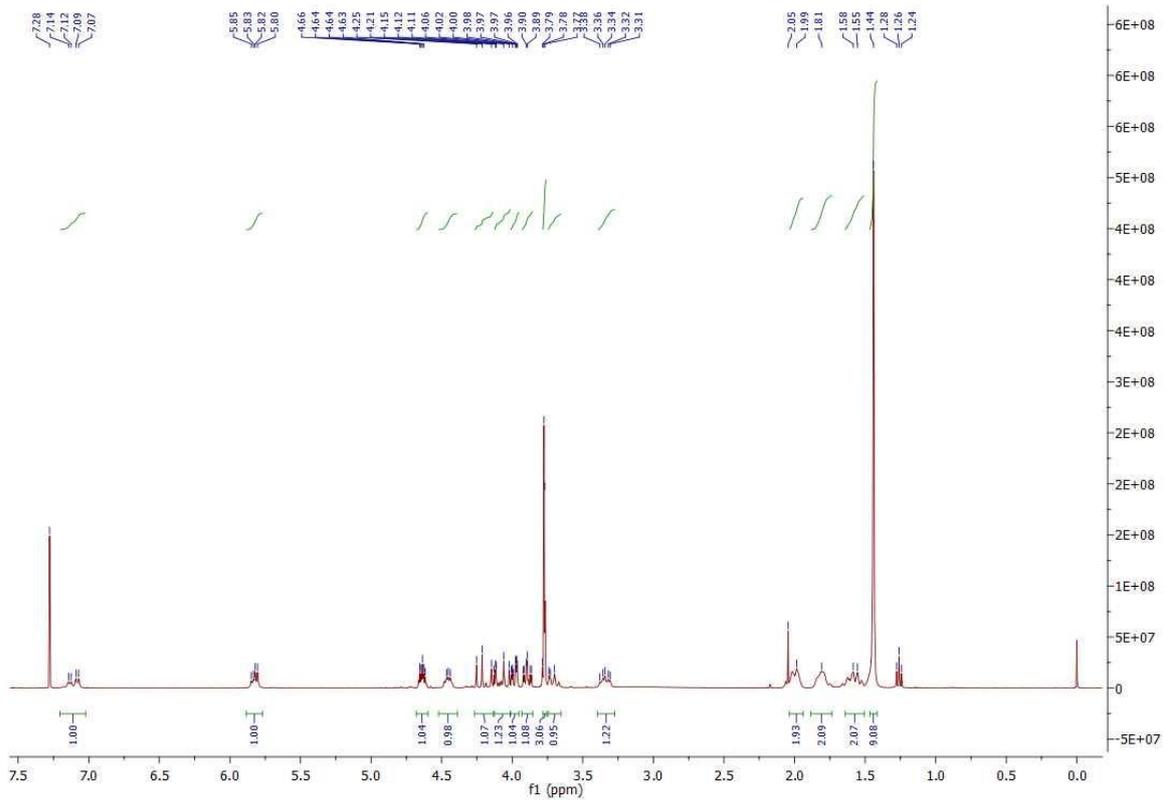
6- H^1 $CDCl_3$



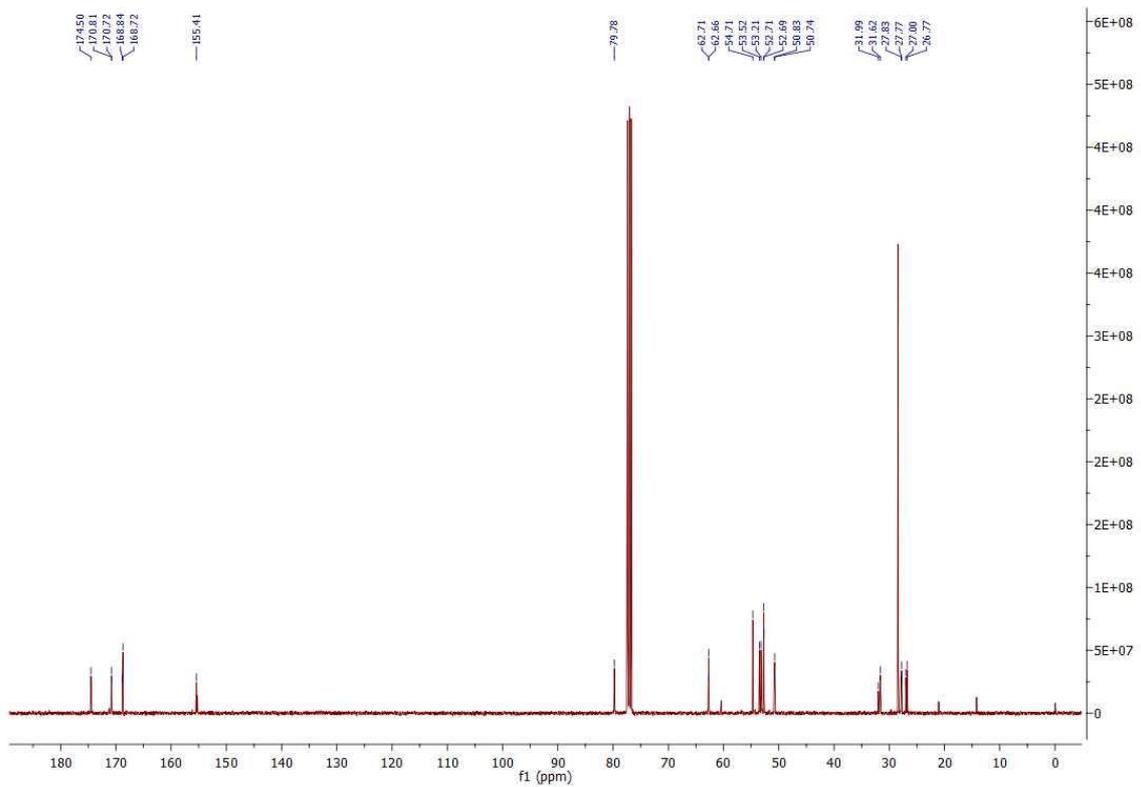
6- C^{13} $CDCl_3$



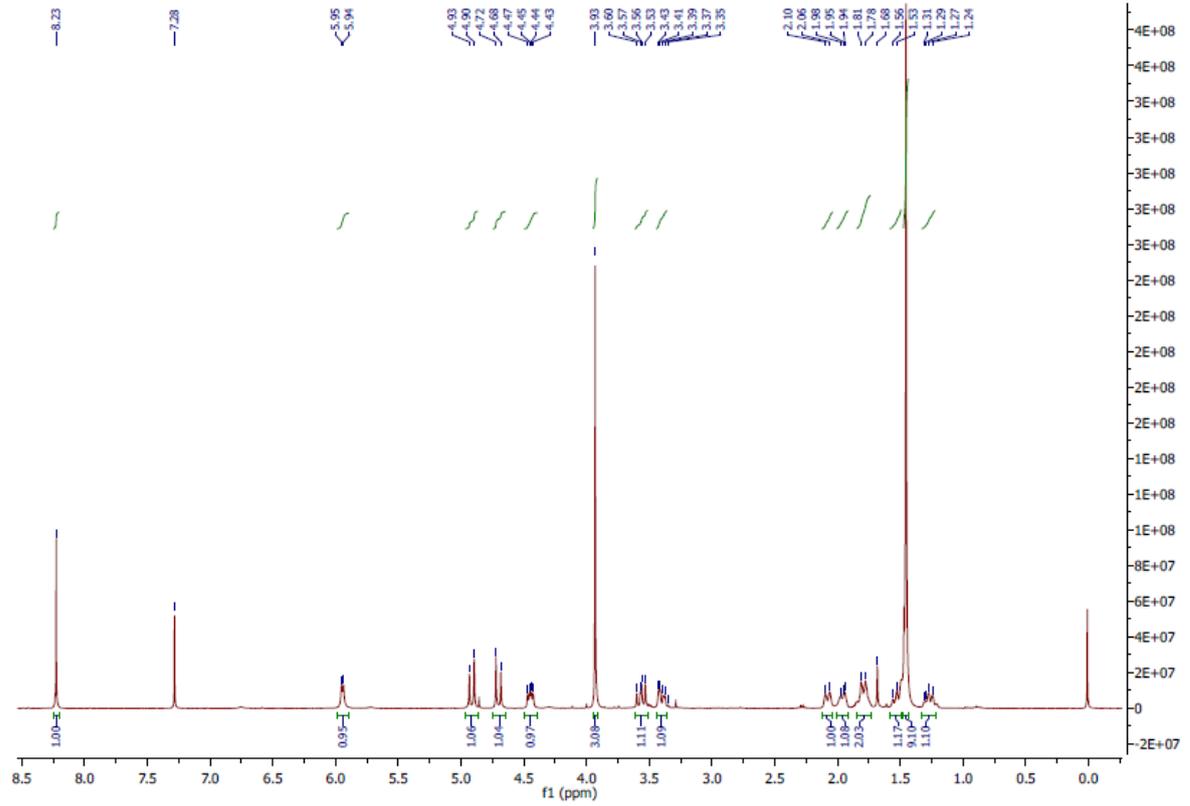
7- ^1H CDCl_3



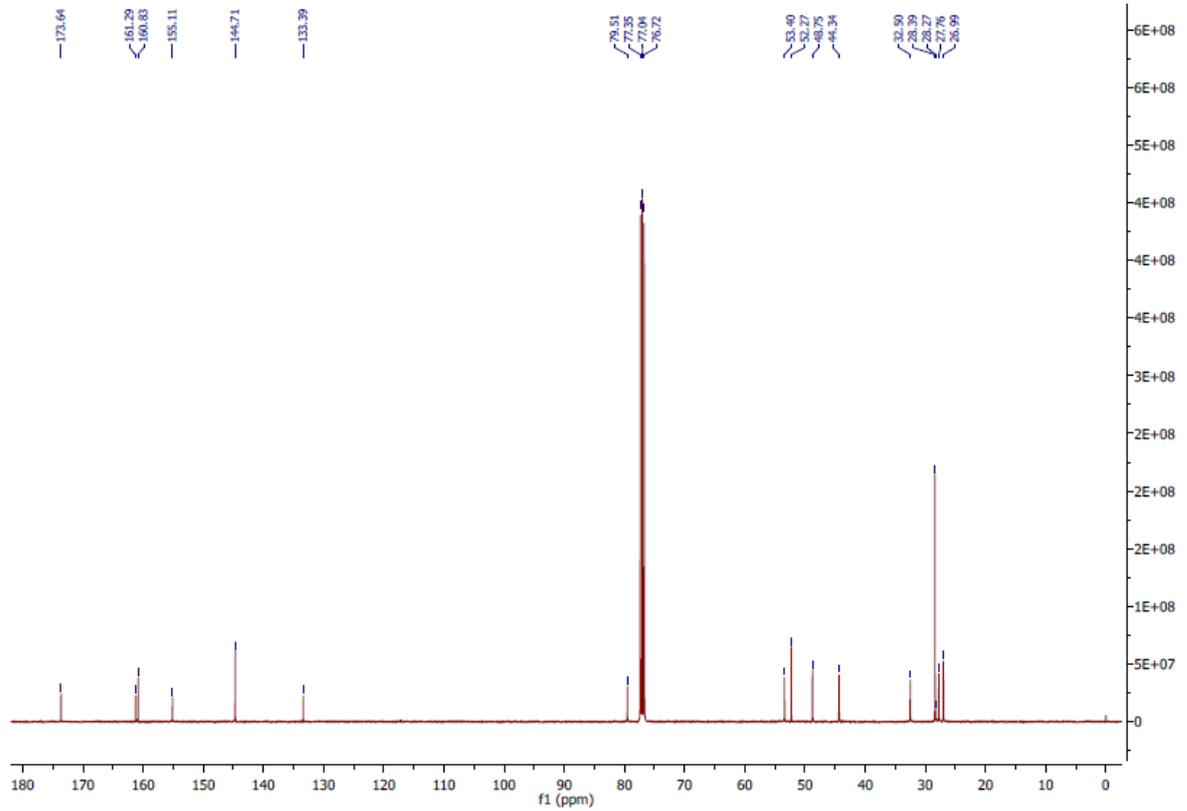
7- ^{13}C CDCl_3



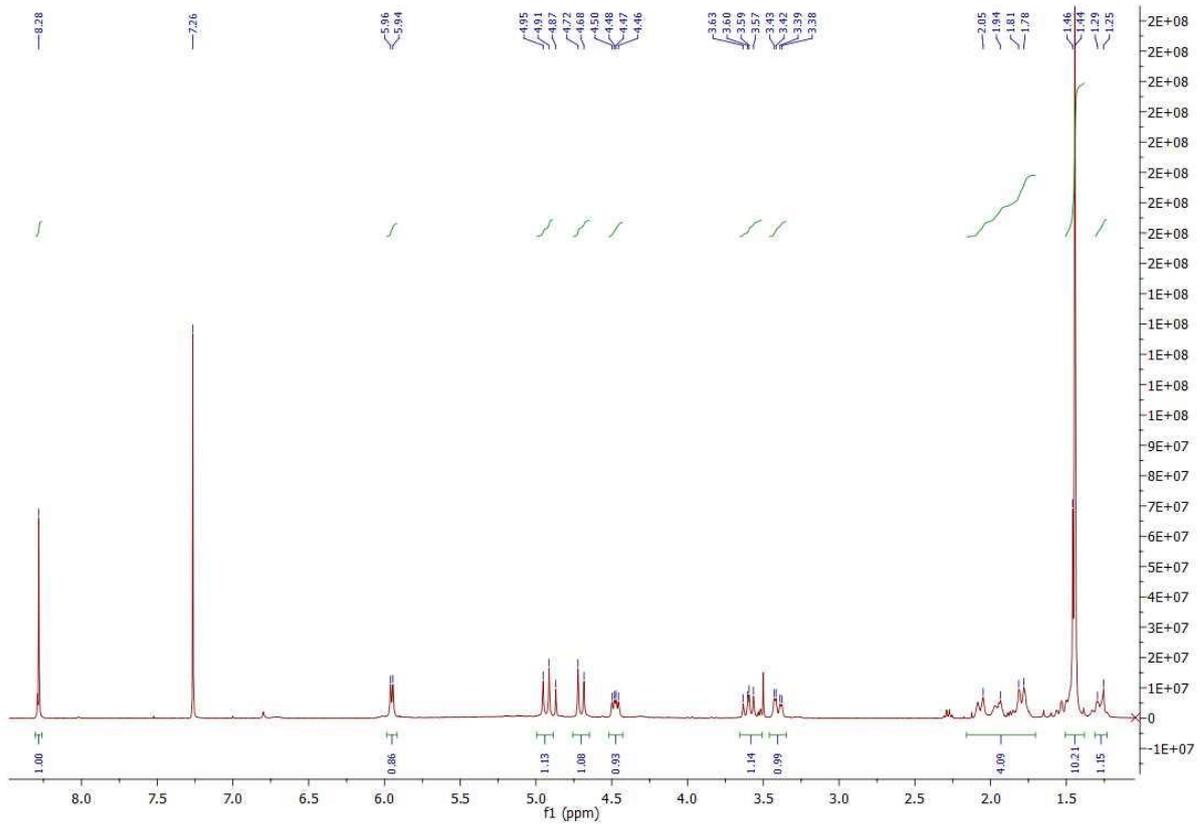
8- H¹ CDCl₃



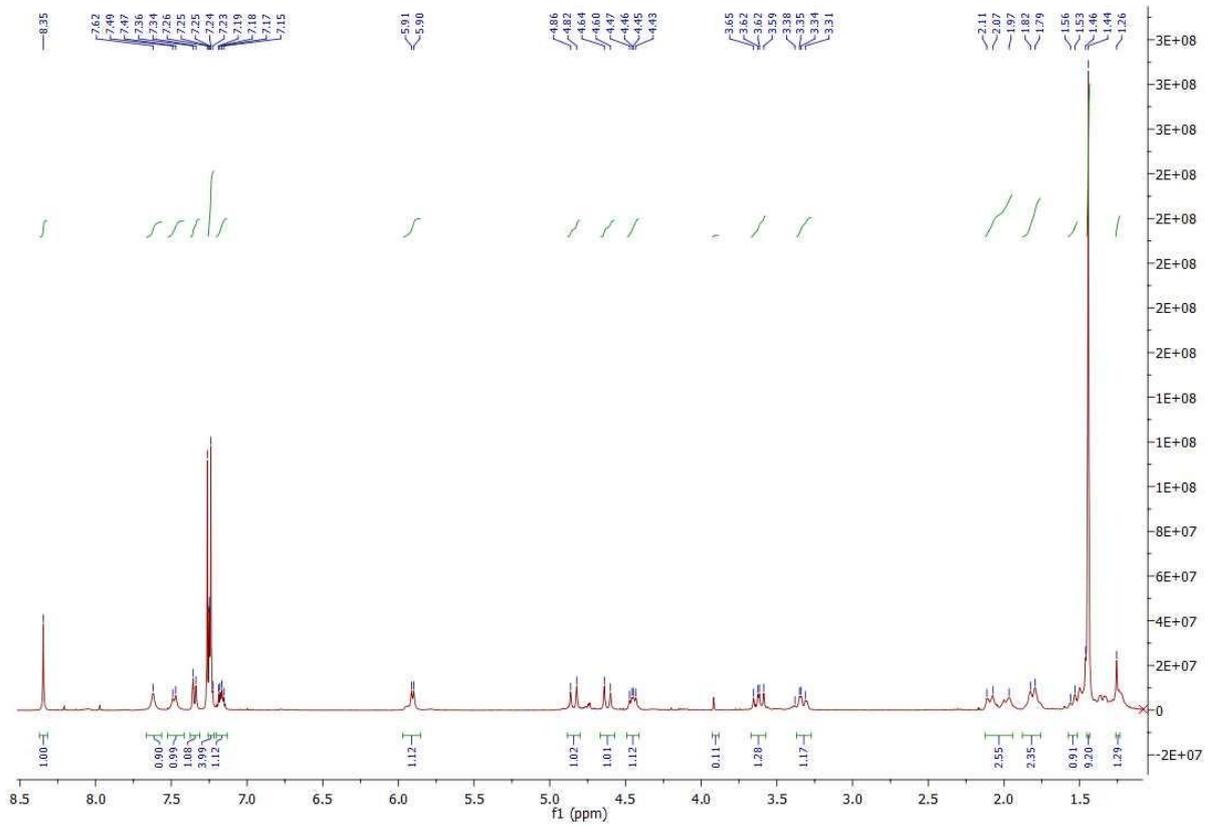
8- C¹³ CDCl₃



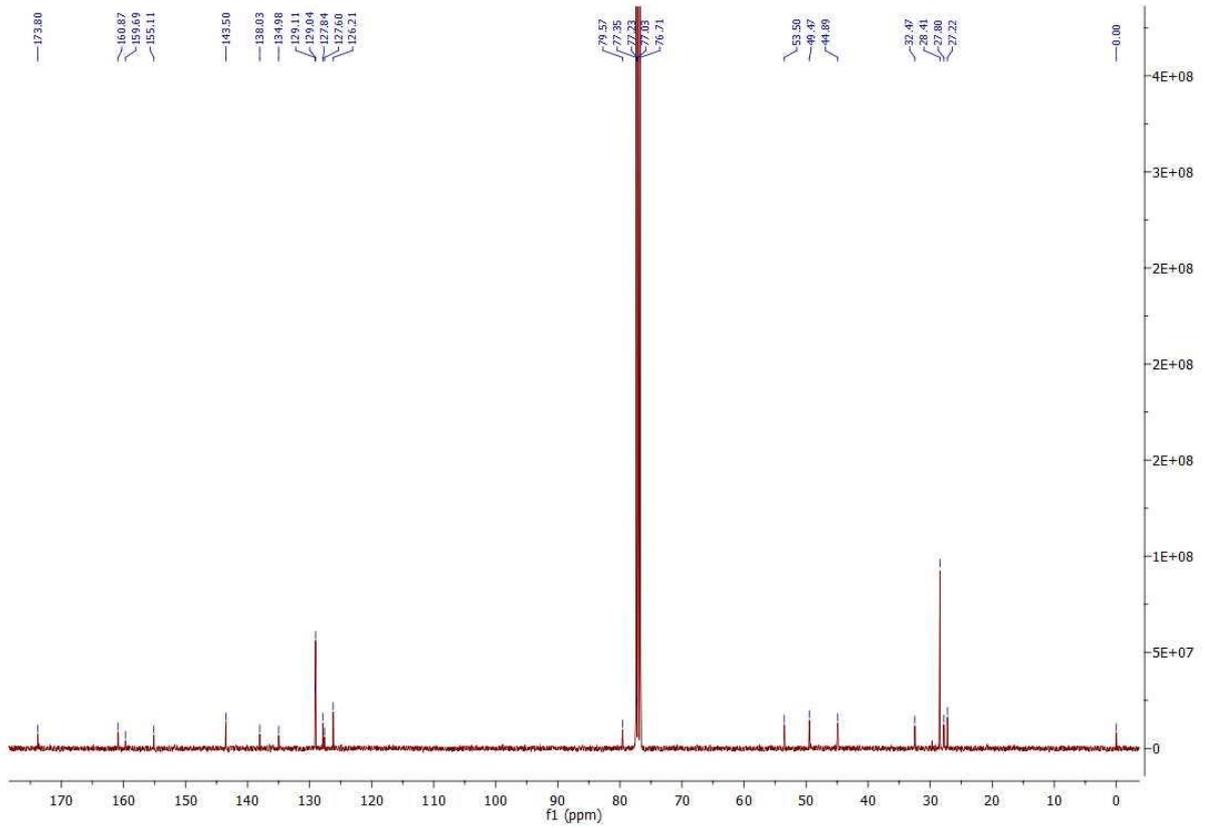
9- H¹ CDCl₃



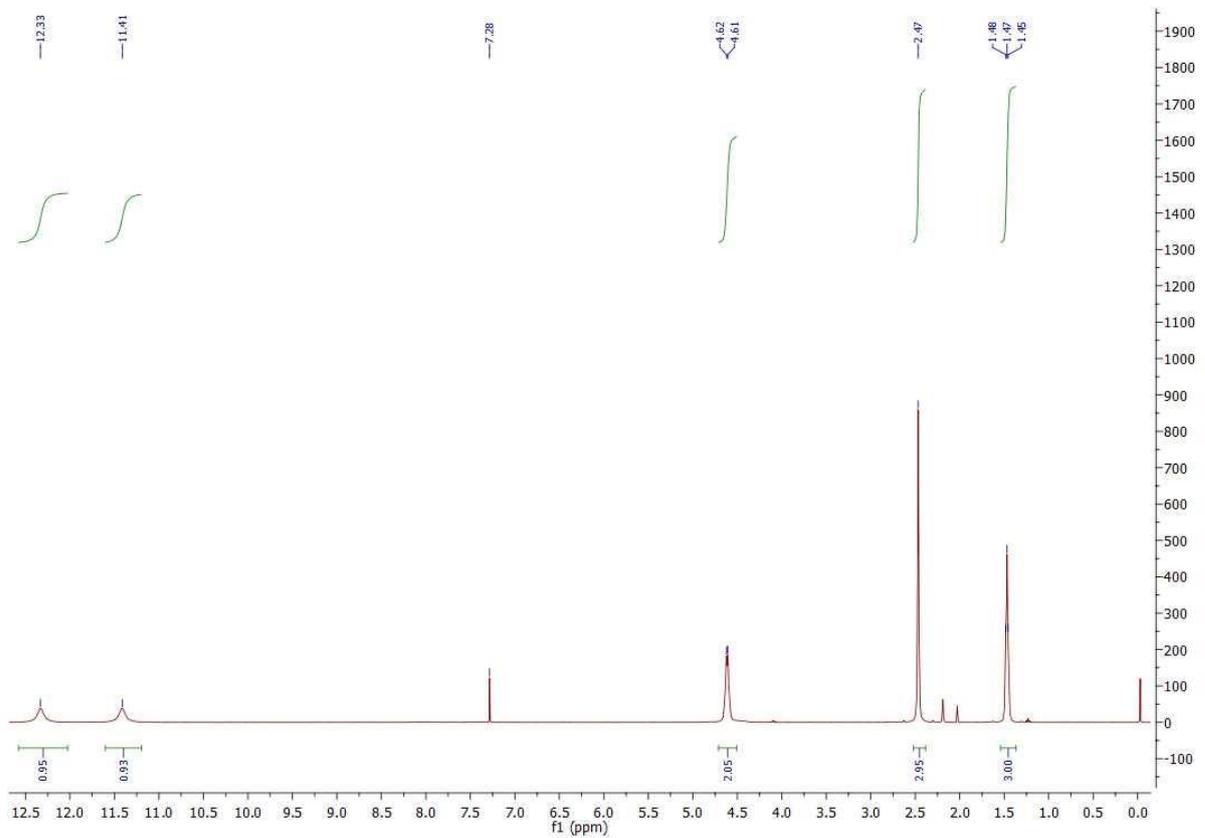
10- H¹ DMSO-d₆



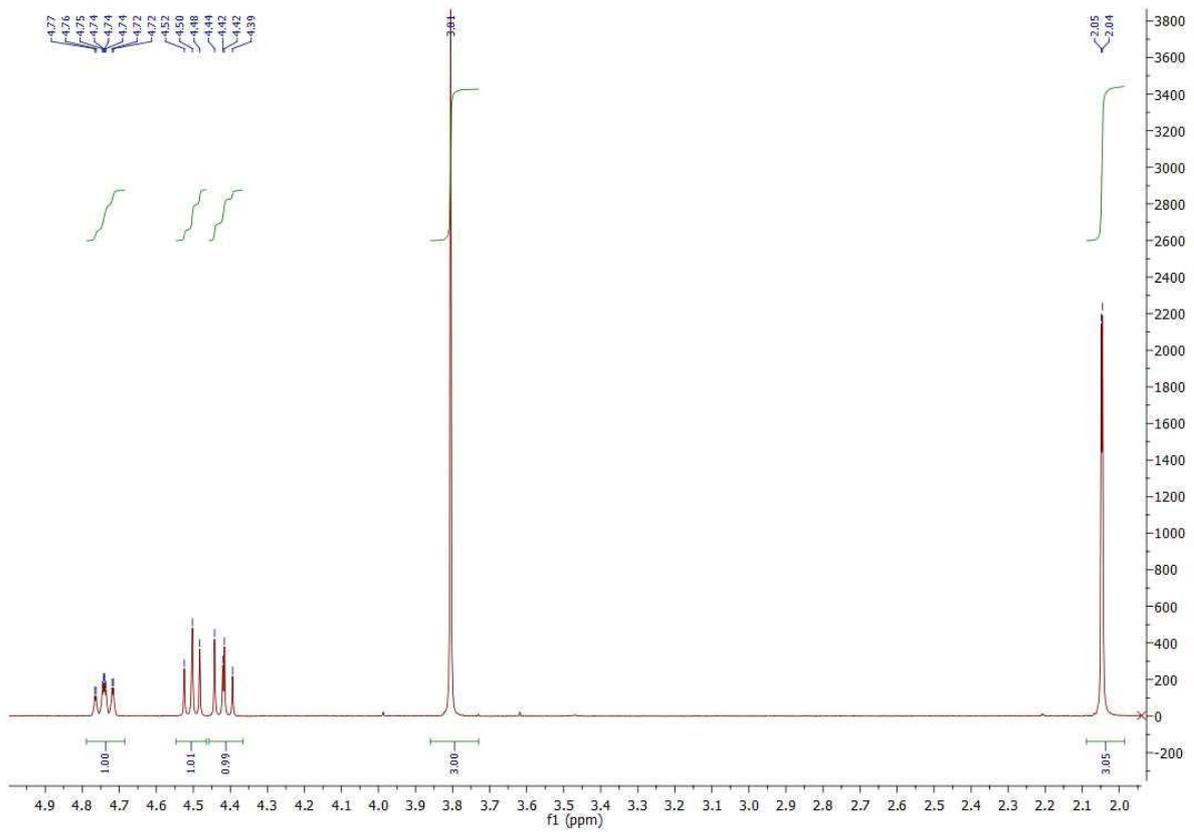
10- C^{13} DMSO-d6



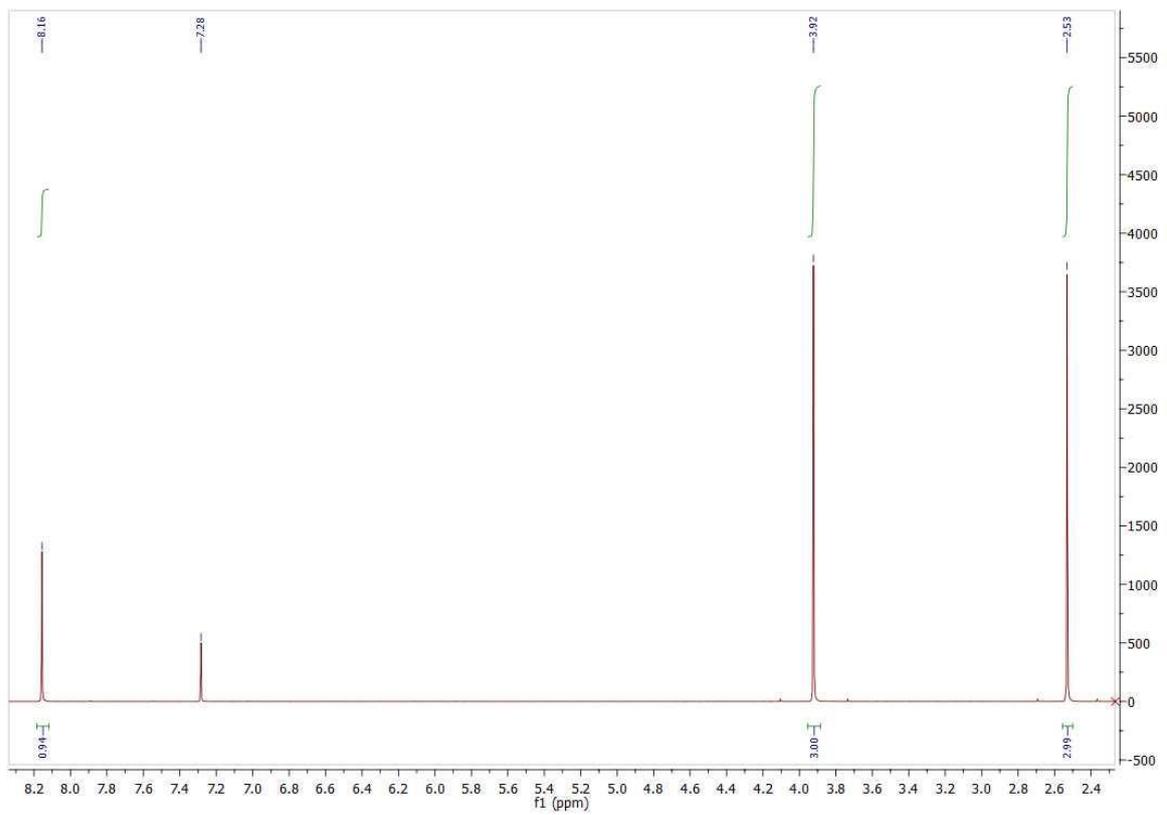
11- H^1 $CDCl_3$



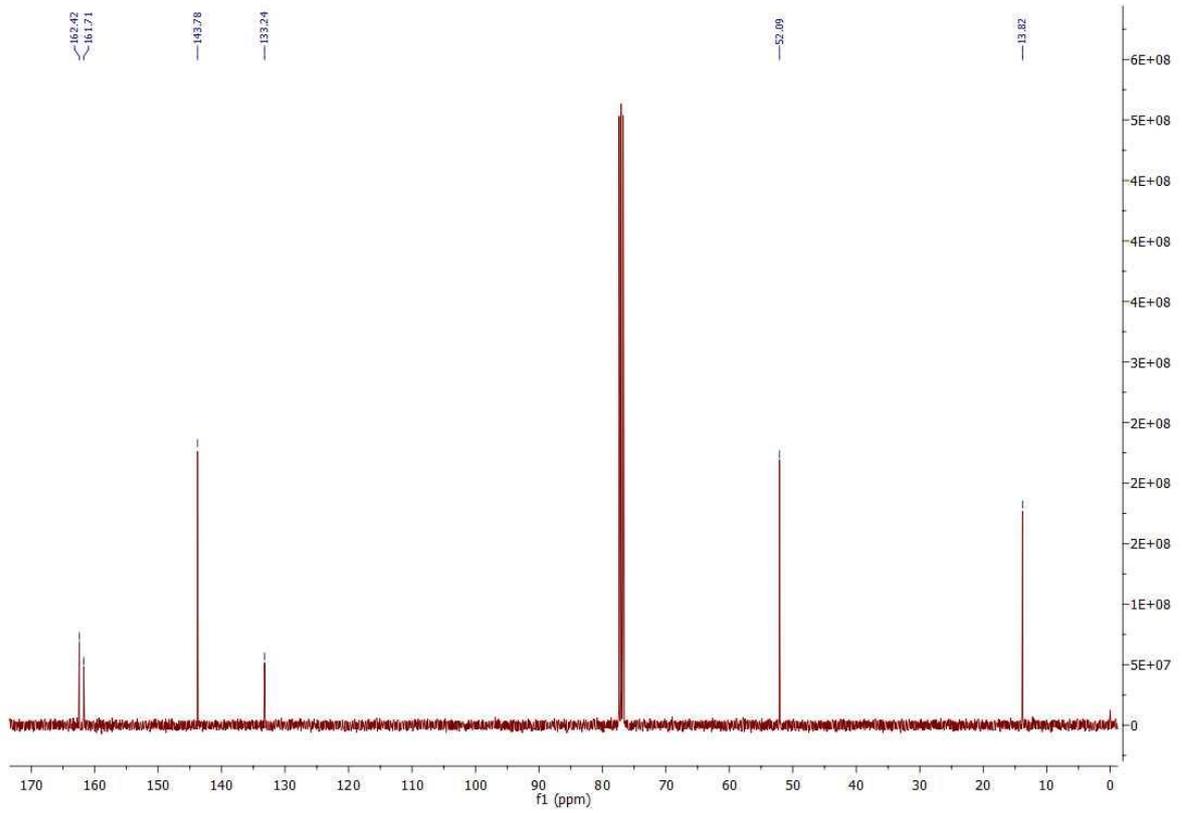
12- H^1 $CDCl_3$



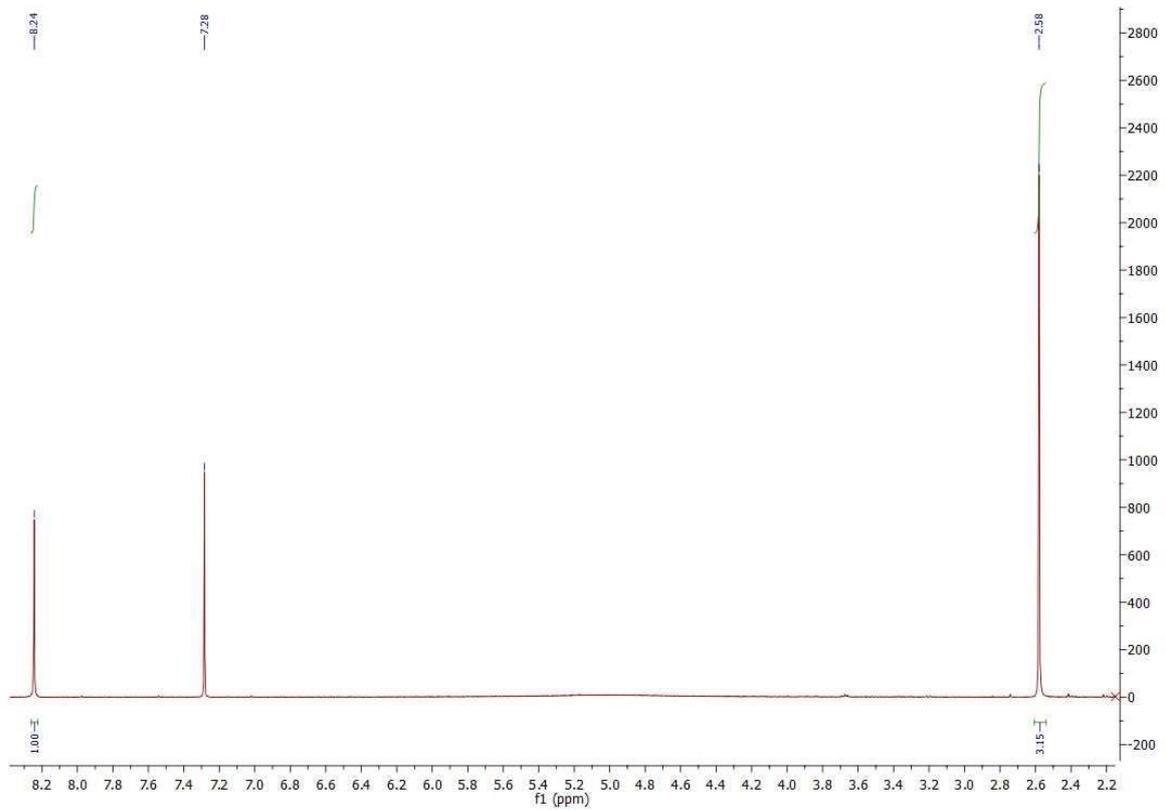
13- H^1 $CDCl_3$



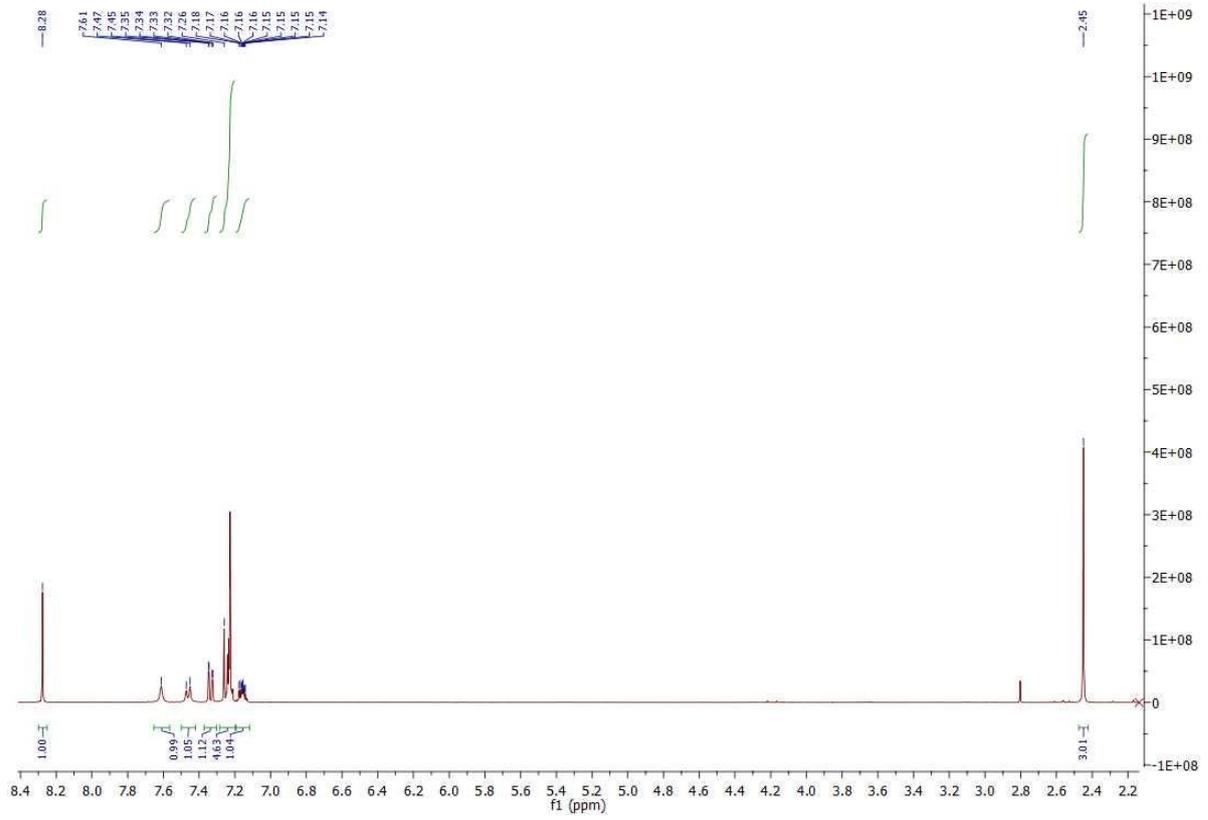
13- C^{13} $CDCl_3$



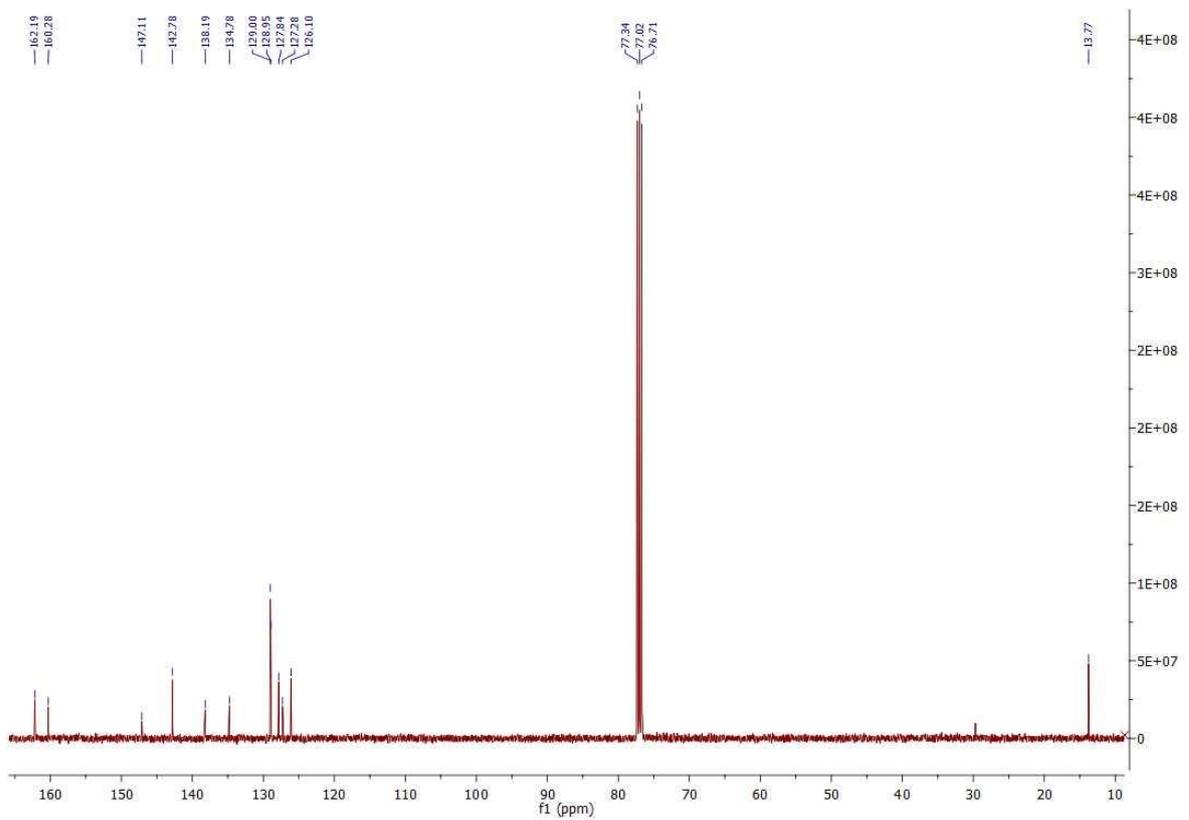
14- H^1 $CDCl_3$



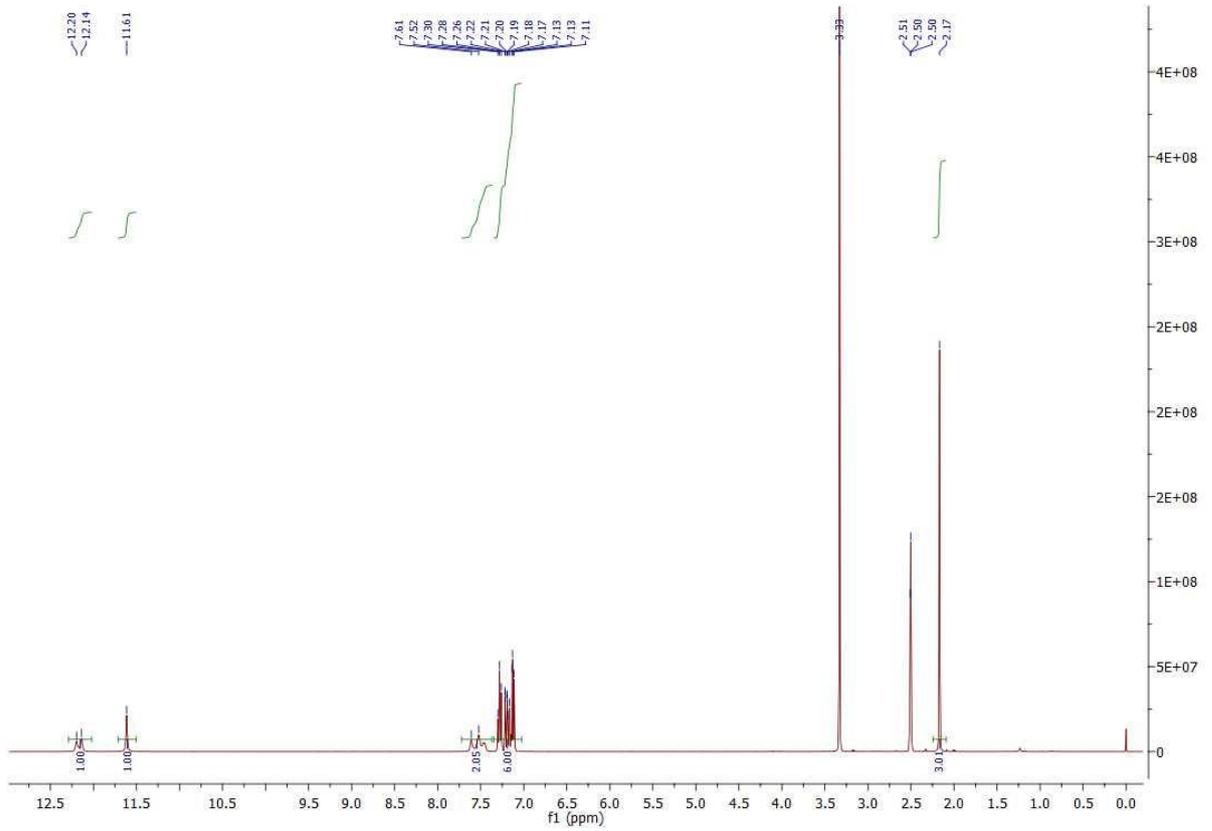
15- H^1 $CDCl_3$



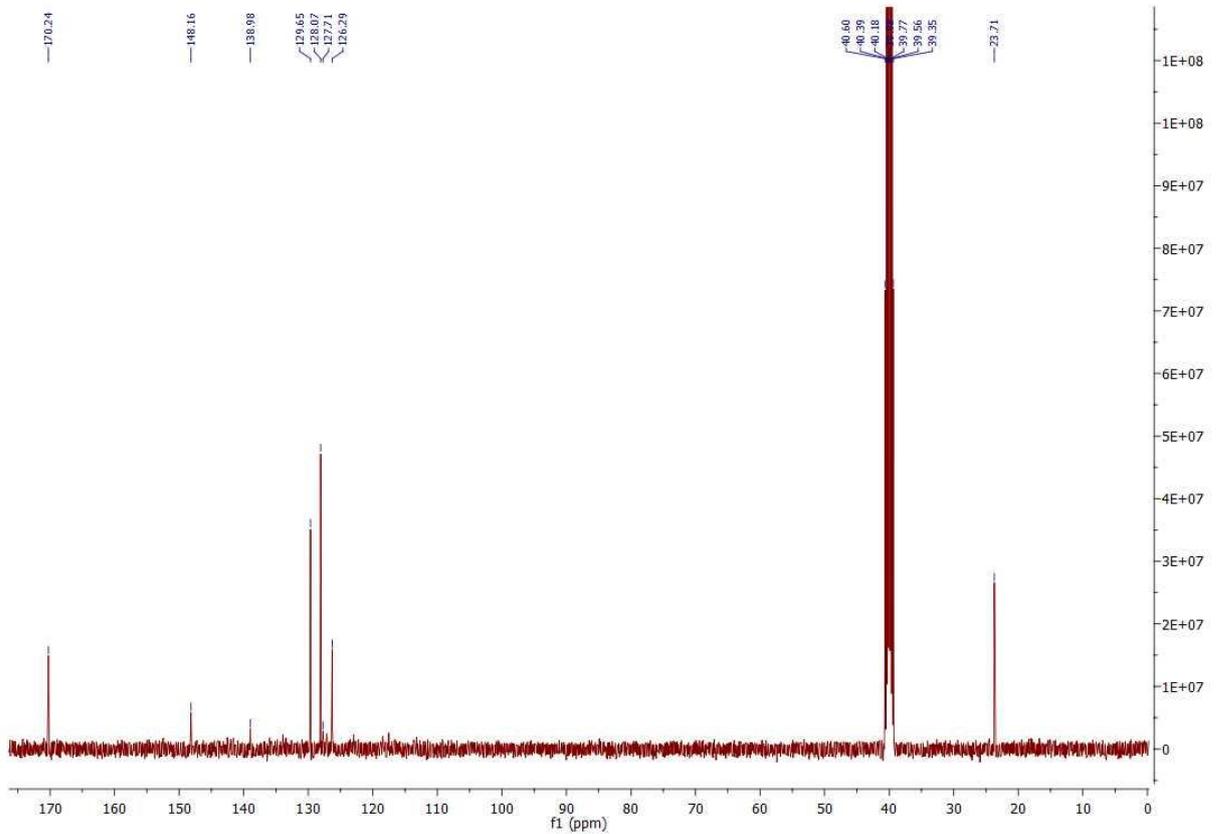
15- C^{13} $CDCl_3$



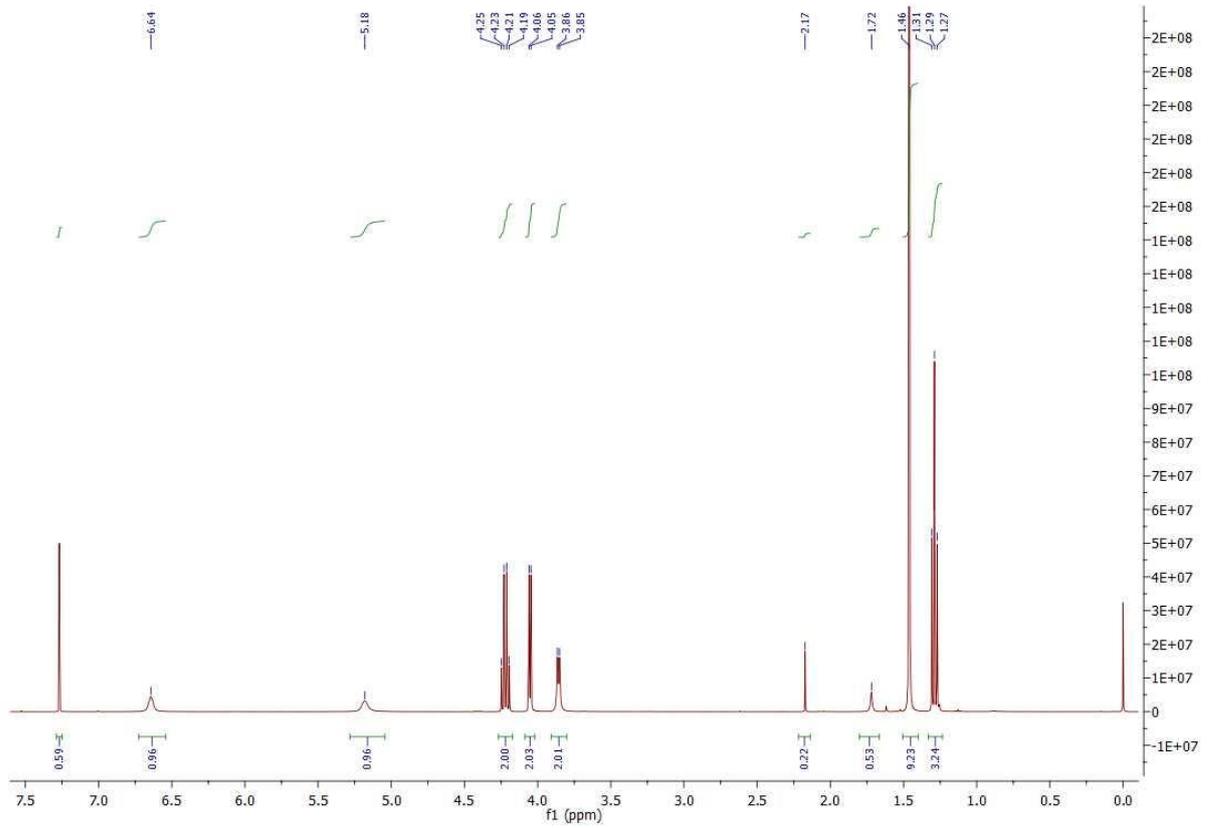
17- ^1H DMSO-d6



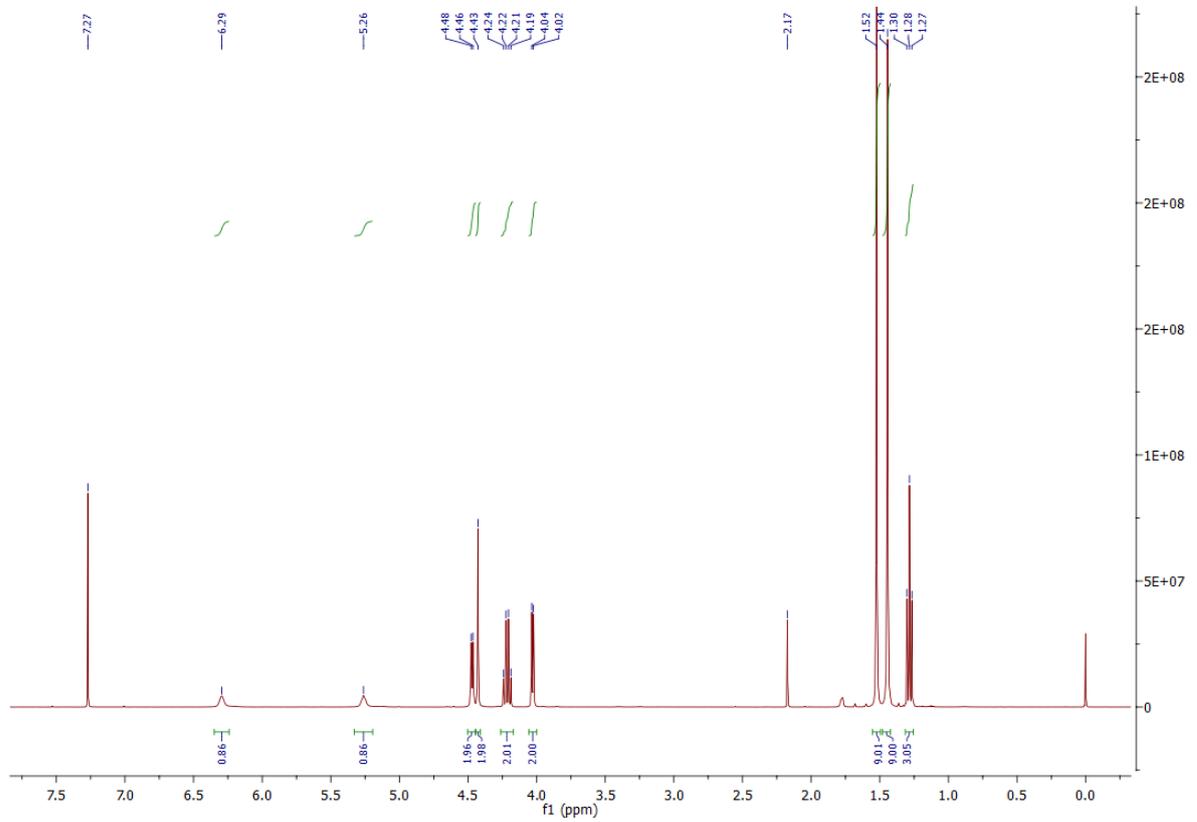
17- ^{13}C DMSO-d6



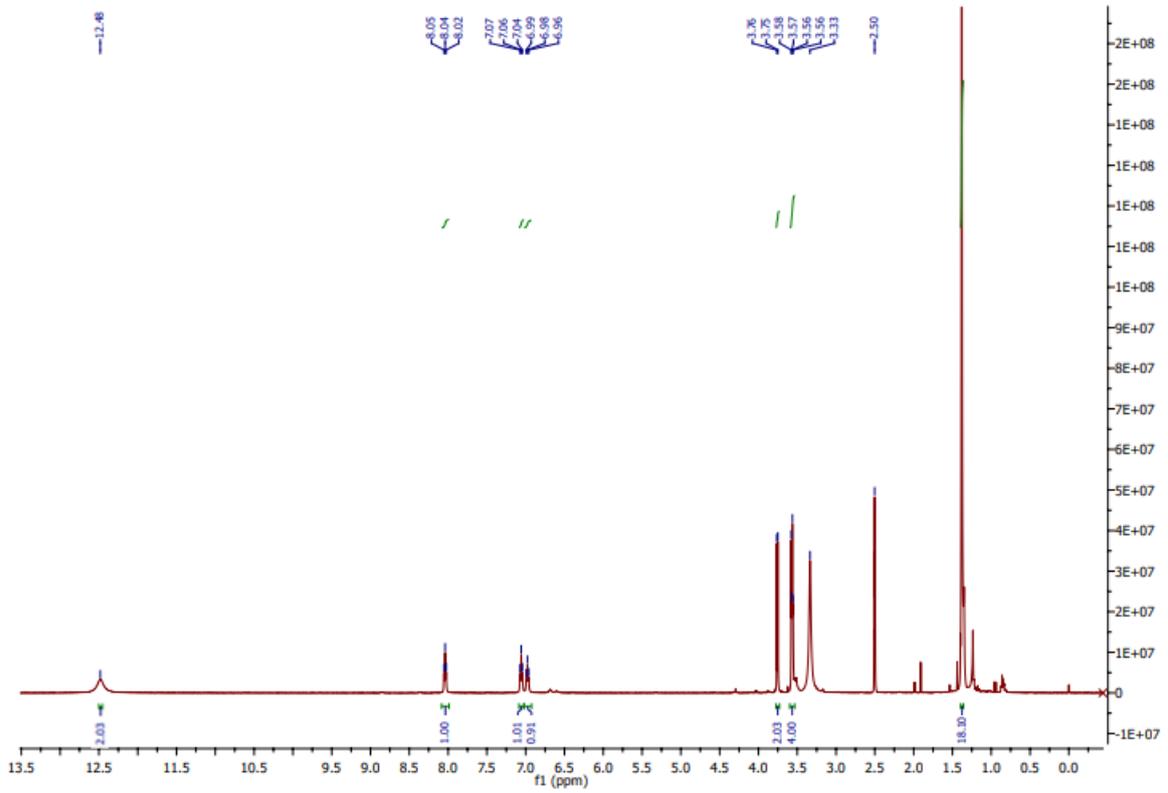
18- H^1 $CDCl_3$



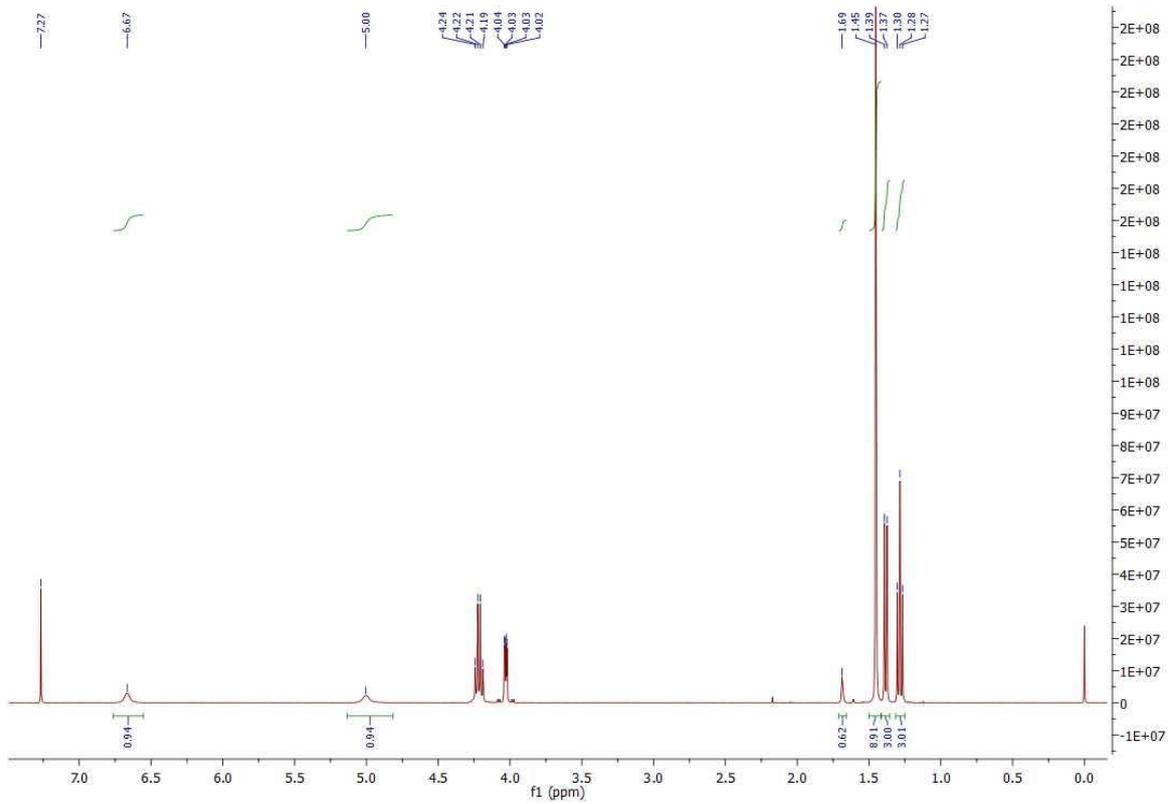
18i- H^1 $CDCl_3$



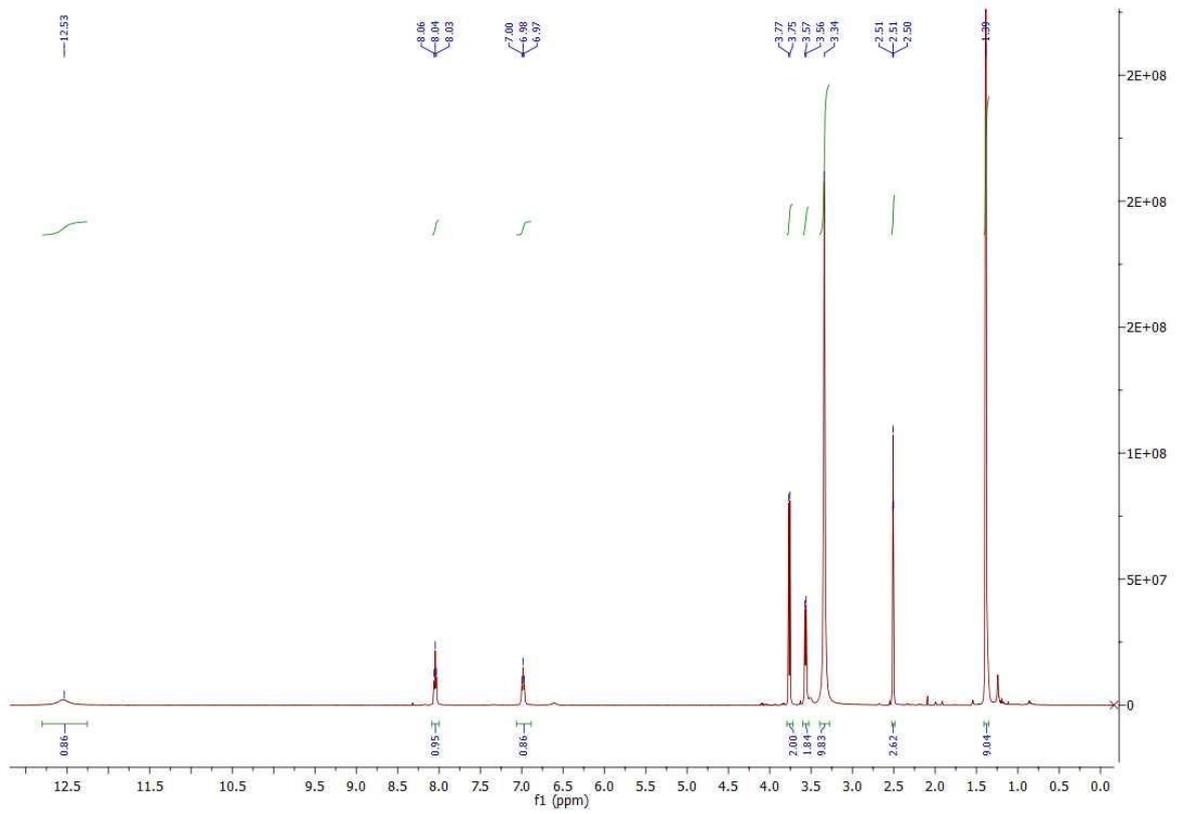
Hidrólisis **18i**



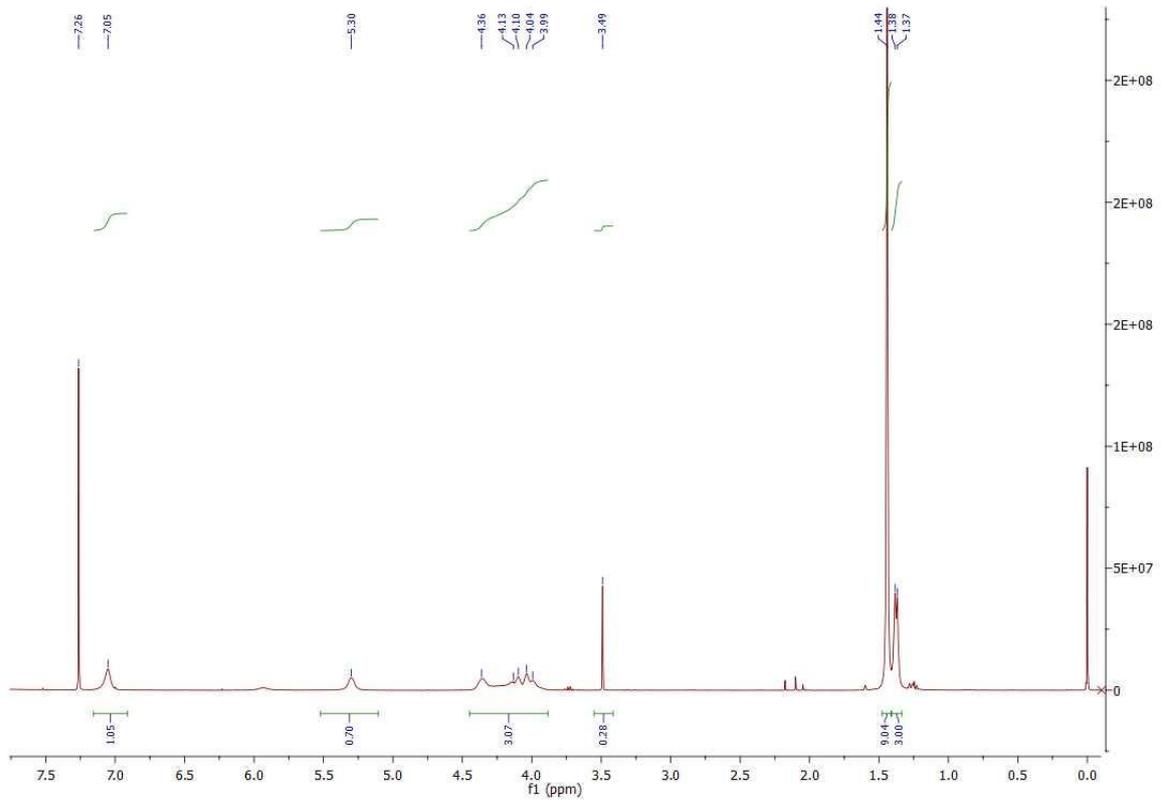
19- H^1 $CDCl_3$



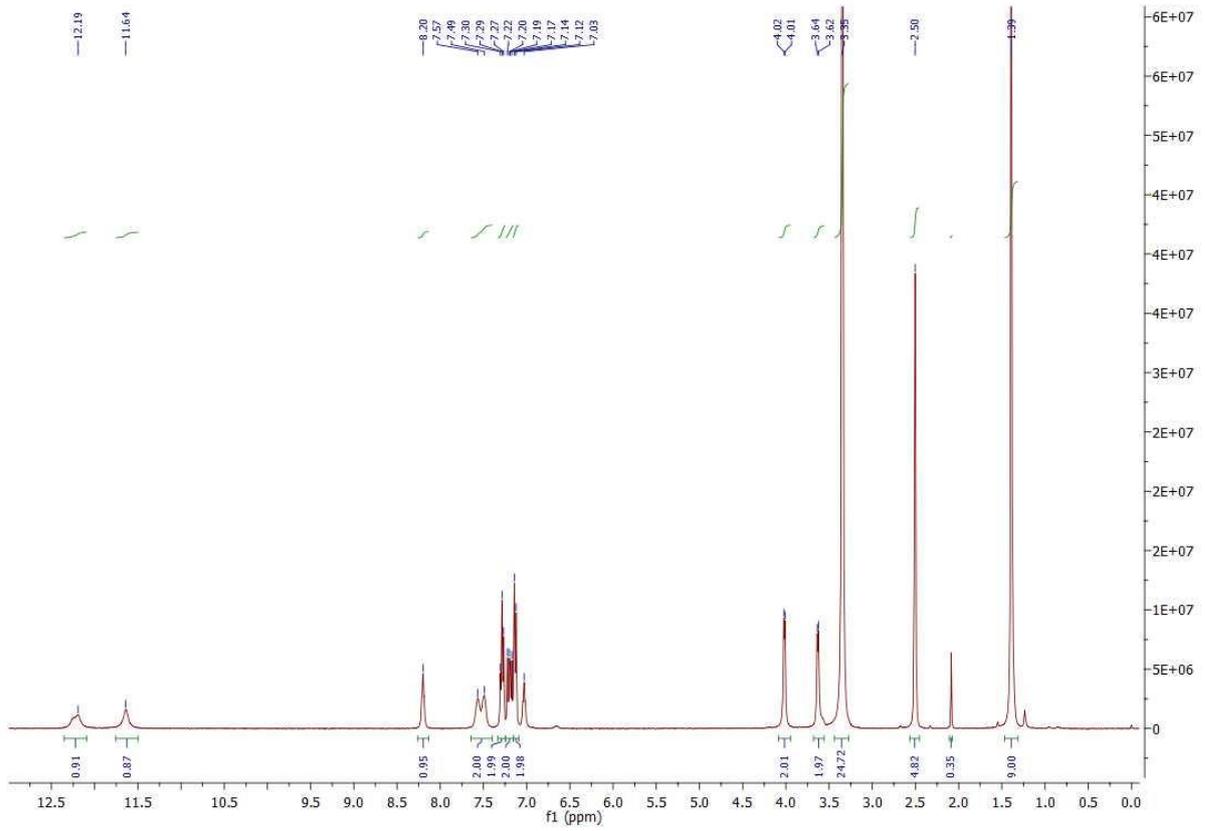
20- H^1 DMSO-d6



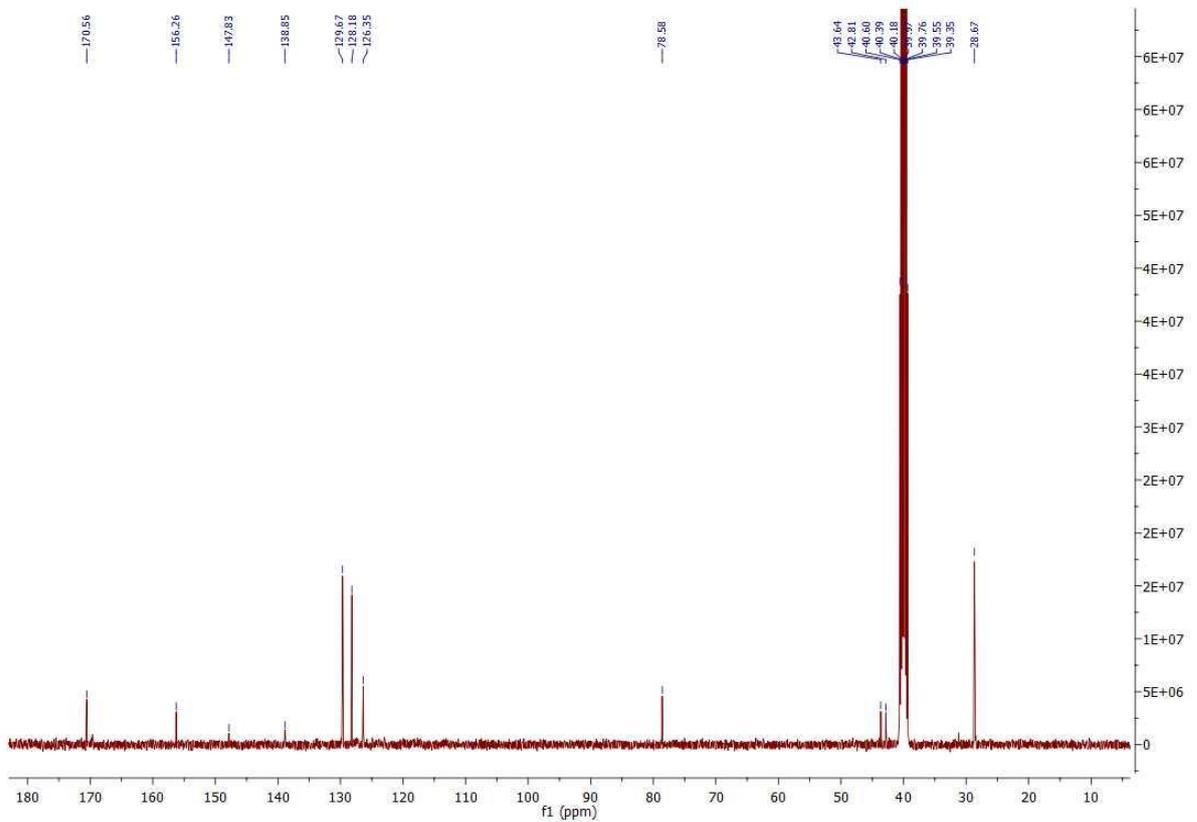
21- H^1 CDCl₃



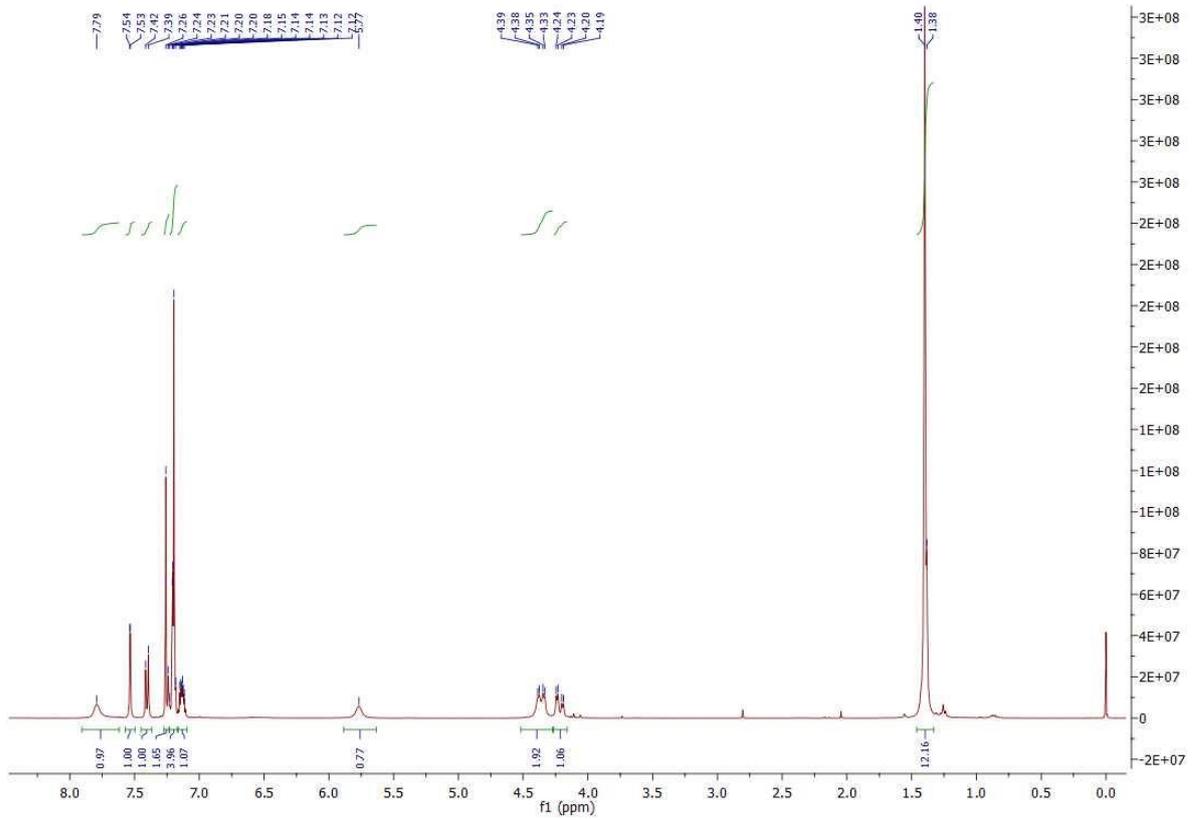
22- H^1 DMSO-d6



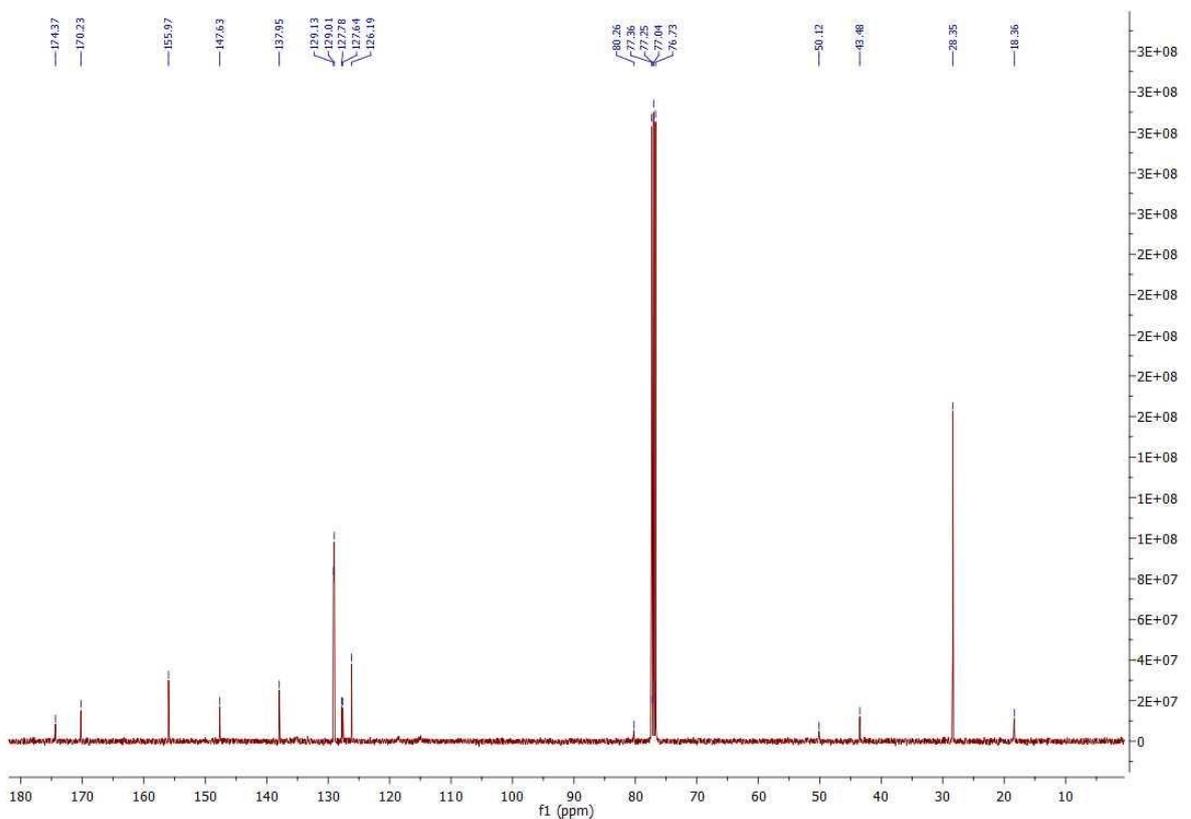
22- C^{13} DMSO-d6



23- ^1H CDCl_3



23- ^{13}C CDCl_3



CAPÍTULO 2

Ensayos *in vitro* de actividad antihelmíntica

Introducción	pág. 95
Metodología	pág. 102
Discusión de resultados	pág. 105
Conclusiones	pág. 115
Bibliografía	pág. 116

INTRODUCCIÓN

El proceso de búsqueda y desarrollo de nuevos antihelmínticos para uso veterinario, ha ido cambiando a lo largo del tiempo, en cuanto a las estrategias de diseño utilizadas. Este es un fenómeno propio de la investigación de fármacos en general, en donde ha habido un cambio acentuado en las últimas décadas, producto de los diversos avances científicos.

Uno de los aspectos claves en la estrategia de investigación de fármacos, son los ensayos de cribado o screening, para la detección de moléculas activas. Estos ensayos buscan evaluar el potencial de nuevos compuestos para lograr el efecto biológico deseado, trabajando en condiciones simplificadas de laboratorio, de forma de direccionar el proceso de búsqueda de nuevas moléculas activas. La evaluación de la actividad *in vivo* de un compuesto, sobre hospederos infectados, es un proceso muy costoso, sobre todo si consideramos el diseño de fármacos destinados a animales de producción. Por consiguiente, esta etapa está restringida a un grupo selecto de moléculas, que hayan demostrado, entre otras cualidades, tener buenos perfiles de actividad en ensayos de screening *in vitro* realizados previamente. La robustez del modelo de ensayo elegido, está directamente relacionada con su carácter predictivo, de manera que nos permita poder anticipar de forma más eficiente, la potencial actividad *in vivo* de un compuesto, a través de ensayos *in vitro*.

El descubrimiento de nuevos fármacos antihelmínticos se ha basado en la aplicación de diversas estrategias [1], identificándose dos grandes metodologías de ensayos de screening *in vitro*.

1) *Ensayos basados en el organismo entero* (fisiología-guiados):

Los compuestos son evaluados directamente sobre el organismo invasor de interés, el cual puede ser un parásito, una bacteria, un virus, etc. El organismo utilizado, se cultiva y se desafía con los compuestos que se desean ensayar, midiendo el efecto mediante cambios en fenotipos indicadores de la sobrevivencia del blanco fisiológico.

2) *Ensayos basados en el mecanismo molecular* (blanco-guiados):

Los compuestos son evaluados a partir de su capacidad de interactuar con un blanco molecular específico, cuya actividad se desea modular. Los ensayos se pueden realizar directamente sobre el blanco molecular, el cual es obtenido a partir de su extracción del organismo de origen, o mediante su producción recombinante.

Avances en las técnicas de manipulación genéticas, han permitido obtener variantes de organismos modificados genéticamente, generando cambios conocidos en su perfil molecular. Como resultado se han podido implementar ensayos basados en el mecanismo de acción, utilizando organismos enteros, sin necesidad de aislar el blanco molecular. En este sentido se han utilizado bacterias modificadas genéticamente, expresando proteínas heterólogas, las cuales son blancos de interés para el screening masivo de fármacos. La expresión de estas proteínas genera cambios conocidos en el metabolismo bacteriano, y su inhibición puede ser constatada evaluando la sobrevida de las bacterias, en condiciones controladas de cultivo [2]. Otro ejemplo interesante en la misma línea, ha sido el screening de fármacos con afinidad por proteínas G humanas, utilizando variantes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente, para expresar de forma recombinante proteínas G de origen humano [3].

Sin dudas la elección del tipo de ensayo a utilizar en el proyecto de diseño de un fármaco, dependerá de varias consideraciones propias del proceso de investigación. Ambas metodologías no son excluyentes, pudiendo coexistir en las distintas etapas del proceso de búsqueda de nuevas moléculas activas.

Los ensayos fisiología-guiados han sido implementados desde larga data y siguen siendo útiles, dada la capacidad de evaluar la actividad sobre un organismo en su conjunto, pudiendo explorar implícitamente blancos moleculares aún desconocidos. Además, trabajar con el organismo entero, permite evaluar simultáneamente los procesos de difusión y metabolización parasitaria, los cuales pueden tener gran incidencia en la actividad de un fármaco.

El complejo ciclo de vida de los helmintos parásitos, alternando estadíos de vida libre con estadíos parasitarios, resulta un desafío para la utilización de estos organismos en ensayos de screening. Es necesario forzosamente contar con un hospedero infectado para poder completar su ciclo, y obtener el material biológico de estudio. Habitualmente se utilizan los estadíos de vida libre debido a que su obtención es más sencilla que los estadíos parasitarios. Estos últimos se alojan en el hospedero, y su obtención implica, generalmente, el sacrificio del animal infectado. Sin embargo ambos tipos de estadíos difieren en varios aspectos fisiológicos, como por ejemplo la presencia de boca, el metabolismo celular, la capacidad de detoxificación, la permeabilidad celular, la presencia de cutícula/vaina, lo que puede hacer variar la susceptibilidad frente a los

antihelmínticos. Poder realizar los ensayos de screening utilizando el estadío para el cual se pretende diseñar un fármaco, resulta una ventaja en este sentido.

Otro aspecto importante para la implementación de ensayos fisiología-guiados, es la elección del fenotipo para evaluar el efecto de los compuestos. Diversos parámetros han sido utilizados, entre ellos: desarrollo larvario, eclosión de huevos, motilidad, capacidad de reproducción, muerte [4, 5, 6, 7]. El parámetro de medición elegido, debe ser apropiado para evaluar el efecto biológico generado por las moléculas en estudio. De lo contrario, moléculas con potencial actividad antihelmíntica, pueden ser erróneamente descartadas, si el parámetro de medición del ensayo de screening, no es el adecuado para medir el efecto generado.

Los ensayos blanco-guiados tienen la ventaja de ser apropiados para la implementación del cribado de alta eficiencia (*high-throughput screening*), dada su capacidad de automatización, y por consiguiente la posibilidad de evaluar la actividad de muchos compuestos en un corto período de tiempo. Otro aspecto interesante de este enfoque, es que permite realizar modificaciones estructurales en las moléculas sintetizadas, para la comprensión de la relación estructura-actividad de los compuestos sintetizados, y optimización de los mismos

Sin embargo, hay un atraso importante en el conocimiento de la fisiología molecular de helmintos parásitos, lo que constituye una limitante para la implementación de ensayos de screening blanco guiados [1]. Es necesario ahondar en la comprensión de la biología básica de los helmintos, para poder seleccionar blancos moleculares de relevancia en el diseño de fármacos.

Los nematodos gastrointestinales son foco de atención y estudio de la parasitología veterinaria, debido al impacto negativo que tienen sobre la industria agropecuaria. Estos nematodos se alojan a lo largo del tracto digestivo del hospedero, principalmente en el abomaso y en el intestino delgado y grueso [8], causando cuadros agudos de gastroenteritis, que afectan severamente la salud del ganado, con una alta tasa de mortalidad.

Con excepción de algunos géneros como *Strongyloides*, *Nematodirus* y *Trichuris*, los nematodos gastrointestinales tienen un ciclo de vida similar, el cual es directo, ya que carece de hospederos intermediarios [9]. Los adultos hembra, alojadas en el interior del

hospedero, ponen huevos, los cuales pasan al exterior a través de las heces. La eclosión de los mismos da origen al estadio larvario, que luego de sucesivas mudas, se convierte en el estadio infectivo (L3), el cual es ingerido, desde las pasturas, por el rumiante durante su alimentación. La duración de los ciclos no supera las tres semanas en la mayoría de las especies. Además las hembras pueden poner hasta miles de huevos por día, lo que explica el gran potencial biótico de estos parásitos. Dada su importancia en la industria agropecuaria, por las pérdidas que tales afecciones ocasionan en el ganado, estos organismos constituyen blancos interesantes para el diseño de nuevos fármacos antihelmínticos.

En este trabajo se utilizó el nematodo *Haemonchus contortus*, como organismo modelo para la evaluación de actividad, en el proceso de búsqueda de nuevas moléculas antihelmínticas. Este nematodo es de gran interés productivo, tanto a nivel nacional como internacional, motivo por el cual es foco de estudio de nuestra línea de investigación.

El nematodo *H. contortus* es un parásito gastrointestinal de rumiantes, que afecta principalmente a ovejas y cabras. Es un gusano hematófago, que se aloja en el abomaso de su hospedero, desde donde extrae la sangre para alimentarse. Las infecciones causadas por este nematodo ocasionan serios problemas de salud en su hospedero, principalmente por los cuadros de anemia generados, muchas veces ocasionando la muerte del mismo [10]. Es un parásito que ha venido generando gran impacto en la industria ovina mundial [11], debido a su alta patogenicidad y su extraordinaria capacidad de generar resistencia a los tratamientos farmacológicos disponibles. En este sentido resulta de gran interés poder trabajar en el desarrollo de nuevos fármacos contra este nematodo.

En la *figura 1* se muestra un esquema del ciclo de vida de *H. contortus*. El estadio adulto se aloja en el abomaso del rumiante hospedero. Las hembras ponen los huevos que son liberados al medio exterior a través de las heces del animal infectado. Los huevos eclosionan para generar el primer estadio larvario L1, el cual sufre sucesivas mudas originando los estadios larvarios L2 y posteriormente L3. Esta etapa larvaria es capaz de migrar desde las heces hacia las pasturas, donde es ingerida por el animal hospedero. Dentro del rumen, la larva L3 infectante, elimina su cutícula (desenvaina), y migra hacia el abomaso, donde muda hacia el estadio larvario L4. Finalmente, luego de un período de entre dos y tres semanas, se origina el estadio adulto, reiniciando el ciclo de infección.

El nematodo *H. contortus* es un organismo de referencia en el estudio de las helmintiasis, y ha servido de modelo para la búsqueda de nuevos fármacos antihelmínticos, diseño de vacunas, y estudios de resistencia farmacológica [12, 13, 14]. Los ensayos de screening basados en este nematodo se han enfocado principalmente en el estadio larvario, midiendo parámetros como la motilidad [15, 16], o el desarrollo larvario [17]. Los ensayos de eclosión de huevos de *H. contortus* también han sido utilizados, pero su aplicabilidad se ha restringido sobre todo al estudio de resistencia a antihelmínticos benzimidazólicos (BZs) [18, 19].

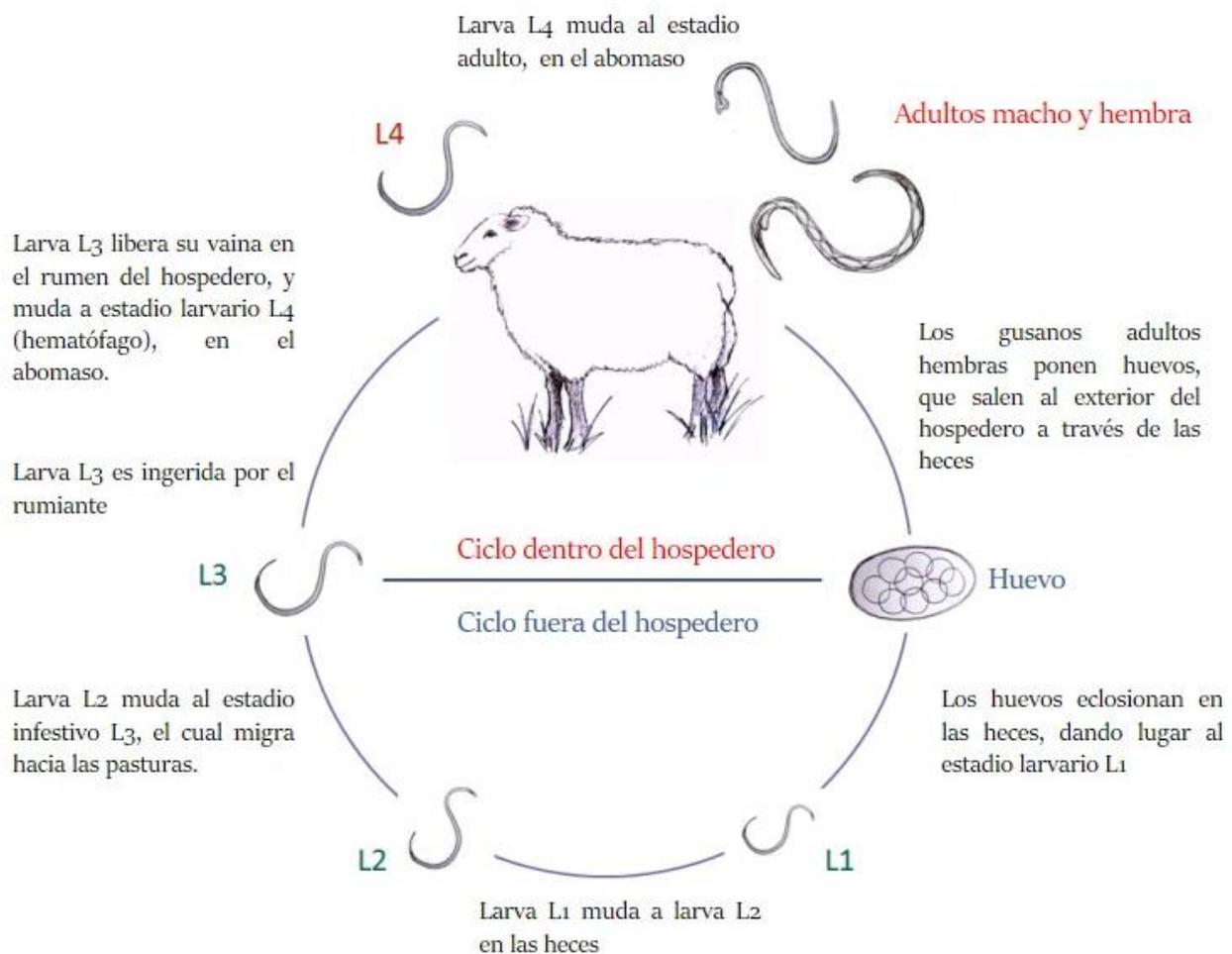


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo *H. contortus*. Los adultos se alojan en el abomaso del rumiante, adheridos a la mucosa del órgano, desde donde se alimentan de la sangre del hospedero. Las hembras liberan los huevos hacia el exterior, a través de las heces. Los huevos eclosionan originando el estadio larvario L1, el cual sufre sucesivas mudas hasta llegar al estar larvario infestivo L3. La larva L3 es ingerida y se aloja en el abomaso, para mudar el estadio L4, el cual es hematófago, y posteriormente al estadio adulto, iniciando nuevamente el ciclo

En este trabajo se utilizaron dos bioensayos *in vitro* de actividad fisiología guiados, sobre los estadios huevo y adulto, del nematodo *H. contortus*. En primer lugar se aplicó un ensayo de screening basado en el estadio adulto, por adaptación del ensayo descrito por O'Grady & Kotze [20]. Este modelo de ensayo emplea la motilidad del parásito, como parámetro para evaluar la actividad antihelmíntica. Los ejemplares adultos hembras, son extraídos del abomaso de ovejas infectadas artificialmente, y son colocados en tubos de ensayos conteniendo medio de cultivo, en presencia de los compuestos a ensayar. Luego de un determinado período de tiempo, la motilidad de los nematodos es evaluada visualmente, y se pondera en base a un score. Este ensayo fue utilizado para guiar el proceso de síntesis de nuevas moléculas, y ahondar en la comprensión de la influencia de los fragmentos estructurales en la actividad biológica observada.

Por otra parte, se aplicó el ensayo de eclosión de huevos (EHA, *egg hatch assay*) de *H. contortus*, por adaptación de lo publicado por Adamu [21]. Este ensayo utiliza como fenotipo de evaluación la capacidad que tienen algunos compuestos antihelmínticos de inhibir la eclosión de huevos, impidiendo la liberación de larvas (efecto ovidica). Como ya indicáramos, los ensayos de eclosión de huevos son bastante limitados para ser utilizados en el screening de nuevos compuestos. Diversas familias de antihelmínticos comerciales, no resultan ovidicas, pese a ser activos frente a estadios parasitarios. Los BZ son una excepción a esta observación.

Es por ello, que el ensayo fue utilizado de forma complementaria, buscando ahondar en el perfil de actividad de aquellas moléculas que previamente habían resultado activas sobre el estadio adulto. Dado que el diseño de nuestras moléculas incluye un dominio estructural benzimidazólico, resulta de interés conocer la respuesta en este ensayo. Brevemente, los huevos de *H. contortus* son extraídos a partir de heces de ovejas infectadas artificialmente y los mismos son cultivados e incubados en presencia de los productos a ensayar. Luego de un tiempo establecido, se determina la cantidad de huevos que eclosionaron a larvas, y se calcula el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos.

Los detalles de la implementación de ambos ensayos de evaluación de actividad, se exponen en la siguiente sección (metodología).

La selección de la especie de helminto utilizada en los ensayos de screening *in vitro*, debe estar basada en la probabilidad de obtener similares respuestas quimioterapéuticas *in vivo*,

contra el organismo blanco final de acción. Sin lugar a dudas, poder contar con un bioensayo de screening que involucre la misma especie de helminto contra la cual se pretende diseñar nuevos fármacos, representa una gran ventaja en el proceso de búsqueda de nuevos antihelmínticos, considerando las diferencias que pueden existir en la susceptibilidad farmacológica entre las distintas especies.

Por otra parte, el ensayo de screening utilizado como guía en el diseño de compuestos, involucra el estadio parasitario del nematodo (estadio adulto), lo que confiere una mayor precisión en la búsqueda de nuevas moléculas activas. Como mencionáramos anteriormente, los distintos estadios del parásito pueden diferenciarse en cuanto a la susceptibilidad farmacológica.

METODOLOGÍA

Ensayo de actividad basado en el estadio adulto

El ensayo de actividad antihelmíntica utilizando el estadio adulto del nematodo de interés productivo *Haemonchus contortus*, fue realizado por adaptación con cambios menores de lo comunicado por O'Grady & Kotze [20]. Se instaló una infección artificial de *H. contortus* en ovinos, mantenidos en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar, a cargo del Dr. Pablo Alonzo. Se utilizó la cepa susceptible *H. contortus* Kirby, proporcionada por el Dr. M. Knox (Laboratorio CSIRO McMaster Laboratory, Armidale, Australia). Los ovinos se infectaron por vía oral, con el estadio larvario L3. Los gusanos adultos son extraídos manualmente del abomaso de los ovinos infectados y necropsados aproximadamente 20-30 días post infección.

Los gusanos se limpian con solución buffer PBS, y se distribuyen en grupos de a 10, en tubos de ensayo con 2 mL de medio de cultivo (RPMI-1640, conteniendo 0.8% de glucosa, 0.25 µg/mL de anfotericina B, 10 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de buffer HEPES y 20% de suero fetal bovino). Los compuestos a ensayar (disueltos en DMSO) son agregados a cada tubo de forma de alcanzar la concentración de trabajo deseada, fijando la concentración final de DMSO en 0.5% v/v en cada tubo. En todos los experimentos se realiza un control positivo (antihelmíntico comercial utilizado en la validación del modelo), un control negativo (medio de cultivo) y un control de vehículo (0.5% de DMSO). Cada compuesto se analiza por sextuplicado. Los tubos son incubados por 72 horas a 37 °C, en una atmósfera conteniendo 5% de CO₂. Luego de 72 horas se evalúa visualmente la motilidad de los gusanos, estableciendo un valor de motilidad (score) que varía de 0 a 3, definido como:

3= La mayoría de los individuos muestran movimiento sinusoidal normal, similar al inicio del cultivo

2= Movimiento significativo en un pequeño número de individuos. Al menos uno presenta movimiento sinusoidal normal.

1= Movimiento muy limitado en un pequeño grupo de individuos. No se observa movimiento en varios gusanos. Ningún gusano presenta movimiento sinusoidal normal.

0= No se observa movimiento

Se consideran activos aquellos compuestos con un índice de motilidad promedio menor a 1.5

El protocolo de experimentación correspondiente a este modelo está en cumplimiento de la ley N° 18611 (procedimientos para la utilización de animales en actividades de investigación científica) y fue aprobado por la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA) de Facultad de Medicina, UdelaR (Protocolo N° exp.: 070153-000586-16).

Ensayo de eclosión de huevos (EHA)

Recuperación de huevos

El material parasitario proviene de ovejas infectadas artificialmente con el nematodo *H. contortus*, acorde a lo especificado en la sección anterior. Los huevos son extraídos a partir de las heces de ovejas infectadas siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. El material fecal se mezcla con una solución NaCl 0.9 %, en una proporción 1:10 (v/v). La mezcla se filtra con una gasa y la solución recuperada se centrifuga a 2300g durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento con una solución NaNO₃ 40% (p/v), en una proporción 1:4 (v/v). Se agita y se centrifuga a 2300g durante 10 minutos. El sobrenadante se filtra utilizando papel Whatman N° 1. El papel de filtro, conteniendo los huevos, se lava con 250 mL de agua destilada, recogiendo el lavado en un vaso de bohemia. La solución de lavado se coloca en tubos Falcon de 50 ml y se centrifuga a 2300g durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante conservando 5 mL en cada tubo. Se homogeniza la solución y se realiza el conteo de huevos en microscopio óptico.

Ensayo EHA

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo comunicado por Adamu y colaboradores [21]. Una solución conteniendo huevos limpios se coloca en placas de 96 pocillos (50 huevos por pocillo), trabajando a un volumen final de 200 µL. El volumen final se alcanza agregando agua destilada y 5 µL de DMSO conteniendo el producto a ensayar (concentración final de DMSO 2.5% v/v). Los productos se ensayan a una concentración final de 25 µM en pocillo. Se realiza un control positivo conteniendo Fenbendazol 25 µM. También se realiza un control negativo conteniendo agua destilada, y un control de

vehículo conteniendo DMSO (concentración final 2.5% v/v). Las placas se incuban a 27° C por 48 horas, y se realiza el conteo de larvas y huevos en cada pozo, utilizando microscopio invertido Nikon TS100, previo agregado de 10 µL de una solución de lugol 1% en cada pozo. Cada compuesto se analiza por sextuplicado. El porcentaje de eclosión de huevos se calcula según:

$$\% \text{ Eclosión de huevos} = 100 \times \text{N}^\circ \text{ de larvas} / (\text{N}^\circ \text{ de larvas} + \text{N}^\circ \text{ de huevos})$$

Los resultados obtenidos para los diferentes compuestos ensayados se procesaron estadísticamente aplicando un test de comparación múltiple, test de Tukey, con un 95 % de confianza (GraphPad Prism 5.00, La Jolla, CA, USA), y se estimaron diferencias significativas entre ellos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ensayo de actividad basado en el estadio adulto

El ensayo de actividad con el estadio adulto fue previamente instalado por el grupo de Farmacología de la Facultad de Química, UdelaR, de forma satisfactoria, obteniéndose resultados concordantes con lo descrito por O'grady y Kotze [20]. Los resultados de motilidad obtenidos para los compuestos ensayados usando dicho modelo resultaron reproducibles tanto para las réplicas realizadas con material derivado de un animal infectado, como con el material proveniente de al menos dos animales más.

En la *figura 2* se muestran imágenes del proceso de implementación del ensayo. Los ovinos infectados artificialmente son necropsados, para luego extraerles el abomaso. Los ejemplares adultos de *H. contortus* son extraídos desde el abomaso del ovino (2B), en donde se encuentran adheridos a la mucosa del órgano. Luego son limpiados, para retirar los restos del contenido del abomaso (2C), y finalmente colocados en los tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo y los productos a ensayar.

La motilidad de los helmintos es evaluada visualmente, utilizando los criterios de clasificación que se detallan en la sección *metodología* del presente capítulo. En la *figura 2D*, se observan dos tubos correspondientes a un ensayo de screening; uno conteniendo un compuesto activo (izquierda), y otro utilizado como control negativo (derecha). En el tubo conteniendo el compuesto activo, se pueden apreciar los helmintos depositados en el fondo del mismo, prácticamente sin movilidad. En el tubo control negativo en cambio, se observan los nematodos realizando un movimiento característico, de forma sinusoidal, en dirección hacia la superficie del medio.

Los scores de motilidad, utilizados como criterio de clasificación en el ensayo de screening, tienen un carácter categórico. Las categorías están definidas por un valor numérico, el cual está en relación con la magnitud del movimiento. Sin embargo el criterio de clasificación utilizado no está basado en una proporcionalidad numérica entre el score y la motilidad, sino más bien, que cada score constituye una descripción cualitativa del movimiento.

Este hecho sin dudas limita el manejo estadístico que se puede realizar para interpretar los datos obtenidos. Como criterio de clasificación se consideran activos aquellos

compuestos con índice de motilidad promedio menor a 1.5. Este punto de corte fue establecido en la validación original del método [20] analizando los resultados de motilidad que surgieron de ensayar un gran número de antihelmínticos comercializados, pertenecientes a diversas clases farmacológicas.

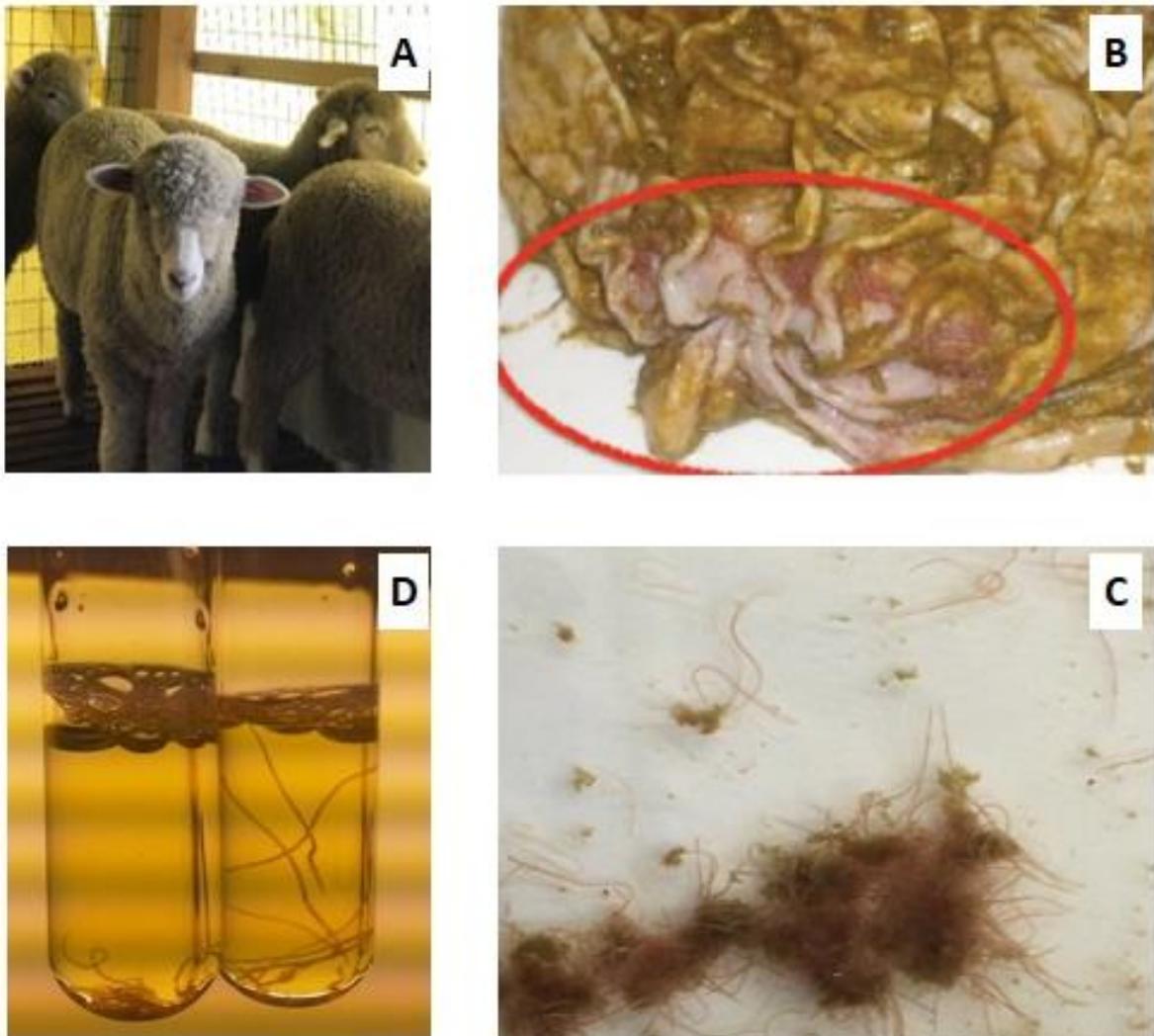


Figura 2. Imágenes de la implementación del ensayo in vitro de actividad antihelmíntica, realizado por nuestro grupo, utilizando el estadio adulto del nematodo *H. contortus*. **A)** Ovinos infectados artificialmente. **B)** Abomaso extraído de ovino necropsado, en donde se encuentran los ejemplares adultos de *H. contortus*, adheridos a la mucosa del órgano. **C)** Limpieza de los ejemplares adultos de *H. contortus*, con solución buffer PBS. **D)** Tubos utilizados en el ensayo de screening, conteniendo ejemplares adultos de *H. contortus* y medio de cultivo. El tubo de la derecha corresponde a un control negativo (score 3), mientras que el tubo de la izquierda contiene un producto activo frente a *H. contortus* (score 0).

Es interesante señalar que parámetros farmacológicos de gran utilidad, como la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), habitualmente obtenidos en ensayos de screening, no pueden ser calculados a partir de este sistema de clasificación. Sin embargo este ensayo de actividad antihelmíntica no se limita solamente a una clasificación binaria, entre compuestos activos e inactivos. El posible identificar ciertos perfiles o fenotipos en el tipo de movimiento de los gusanos, los cuales podrían sugerir distintos mecanismos de toxicidad.

A modo de ejemplo, el antihelmíntico ivermectina (IVM), ejerce su acción antiparasitaria mediante el agonismo sobre un tipo de canales iónicos acoplados a Glutamato, permeables al anión cloruro, denominados GluCl [22]. La acción neurotóxica resultante sobre el parásito, ocasiona parálisis muscular en el nematodo. Como consecuencia, en el presente ensayo de screening, la IVM ejerce una notoria inhibición de la motilidad, registrándose scores cercanos a 0, en rangos amplios de concentración (y del orden μM) y a tiempos cortos de incubación.

En cambio, familias de fármacos como los BZs, ejercen su acción antihelmíntica interfiriendo con procesos metabólicos celulares, sin ejercer una acción directa sobre el sistema neuromuscular. Los BZs inhiben la polimerización de tubulinas [23] lo que genera una serie alteraciones celulares, que conducen a la muerte del parásito [24]. Los efectos de citotoxicidad causados por BZ, no tienen un impacto directo y rápido sobre la motilidad de los helmintos, lo que se evidencia en el presente ensayo de screening, alcanzando scores de actividad generalmente cercanos a 1, a concentraciones y tiempos mayores comparados por ejemplo con IVM.

Otro aspecto a destacar de este ensayo, es que al tener una duración de 72 horas, permite detectar compuestos con lenta respuesta de acción sobre el fenotipo motilidad. Tal es el caso de la familia de los BZs. Dado su mecanismo de acción, la respuesta citotóxica de estos fármacos ocurre de forma lenta, lo que aumenta la probabilidad de clasificarlos incorrectamente como no activos, en algunos ensayos *in vitro* (utilizando tiempos menores de screening, por ejemplo) [15]. En este sentido, el tiempo de evaluación del ensayo de screening es un factor clave para poder evidenciar la actividad de estos fármacos [25], y evitar su inclusión en resultados falsos negativos.

Para nuestro trabajo en particular, es fundamental contar con un ensayo capaz de detectar la actividad de BZs, dada la relación estructural que presentan con las nuevas moléculas sintetizadas en la presente tesis.

En la *tabla 1* se muestran los resultados del ensayo actividad antihelmíntica para los nuevos compuestos, cuya estrategia de síntesis se detalló en el *capítulo 1*. Los antihelmínticos comerciales IVM y el fenbendazol fueron incluidos en el ensayo, como controles positivos. También fueron incluidos dos controles negativos, conteniendo medio cultivo, y medio de cultivo con 0.5% de DMSO.

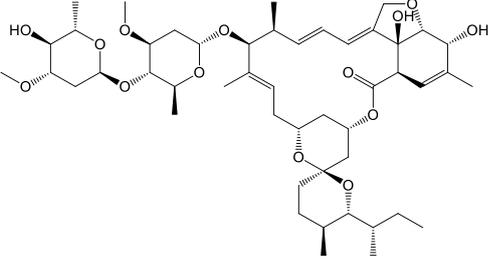
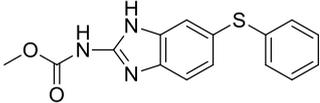
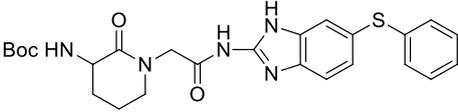
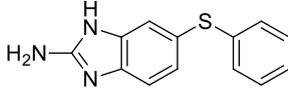
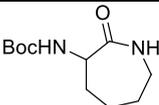
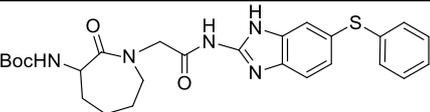
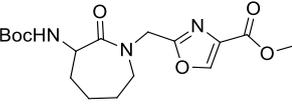
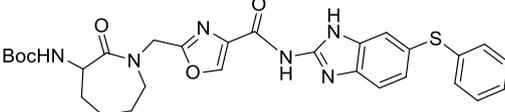
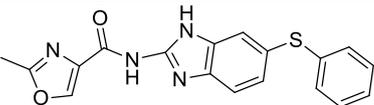
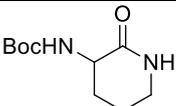
Inicialmente se ensayaron los compuestos 6 y 10, dado que fueron las primeras moléculas sintetizadas. Estos compuestos son análogos estructurales del compuesto 1a, que surgen a partir de realizar modificaciones a nivel del anillo lactámico y el linker. El compuesto 6 resultó inactivo, mientras que el compuesto 10 resultó activo, presentando un score de motilidad similar al compuesto 1a, y al patrón fenbendazol.

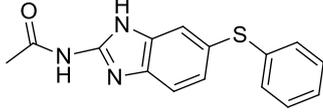
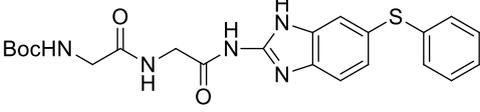
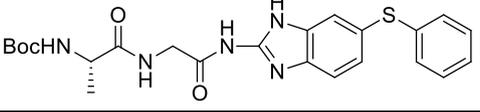
Analizando estos resultados de actividad antihelmíntica, se realizaron modificaciones moleculares con la finalidad de ahondar en la comprensión de la influencia de los distintos componentes estructurales, sobre la actividad biológica observada para los compuestos 1a y 10. Se buscó reconocer las subunidades estructurales mínimas, que fueran capaces de presentar actividad en el ensayo biológico utilizado. Para ello se procedió a desacoplar el dominio lactámico del dominio benzimidazólico, generando variantes moleculares más simples, que contengan sólo uno de los dos dominios originales.

Como resultado de la simplificación estructural del compuesto 10, se obtuvieron los compuestos 2, 3, 8 y 15, cuya actividad fue ensayada. Tres de ellos (2, 3 y 8) corresponden a intermediarios de reacción del compuesto 10. Los compuestos 3 y 8 son derivados del anillo lactámico, y resultaron inactivos. Por otra parte, los compuestos 2 y 15 son derivados del anillo benzimidazólico; el compuesto 2 es considerado inactivo, mientras que el compuesto 15 resultó activo, presentando un score de actividad similar al compuesto 10, su análogo estructural superior.

La simplificación estructural del compuesto 1a, dio origen a las estructuras 16 y 17. El compuesto 16 es un derivado del dominio lactámico, considerado inactivo, mientras que el compuesto 17 es una variante derivada del dominio benzimidazólico, que presentó un score de actividad comparable a su análogo 1a.

Tabla 1. Resultados de actividad antihelmíntica sobre gusanos adultos de *H. contortus*, de los compuestos sintetizados. Todos los compuestos fueron ensayados a una concentración igual a 10 µg/mL (acorde [20]) salvo la IVM que se ensayó a una concentración igual a 0.01 µg/mL.

COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	SCORE DE MOTILIDAD
Control medio	-	2.8
Control 0.5% DMSO	-	2.7
Ivermectina		0.3
Fenbendazol		1.0
1a		1.2
2		2.3
3		2.8
6		3.0
8		2.8
10		1.3
15		1.0
16		2.5

17		0.9
22		1.8
23		2.0

Los resultados obtenidos sugieren en primer lugar, que el residuo benzimidazólico sería fundamental para la actividad antihelmíntica observada, aunque no es una condición suficiente, lo que se constata en la falta de actividad de los compuestos 2 y 6. Por otra parte los derivados que contienen únicamente el dominio lactámico (compuestos 3, 8 y 16), demostraron no ser activos en este ensayo. Este resultado contrasta con lo reportado previamente por el grupo de trabajo [26], en donde derivados lactámicos resultaron tener gran actividad en ensayos *in vitro*, frente el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis* L4. La susceptibilidad farmacológica para estos compuestos, resulta diferente para las especies de nematodos utilizadas en ambos bioensayos, lo que obliga a reconsiderar la estrategia de síntesis utilizada. Por otra parte los compuestos 15 y 17 mostraron perfiles de actividad similares al fenbendazol.

En base a los resultados obtenidos, se podría pensar que el dominio benzimidazólico constituye la unidad farmacofórica responsable de la actividad observada en los compuestos 1a y 10. Sin embargo, a pesar de que los derivados conteniendo únicamente el dominio lactámico, no resultaron activos, surge el interrogante acerca de la influencia que este dominio estructural podría ejercer en la actividad de los compuestos híbridos. Esto queda de manifiesto observando la diferencia de actividad entre los compuestos 1a y 6, hecho que resulta llamativo, dada la similitud estructural de ambas moléculas.

El aumento del tamaño del anillo lactámico en un carbono, significó la pérdida de actividad para el compuesto 6. Una interpretación posible, sería que la modificación estructural del dominio lactámico, genere un cambio conformacional que afecte la actividad de la molécula. Un aumento en la flexibilidad del anillo lactámico, a través de la homologación en un carbono, podría generar una disposición espacial diferente de los

restos más lipofílicos y voluminosos de las moléculas, y como consecuencia la pérdida de actividad.

Para estudiar este aspecto, se procedió a la síntesis de análogos de los compuestos 1a y 6, sustituyendo el anillo lactámico por una cadena abierta, conteniendo un grupo amida. El objetivo era poder estudiar la influencia del tamaño molecular y la flexibilidad estructural de esta región, en la actividad antihelmíntica. Como resultado se sintetizaron los compuestos 22 y 23. Los mismos fueron evaluados, obteniéndose scores considerados como inactivos.

Observando estos resultados, podemos afirmar que la presencia del anillo lactámico parecería aportar a la actividad de las moléculas híbridas. Sin embargo la influencia de la conformación estructural de esta región en la actividad biológica, no resulta clara. Pequeñas modificaciones estructurales, tienen como resultado la pérdida o disminución de actividad, lo que se observa en los compuestos 6, 22 y 23. El panorama se complejiza aún más, si consideramos el compuesto 10. El mismo es activo, pese a contener el anillo lactámico de siete miembros, lo que sugiere que el linker oxazol debe estar jugando un rol importante en la actividad de la molécula. Será necesario profundizar en el estudio de estos aspectos para poder esclarecer las interrogantes planteadas.

Ensayo de eclosión de huevos (EHA)

Los resultados obtenidos en la sección anterior indicarían que el dominio benzimidazólico es una estructura fundamental para la actividad antihelmíntica, estando presente en todas las moléculas que resultaron activas. En este sentido se buscó profundizar en el perfil de actividad de las nuevas moléculas, intentando comprender el rol del dominio estructural benzimidazólico, en la actividad observada. Para ello utilizamos el ensayo EHA.

El ensayo EHA había sido previamente instalado por el grupo de Farmacología de la Facultad de Química, UdelaR, de forma satisfactoria. En la *figura 3* se muestran imágenes del ensayo utilizado para la evaluación de compuestos de la presente tesis. En la misma se muestran fotografías de los pocillos, tomadas desde el microscopio invertido, al final del período de incubación de huevos. Las imágenes corresponden al control negativo con agua (donde se aprecia claramente una gran proporción de larvas emergidas de huevos

eclosionados) y un control positivo conteniendo Fenbendazol (donde se observa mayoritariamente huevos sin eclosionar).

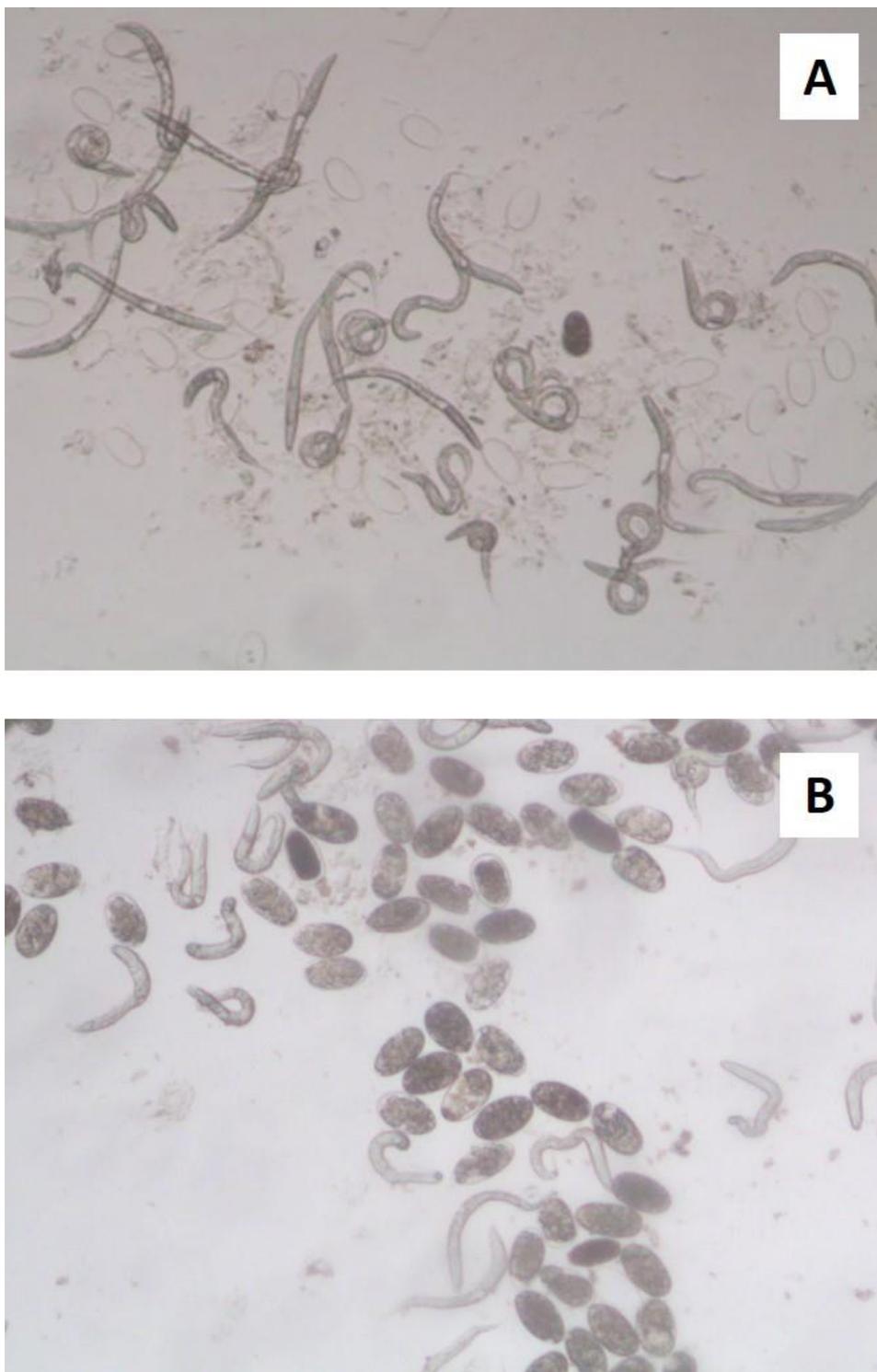


Figura 3. Imágenes del ensayo de eclosión de huevos (EHA) de *H. contortus*. A) Control negativo conteniendo H₂O. B) Control positivo conteniendo Fenbendazol 25 µM.

Se ensayaron los compuestos 1a, 10, 15 y 17, los cuales habían resultado activos frente al estadio adulto de *H. contortus*. En la *tabla 2* se muestran los resultados obtenidos, indicando el porcentaje promedio de eclosión de huevos para cada compuesto, luego de finalizado el período de incubación. Los resultados fueron analizados mediante un test de comparación múltiple, aplicando el test de Tukey (ver *figura 4*). Se buscó determinar si los valores obtenidos para cada muestra presentaban diferencias significativas con el control de DMSO.

Como podemos observar, los compuestos 15 y 17 resultaron activos. El perfil de actividad de estos compuestos es muy similar al de su análogo Fenbendazol, en base a los ensayos realizados hasta el momento, sugiriendo que estos compuestos podrían corresponder a nuevas variantes de BZs.

Los compuestos 1a y 10 en cambio, no presentaron diferencias significativas con el control de DMSO. Si bien el dominio benzimidazólico resultó clave para su actividad antihelmíntica frente al estadio adulto, no se conserva el mismo perfil de actividad que en los BZs, no resultando ovicida, a las concentraciones ensayadas.

En este sentido, se podría suponer que la actividad de los compuestos 1a y 10 frente al estadio adulto, no podría estar explicada exclusivamente por la actividad de sus análogos inferiores, 17 y 15 respectivamente, pudiendo sugerir para los compuestos 1a y 10, un mecanismo distinto al observado en los BZs mencionados.

Tabla 2. Resultados del ensayo de eclosión de huevos de *H.contortus* (EHA). Todos los compuestos fueron evaluados a una concentración de 25 μ M. Para cada compuesto se informa el promedio del porcentaje de eclosión para seis réplicas, y su respectiva desviación estándar (SD)

Compuesto	Control H ₂ O	Control DMSO	Fenbendazol	1a	10	15	17
% Eclosión Promedio	98	84	21	78	74	20	43
SD	2	6	6	8	9	3	8

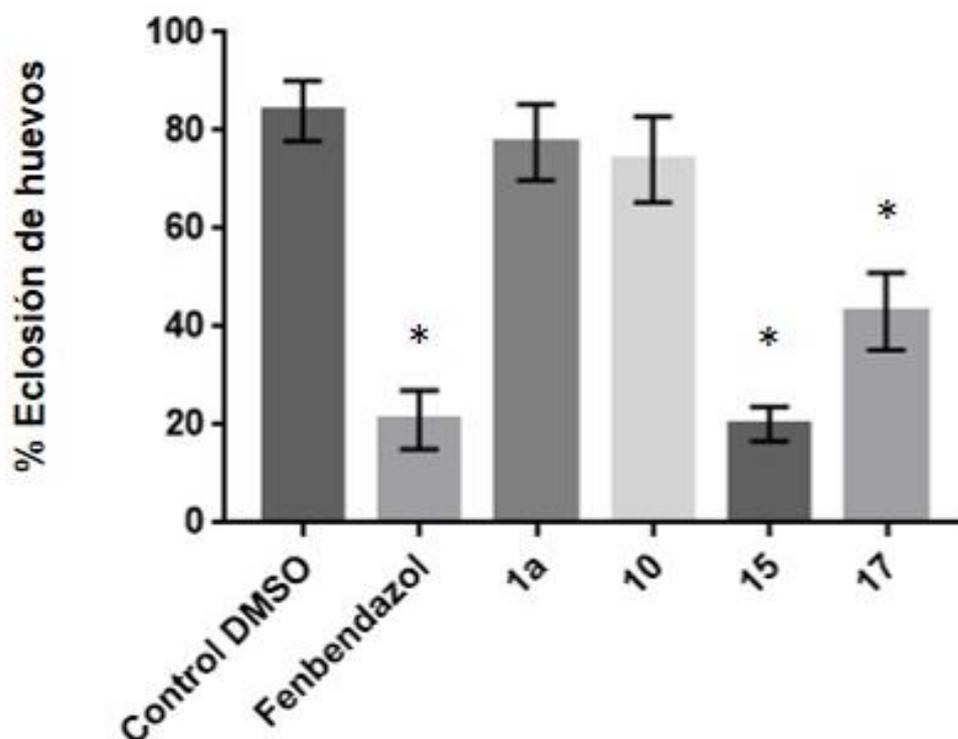


Figura 4. Porcentaje de eclosión de huevos de *H.contortus*. Los resultados se analizaron utilizando el test de Tukey ($p= 0.05$). (*) Presentaron diferencias significativas con el control DMSO.

CONCLUSIONES

En el presente capítulo se presenta el uso de un ensayo fisiología guiado sobre el estadio adulto del nematodo *H. contortus*, con el fin de evaluar la actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos sintetizados en el capítulo 1. Las nuevas moléculas pudieron ser evaluadas de forma satisfactoria.

Se ensayaron un total de 10 compuestos, de los cuales 3 resultaron activos (compuestos 10, 15 y 17). El análisis de los resultados obtenidos sugiere en primer lugar que el dominio benzimidazólico resulta necesario para la actividad observada, estando presente en todas las moléculas activas, aunque no es una condición suficiente para la presencia de actividad. El dominio lactámico en cambio, parece no ser activo de forma aislada frente a *H. contortus*, en contraposición con resultados previamente obtenidos frente al nematodo *N. brasiliensis*, lo que sugiere diferente susceptibilidad farmacológica para los diferentes nematodos, al menos para estos compuestos.

A pesar de ello, el dominio lactámico parece tener influencia en la actividad de los compuestos híbridos. La modulación de esta región molecular tiene incidencia en los perfiles de actividad, lo que se evidenció al ensayar los compuestos 6, 10, 22 y 23. No fue posible establecer una relación entre la conformación de esta región y la actividad antihelmíntica.

Finalmente se buscó profundizar en el perfil de actividad de los compuestos que habían resultado activos frente al estadio adulto de *H. contortus*, utilizando el ensayo de eclosión de huevos. Los compuestos 15 y 17 resultaron activos, mientras que los compuestos híbridos 1a y 10 no presentaron diferencias significativas con el control DMSO. Estos resultados conducen a pensar que en los compuestos híbridos, el dominio benzimidazólico no estaría teniendo el mismo perfil de actividad que en los BZs, o que en sus análogos 15 y 17, sugiriendo que la acción antihelmíntica de los compuestos híbridos pueda ocurrir por un mecanismo de acción distinto al de sus precursores BZs.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]- Geary, T. G., Thompson, D. P., & Klein, R. D. (1999). Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *International Journal for Parasitology*, 29(1), 105-112.
- [2]- Klein, R. D., & Geary, T. G. (1997). Recombinant microorganisms as tools for high throughput screening for nonantibiotic compounds. *Journal of Biomolecular Screening*, 2(1), 41-49.
- [3]- Pausch, M. H. (1997). G-protein-coupled receptors in *Saccharomyces cerevisiae*: high-throughput screening assays for drug discovery. *Trends in Biotechnology*, 15(12), 487-494.
- [4]- Bennett, J. L., & Pax, R. A. (1987). Micromotility meter: instrumentation to analyse Helminth motility. *Parasitology Today*, 3(5), 159-160.
- [5]- Rew, R. S., Urban Jr, J. F., & Douvres, F. W. (1986). Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. *American Journal of Veterinary Research*, 47(4), 869.
- [6]- Ochoa, C., Rodríguez, M., Domínguez, L., Saldaña, J., Maio, R. D., Alonso-Villalobos, P., & Martínez Grueiro, M. M. (1999). Nematocide activity of 6, 7-diarylpteridines in three experimental models. *Journal of Helminthology*, 73(4), 333-336.
- [7]- Le Jambre, L. F. (1976). Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 2(4), 385-391.
- [8]- Vlassoff, A., Leathwick, D. M., & Heath, A. C. G. (2001). The epidemiology of nematode infections of sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 49(6), 213-221.
- [9]- Sissay, M. (2007). Helminth parasites of sheep and goats in Eastern Ethiopia (Tesis Doctoral). Swedish University of Agricultural Sciences.
- [10]- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93, 95-143.
- [11]- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186(1-2), 70-78.
- [12]- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., & Gauvry, N. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452(7184), 176-180.
- [13]- LeJambre, L. F., Windon, R. G., & Smith, W. D. (2008). Vaccination against *Haemonchus contortus*: performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 302-312.

- [14]- Gilleard, J. S., & Devaney, E. (2013). *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*, 140(12), 1506.
- [15]- Boisvenue, R. J., Brandt, M. C., Galloway, R. B., & Hendrix, J. C. (1983). In vitro activity of various anthelmintic compounds against *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 13(4), 341-347.
- [16]- Preston, S., Jabbar, A., Nowell, C., Joachim, A., Ruttkowski, B., Baell, J., & Jex, A. R. (2015). Low cost whole-organism screening of compounds for anthelmintic activity. *International Journal for Parasitology*, 45(5), 333-343.
- [17]- Boisvenue, R. J., Emmick, T. L., & Galloway, R. B. (1977). *Haemonchus contortus*: Effects of compounds with juvenile hormone activity on the in vitro development of infective larvae. *Experimental Parasitology*, 42(1), 67-72.
- [18]- Hall, C. A., Campbell, N. J., & Richardson, N. J. (1978). Levels of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* recorded from an egg hatch test procedure. *Research in Veterinary Science*, 25(3), 360.
- [19]- Várady, M., Čudeková, P., & Čorba, J. (2007). In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), 104-110.
- [20]- O'Grady, J., & Kotze, A. C. (2004). *Haemonchus contortus*: in vitro drug screening assays with the adult life stage. *Experimental Parasitology*, 106(3-4), 164-172.
- [21]- Adamu, M., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2013). Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *BioMed Central Veterinary Research*, 9(1), 1-9.
- [22]- Wolstenholme, A. J., & Rogers, A. T. (2006). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(supplement 1), 85-95.
- [23]- Kohler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31, 336-345.
- [24]- Atkinson, C., Newsam, R. J., & Gull, K. (1980). Influence of the antimicrotubule agent, mebendazole, on the secretory activity of intestinal cells of *Ascaridia galli*. *Protoplasma*, 105(1-2), 69-76.
- [25]- Jenkins, D. C., Armitage, R., & Carrington, T. S. (1980). A new primary screening test for anthelmintics utilizing the parasitic stages of *Nippostrongylus brasiliensis*, in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63(3), 261-269.

[26]- Mendina, P. (2009). Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. (Tesis Doctoral). Facultad de Química, Universidad de la Republica.

CAPÍTULO 3

Instalación de un bioensayo blanco-guiado para la comprensión del posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados

Introducción	pág. 121
Metodología	pág. 127
Discusión de resultados	pág. 133
Conclusiones	pág. 144
Bibliografía	pág. 146

INTRODUCCIÓN

La identificación del mecanismo de acción de un compuesto activo o una familia de compuestos activos, resulta de gran utilidad en el proceso de desarrollo de un fármaco. El conocimiento del blanco molecular, así como el sitio de unión al ligando, y las posibles interacciones entre ambos, permite direccionar las etapas de modulación química en el diseño de nuevas moléculas, con el fin de optimizar los perfiles farmacodinámicos y/o farmacocinéticos.

La identificación del blanco de acción es una tarea para nada simple, que involucra la aplicación de diversas metodologías complementarias, basadas principalmente en enfoques bioquímicos, genéticos, y computacionales [1]. En este capítulo buscamos ahondar en la comprensión del mecanismo de acción de los nuevos compuestos activos, sintetizados en el marco de la presente tesis, mediante la aplicación de un ensayo *in vitro* blanco guiado.

El blanco molecular utilizado en los estudios *in vitro* fue elegido teniendo en cuenta el mecanismo de acción del precursor estructural benzimidazólico, dada la relevancia que este dominio estructural parece tener en la actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos, lo que se expuso en el *capítulo 2*. El mecanismo de acción de los antihelmínticos benzimidazólicos, como ya fuera mencionado, consiste en la alteración del proceso de formación de microtúbulos, inhibiendo la polimerización de tubulinas [2]. En este sentido, se pretendió instalar un ensayo *in vitro* de polimerización de tubulinas, basado en la turbidimetría, por adaptación del método original reportado por Shelanski et al., y Lee et al. [3, 4], sobre el cual profundizaremos a continuación.

Los microtúbulos son biopolímeros constituyentes del citoesqueleto celular, formados por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la α tubulina y β tubulina [5]. Estas estructuras cumplen funciones esenciales a nivel celular, participando en procesos fundamentales como en el transporte intracelular, división y movimiento celular. Su importancia a nivel molecular los convierte en blancos atractivos, que han sido explotados para el diseño de diversas clases de fármacos como antineoplásicos [6], antihelmínticos [7], o antiprotozoarios [8].

El proceso de polimerización es un fenómeno de equilibrio dinámico, en el que se alternan fases de polimerización y crecimiento de microtúbulos, y fases de despolimerización y

contracción de microtúbulos [5]. Este dinamismo es la base para poder ejercer sus funciones en la célula. El proceso de polimerización está además regulado por una compleja maquinaria enzimática que coordina su funcionamiento acorde a las necesidades celulares. El nucleótido GTP también cumple un rol fundamental en este proceso; se encuentra unido a los dímeros de tubulina, y facilita su ensamblaje al microtúbulo en crecimiento. Su hidrólisis a GDP, desestabiliza la polimerización, promoviendo los eventos de despolimerización. En la *figura 1* se esquematiza el fenómeno de equilibrio dinámico de los microtúbulos.

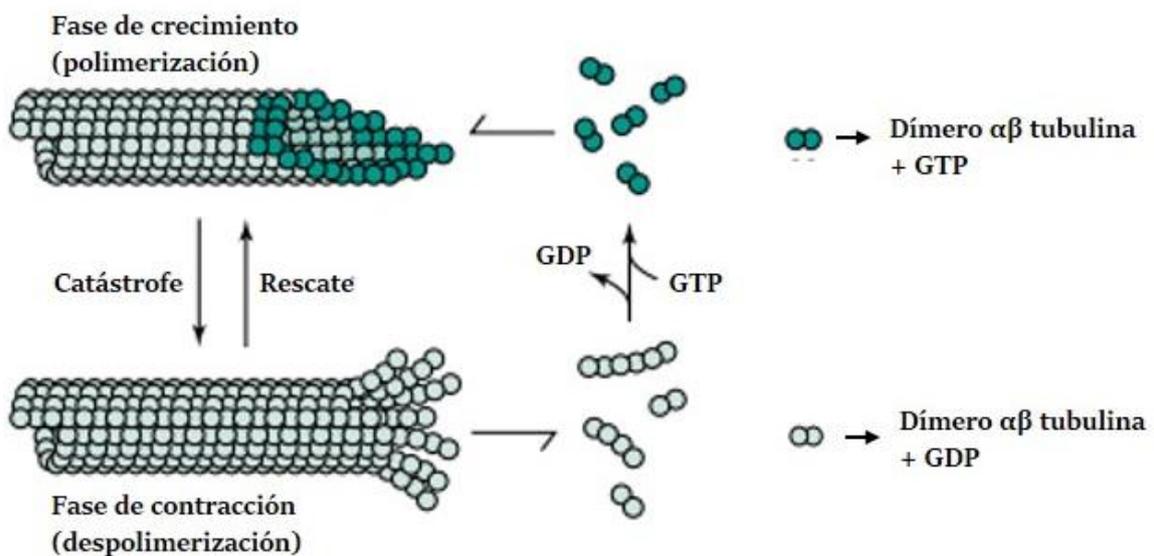


Figura 1. Proceso de equilibrio dinámico de los microtúbulos. El crecimiento y contracción de los microtúbulos ocurre debido a la alternancia entre la polimerización y despolimerización de los dímeros de $\alpha\beta$ tubulina, en el extremo final de los microtúbulos. Los dímeros de $\alpha\beta$ tubulina unidos a GTP (mostrados en verde) se unen al extremo del filamento en crecimiento. El GTP es hidrolizado a GDP, un vez que el dímero es incorporado al microtúbulo. En la fase de despolimerización se liberan dímeros de $\alpha\beta$ tubulina unidos a GDP (mostrados en blanco). La transición desde la fase de crecimiento hacia la fase de contracción se denomina catástrofe, mientras que la transición opuesta se denomina rescate.

Wisenberg y colaboradores lograron por primera vez en 1972, polimerizar en condiciones *in vitro*, tubulinas aisladas a partir de cerebro de ratas [9]. En esta publicación se establecieron las condiciones fundamentales para llevar a cabo el proceso de polimerización *in vitro*, que implicaban la presencia de GTP, Mg²⁺ y quelantes de calcio, en el buffer de trabajo. Por otra parte se estableció la dependencia del proceso de polimerización con la temperatura. Las tubulinas polimerizaban por encima de 35°, y se despolimerizaban de forma reversible a temperaturas cercanas a 0°. La constatación de la formación de microtúbulos la realizaron mediante microscopía electrónica.

En los trabajos de Shelanski et al., y Lee et al. [3, 4] se modificó la metodología descrita por Wisenberg, incorporando potenciadores de la polimerización, como sacarosa o glicerol, los cuales aumentaban la estabilidad y rapidez del proceso de polimerización. Por otra parte, modificaron el sistema de detección de microtúbulos, utilizando un método turbidimétrico, que se basa en la capacidad que tienen los microtúbulos de dispersar la luz. De esta forma, el proceso de polimerización pudo ser seguido de forma dinámica, mediante la medida concomitante de la dispersión óptica, cuyo valor es proporcional a la masa de microtúbulos formada. Estas modificaciones dieron lugar a una modalidad de ensayo *in vitro*, que ha sido de gran utilidad, tanto en los estudios para comprender el mecanismo de la polimerización [10, 11], como en la búsqueda de nuevos fármacos que actúen sobre las tubulinas [12, 13].

Un detalle importante, es el origen de las tubulinas que son utilizadas en el ensayo *in vitro*. A pesar de que las tubulinas son proteínas muy conservadas dentro de los organismos eucariotas, existen diferencias en las secuencias primarias y en las modificaciones postraduccionales, que modulan su funcionamiento, y además pueden modificar su susceptibilidad a fármacos [14, 15].

En el presente capítulo presentamos la implementación del ensayo *in vitro* de polimerización, trabajando con tubulinas de dos orígenes distintos. Por un lado utilizamos tubulinas de origen mamífero, obtenidas a partir de cerebro porcino, las cuales están disponibles comercialmente. Las tubulinas son un insumo esencial para la realización del ensayo, por lo cual contar con disponibilidad de este material biológico, significa una

ventaja para poder poner a punto la metodología y darle continuidad a los ensayos de actividad.

Por otra parte buscamos realizar el ensayo de polimerización, trabajando con tubulinas procedentes de helmintos parásitos. Sin lugar a dudas este sería el escenario óptimo para la realización del ensayo, ya que estaríamos evaluando la interacción molecular de los nuevos compuestos, con un blanco biológico de origen parasitario, minimizando las diferencias de susceptibilidad.

La desventaja de esta estrategia, radica en la dificultad para obtener tubulinas procedentes de helmintos. Las mismas no están disponibles comercialmente, y dada su baja concentración en el material parasitario, resulta poco viable la aplicación de técnicas clásicas de purificación [16]. Estas metodologías se basan en ciclos de polimerización y sedimentación de microtúbulos, y han sido exitosas principalmente trabajando con cerebros de mamíferos, dada la abundancia de las tubulinas en estos tejidos [17], lo que permite su polimerización en los extractos crudos.

En este sentido hemos utilizado una novedosa metodología, basada en el principio de cromatografía de afinidad, la cual se describe a continuación.

Este trabajo fue realizado colaborando con la Dra. Beatriz Munguía, en el marco de un proyecto de investigación de nuestro grupo de trabajo. Dicho proyecto se realizó en colaboración con la Dra. Mónica Marín (Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR), cuyo laboratorio, instalaciones y equipamiento puso a disposición para la realización del mismo.

Purificación de tubulinas de helmintos.

Como mencionáramos anteriormente, contar con tubulinas nativas del organismo en estudio, supone una ventaja a la hora de realizar ensayos *in vitro* de polimerización, pudiendo arrojar resultados más representativos del problema abordado. Los estudios de polimerización, requieren grandes cantidades de tubulinas, lo que se detalla en la sección *metodología*. Esto ha limitado la aplicación de ensayos de polimerización trabajando con material de origen parasitario, sobre todo teniendo en cuenta la dificultad para aislar

tubulinas a partir de estos organismos, donde hay una baja concentración de estas proteínas a nivel celular.

Widlund y colaboradores desarrollaron una novedosa cromatografía de afinidad, que les permitió aislar tubulinas de diversos organismos, como levaduras, insectos, helmintos y mamíferos, arrojando resultados promisorios [18]. Nuestro grupo de trabajo ha implementado esta técnica cromatográfica [19] trabajando con dos especies de helmintos: el nematodo *Haemonchus contortus*, el cual es un parásito ovino de interés productivo, y ha sido utilizado para el modelo *in vitro* fisiología guiado de actividad antihelmíntica, que hemos instalado en el laboratorio para la búsqueda de nuevos compuestos; y el cestodo *Mesocestoides Vogae*, parásito murino, utilizado como modelo biológico para el estudio de helmintos, que tiene la ventaja de proporcionar gran cantidad de material biológico, y su ciclo de vida puede desarrollarse en el laboratorio, mediante infección artificial en ratones.

La metodología de purificación desarrollada por Willund [18] se basa en la afinidad de unión entre un grupo de proteínas denominadas MAP (microtubule associated proteins) y los microtubulos. Las MAPs son un vasto grupo de proteínas presentes en todos los organismos eucariotas, que se encargan de regular el funcionamiento de los microtúbulos en las células. Particularmente la familia MAP215/Dis 1, cumple la función de facilitar la unión de los dímeros de $\alpha\beta$ tubulina en la fase de crecimiento de microtúbulos. La unión con las tubulinas ocurre de forma no covalente, a través de un dominio proteico característico, denominado dominio TOG (Tumor Overexpressed Gene). La estrategia utilizada consiste en expresar, de forma recombinante, el dominio TOG, e inmovilizarlo en un matriz, de forma de construir una columna de afinidad para purificar tubulinas.

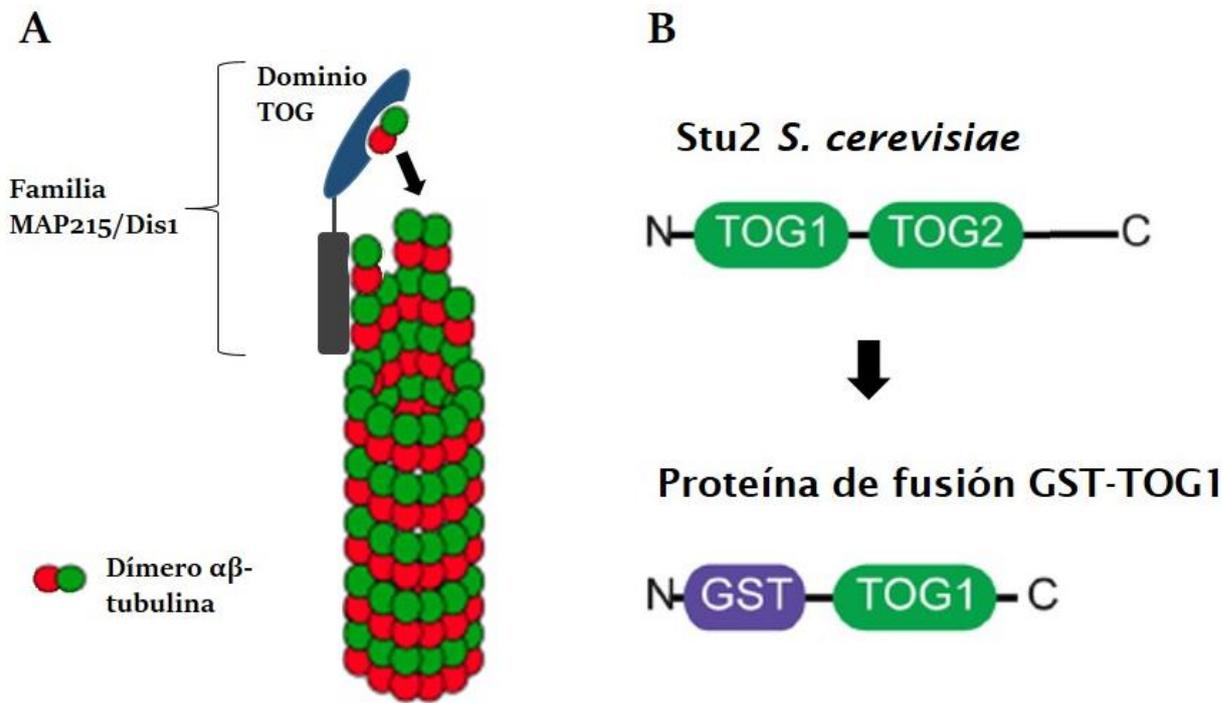


Figura 2. A) Esquema del funcionamiento de la familia de proteínas MAP215/Dis1. Este grupo de proteínas facilita la unión de los dímeros de tubulina al microtúbulo en crecimiento. La unión a las tubulinas ocurre a través dominios proteicos característicos, denominados TOG. B) Margen superior: proteína Stu2 de *S.cerevisiae*. Margen inferior: proteína de fusión GST-TOG1 utilizada para construir la columna de afinidad.

Particularmente se utiliza el dominio TOG1 perteneciente a la proteína MAP STU2 (una variante de la familia MAP215/Dis1, presente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*). Este dominio proteico es expresado de forma recombinante en *Escherichia coli*, como proteína de fusión, unido a la enzima Glutación S- Transferasa (GST) (Figura 2B). La proteína de fusión es purificada e inmovilizada covalentemente en una columna con matriz de agarosa modificada. Los extractos parasitarios son purificados en la columna, quedando retenidos los dímeros de tubulina, los cuales son eluidos posteriormente mediante modificación de las concentraciones salinas.

METODOLOGÍA

Ensayo de polimerización de tubulinas de origen porcino

El ensayo de polimerización de tubulinas fue llevado a cabo utilizando el kit comercial Tubulin Polymerization Assay Kit BK006P (Cytoskeleton, Denver, CO), acorde a las instrucciones del fabricante [20]. Se preparó una solución de tubulinas de origen porcino, purificadas (> 99% de pureza), en 100 µL de una solución buffer conteniendo 80 mM ácido 1,4-Piperazindietanosulfónico [PIPES], 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP y 10% glicerol, pH 6.9. Se utilizaron 300 µg de tubulinas, alcanzando una concentración final de 3 mg/mL. La solución se preparó a 4° C, e inmediatamente fue transferida a una placa de 96 pozos, precalentada a 37° C, la cual contenía 10 µL de la solución del compuesto a ensayar o de solución control. Los compuestos a ensayar se diluyeron en una solución buffer conteniendo 80 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA y 5% de DMSO. La solución de control consistió en el buffer de disolución de compuestos. Se midió la absorbancia de la placa a 340 nm y 37°C, utilizando el lector de placa multimodo Synergy HTX (BioTek Instruments), durante 60 minutos.

Purificación de tubulinas de *M. vogae* y *H. contortus* mediante cromatografía de afinidad TOG

Producción recombinante de la proteína GST-TOG1

El dominio TOG1 de la proteína MAP STU2 de *S. cerevisiae* fusionado a la proteína GST fue expresado en *E. coli*, acorde a Widlund et al., 2012 [18] con modificaciones menores. El plásmido pGEX-6P-1 Stu2 1-306 (Addgene plasmid #38315) fue utilizado para transformar la cepa Rosetta, de *E. coli*. Se cultivó la cepa transformada en 50 mL de medio de cultivo Terrific Broth (TB), conteniendo ampicilina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL), durante toda la noche, con agitación, a 37°C y 200 rpm. 15 mL del cultivo anterior fueron transferidos a 185 mL de TB, conteniendo los mismos antibióticos, con agitación, a 37°C y 200 rpm. Una vez alcanzado un valor de densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.5, se modificó la temperatura a 18°C, y se indujo la expresión de GST-TOG1 con el agregado de 0.2 mM Isopropil-b-D-tiogalactósido (IPTG). Se deja agitando toda la noche, a 18°C y 200 rpm. La biomasa formada se sedimentó por centrifugación (6300g, 15 minutos a 4°C). El pellet formado se resuspendió en 2X buffer fosfato salino (2X PBS:

NaCl 274 mM, Na₂HPO₄ 16.2 mM, KCl 5.4 mM, KH₂PO₄ 3 mM, pH 7.4), conteniendo 0.5 mM de ditioneitol (DTT), coctel inhibidor de proteasa (Complete EDTA-free, Roche) y 5 mg/mL DNAsa. Las células se lisaron utilizando homogeneizador de ultrasonido Sonic Ruptor 250, Omni International (4 ciclos de 10 minutos, 40% amplitud, 40 % pulser) y el lisado fue clarificado por centrifugación (27000g, 15 minutos, 4°C). La fracción soluble se introdujo en una columna de Glutación-Agarosa (Glutathione-Sepharose 4B, GE HealthCare, tamaño 1 mL), pre equilibrada con 10 mL de buffer 2X PBS, conteniendo 0.5 mM DTT (buffer de lavado), y se dejó incubando toda la noche a 4°C. La columna fue lavada con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 1% de Tween 20, y se realizó la elución de la proteína GST-TOG1 con 10 mL de buffer 2XPBS pH8, conteniendo 0.5 mM DTT y 5 mM de glutatión reducido. Se realizó cambio de buffer para una solución conteniendo 100 mM NaHCO₃ y 100 mM NaCl, utilizado una columna de exclusión molecular PD10 (PD10 desalting columns GE Healthcare, Suecia).

Preparación de columna de afinidad TOG1

La columna de afinidad TOG1 se preparó inmovilizando la proteína de fusión GST-TOG1 a una columna de resina de agarosa activada con N-hidroxisuccinimida (NHS) (HiTrap NHS-activated HP, GE Healthcare, 1 mL). Previo a realizar la inmovilización, se agregó MgCl₂ a la solución conteniendo la proteína de fusión GST-TOG1, alcanzando una concentración final de 80 mM MgCl₂, 100 mM NaHCO₃ y 100 mM NaCl. La columna se activa, previo a la inmovilización, mediante el lavado con 6 mL de solución helada de HCl 1 mM (velocidad de flujo: 1 mL/min.). La inmovilización se realiza mediante la recirculación de la solución conteniendo la proteína de fusión, durante 3 horas, a 4° C (velocidad de flujo: 1 mL/min.). El percolado se conservó para posterior evaluación de la eficiencia de la inmovilización (para la cuantificación proteica el buffer se cambia a una solución conteniendo 100 mM NaHCO₃ y 100 mM NaCl, utilizado una columna de exclusión molecular PD10). Los grupos NHS sin reaccionar se bloquean incubando la resina por 30 minutos, a temperatura ambiente, con 10 mL de una solución conteniendo 0.5 M etanolamina y 0.5 M NaCl, pH 8.3. Posteriormente la columna se lava con 6 mL de buffer 6X PBS, 6 mL de buffer 1X PBS y 6 mL de buffer 1X PBS conteniendo 50% glicerol (solución de almacenamiento).

Preparación de muestra de M.vogae

El mantenimiento de la infección de *M.vogae* y la recuperación de especímenes en el estadio larvario tetrathyridia (TT), se realizó acorde a la metodología reportada previamente por nuestro grupo de investigación [21, 22]. El protocolo de experimentación (N° 02-05-10) se encuentra regulado por la ley N° 18611 (procedimientos para la utilización de animales en actividades de investigación científica), y está aprobado por la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA) de Facultad de Química-UdelaR. Las larvas de *M.vogae* TT se lavaron con buffer BRB80 (80 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 6.9). Posteriormente las larvas TT se suspendieron en igual volumen de buffer BRB80, conteniendo coctel inhibidor de proteasa (Complete EDTA-free, Roche) y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). La suspensión se congeló con nitrógeno líquido y se molió en mortero, hasta lograr un polvo fino y homogéneo. Se dejó descongelar el polvo en baño de hielo, y se clarificó la solución mediante centrifugación (20600g, 15 minutos, 4° C). El sobrenadante se filtró utilizando una membrana de celulosa de 0.45 µm, y se reservó en baño de hielo hasta su posterior purificación en la columna de afinidad TOG1.

Preparación de muestra de H.contortus

La obtención de ejemplares adultos de *H.contortus* fue realizada acorde a lo ya descrito en la sección *metodología, capítulo 2*, de la presente tesis. Una vez extraídos, los gusanos fueron lavados con buffer PBS y luego buffer BRB80. Posteriormente se suspendieron en igual volumen de buffer BRB80 conteniendo 1 mM DTT, 10 mM EDTA, 100 µM leupeptina y 1.25 µM pepstatina A. La suspensión se congeló con nitrógeno líquido y se molió en mortero, hasta lograr un polvo fino y homogéneo. Se dejó descongelar el polvo en baño de hielo, y se clarificó la solución mediante centrifugación (20600g, 15 minutos, 4° C). El sobrenadante se filtró utilizando una membrana de celulosa de 0.45 µm, y se reservó en baño de hielo hasta su posterior purificación en la columna de afinidad TOG1.

Purificación de tubulinas

La purificación se llevó a cabo a 4° C. La columna de afinidad TOG1 fue previamente equilibrada con 10 mL de buffer BRB80 (velocidad de flujo 0.5 mL/min.). Posteriormente se sembraron las muestras procesadas de *M. vogae* y *H. contortus* (0.5 mL/min.). A continuación se realizó un lavado con 4 mL de buffer BRB80 conteniendo 0.1 mM Mg²⁺ GTP (0.5 mL/min), el cual es recolectado junto con el percolado. El segundo lavado se realizó con 10 mL de buffer BRB80 conteniendo 0.01 mM Mg²⁺ GTP (cambiando el flujo a 1 mL/min). La elución de las tubulinas se realizó con 5 mL de buffer BRB80 conteniendo 0.01 mM Mg²⁺ GTP y 500 mM (NH₄)₂SO₄. Rápidamente se hizo un desalado del eluato con el buffer BRB80 conteniendo 0.01 mM Mg²⁺ GTP, utilizando una columna de exclusión molecular PD10. La solución obtenida se concentró utilizando filtros para centrífuga (Microsep Advance Centrifugal Devices, Pall Corporation, punto de corte 3 KDa) La columna se regeneró lavando con 6 mL de buffer 10X PBS y 6 mL de buffer 1X PBS, y se almacenó en buffer 1X PBS conteniendo 50% de glicerol, a -20° C.

SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) [23], trabajando con concentraciones de acrilamida de 8% y 10%, utilizando como método de tinción el azul de Coomassie. Para realizar el *Western blot* [24], los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare), mediante transferencia húmeda (400 mA, 1.5 h, 4° C). La membrana se mantuvo en buffer de bloqueo (5% de leche descremada en solución buffer tris conteniendo tween 20 (TBST)), durante toda la noche, a 4° C. Posteriormente la membrana se incubó con anticuerpos anti α tubulina (anticuerpo monoclonal AA4.3, DSHB, Universidad de Iowa) dilución 1:73 en buffer de bloqueo, durante 1h, a temperatura ambiente, con agitación. Se realizaron sucesivos lavados con TBST y se incubó con anticuerpos secundarios *goat anti mouse* (SC-2005, Santa Cruz), dilución 1:2000 en buffer de bloqueo, durante 1h, a temperatura ambiente, con agitación. El revelado se realizó utilizando el reactivo Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). Las proteínas reactivas se

visualizaron utilizando el analizador G-Box (SynGene, Synoptics Ltd.). Las imágenes digitales fueron procesadas utilizando el software GeneTools Software (Syngene, Synoptics Ltd).

Cuantificación proteica

La cuantificación proteica fue realizada aplicando el método del Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando el kit comercial BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific).

Espectrometría de masas

Las bandas de proteínas seleccionadas en los geles de SDS-PAGE, fueron recortadas y digeridas con tripsina (Sequence Grade, Promega), durante toda la noche a 37° C. El espectro de masas de los péptidos resultantes fue adquirido en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems), en el laboratorio de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur Montevideo. Las proteínas fueron identificadas utilizando las bases de datos NCBI nr y <http://parasite.wormbase.org/index.html>, utilizando el software de búsqueda Mascot search engine (Matrix Science), con los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de masa isotópica 0.08 Da; tolerancia de masa de fragmento 0.40 Da, tolerancia de un clivaje triptico faltante.

*Polimerización de tubulinas de *M.vogae**

Se prepararon 100 µL de una solución de tubulinas de *M.vogae*, en solución buffer conteniendo 80 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP y 10% glicerol, pH 6.9. Se utilizaron 200 µg de tubulinas, alcanzando una concentración final de 2 mg/mL. La solución fue preparada a 4° C, e inmediatamente transferida a una placa de 96 pozos, precalentada a 37° C, la cual contenía 10 µL de una solución de paclitaxel 100 mM disuelto en una solución buffer conteniendo 80 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA y 5% de DMSO. Se midió la absorbancia de la placa a 340 nm y 37°C, utilizando el lector

de placa multimodo Synergy HTX (BioTek Instruments), realizando una lectura por 1 minuto, durante 60 minutos.

Ensayo de sedimentación de tubulinas de M.vogae.

Luego de finalizar el ensayo de polimerización de tubulinas de *M.vogae*, el contenido del pocillo de la placa (100 μ L), fue transferido a un tubo Eppendorf y centrifugado (20.000g, 45 minutos, 35° C). Se retiró el sobrenadante y el pellet se reconstituyó en 100 μ L de solución buffer conteniendo 80 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA y 0.5% DMSO. Se realizó cuantificación proteica del sobrenadante y del pellet reconstituido.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ensayo de polimerización de tubulinas de origen porcino

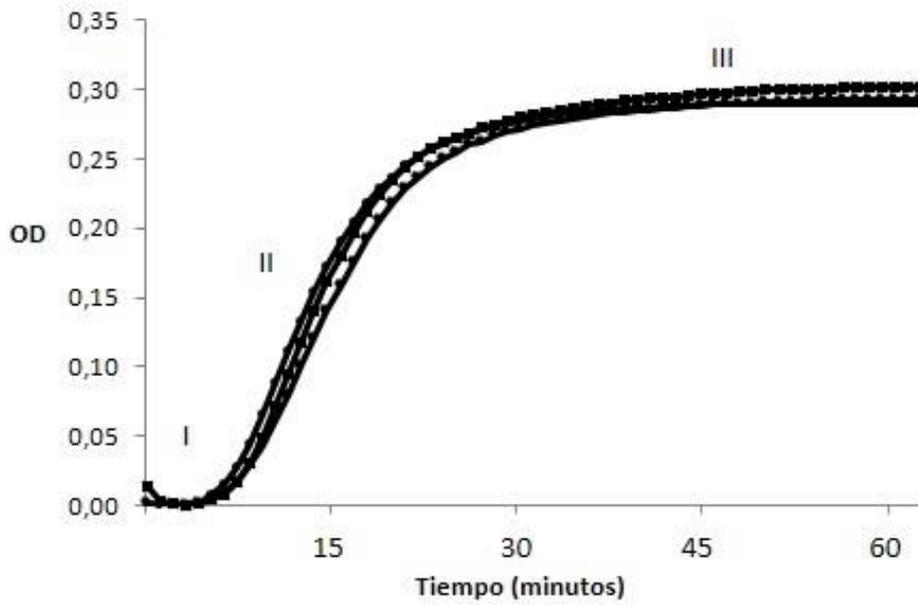
En esta etapa se implementó el ensayo de polimerización de tubulinas, trabajando con tubulinas de origen porcino, disponibles comercialmente. El objetivo principal de esta instancia era poner a punto la metodología para la realización del ensayo *in vitro* de polimerización. Por otra parte, era de interés poder evaluar el efecto de determinados compuestos sobre el proceso de polimerización, a pesar de estar trabajando con un blanco molecular de origen mamífero.

Como explicáramos en la introducción, el ensayo se basa en la capacidad que tienen los microtúbulos de dispersar la luz, de forma proporcional a la masa de polímero formada. Las tubulinas son sometidas a condiciones *in vitro* de polimerización, y la dispersión óptica (OD) es medida concomitantemente al proceso. Como resultado se construye una curva de polimerización, graficando los valores de OD en función del tiempo.

En la *figura 3A* se muestran tres réplicas independientes de curvas de polimerización control, obtenidas en nuestro laboratorio, utilizando el kit comercial de tubulinas porcinas. La curva muestra un perfil sigmoideo, en el que se pueden identificar las tres fases del proceso de polimerización, indicadas en el gráfico: fase I= **nucleación** (es una fase de lenta velocidad de polimerización, en la que se forman pequeños polímeros que servirán de núcleos para el ensamble de los microtúbulos); fase II= **crecimiento** (corresponde a una fase de rápida velocidad de polimerización, en la que se observa un gran crecimiento en la masa microtúbulos formada); fase III= **estado estacionario** (la velocidades de polimerización y despolimerización se igualan, manteniendo constante la masa de microtúbulos formada).

De este modo, los compuestos que tengan la capacidad de interferir con el proceso de polimerización, alterarán el perfil característico de la curva. En la *figura 3B* se muestra el gráfico obtenido, cuando se realizó el ensayo de polimerización, agregando fármacos patrones, cuya actividad sobre los microtúbulos está reportada. Por un lado, utilizamos el antihelmíntico comercial albendazol, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la polimerización de tubulinas [3]. Su efecto en la curva se traduce en una disminución, tanto en la velocidad de polimerización, como en el valor de OD máximo alcanzado en el estado estacionario.

A



B

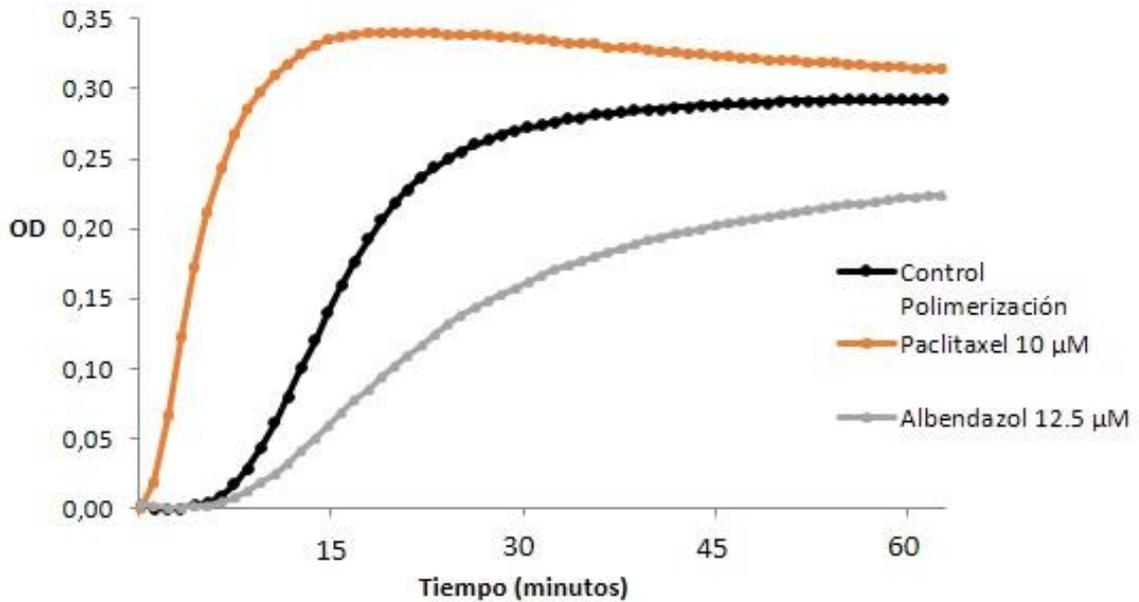


Figura 3. Curvas de polimerización de tubulinas. **A)** réplicas independientes de curvas de polimerización control. Se indican las tres fases del proceso de polimerización: fase I= nucleación, fase II= crecimiento, fase III= estado estacionario. **B)** Perfiles de curvas de polimerización con el agregado de fármacos que interfieren con el proceso de polimerización de tubulinas: Albendazol 12.5 µM, Paclitaxel 10 µM. Se incluye además un control de polimerización.

Por otra parte, el equilibrio dinámico de formación de microtúbulos, puede ser afectado por compuestos que estabilicen de forma anormal el proceso de polimerización, como es el caso del fármaco antineoplásico paclitaxel [25]. En la *figura 3B*, observamos que la presencia de paclitaxel elimina la fase nucleación, generando un aumento notorio en la velocidad de polimerización en la fase de crecimiento.

Una vez puesta a punto la metodología, se realizó el ensayo de polimerización evaluando los compuestos que habían presentado actividad antihelmíntica en el ensayo de screening detallado en el *capítulo 2* (compuestos 1a, 10, 15 y 17). Se incluyeron un control de polimerización, y los patrones activos albendazol y paclitaxel. En la *figura 4* se muestran las curvas de polimerización obtenidas.

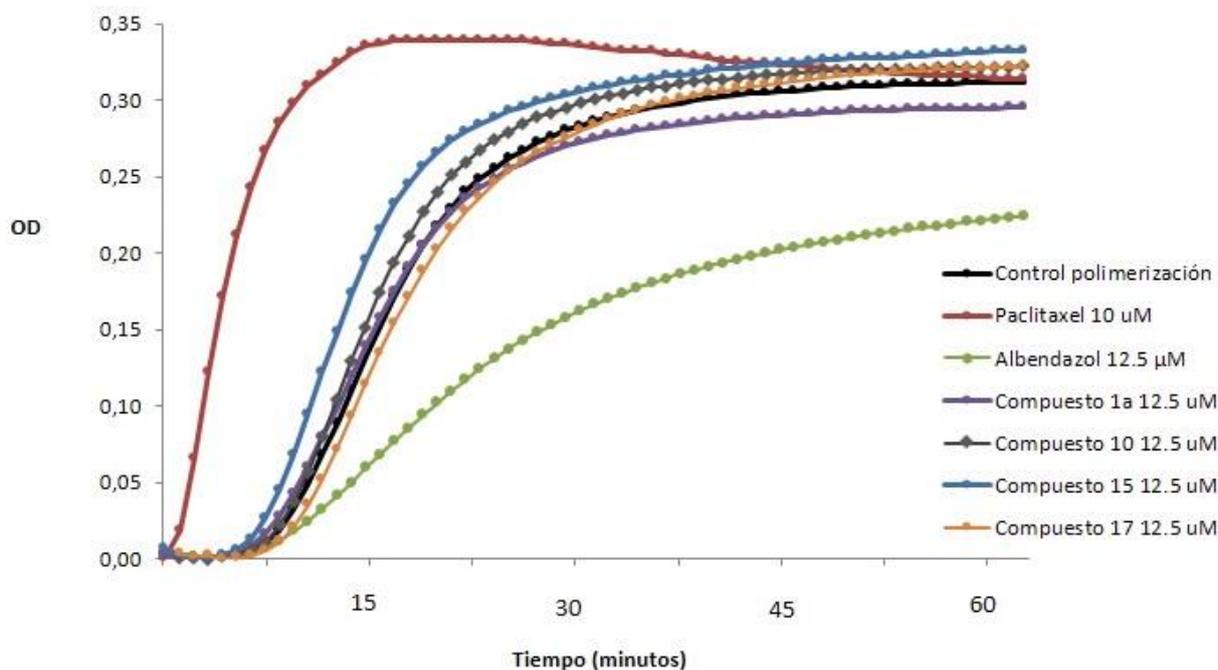


Figura 4. Ensayo de polimerización de tubulinas. Se ensayaron los compuestos 1a, 10, 15 y 17, los cuales habían presentado actividad antihelmíntica contra *H.contortus*. Además se incluyeron un control de polimerización, y los patrones activos albendazol y paclitaxel.

La evaluación de los gráficos se realiza de forma cualitativa, y cuantitativa, a través del cálculo de tres parámetros: 1) La velocidad máxima de polimerización (**V_{max}**), obtenida a partir del valor máximo de pendiente observado en el gráfico. 2) El tiempo al que ocurre V_{max}, denominado **T_{max}**. 3) El porcentaje de polimerización (**% Pol.**), definido como el cociente entre el valor de OD final para una muestra, y el valor de OD final para el control de polimerización. Este último parámetro está relacionado con la cantidad total de microtúbulos formados. Los parámetros de evaluación obtenidos en el ensayo de polimerización se muestran en la *tabla 1*

Tabla 1. Parámetros de evaluación de las curvas de polimerización, mostradas en la *figura 4*.

Compuesto	V_{máx.} (mOD/minuto)	T_{máx.} (minutos)	% Pol.
Control de polimerización	22	12.5	100
Albendazol 12.5 μ M	10	13.5	72
Paclitaxel 10 μ M	56	2.5	100
1a	21	12.5	95
10	25	12.5	103
15	28	10.5	106
17	22	12.5	103

Analizando los resultados obtenidos podemos destacar en primera instancia, el efecto de los patrones activos en el proceso de polimerización, lo que coincide con lo observado en la puesta a punto de la metodología (*Figura 3B*). El paclitaxel elimina la fase de nucleación, debido a un aumento significativo de la velocidad polimerización. Como resultado la V_{max} obtenida es de mayor magnitud (56 mOD/min), y ocurre a tiempos menores (2.5 minutos), en comparación con el control de polimerización. Por otra parte no se observan cambios en el porcentaje de polimerización. El albendazol en cambio, inhibe la polimerización de tubulinas, lo cual se traduce en una disminución de la velocidad de polimerización (V_{máx.}= 10 mOD/min), y una menor masa total de microtúbulos formados (% Pol.= 72%).

Finalmente, considerando los compuestos 1a, 10, 15 y 17, el análisis cualitativo del gráfico en conjunto con los parámetros calculados, sugieren fuertemente que dichos compuestos presentan un comportamiento similar al control de polimerización. En las condiciones ensayadas, ninguno de los compuestos interferiría con la polimerización de tubulinas porcinas.

Cabe señalar que los benzimidazoles antihelmínticos presentan mayor afinidad de unión a las tubulinas de parásitos helmintos, en comparación con las tubulinas de origen mamífero [26], lo que explicaría la mayor selectividad de acción farmacológica de estos compuestos, y por ende su aplicación comercial como antihelmínticos. Como consecuencia, el ensayo podría presentar resultados falsos negativos, cuando se trabaja con compuestos selectivos por tubulinas de origen parásito. En este sentido, se buscó aislar tubulinas nativas de helmintos, con el objetivo de utilizarlas en el ensayo de polimerización. Los resultados de esta etapa se exponen a continuación.

Purificación de tubulinas de *M. vogae* y *H. contortus* mediante cromatografía de afinidad TOG

En esta instancia se buscó purificar tubulinas nativas de helmintos parásitos, mediante la aplicación de una novedosa cromatografía de afinidad, basada en los fenómenos de interacción presentes entre las proteínas de la familia MAP215/Dis1 y las tubulinas, a través de los dominios proteicos TOG. La columna de afinidad se realizó mediante la expresión recombinante en *E. coli*, de una proteína de fusión, la GST-TOG1, la cual es inmovilizada en una matriz de agarosa, modificada con grupos N-hidroxisuccinimida (NHS).

Puntualmente utilizamos el dominio TOG1 de la proteína STU2 (una proteína perteneciente a la familia MAP215/Dis1, presente en *S. cerevisiae*), acorde a lo descrito en el desarrollo original de la metodología [18]. Es interesante señalar que los residuos aminoacídicos responsables de la interacción entre el dominio TOG1 de la proteína STU2, y los dímeros de tubulina, se encuentran conservados en organismos eucariotas mayores, como mamíferos y helmintos [27, 28]., lo que permitiría la utilización de este dominio en la purificación de tubulinas pertenecientes a organismos distintos de *S. cerevisiae*.

Por otra parte la fusión con la proteína GST, tiene como objetivo permitir la posterior purificación del producto de expresión, utilizando columnas de afinidad conteniendo glutatión reducido. La estrategia explora la afinidad que esta enzima presenta por el glutatión, su ligando natural.

La transformación bacteriana y la expresión de la proteína GST-TOG1 pudieron realizarse de forma satisfactoria. En la *figura 5* se muestra el análisis mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE), de las distintas fracciones del lisado bacteriano. La proteína de fusión se concentra mayoritariamente en la fracción soluble (FS), observándose una intensa banda molecular entre 55 y 70 kDa (el peso teórico de la proteína de fusión es 61.8 kDa). La purificación de la GST-TOG1 mediante cromatografía de afinidad, arrojó un rendimiento de 2.8 mg de proteína por gramo de bacteria. La proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE (ver *figura 5*) y confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF.

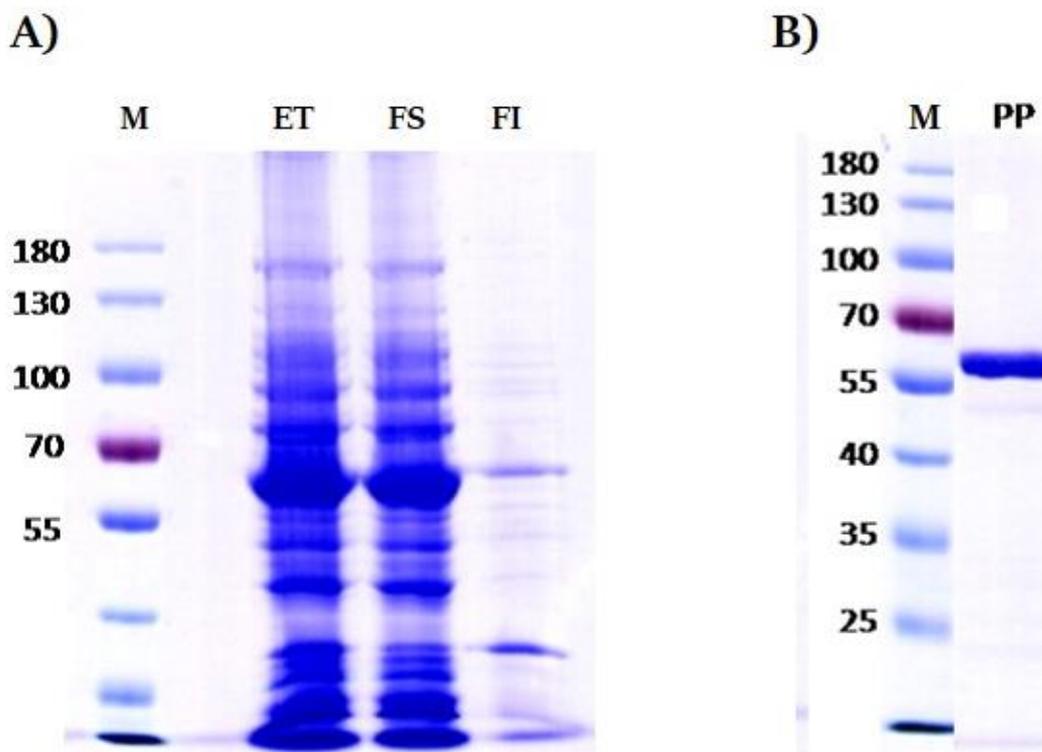


Figura 5. Expresión y purificación de GST-TOG1. A) SDS-PAGE 8% de las distintas fracciones del lisado bacteriano: extracto total (ET), fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI). B) SDS-PAGE 10% de la proteína GST-TOG1 purificada. (PP). Método de tinción: azul de Coomassie. M: Marcador de peso molecular.

La proteína de fusión se inmovilizó a la columna de agarosa activada con NHS, con una eficiencia de 70%, quedando lista para su utilización en la purificación de tubulinas. En la *figura 6* se esquematiza el proceso molecular que da lugar a la inmovilización de la proteína GST-TOG1 en la columna. Los grupos NHS se encuentran unidos a la matriz de agarosa, mediante enlaces éster, los cuales son desplazados por el ataque de grupos amino de la proteína de fusión. Como resultado la proteína queda inmovilizada mediante la formación de enlaces amida de alta estabilidad, liberándose los grupos NHS.

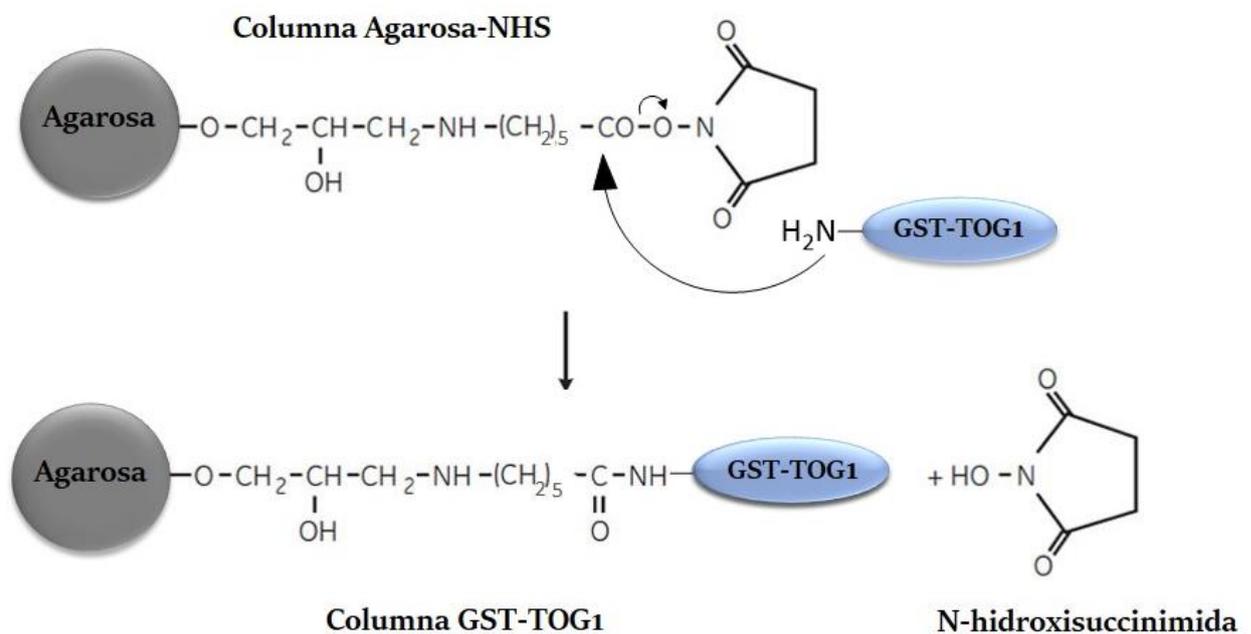


Figura 6. Inmovilización de la proteína GST-TOG1, en la columna de agarosa activada con NHS.

Posteriormente se procedió a la purificación de los extractos de helmintos parásitos. El análisis de las distintas fracciones se realizó mediante SDS-PAGE y Western blot (ver *figuras 7 y 8*). Esta última técnica permite la identificación más precisa de una proteína, debido a que la interacción está basada en el reconocimiento de anticuerpos específicos. En este caso utilizamos anticuerpos específicos para la α -tubulina. Por otra parte se realizó

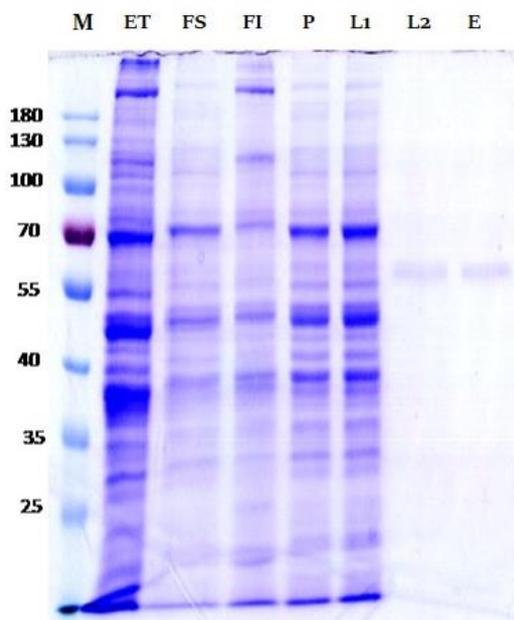
la cuantificación proteica de los distintos extractos, para evaluar los rendimientos del proceso.

Tanto en el procedimiento aplicado para *M.vogae*, como en *H.contortortus*, se observó una gran pérdida de tubulinas en el percolado y en las sucesivas etapas de lavado. Sin embargo se logró aislar tubulinas de ambos organismos, lo que se evidencia en la fracción correspondiente a la elución (eluato). En ambos casos se observa una banda en el entorno de los 55 kDa, que revela positivamente en el western blot, indicando la presencia de alfa tubulina. Es interesante resaltar, que si bien las proteínas α y β se encuentran conformando un dímero en su estado nativo, las condiciones desnaturizantes de la electroforesis, rompen las uniones entre ambas proteínas. Por este motivo el peso molecular de la banda obtenida en el eluato no corresponde al peso molecular del dímero de tubulinas, sino al de sus componentes por separado. Coincidentemente la α y β tubulina tienen un peso molecular teórico similar, aproximado a 50 kDa, en ambos organismos, por lo que ambas bandas se superponen en el gel.

La confirmación de las proteínas aisladas se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En el eluato de *M.vogae* se identificaron las proteínas α tubulina 2 y β tubulina 1, correspondientes a dicho organismo. En el eluato de *H.contortortus*, se identificó la proteína β tubulina 1 y la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) del mismo organismo. La coelución de ambas enzimas podría deberse a interacciones inespecíficas de la GDH con la columna de afinidad. Esta enzima presenta gran expresión en el estadio adulto de *H.contortortus* [29], lo que podría contribuir al fenómeno de interacción inespecífica. Curiosamente no se confirmó la presencia de α tubulina, pese a haber sido identificada mediante western blot, lo que se podría deber a una diferencia en el límite de detección de ambas técnicas.

Mediante cuantificación proteica se pudo determinar la obtención de 0.076 mg de tubulinas de *M.vogae*, en una sola utilización de la columna, a partir de una fracción soluble conteniendo 111 mg de proteínas totales. Sucesivas etapas de purificación permitieron la obtención de un total de 0.310 mg de tubulinas. Por otra parte la purificación de *H.contortortus* permitió la obtención de 0.034 mg de tubulinas, que resultaron estar impuras con la enzima GDH. El total de proteínas sembrada en este caso fue 66 mg.

A) SDS-PAGE



B) Western Blot

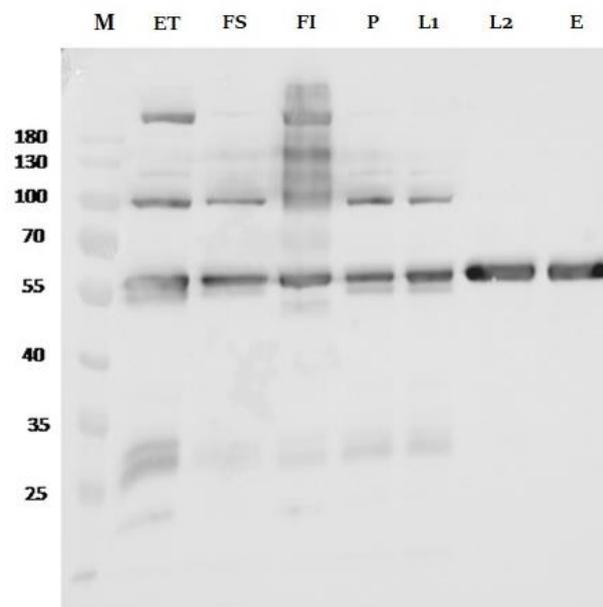
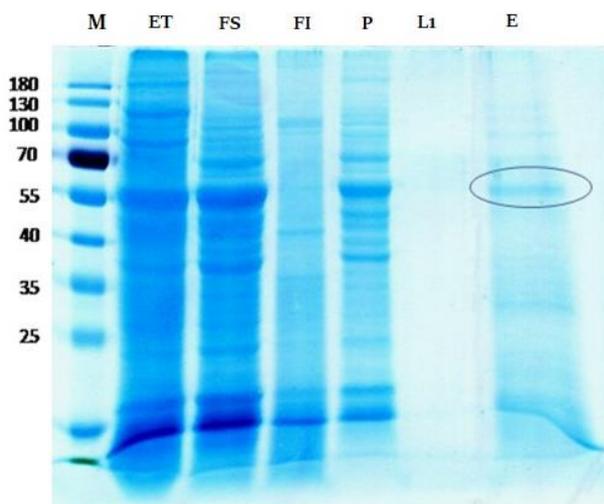


Figura 7. Purificación de tubulinas de *M.vogae*. A) SDS-PAGE 10%, tinción azul de Coomassie. B) Western blot, revelado con anticuerpo anti α tubulina. Se analizaron las siguientes fracciones: Extracto total (ET), Fracción soluble (FS), Fracción insoluble (FI), Percolado (P), Lavado 1 (L1), Lavado 2 (L2) y Eluato (E). M: marcador de peso molecular.

A) SDS-PAGE



B) Western Blot

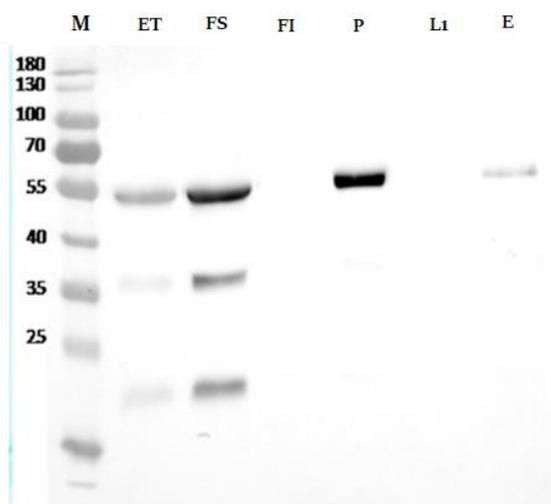


Figura 8. Purificación de tubulinas de *H.contortus*. A) SDS-PAGE 10%, tinción azul de Coomassie. B) Western blot, revelado con anticuerpo anti α tubulina. Se analizaron las siguientes fracciones: Extracto total (ET), Fracción soluble (FS), Fracción insoluble (FI), Percolado (P), Lavado 1 (L1) y Eluato (E). M: marcador de peso molecular.

Los resultados sugieren que la cromatografía de afinidad TOG no es aplicable para la obtención de tubulinas de *H.contortus*, dado que las mismas se obtienen impuras y en muy baja cantidad. Por otra parte, si bien la purificación de tubulinas de *M.vogae* fue exitosa, se obtuvo una baja cantidad de tubulinas, pese a realizar varios ciclos de purificación, lo que torna bastante laboriosa su obtención.

Ensayo de polimerización de tubulinas de *M.vogae*

En esta etapa buscamos polimerizar de forma *in vitro*, las tubulinas del cestodo *M.vogae*, obtenidas utilizando la cromatografía de afinidad TOG, como se describió en la sección anterior. Se aplicaron las condiciones de polimerización que surgieron luego de poner a punto el método utilizando tubulinas de origen porcino, con la salvedad de trabajar a una concentración de 2 mg/mL de tubulinas, dado que fue la máxima concentración que se pudo alcanzar, en vista de la cantidades de tubulinas purificadas.

En la *figura 9* se muestra la curva de polimerización obtenida a partir del ensayo realizado con tubulinas de *M.vogae*. Como podemos observar, la curva presenta un comportamiento bastante irregular, en comparación a las curvas obtenidas trabajando con tubulinas porcinas. La presencia de oscilaciones en la curva se debe a los bajos valores de OD registrados, lo que indica una menor formación de microtúbulos. La OD máxima alcanzada fue de 15 mOD, lo que correspondería a 15 µg de microtúbulos formados [20]. Considerando que se utilizaron un total de 200 µg de tubulinas el ensayo, podríamos señalar que sólo el 8% de las mismas pudieron polimerizar. Este porcentaje es bastante pequeño, si consideramos que las tubulinas porcinas alcanzan valores superiores al 90% de polimerización.

Para confirmar esta observación, se realizó un ensayo de sedimentación, luego de polimerizar las tubulinas de *M.vogae*. El ensayo se basa en la propiedad que presentan los microtúbulos cuando son sometidos a centrifugación, los cuales sedimentan formando un pellet, mientras que las tubulinas sin polimerizar permanecen en el sobrenadante [30]. De esta forma se puede cuantificar la cantidad de proteínas sedimentadas y estimar la masa de microtúbulos formada. La cuantificación proteica de pellet arrojó un total de 14 µg de microtúbulos formados, lo que coincide que los valores obtenidos observando la curva de polimerización.

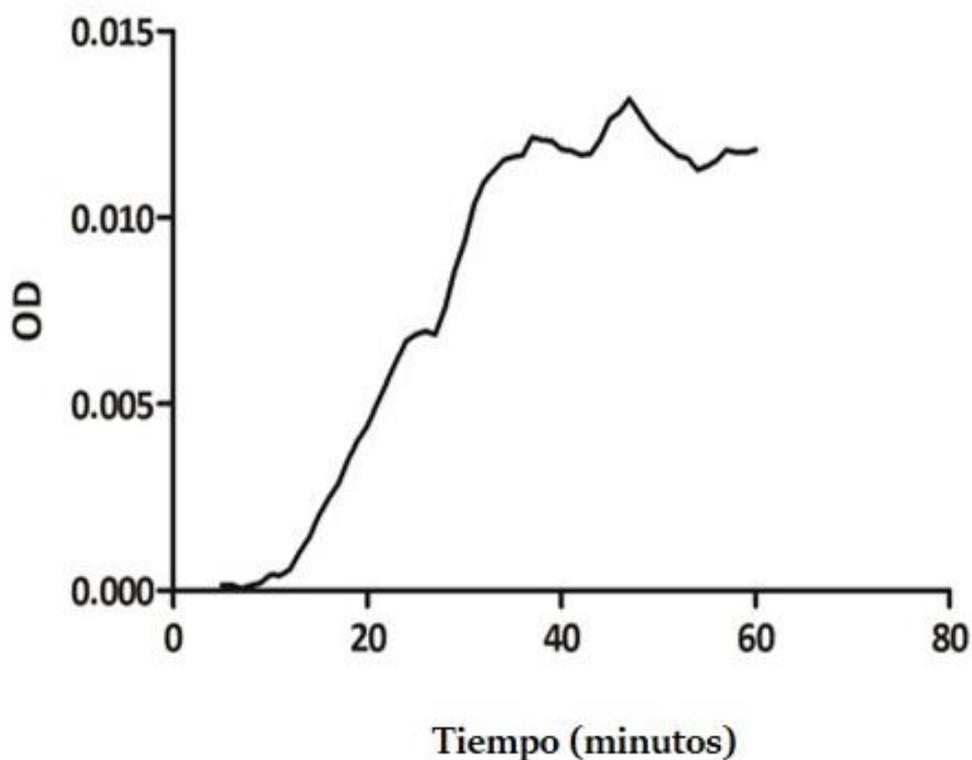


Figura 9. Ensayo de polimerización de tubulinas de *M.vogae*. El ensayo fue realizado en presencia de paclitaxel (10 μ M) para potenciar la formación de microtúbulos.

La baja cantidad de tubulinas de *M.vogae* obtenidas utilizando la cromatografía de afinidad, sumado al bajo porcentaje de funcionalidad de las mismas, sugiere que sería poco factible poder instalar un ensayo de polimerización de tubulinas, en estas condiciones. Debemos tener en cuenta además, que para la realización del ensayo se requieren en el entorno de 300 μ g de tubulinas por muestra, debiendo incluir controles positivos y negativos de polimerización, para la correcta validación del método. Si consideramos que las sucesivas etapas de purificación de tubulinas de *M.vogae*, fueron apenas suficientes para ensayar una muestra control, resulta bastante improbable lograr resultados de interés, en esta dirección. Evidentemente resulta necesario poder optimizar la metodología de purificación, o explorar metodologías alternativas, que puedan cumplir con el requisito de obtener tubulinas funcionales y en las cantidades requeridas.

CONCLUSIONES

En este capítulo se buscó trabajar en la instalación de un ensayo *in vitro* de polimerización de tubulinas, con el fin de evaluar la posible participación de este blanco molecular en el mecanismo de acción de los nuevos compuestos activos, sintetizados en la presente tesis. El abordaje se realizó pretendiendo trabajar con tubulinas de dos orígenes distintos. Por un lado, tubulinas de origen porcino disponibles comercialmente; y por otra parte, tubulinas nativas de helmintos parásitos, las cuales intentamos purificar a partir de los helmintos *M.vogae* y *H.contortus*.

La instalación del ensayo utilizando tubulinas de origen porcino, pudo realizarse de forma satisfactoria. La posibilidad de poder contar con este insumo de forma comercial, permitió disponer de las cantidades de tubulinas necesarias para poner a punto la metodología. Posteriormente se ensayaron los compuestos 1a, 10, 15 y 17. Ninguno de ellos presentó un comportamiento distinto al control de polimerización, si bien debemos considerar que los benzimidazoles antihelmínticos presentan menor afinidad por tubulinas de origen mamífero, pudiendo presentarse resultados falsos negativos en este ensayo.

La purificación de tubulinas nativas de helmintos buscó realizarse mediante la implementación de la cromatografía de afinidad TOG. La construcción de la columna de afinidad se llevó a cabo, acorde a lo descrito en el desarrollo original de la metodología. Se logró la producción recombinante de la proteína de fusión GST-TOG1, con buenos rendimientos, así como su inmovilización en columnas de agarosa-NHS.

La metodología de purificación demostró ser inadecuada para aislar tubulinas de procedentes de *H.contortus*, dado que las mismas se obtenían impurificadas con la enzima GDH, y en un muy bajo rendimiento, lo cual se constató en sucesivos experimentos realizados. La abundancia de esta enzima en el estadio adulto *H.contortus*, posiblemente influya en la interacción inespecífica observada.

Por otra parte, se logró purificar tubulinas procedentes de *M.vogae*, las cuales fueron confirmadas mediante espectrometría de masas MALDI TOF. Las cantidades obtenidas fueron muy bajas, y luego se sucesivas etapas de extracción, se logró realizar solamente un ensayo control de polimerización de tubulinas. La curva de polimerización, así como los ensayos de sedimentación, demostraron que las tubulinas obtenidas presentaban aproximadamente 10 % de funcionalidad.

Los bajos rendimientos de purificación, así como la baja funcionalidad de la tubulinas obtenidas, sugieren que la cromatografía de afinidad TOG, no es un método adecuado para obtener tubulinas, a partir de los helmintos parásitos utilizados. La descripción original de la metodología, demostraba gran versatilidad de la técnica, lo cual no fue reproducible, trabajando con nuestras matrices parasitarias.

A partir de los resultados obtenidos, no podemos demostrar ni descartar que los nuevos compuestos con actividad antihelmíntica, sintetizados en la presente tesis, ejercen su acción mediante la inhibición de la polimerización de tubulinas. Sería necesario poder lograr purificar tubulinas nativas de helmintos de forma eficiente, ya sea mediante la optimización de la metodología presentada en este capítulo o mediante la exploración de nuevas técnicas de purificación.

Gran parte de estos resultados fueron comunicados, Munguía, Teixeira et al., 2017 [19].

BIBLIOGRAFÍA

- [1]- Schenone, M., Dančik, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 9(4), 232.
- [2]- Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31, 336-345.
- [3]- Shelanski, M. L., Gaskin, F., & Cantor, C. R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 765-768.
- [4]- Lee, J. C., & Timasheff, S. N. (1977). In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. *Biochemistry*, 16(8), 1754-1764.
- [5]- Desai, A., & Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 83-117.
- [6]- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253-265.
- [7]- Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6(4), 112-115.
- [8]- Werbovetz, K. A. (2002). Tubulin as an antiprotozoal drug target. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2(6), 519-529.
- [9]- Weisenberg, R. C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science*, 177(4054), 1104-1105.
- [10]- Carrier, M. F., & Pantaloni, D. (1978). Kinetic analysis of cooperativity in tubulin polymerization in the presence of guanosine di-or triphosphate nucleotides. *Biochemistry*, 17(10), 1908-1915.
- [11]- Stewart, R. J., Farrell, K. W., & Wilson, L. (1990). Role of GTP hydrolysis in microtubule polymerization: evidence for a coupled hydrolysis mechanism. *Biochemistry*, 29(27), 6489-6498.
- [12]- Stengel, C., Newman, S. P., Day, J. M., Chander, S. K., Jourdan, F. L., Leese, M. P., & Purohit, A. (2014). In vivo and in vitro properties of STX2484: a novel non-steroidal anti-cancer compound active in taxane-resistant breast cancer. *British Journal of Cancer*, 111(2), 300-308.
- [13]- Kozłowski, M. R., & Kozłowski, R. E. (2020). A novel, small peptide with activity against human pancreatic cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(5), 1356.

- [14]- Janke, C., & Bulinski, J. C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(12), 773-786.
- [15]- Dawson, P. J., Gutteridge, W. E., & Gull, K. (1984). A comparison of the interaction of anthelmintic benzimidazoles with tubulin isolated from mammalian tissue and the parasitic nematode *Ascaridia galli*. *Biochemical Pharmacology*, 33(7), 1069-1074.
- [16]- Andreu, J. M. (2007). Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. *Microtubule Protocols* (17-28). Humana Press.
- [17]- Hiller, G., & Weber, K. (1978). Radioimmunoassay for tubulin: a quantitative comparison of the tubulin content of different established tissue culture cells and tissues. *Cell*, 14(4), 795-804.
- [18]- Widlund, P. O., Podolski, M., Reber, S., Alper, J., Storch, M., Hyman, A. A., & Drechsel, D. N. (2012). One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Molecular Biology of the Cell*, 23(22), 4393-4401.
- [19]- Munguía, B., Teixeira, R., Veroli, V., Melian, E., Saldaña, J., Minteguiaga, M., & Domínguez, L. (2017). Purification of native *M. vogae* and *H. contortus* tubulin by TOG affinity chromatography. *Experimental Parasitology*, 182, 37-44
- [20]- *Tubulin Polymerization Assay Kit Manual* (BK006); Cytoskeleton: Denver, CO, 2016; p 1-20.
- [21]- Saldaña, J., Casaravilla, C., Marín, M., Fernandez, C., & Domínguez, L. (2003). The toxicity of praziquantel against *Mesocestoides vogae* (syn. *corti*) tetrathyridia can be assessed using a novel in vitro system. *Parasitology Research*, 89(6), 467-472.
- [22]- Saldaña, J., Marín, M., Fernández, C., & Domínguez, L. (2001). In vitro taurocholate-induced segmentation and clustering of *Mesocestoides vogae* (syn. *corti*) tetrathyridia (Cestoda)–inhibition by cestocidal drugs. *Parasitology Research*, 87(4), 281-286.
- [23]- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- [24]- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- [25]- Verweij, J., Clavel, M., & Chevalier, B. P. (1994). Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind. *Annals of Oncology*, 5, 495-505.

- [26]- Friedman, P. A., and Platzer, E. G. (1980). Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *AscarisSuum* embryonic tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 630(2), 271-278.
- [27]- Al-Bassam, J., Larsen, N. A., Hyman, A. A., & Harrison, S. C. (2007). Crystal structure of a TOG domain: conserved features of XMAP215/Dis1-family TOG domains and implications for tubulin binding. *Structure*, 15(3), 355-362.
- [28]- Ayaz, P., Ye, X., Huddleston, P., Brautigam, C. A., & Rice, L. M. (2012). A TOG: $\alpha\beta$ -tubulin complex structure reveals conformation-based mechanisms for a microtubule polymerase. *Science*, 337(6096), 857-860.
- [29]- Skuce, P. J., Stewart, E. M., Smith, W. D., & Knox, D. P. (1999). Cloning and characterization of glutamate dehydrogenase (GDH) from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 118(3), 297-304.
- [30]- Meegan, M. J., Nathwani, S., Twamley, B., Zisterer, D. M., & O'Boyle, N. M. (2017). Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 453-463.

CAPÍTULO 4

Aplicación de ensayos *in silico* para la comprensión del posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados

Introducción	pág. 151
Metodología	pág. 158
Discusión de resultados	pág. 159
Conclusiones	pág. 177
Bibliografía	pág. 179

INTRODUCCIÓN

El objetivo de esta instancia es poder aportar a la comprensión del mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados, que hayan presentado actividad antihelmíntica, mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas. Los estudios *in silico* utilizados permitieron simular la interacción de los nuevos compuestos sintetizados con la β tubulina del nematodo *Haemonchus contortus*. Particularmente aplicamos las técnicas de *docking molecular* y *modelado por homología*, las cuales se introducen a continuación.

Para la aplicación de estas herramientas, se contó con una pasantía en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, a cargo del Prof. Dr. Alan Talevi, y bajo la supervisión de la Prof. Dra. Luciana Gavernet.

Docking molecular.

El docking molecular, también conocido como docking, es una herramienta que consiste en una simulación computacional, orientada a predecir la conformación adoptada, la afinidad de unión y las interacciones presentes, entre un complejo receptor-ligando. Las posibilidades de complejos comúnmente estudiadas abarcan: proteína-ácido nucleico, proteína-proteína y proteína-ligando, siendo esta última estrategia de gran importancia en el diseño de fármacos, y por ende es la variante más utilizada.

El docking puede ser clasificado teniendo en cuenta la libertad de movimiento permitida para las estructuras, tanto del receptor como del ligando. Se pueden reconocer tres modalidades distintas [1]:

-Receptor rígido-ligando rígido: Ambas estructuras poseen geometrías rígidas durante el estudio. Se permiten solo variaciones traslacionales entre el ligando y el receptor. Su utilidad radica principalmente en el análisis de la complementariedad tridimensional de estructuras. Fue utilizada en las primeras versiones de los programas de docking, dada su simplicidad, y actualmente se aplica mayoritariamente en algunos de estudios de docking del tipo proteína-proteína.

-Receptor rígido-ligando flexible: Es la modalidad más aplicada en la actualidad, y es en la cual enmarcamos nuestro trabajo. Se permiten variaciones conformacionales del

ligando durante el estudio, lo cual conlleva un aumento de la exactitud del método, si bien implica un aumento en el costo computacional del procedimiento.

-Receptor flexible-ligando flexible: Ambas estructuras permanecen flexibles para maximizar el estudio de las posibles interacciones que podrían generarse. Es un reflejo más apropiado del fenómeno de interacción entre una proteína y su ligando. Sin embargo, su aplicación implica mayor complejidad en los cálculos computacionales utilizados, lo cual no siempre resulta redituable.

Los protocolos utilizados por los distintos programas de docking se pueden describir como la combinación de dos grandes procedimientos: 1) la búsqueda de distintas conformaciones relativas entre el ligando y el receptor; 2) la evaluación de la energía de unión para las distintas conformaciones [2]. Estos procedimientos se llevan a cabo mediante la aplicación de algoritmos de búsqueda, y algoritmos de evaluación respectivamente, para los cuales existe una variedad de alternativas utilizadas por los distintos programas de docking [3].

Los algoritmos de **búsqueda** tienen como objetivo explorar los posibles modos de unión entre el ligando y el receptor [4]. Estos algoritmos deben ser capaces de reproducir un número de configuraciones dentro de las cuales estén incluidas aquellas que serían observables experimentalmente. Un algoritmo ideal debería elucidar exhaustivamente todos los posibles modos de unión entre el receptor y el ligando. Sin embargo, una exploración de esta magnitud es imposible desde el punto de vista práctico. Sólo una pequeña parte del espacio muestral puede ser analizado, por lo que esta exploración debe ser efectiva. Por lo tanto, en el análisis conformacional se aplican restricciones y aproximaciones, que permitan reducir la dimensión del problema abordado, logrando resultados confiables, en tiempos razonables. Cada algoritmo utiliza distintas estrategias para lograr una exploración eficaz del espacio conformacional. Los principales métodos de búsqueda se pueden clasificar como:

1) *sistemáticos*: la búsqueda de conformaciones distintas se realiza mediante la exploración de los grados de libertad de una molécula, a través de cambios sistemáticos en los mismos.

2) *estocásticos*: también denominados métodos random, exploran las diferentes posibilidades de conformaciones, mediante cambios generados al azar. Las conformaciones generadas son evaluadas y seleccionadas mediante funciones de probabilidad.

3) *basado en simulaciones*: las distintas conformaciones son obtenidas mediante simulaciones moleculares como la dinámica molecular o la minimización de energía.

Los algoritmos de **evaluación** buscan cuantificar la energía de unión mediante la evaluación numérica de las interacciones no covalentes entre el ligando y el receptor, para cada conformación explorada [5]. Estos deberían ser capaces de cuantificar correctamente las distintas conformaciones, de forma de poder predecir los modos de unión experimentales. Una correcta cuantificación de la energía de unión también permitiría distinguir la afinidad de distintos compuestos sobre un determinado blanco, permitiendo predecir su actividad biológica. Sin dudas esta es la etapa más compleja del análisis de docking, en donde se observan las mayores imprecisiones en los resultados obtenidos. La aplicación de estos algoritmos continúa siendo el factor limitante en la aplicación del docking. Los métodos de evaluación se agrupan en cuatro grandes categorías:

1) *métodos basados en el conocimiento*: utilizan la información reportada sobre la interacción de diversos complejos proteína-ligando, resueltos experimentalmente. Esta información es utilizada como referencia para evaluar las conformaciones simuladas computacionalmente.

2) *métodos basados en campos de fuerza*: utilizan los conceptos de la mecánica molecular para calcular la energía de unión entre el ligando y el receptor.

3) *métodos empíricos*. La energía de unión es calculada mediante la sumatoria de términos energéticos independientes, los cuales son parametrizados a partir de datos disponibles experimentalmente.

4) *métodos consenso*. Utilizan una combinación de funciones de evaluación, con el objetivo de poder mejorar la exactitud de los resultados obtenidos aplicando funciones de evaluación individuales.

Los estudios de docking requieren ser validados previa su aplicación, de forma de poder evaluar si los programas utilizados son capaces de reproducir resultados confiables, para

nuestro sistema en estudio [6]. Existen dos grandes enfoques en la validación del docking proteína-ligando, los cuales son complementarios sí. Un aspecto consiste es tratar de reproducir mediante la simulación computacional, la conformación experimental descrita para un ligando que haya sido cocrystalizado con el receptor en estudio. Esta estrategia se denomina **re-docking**. De esta forma, para que el método utilizado en el docking molecular sea válido, debe arrojar conformaciones para el ligando similares a las observadas en la estructura cristalina. El parámetro utilizado para comparar las distintas conformaciones es el RMSD (Root Mean Square Desviation). En líneas generales, programas que arrojen valores de RMSD menores a 2 Å (entre la conformación calculada y la descrita experimentalmente) son considerados exitosos [7].

El otro enfoque de la validación, apunta a evaluar la capacidad que tiene el programa de docking utilizado, de distinguir entre compuestos activos y no activos, frente a un determinado blanco molecular. Para ello se utilizan subconjuntos de testeo en los que se incluyen compuestos de actividad conocida sobre el receptor considerado, y compuestos que son inactivos frente a este receptor. Las energías de unión de ambos grupos deben ser estadísticamente distintas, siendo más favorable para los compuestos activos. Esto indicaría que el programa utilizado es capaz de distinguir posibles ligandos para el receptor.

La construcción de una curva ROC (Receiver operating characteristic) es una herramienta estadística útil para la evaluación de los subconjuntos de testeo. Esta metodología estadística consiste en una representación gráfica, que permite evaluar la calidad de un sistema clasificador binario, según varía el umbral de discriminación o punto de corte seleccionado [8]. La idea es poder constatar si existe diferencia entre las energías de unión calculadas para ambos grupos, y establecer cuál sería el punto de corte óptimo. En la sección *discusión de resultados*, profundizaremos sobre esta última metodología de validación, dado que será utilizada para validar nuestros estudios de docking,

El docking molecular se ha convertido en una herramienta fundamental para la química *in silico*. En las últimas décadas, ha constituido una metodología de gran utilidad en el desarrollo de fármacos por parte de la industria farmacéutica, debido a sus numerosas aplicaciones: screening virtual de bibliotecas de compuestos para la identificación de estructuras “hit”, o cabezas de serie; optimización de compuestos activos; identificación y estudios de sitios de acción; estudios de metabolismos de fármacos, entre otras.

A pesar de los avances continuos en el desarrollo de los programas de docking, una de sus grandes limitaciones, es que sus cálculos están basados principalmente en consideraciones entálpicas. Los factores entrópicos y la influencia de los fenómenos de solvatación, son dos puntos clave en el proceso de interacción ligando-receptor, que no han sido estudiados exhaustivamente por los programas de docking, dada la complejidad de su abordaje. Otra limitante de esta metodología es que para poder realizar los estudios de docking, es necesario contar con la estructura cristalina elucidada del receptor, mediante métodos tales como difracción de rayos X, o resonancia magnética nuclear (RMN).

Si bien el número de estructuras proteicas resueltas y reportadas en base de datos es enorme y aumenta de forma significativa cada año, se desconoce la estructura cristalina de la mayor parte de las proteínas reportadas. Una alternativa a esta disyuntiva es la creación computacional de modelos teóricos tridimensionales, mediante la aplicación de técnicas de modelado de proteínas, sobre las cuales hablaremos a continuación.

Modelado de proteínas

Las técnicas de modelado de una proteína tienen como objetivo predecir su estructura tridimensional a partir de su secuencia peptídica. En otras palabras, buscan lograr una representación de la estructura secundaria y terciaria de una proteína, tomando como única información su estructura primaria. Los métodos de modelado se pueden clasificar en dos grandes grupos [9]:

1) *Métodos comparativos*: Se basan en estructuras proteicas que han sido previamente resueltas, las cuales son utilizadas como moldes de construcción para la proteína problema. Los dos principales métodos comparativos son: modelado **por homología** y **threading** o enhebrado de proteínas.

2) *Métodos ab initio*: Buscan predecir la estructura tridimensional proteica basándose solamente en la información contenida en la secuencia peptídica, mediante la aplicación de modelos fisicoquímicos que intentan predecir el proceso de plegamiento. Tienen la ventaja de no estar restringidos a estructuras previamente reportadas, pero son muy

costosos desde el punto de vista computacional, por lo cual su aplicación muchas veces está limitada a péptidos pequeños.

En este capítulo aplicaremos el método de *modelado por homología*. Esta metodología busca predecir la estructura terciaria de una proteína problema, utilizando como molde estructuras cristalinas resueltas experimentalmente, correspondientes a otras proteínas, con las cuales existe homología en la secuencia primaria. El fundamento de esta herramienta supone que proteínas de similar secuencia peptídica, poseen estructuras tridimensionales similares. De esta forma, cuanto mayor sea la similitud de secuencias, mejor será la predicción de la estructura [10].

El procedimiento de modelado por homología se puede resumir en cuatro etapas [11]:

1) *selección de un molde*: consiste en una alineación preliminar de la secuencia blanco, con secuencias de proteínas cuyas estructuras tridimensionales son conocidas y están disponibles en bases de datos. El Protein Data Bank (PDB) [12] es la principal base de datos, que contiene información estructural tridimensional de una gran cantidad de proteínas y ácidos nucleicos, que han sido elucidados experimentalmente. El procedimiento de selección se realiza con algoritmos de búsqueda, siendo el método BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [13] el más utilizado para tal fin. Para la selección del molde se buscan aquellas secuencias que presenten homología con la secuencia blanco. Por otra parte, la calidad de la estructura cristalina del molde a elegir, es un factor para tener en cuenta, ya que condicionará la calidad del modelo generado.

2) *alineamiento de la secuencia problema con el molde*: Se realiza un re-alineamiento entre el la secuencia blanco y el molde elegido. El objetivo es mejorar el resultado del alineamiento obtenido en la etapa de selección, aplicando algoritmos más exhaustivos, de forma de poder encontrar la máxima correspondencia de aminoácidos entre ambas estructuras.

3) *creación del modelo tridimensional*: En esta etapa se busca transferir la información contenida en la estructura molde, para la construcción de un modelo tridimensional del blanco. Se establecen las coordenadas tridimensionales para el esqueleto peptídico y las cadenas laterales, considerando la identidad y similitud de los residuos aminoacídicos, pero también las inserciones o deleciones que existen entre ambas secuencias.

4) *optimización y validación del modelo*: En el proceso de optimización se busca remover posibles errores estructurales generados en la construcción del modelo, y minimizar la energía final de la estructura. Las simulaciones de dinámica molecular son generalmente utilizadas para la optimización. Finalmente se realiza la validación del modelo, en la que busca evaluar la calidad de la estructura tridimensional obtenida. Se consideran distintos aspectos que evalúan la factibilidad de las conformaciones adoptadas en el modelo creado. Existen diversos métodos y softwares para llevar a cabo esta etapa, los cuales difieren en los parámetros considerados para la evaluación. En la siguiente sección se detallarán los métodos de validación utilizados.

METODOLOGÍA

Modelado de proteínas

Los modelos tridimensionales de las proteínas fueron creados mediante la técnica de modelado por homología, utilizando el software Modeller 9 [14]. La búsqueda de *templates* (secuencias utilizadas como molde) se realizó utilizando el servidor NCBI-BLAST, a través del software UCSF Chimera [15]. Se modeló la secuencia de la proteína β tubulina isotipo 1 de *Haemonchus contortus* (código Uniprot: c5j0j1), trabajando con los residuos 1-426, utilizado como template la β tubulina 3 de *Homo sapiens* (código PDB: 6S8L). La energía del modelo fue minimizada utilizando el campo de fuerza AMBER99. El modelo fue validado utilizando el software PROCHEK [16] y el servidor QMEAN [17].

Docking molecular

Los estudios de docking fueron realizados utilizando el programa Autodock 4.2.6 [18]. El tamaño de la grilla utilizado fue de 80x80x80, con un espaciado de grilla de 0.375 Å. La grilla estaba centrada en el aminoácido fenilalanina 200 (PHE 200) de la β tubulina. Se utilizó el algoritmo genético de Lamarckian, como algoritmo de búsqueda de conformaciones. Los ligandos fueron minimizados energéticamente utilizando el campo de fuerza MMFF94. Se permitió libre rotación para todos los enlaces a excepción del enlace amida. Se consideraron los distintos isómeros cis-trans de los enlaces amida, y el tautomerismo de los anillos benzimidazólicos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los estudios de modulación estructural realizados en el *capítulo 1*, sugieren que el dominio benzimidazólico sería necesario para actividad biológica observada. En este sentido se busca estudiar si los nuevos compuestos podrían compartir el mismo mecanismo de acción que su precursor benzimidazólico fenbendazol.

La β tubulina está reportada como el blanco principal involucrado en el mecanismo de acción de los fármacos benzimidazoles antihelmínticos (BZs) [19]. En este capítulo se procedió a estudiar la factibilidad de unión entre los compuestos sintetizados, que hayan presentado actividad antihelmíntica *in vitro*, y la β tubulina isotipo 1 del nematodo *H. contortus*. Este subtipo de tubulina, está asociada a los principales fenómenos de resistencia a BZs [20], y su presencia es fundamental para la presencia de actividad de BZs en *H. contortus*.

Tal como se mencionó anteriormente, un insumo imprescindible para el estudio computacional del proceso de interacción ligando-receptor, es contar con un modelo tridimensional de la estructura del receptor. La calidad del modelo utilizado es una variable importante a tener en cuenta, ya que condiciona el desempeño y la veracidad de los resultados obtenidos, en las simulaciones computacionales. Por este motivo, la elección y la preparación del blanco molecular, es un paso clave previo a realizar los estudios de docking. Dado que al momento no se encuentra reportada ninguna estructura cristalográfica de la β tubulina de *H. contortus*, se procedió a crear un modelo teórico, aplicando la metodología de modelado por homología.

La secuencia de la β -tubulina isotipo 1 fue obtenida a partir de la base de datos Uniprot. La estructura tridimensional fue modelada utilizando la β -tubulina 3 de *Homo sapiens* (código PDB: 6S8L). Para realizar la elección del *template* se tuvieron en consideración los siguientes aspectos: el porcentaje de identidad de ambas secuencias, la resolución de la estructura cristalina del *template* y la calidad de los modelos generados.

Las secuencias proteicas presentaron un 86% de identidad de secuencia. La estructura correspondiente al PDB 6S8L tiene una resolución de 1.8 Å, lo cual es considerado como alta resolución.

El modelo fue construido utilizando el software Modeller. La validación de modelo fue realizada mediante el análisis los gráficos de Ramachandran [21] obtenidos utilizando el software PROCHEK. Estos son gráficos bidimensionales que analizan las distribuciones de los ángulos diedros ϕ (phi) y ψ (psi) presentes en los enlaces peptídicos de una proteína. El fundamento radica en que no todas las combinaciones de ángulos diedros son factibles de ocurrir dentro de la estructura de una proteína, debido a impedimentos estéricos entre los residuos aminoacídicos de las cadenas laterales. De esta manera se definen en el gráfico zonas con distintos grados de restricción, basadas en la información experimental cristalográfica de diversas proteínas, depositada en bases de datos. La distribución de los pares de ángulos ϕ - ψ de la proteína a evaluar, nos permite identificar posibles errores en la determinación de la estructura, y así evaluar la calidad de nuestro modelo. En la *figura 1*, se muestra el diagrama de Ramachandran obtenido para el modelo creado de la β -tubulina isotipo 1 de *H.contortus*. El diagrama muestra el 82.0% de los residuos en regiones más favorecidas, 17.7% en regiones permitidas, y solamente 1 residuo (0.3%) en regiones generosamente permitidas, careciendo de residuos en regiones prohibidas.

Otra herramienta aplicada en la evaluación de la calidad del modelo fue la función de evaluación QMEAN (Quality Model Energy ANalysis) [22]. La misma consiste en una función de puntuación, basada en la evaluación de parámetros geométricos estructurales de las proteínas. El resultado de la función es un valor de calidad global de la proteína, el cual está basado en análisis geométricos locales. Los parámetros considerados por la función QMEAN son: los potenciales de interacción basados en las distancias atómicas, los potenciales derivados de la torsión angular entre los aminoácidos, y los potenciales de solvatación de los residuos aminoacídicos.

El valor de la función QMEAN obtenido es normalizado contra valores de potenciales medios calculados para estructuras cristalinas, reportadas con alta resolución, correspondientes a proteínas de similar tamaño. El valor normalizado (también llamado Z-Score), es independiente del tamaño de la proteína. El análisis del modelo obtenido de β -tubulina, arrojó un valor QMEAN (Z-Score) = -1.05. Esto significa que el valor QMEAN calculado para nuestro modelo, se aparta de los valores medios obtenidos para proteínas de similar tamaño, en una proporción igual a 1.05 veces la desviación estándar de dicha población de referencia, lo cual es considerado dentro de los rango de calidad esperados para una estructura correcta [23].

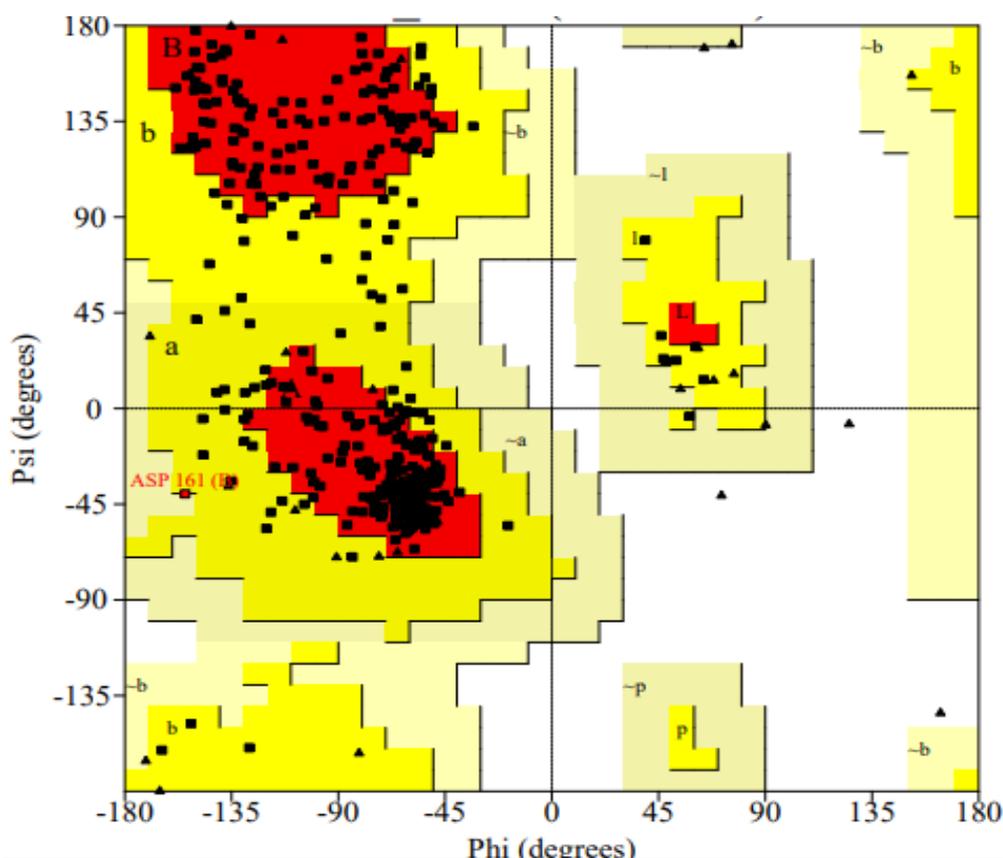


Figura 1. Diagrama de Ramachandrán obtenido para el modelo estructural de β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus*. El diagrama fue construido utilizando el servidor PROCHEK. Se grafican los ángulos diedros para cada residuo aminoácido. En el eje de las abscisas se disponen los ángulos ϕ (phi) y en el eje de las ordenadas se disponen los ángulos ψ (psi).

De esta forma se obtuvo un modelo por homología de la β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus*, el cual cumple satisfactoriamente con los parámetros de calidad necesarios para su aplicación en estudios bioinformáticos. En esta instancia el modelo fue utilizado para la implementación de estudios de docking. Si bien es cierto que el escenario ideal para el estudio de la interacción receptor-ligando, implicaría contar con la estructura cristalográfica del receptor (elucidada experimentalmente), los estudios de docking basados en modelos por homología parecen arrojar resultados igualmente satisfactorios. Trabajos recientes [24, 25] comparan los resultados de estudios de docking utilizando

como blancos moleculares, tanto estructuras cristalinas como modelos obtenidos por homología. Si bien los resultados obtenidos trabajando con estructuras cristalinas son de mayor precisión, ambas metodologías fueron apropiadas para el estudio de los sistemas considerados.

Otro aspecto importante para en el procedimiento de docking, es la elección del sitio del unión, sobre el cual se analizará la posible interacción con el ligando. La búsqueda de esta región en toda la superficie de la proteína, implicaría un aumento excesivo del costo computacional y por ende de los tiempos de trabajo. El conocimiento previo acerca de la naturaleza de la interacción ligando-sitio de unión es un insumo de gran utilidad en esta etapa. El conocimiento de la ubicación de los sitios activos enzimáticos, sitios alostéricos, sitios de unión a cofactores, etc., puede resultar una buena estrategia para acortar tiempos de cálculo.

Como mencionáramos anteriormente, los BZs interfieren con la formación de microtúbulos, mediante su unión a la β tubulina. Sin embargo, los detalles concretos de esta interacción no están elucidados. Las tubulinas son proteínas sin actividad catalítica, por lo cual no es posible aplicar la lógica de identificación de un sitio de unión a un sustrato. A su vez, como hemos señalado, la carencia de estructuras cristalinas reportadas para tubulinas de parásitos helmintos, dificulta aún más la identificación del sitio de acción de los BZs.

Diversos trabajos de biología molecular han estudiado los fenómenos de resistencia a BZs, asociados a mutaciones en genes que codifican para la β -tubulina [26], buscando ahondar en la comprensión del modo de interacción de estos fármacos con su blanco. Los aminoácidos fenilalanina 167 (PHE 167), glutamato 198 (GLU 198) y fenilalanina 200 (PHE200), identificados en la secuencia de la β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus*, están conservados en la mayoría de los helmintos sensibles a BZs, y constituyen factores claves en la interacción con estos ligandos [27]. Por otra parte, ensayos *in vitro* para el estudio de unión de fármacos a tubulinas, sugieren que antihelmínticos como Mebendazol, competiría con la colchicina por el sitio de unión a tubulinas. [28]. La colchicina es un agente inhibidor de la polimerización de tubulinas, con gran afinidad sobre tubulinas de origen mamífero. La misma se encuentra cocrystalizada con el dímero α/β tubulina procedente del mamífero *Bos taurus* (PDB ID: 1SA0) [29], información que resulta de gran utilidad para poder identificar el sitio de unión de BZs.

Arguayo-Ortiz y colaboradores realizaron un análisis computacional integrado [30] aplicando herramientas de modelado por homología, docking molecular y dinámica molecular, en el cual proponen un sitio de unión a BZs, trabajando con la β tubulina del nematodo *Trichinella spiralis*. El sitio consiste en un bolsillo hidrofóbico ubicado en la parte N-terminal de la proteína, próximo a la interface de unión con el monómero α tubulina. El sitio propuesto está en consonancia con las observaciones experimentales mencionadas anteriormente. Estudios posteriores [31] implementaron este sitio de unión para el estudio *in silico* de la β -tubulina de *H.contortus*, obteniendo resultados de gran relevancia para la comprensión de los fenómenos de resistencia a BZs.

Basados en el trabajo de Arguayo-Ortiz et al., (2013) [30], hemos definido la región en nuestro modelo de β -tubulina, sobre la cual realizaremos el estudio de docking de los compuestos a evaluar. La región está centrada en el aminoácido PHE 200, y consiste en un cubo de 30 Å de lado. En la *figura 2* se muestra la región seleccionada en nuestro modelo tridimensional.

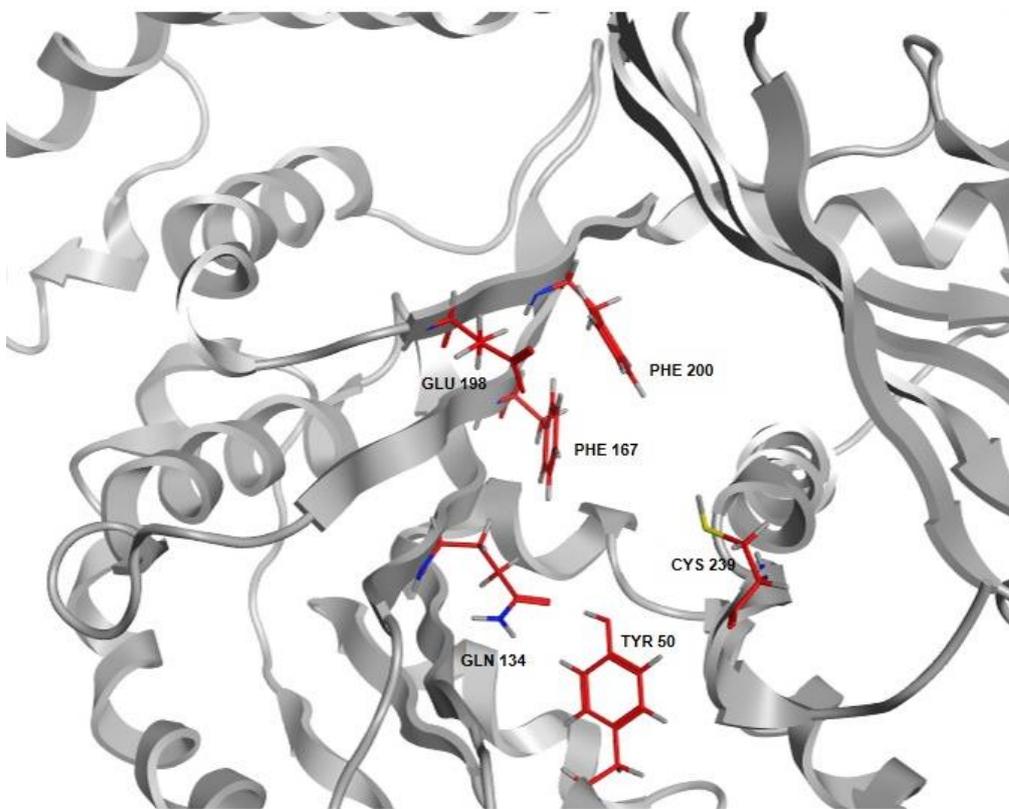


Figura 2

Región seleccionada en el modelo de β tubulina isotipo 1 de *H.contortus*, para realizar el docking molecular. La selección de la región está basada en los estudios de Arguayo-Ortiz y

colaboradores [31]. En rojo se señalan los principales residuos aminoacídicos que estarían involucrados en la interacción con los BZs

Una vez construido el modelo del receptor, y elegido el sitio de estudio en el mismo, se precedió a definir las condiciones del estudio de docking propiamente dicho. El programa seleccionado para realizar las simulaciones de docking fue el AutoDock 4.2.6. Este programa utiliza un algoritmo de búsqueda de conformaciones del tipo estocástico. Particularmente se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano [32]. Este tipo de algoritmo utiliza los conceptos de biología evolutiva para la exploración de las distintas conformaciones del ligando. Las variables que definen una posición particular del ligando con respecto al receptor son incluidas en “genes”, dentro de un “cromosoma”. A partir de una población inicial de conformaciones, las cuales están definidas en sus respectivos cromosomas, se realizan fenómenos análogos a la mutación y recombinación genética, para la generación de nuevas conformaciones al azar. Por otra parte, el programa AutoDock aplica funciones de evaluación basadas en campos de fuerza. Particularmente utiliza el campo de fuerza AMBER.

Como mencionáramos anteriormente, previo a la aplicación de un programa de docking, es necesario realizar una validación del mismo, de forma de poder evaluar la aptitud de su implementación, considerando el sistema en estudio. La estrategia de **re-docking** no pudo ser utilizada, dado que no contamos con estructuras cristalográficas de ligandos del tipo BZs, unidos a la β -tubulina. Se procedió a aplicar la estrategia de subconjuntos de testeo.

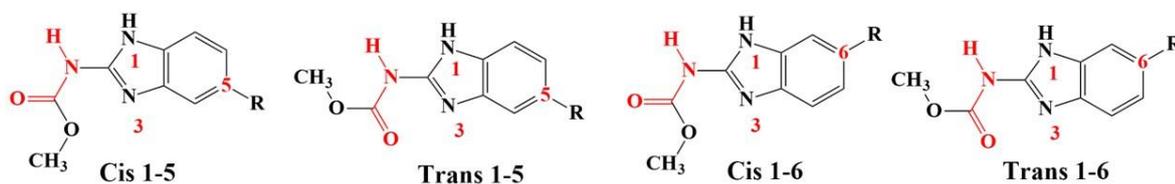
El escenario ideal para la aplicación de esta estrategia, implicaría contar con resultados de ensayos *in vitro*, realizados sobre el blanco molecular β tubulina, de forma de poder definir los distintos conjuntos de testeo. Los resultados de este ensayo permitirían la clasificación de los patrones utilizados según su actividad, lo cual serviría de referencia para evaluar los resultados obtenidos mediante docking.

Dado que la disponibilidad de ensayos moleculares *in vitro*, realizados con las tubulinas de helmintos parásitos es muy limitado, se procedió a realizar la siguiente aproximación: como control positivo se utilizaron antihelmínticos comerciales de la familia de los benzimidazoles, cuyo mecanismo de acción antihelmíntica está reportado, y consiste en la inhibición de la polimerización de tubulinas, mediante su unión a la subunidad β tubulina [19]. Como control negativo se utilizaron compuestos antihelmínticos

comerciales, que pertenecen a diversas familias de fármacos, cuyos mecanismos de acción están reportados [33, 34], e involucrarían blancos moleculares distintos a las tubulinas.

En la *tablas 1 y 2*, se muestran la estructura y la energía de unión calculadas, para los compuestos elegidos para la validación (controles positivos y negativos respectivamente). En la *tabla 1* se muestran las distintas variantes de isómeros que se pueden presentar para los BZs, los cuales se estudian de forma separada. El tautomerismo del anillo benzimidazólico genera las conformaciones 1-5 y 1-6. Por otra parte, la rotación restringida del enlace amida, es contemplada en los estudios de docking, impidiendo el intercambio entre la conformaciones cis-trans para una misma molécula. De esta forma los isómeros cis-trans (referentes al enlace amida del grupo carbamato), son considerados como compuestos distintos. El carácter enantiomérico del sulfóxido de albedazol también fue tenido en cuenta, considerando los isómeros S y R. Se evaluaron 10 BZs estructuralmente distintos, lo que implicó el ensayo de un total de 42 isómeros. En cuanto a los controles negativos se ensayaron un total de 11 compuestos.

Tabla 1. Benzimidazoles antihelmínticos utilizados como grupo control positivo en la validación del estudio de docking. Se muestra la estructura de cada compuesto y la respectiva energía de unión calculada. Se consideró el tautomerismo del anillo benzimidazólico (isómeros 1-5 y 1-6), la rotación restringida del enlace amida (cis-trans) y los isómeros S y R del sulfóxido de albendazol.



COMPUESTO	R	ISÓMERO	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)
Albendazol		Cis 1-5	-8,48
		Trans 1-5	-7,90
		Cis 1-6	-8,69
		Trans 1-6	-8,46
Fenbendazol		Cis 1-5	-8,81
		Trans 1-5	-8,01
		Cis 1-6	-9,08
		Trans 1-6	-7,89
Mebendazol		Cis 1-5	-9,12
		Trans 1-5	-9,05
		Cis 1-6	-8,67
		Trans 1-6	-8,37
Flubendazol		Cis 1-5	-7,78
		Trans 1-5	-7,96
		Cis 1-6	-8,04
		Trans 1-6	-7,53
Nocodazol		Cis 1-5	-8,35
		Trans 1-5	-9,01
		Cis 1-6	-8,11
		Trans 1-6	-7,48
Oxibendazol		Cis 1-5	-7,54
		Trans 1-5	-7,55
		Cis 1-6	-7,18
		Trans 1-6	-7,43

Tabla 1. Continuación

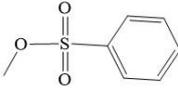
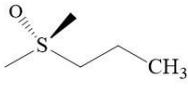
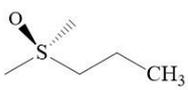
COMPUESTO	R	ISÓMERO	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)
Parbendazol		Cis 1-5	-7,60
		Trans 1-5	-7,94
		Cis 1-6	-8,84
		Trans 1-6	-8,38
Luxabendazol		Cis 1-5	-7,66
		Trans 1-5	-7,68
		Cis 1-6	-8,19
		Trans 1-6	-7,75
Carbendacima	H	Cis	-7,06
		Trans	-7,04
Albendazol sulfóxido (R)		Cis 1-5	-8,42
		Trans 1-5	-7,46
		Cis 1-6	-9,19
		Trans 1-6	-8,88
Albendazol sulfóxido (S)		Cis 1-5	-8,64
		Trans 1-5	-8,11
		Cis 1-6	-8,99
		Trans 1-6	-8,74

Tabla 2. Antihelmínticos comerciales utilizados como grupo control negativo en la validación del estudio de docking. Se muestra la estructura de cada compuesto y la respectiva energía de unión calculada

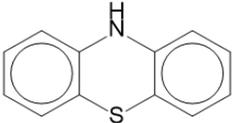
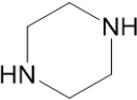
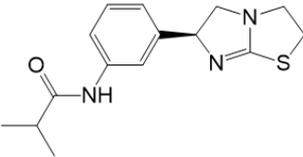
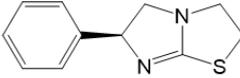
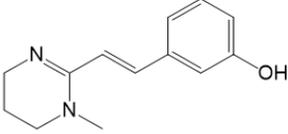
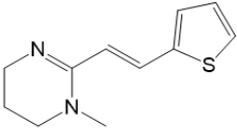
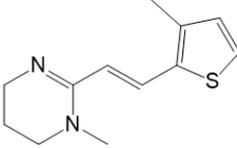
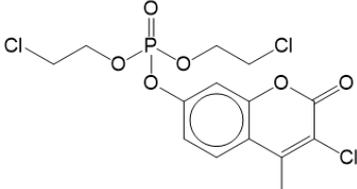
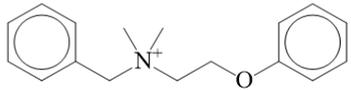
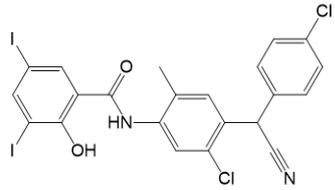
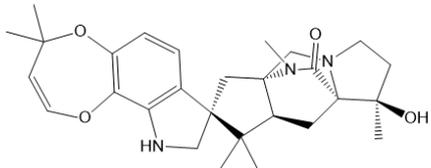
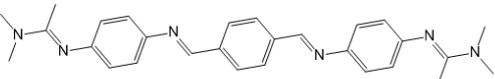
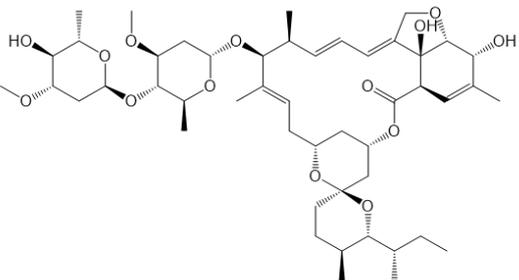
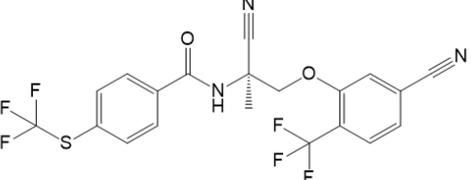
COMPUESTO	ESTRUCTURA	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)
Fenotiazina		-5,74
Piperazina		-5,37
Butamisol		-7,87
Levamisol		-6,01
Oxantel		-6,61
Pirantel		-6,32
Morantel		-6,95
Haloxon		-4,21

Tabla 2. Continuación

COMPUESTO	ESTRUCTURA	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)
Befenio		-7,99
Closantel		-5,94
Derquantel		-6,51
Tirbendimidina		-5,14
Ivermectina		> 0*
Monepantel		-6,38

* Para el caso de la Ivermectina se evidencia en el docking la incapacidad del compuesto de ubicarse en el sitio de estudio, lo cual se constata mediante un valor de energía de unión positivo. Posiblemente el gran tamaño molecular de la Ivermectina imposibilite un correcto posicionamiento de esta molécula en el sitio del receptor seleccionado para realizar la simulación de docking.

A partir de los resultados de energía de unión obtenidos para los compuestos controles, se construyó una curva ROC. Esta herramienta estadística consiste en la construcción de un gráfico que relaciona los parámetros sensibilidad y especificidad de un método de clasificación binario, a medida que se varía el punto de corte. Ambos parámetros están directamente relacionados con la exactitud del método en la clasificación de las variables. La *sensibilidad* es un estimador que determina la relación de **verdaderos positivos** detectados por el método, mientras que la *especificidad*, es un estimador que determina la relación de **verdaderos negativos** detectados por el método. Ambos estimadores se definen a continuación:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{TP}$$

Siendo VP la cantidad de casos verdaderos positivos detectados por el método, mientras que TP es la cantidad de casos positivos totales en la muestra

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{TN}$$

Siendo VN la cantidad de casos verdaderos negativos detectados por el método, mientras que TN es la cantidad de casos negativos totales en la muestra.

El punto de corte se define como el valor límite para clasificar los resultados como positivos o negativos. De esta forma, los parámetros sensibilidad-especificidad adoptarán valores definidos, según el punto de corte elegido. La curva ROC se construye graficando el parámetro *sensibilidad* (ordenadas), en función del parámetro 1-especificidad (abscisas), calculados para cada posible punto de corte. El área bajo la curva del gráfico (AUC) brinda información acerca de la calidad el método utilizado. Valores de área cercanos a 0.5 indican una distribución aleatoria de los resultados, demostrando que el método es totalmente inadecuado para distinguir las variables correctamente. El valor máximo e ideal de AUC, es 1, lo que implicaría que el método utilizado fue capaz de clasificar correctamente todas las variables utilizadas como referencia [35].

En la *figura 3* se muestra el gráfico ROC construido considerando la energía de unión calculada para los controles positivos y negativos. El valor de energía de unión óptimo

elegido como punto de corte fue -7.04 Kcal/mol. Utilizando este criterio de clasificación, el 100% de los controles positivos son clasificados correctamente (sensibilidad 1.0), mientras que 91% de los controles negativos fueron clasificados correctamente (especificidad 0.91). Por otra parte el AUC obtenida fue 0.937, lo que implica un excelente desempeño del método utilizado [6].

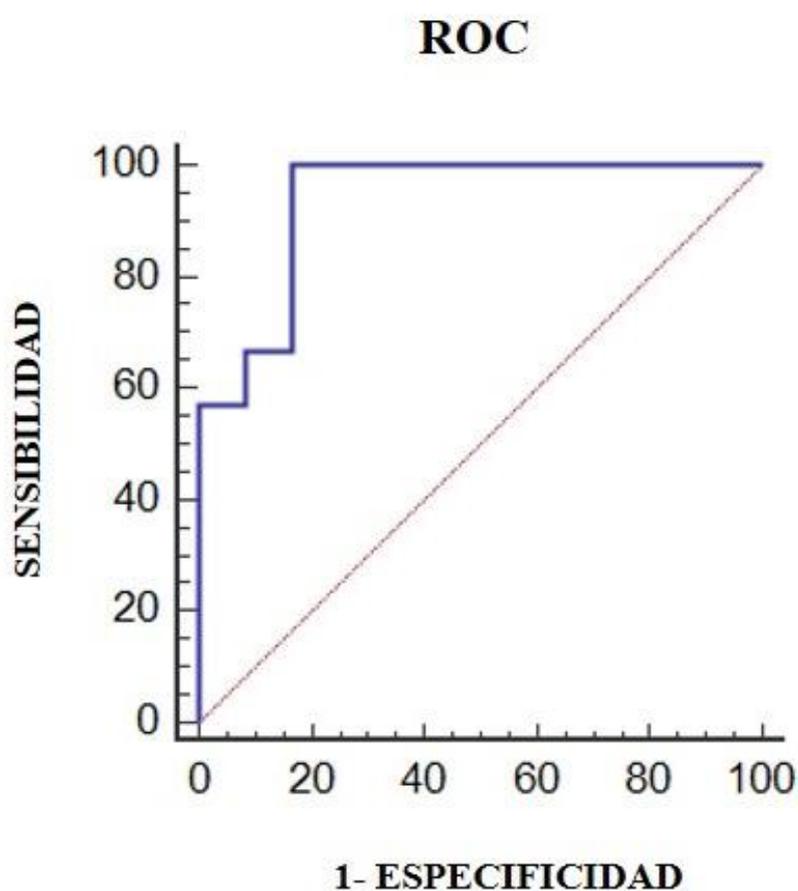


Figura 3. Gráfico ROC construido a partir de los valores de energía de unión calculados para los controles positivos y negativos.

Un aspecto importante en el análisis de los resultados de docking, es la inspección visual de las conformaciones obtenidas para el ligando, y el análisis de las posibles interacciones moleculares que se llevarían a cabo con el receptor. En la *figura 4* se muestra la superposición de las conformaciones de más baja energía de unión, obtenidas para cada uno de los benzimidazoles utilizados como grupo control positivo. Todas las conformaciones se disponen de manera similar, sugiriendo un modo de unión concordante para estos compuestos. Se distingue una interacción molecular principal entre los ligandos y el receptor, que corresponde con la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo del residuo Glu 198, y los hidrógenos presentes en anillo benzimidazólico y el grupo carbamato, pertenecientes a los ligandos. Por otra parte, aunque en menor proporción, se constató la interacción entre el grupo amida del residuo glutamina 134 (GLN 134) y el grupo carbamato de los ligandos. Estas interacciones están en concordancia con los resultados previamente reportados acerca del estudio computacional de la interacción entre los BZ y la β -tubulina [31].

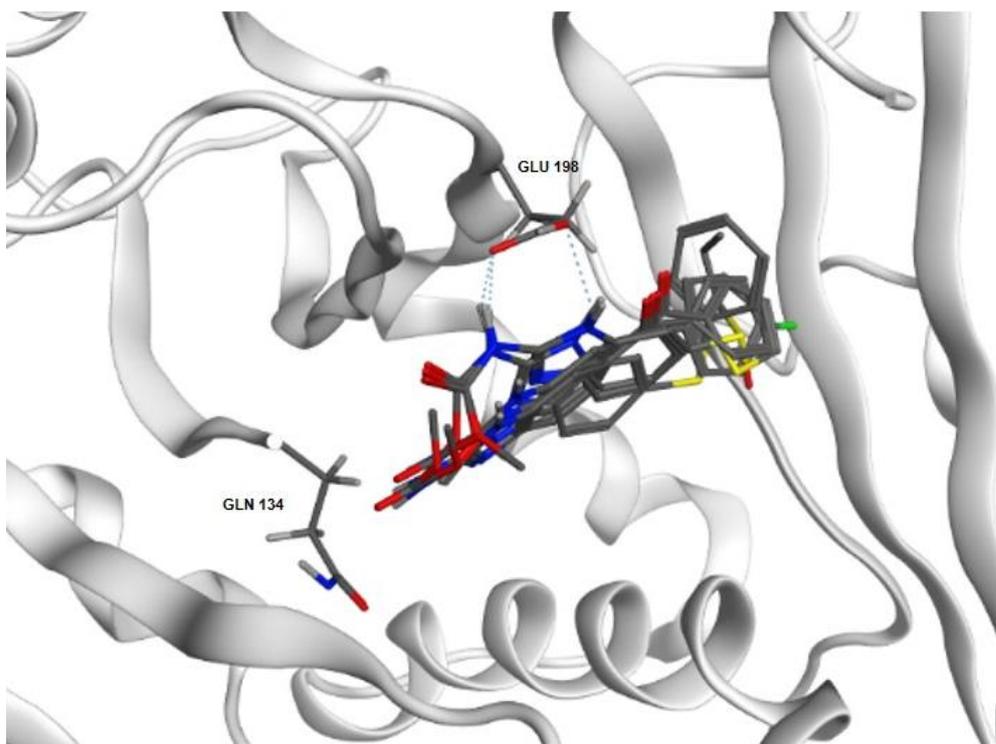


Figura 4. Disposición de las conformaciones de menor energía obtenidas para los BZs utilizados como grupo control positivo en el estudio de docking.

Una vez validado el sistema, se procedió a realizar los cálculos de docking (en las mismas condiciones de simulación) para aquellos compuestos que presentaron actividad antihelmíntica contra el nematodo *H. contortus*, en los ensayos *in vitro* realizados (ver capítulo 2). Los compuestos seleccionados fueron 1a, 10, 15 y 17. El objetivo era poder analizar las conformaciones de menor energía, (considerando tanto la disposición adoptada en la proteína, como el valor de energía de unión calculado), y comprarlas con las obtenidas para los controles positivos. En la *tabla 3* se muestran los valores de energía de unión obtenidos para cada compuesto. Se realizaron los cálculos considerando todas las variantes isoméricas de cada estructura (isomería cis-trans enlace amida/tautomerismo anillo benzimidazólico). Cabe señalar que los compuestos 1a y 10 presentan dos centros de isomería geométrica: el enlace amida del grupo terbutiloxicarbonilo (Boc), y el enlace amida contiguo al dominio benzimidazólico. Además ambos compuestos presentan un carbono quiral en el dominio lactámico. Dado que estamos trabajando con mezclas racémicas, las variantes de los isómeros R y S también fueron consideradas en los cálculos.

Analizando los resultados obtenidos podemos afirmar que todos los valores de energía de unión calculados poseen valores absolutos mayores al punto de corte (-7.04 Kcal/mol). Esto indicaría que los compuestos analizados estarían considerados dentro del grupo control positivo. En otras palabras, los estudios de docking realizados en las condiciones descritas, identificarían a las moléculas estudiadas como posibles ligandos de unión a la β tubulina 1 de *H. contortus*, considerando el factor de energía de unión como parámetro de evaluación.

Por otra parte, se analizaron las disposiciones adoptadas en torno a la β tubulina, para las conformaciones de menor energía de unión, lo cual se representa en la *figura 5*. Los compuestos 15 y 17 se ubican muy próximos entre sí, y presentan una disposición similar a la observada para los patrones BZs, constatándose la formación de enlaces de hidrógeno con el residuo Glu 198. Los compuestos 15 y 17 poseen gran similitud estructural con su precursor Fenbendazol, por lo cual los resultados observados serían esperables.

Los compuestos 1a y 10 en cambio, se disponen en un sitio un poco apartado del sugerido para los BZ. Si bien están cercanos al Glu 198, se ubican desde la parte exterior de la tubulina, sin constatarse la formación de enlaces de hidrógeno con este residuo. Se debe considerar que estos compuestos poseen un mayor tamaño molecular que sus análogos

15, 17, por lo que al parecer, no sería energéticamente favorable su ubicación dentro del bolsillo de la proteína, en el que se unirían los BZs.

Tabla 3. Ensayo de docking de los nuevos compuestos sintetizados que presentaron actividad antihelmíntica *in vitro*. Se muestra la estructura de cada compuesto y la respectiva energía de unión calculada. Se consideró la rotación restringida de los enlaces amida (cis-trans), el tautomerismo del anillo benzimidazólico (isómeros 1-5 y 1-6) y los isómeros R y S correspondientes al carbono quiral del anillo lactámico. Para los compuestos 1a y 10 la primera especificación de isomería geométrica corresponde al enlace amida del grupo Boc, mientras que la segunda especificación corresponde al enlace amida contiguo al dominio benzimidazólico.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	ISÓMERO	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)
1a (S)		Cis Cis 1-5	-8,29
		Cis Trans 1-5	-8,58
		Trans Cis 1-5	-9,89
		Trans Trans 1-5	-8,23
		Cis Cis 1-6	-9,22
		Cis Trans 1-6	-8,82
		Trans Cis 1-6	-9,39
		Trans Trans 1-6	-7,99
1a (R)		Cis Cis 1-5	-9,28
		Cis Trans 1-5	-8,90
		Trans Cis 1-5	-9,66
		Trans Trans 1-5	-9,29
		Cis Cis 1-6	-9,77
		Cis Trans 1-6	-8,55
		Trans Cis 1-6	-8,70
		Trans Trans 1-6	-8,70
10 (S)		Cis Cis 1-5	-7,13
		Cis Trans 1-5	-7,06
		Trans Cis 1-5	-9,39
		Trans Trans 1-5	-8,40
		Cis Cis 1-6	-10,00
		Cis Trans 1-6	-7,58
		Trans Cis 1-6	-9,74
		Trans Trans 1-6	-7,17
10 (R)		Cis Cis 1-5	-8,85
		Cis Trans 1-5	-8,12
		Trans Cis 1-5	-9,92
		Trans Trans 1-5	-7,90
		Cis Cis 1-6	-9,76
		Cis Trans 1-6	-9,69
		Trans Cis 1-6	-9,27
		Trans Trans 1-6	-10,29
15		Cis 1-5	-9,25
		Trans 1-5	-8,06
		Cis 1-6	-10,03
		Trans 1-6	-8,79
17		Cis 1-5	-9,00
		Trans 1-5	-8,24
		Cis 1-6	-9,16
		Trans 1-6	-8,46

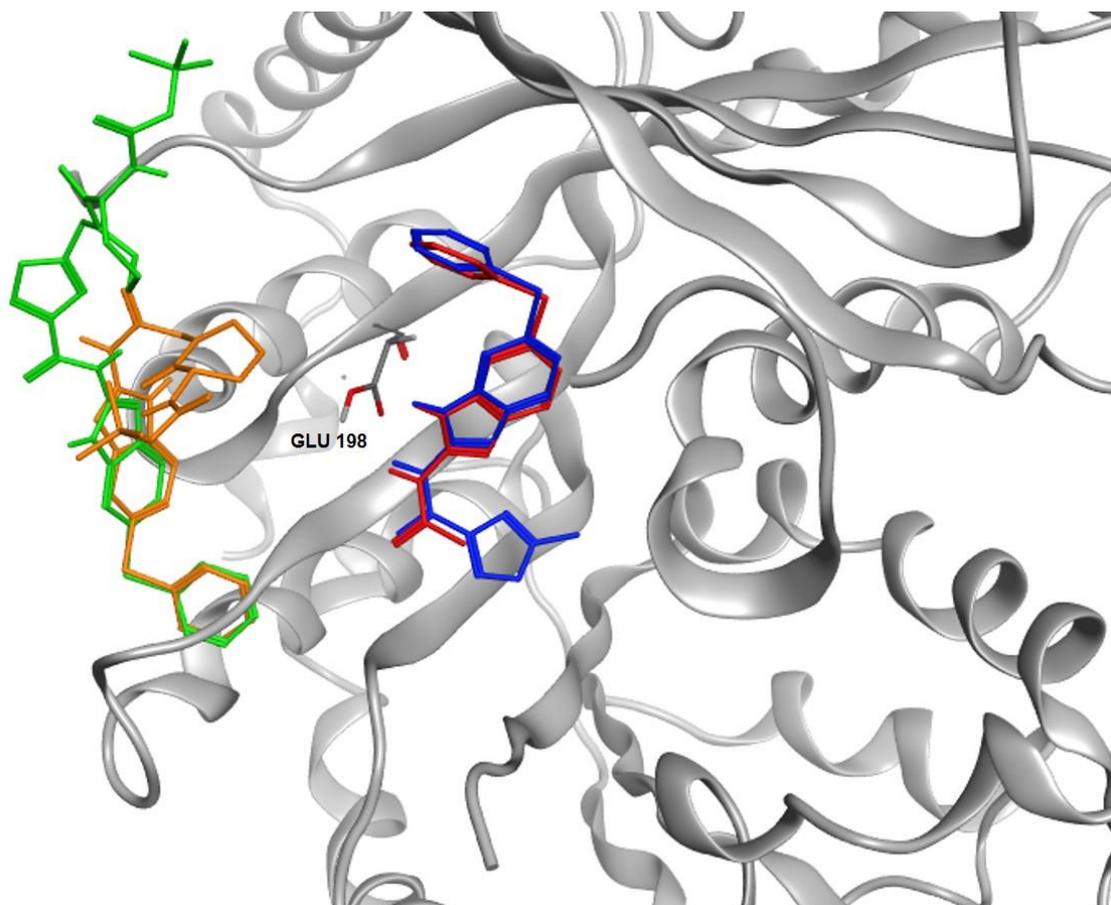


Figura 5. Conformaciones adoptadas por los compuestos analizados en el ensayo de docking, frente a la β tubulina 1 de *H. contortus*. En azul y en rojo se muestran los compuestos 15 y el 17 respectivamente. En naranja y verde se muestran los compuestos 1a y 10 respectivamente.

CONCLUSIONES

En el presente capítulo se presentaron las herramientas usadas de química *in silico* con el objetivo de ahondar en la comprensión sobre posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados. Puntualmente se evaluó la factibilidad de unión entre los ligandos seleccionados y la β tubulina 1 de *H.contortus*, mediante la aplicación de docking molecular.

En primer lugar se obtuvo un modelo tridimensional de la estructura de la β tubulina 1 de *H.contortus*, aplicando la estrategia de modelado por homología. El modelo obtenido, cumplió satisfactoriamente con los criterios de validación utilizados. La creación del modelo fue un paso clave para realizar el estudio de docking, dado que no contábamos con la estructura cristalina del blanco molecular en estudio. Además, representa un insumo importante para continuar con estudios *in silico* sobre esta proteína. Contar con el modelo tridimensional de una proteína permite profundizar en el estudio estructural y funcional de la misma. Por otra parte, constituye un elemento fundamental para la aplicación de otras técnicas bioinformáticas, como la dinámica molecular, que permitan continuar aportando a la comprensión de la interacción entre la β tubulina y sus posibles ligandos.

El programa de docking utilizado, Autodock 4.2.6, demostró ser adecuado para el sistema en estudio. La validación del ensayo de docking, en las condiciones utilizadas, arrojó resultados satisfactorios. Mediante el estudio de subconjuntos de testeo, el programa de docking presentó un valor de sensibilidad de 100%, y un valor de especificidad de 91% para el valor de corte seleccionado (-7.04 Kcal/mol).

Finalmente se hizo el estudio de docking de los nuevos compuestos sintetizados, que habían presentado actividad antihelmíntica, en modelos *in vitro*, frente al nematodo *H.contortus*. Los compuestos estudiados fueron 1a, 10, 15 y 17. Todos los compuestos arrojaron valores de energía de inferiores al valor de punto de corte establecido, para la identificación de compuestos activos.

En cuanto al estudio de las conformaciones de menor energía, los compuestos 15 y 17 presentaron disposiciones similares a las adoptadas por los BZs, utilizados como control. Ambos compuestos se disponen dentro del bolsillo proteico, que estaría sugerido como sitio de unión para los BZs, adoptando la misma orientación que sus precursores

estructurales, e interaccionado con el aminoácido GLU 198. Desde el punto de vista de los estudios de docking realizados, los compuestos 15 y 17, podrían ejercer su acción biológica mediante la unión a la β tubulina.

En cambio, las conformaciones de menor energía obtenidas para los compuestos 1a y 10, se ubican en un sitio del receptor distinto al descrito para los BZs, ubicado sobre la superficie de la tubulina. El mayor tamaño molecular de estos compuestos impediría su disposición dentro del bolsillo de la tubulina, donde se unirían los benzimidazoles.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]- Roy, K. (Ed.). (2019). *In silico drug design: repurposing techniques and methodologies*. Academic Press.
- [2]- Taylor, R. D., Jewsbury, P. J., & Essex, J. W. (2002). A review of protein-small molecule docking methods. *Journal of Computer-aided Molecular Design*, 16(3), 151-166.
- [3]- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935-949.
- [4]- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4), 409-443.
- [5]- Huang, S. Y., Grinter, S. Z., & Zou, X. (2010). Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40), 12899-12908.
- [6]- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., & Lee, R. E. (2009). Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 444-460.
- [7]- Jain, A. N. (2008). Bias, reporting, and sharing: computational evaluations of docking methods. *Journal of Computer-aided Molecular Design*, 22(3-4), 201-212.
- [8]- Zou, K. H., O'Malley, A. J., & Mauri, L. (2007). Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*, 115(5), 654-657
- [9]- Deng, H., Jia, Y., & Zhang, Y. (2018). Protein structure prediction. *International Journal of Modern Physics B*, 32(18), 1840009.
- [10]- Cavasotto, C. (2011). Homology models in docking and high-throughput docking. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(12), 1528-1534.
- [11]- Wallner, B., & Elofsson, A. (2005). All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs. *Protein Science*, 14(5), 1315-1327.
- [12]- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer Jr, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., & Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *European Journal of Biochemistry*, 80(2), 319-324.

- [13]- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- [14]- Šali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779-815.
- [15]- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- [16]- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291.
- [17]- Benkert, P., Künzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research*, 37(2), 510-514.
- [18]- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- [19]- Kohler, P. (2001). The biochemical basis of antihelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31, 336-345.
- [20]- Kwa, M. G., Veenstra, J. G., & Roos, M. H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63(2), 299-303.
- [21]- Ramachandran, G. N. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7, 95-99.
- [22]- Benkert, P., Tosatto, S. C., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(1), 261-277.
- [23]- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- [24]- Diller, D. J., & Li, R. (2003). Kinases, homology models, and high throughput docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(22), 4638-4647.
- [25]- McGovern, S. L., & Shoichet, B. K. (2003). Information decay in molecular docking screens against holo, apo, and modeled conformations of enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(14), 2895-2907.

- [26]- Oakley, B. R. (1985). Microtubule mutants. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 63(6), 479-488.
- [27]- Beech, R. N., Skuce, P., Bartley, D. J., Martin, R. J., Prichard, R. K., & Gilleard, J. S. (2011). Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology*, 138(2), 160-174..
- [28]- Laclette, J. P., Guerra, G., & Zetina, C. (1980). Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 92(2), 417-423.
- [29]- Ravelli, R. B., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., & Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, 428(6979), 198-202.
- [30]- Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Medina-Franco, J. L., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Hernández-Luis, F., & Hernández-Campos, A. (2013). Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: insights from computational and experimental data. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 41, 12-19.
- [31]- Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Romo-Mancillas, A., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Medina-Franco, J. L., & Hernández-Campos, A. (2013). Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 45, 26-37.
- [32]- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- [33]- Wolstenholme, A. J. (2011). Ion channels and receptor as targets for the control of parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 1(1), 2-13.
- [34]- Robertson, A. P., Buxton, S. K., Puttachary, S., Williamson, S. M., Wolstenholme, A. J., Neveu, C., & Martin, R. J. (2012). Antinematodal drugs—modes of action and resistance: and worms will not come to thee. *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, 233-249.
- [35]- Triballeau, N., Acher, F., Brabet, I., Pin, J. P., & Bertrand, H. O. (2005). Virtual screening workflow development guided by the “receiver operating characteristic” curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2534-2547.

CONCLUSIONES GENERALES

Se sintetizaron seis compuestos nuevos basados en el precursor estructural 1a, con el objetivo de ampliar la biblioteca de compuestos potencialmente antihelmínticos disponibles, así como también, profundizar en la comprensión de la relación estructura-actividad de dichas moléculas.

Las nuevas estructuras fueron obtenidas realizando modificaciones a nivel del anillo lactámico y del linker de unión de los dominios estructurales del precursor 1a. En función de los resultados de actividad biológica obtenidos y a los efectos de intentar acercarnos a la interpretación de los mismos, se aplicaron sobre los compuestos sintetizados, técnicas de simplificación molecular e ingeniería inversa (deconvolución), las cuales nos permitieron extraer una serie de conclusiones importantes.

La actividad antihelmíntica de las nuevas moléculas sintetizadas fue evaluada mediante ensayos *in vitro* fisiología guiados, utilizando el nematodo *Haemonchus contortus*. Puntualmente se realizaron ensayos de actividad trabajando con el estadio adulto y el estadio huevo de dicho nematodo, aplicando metodologías que habían sido previamente validadas por nuestro grupo de investigación, y que demostraron ser reproducibles para su aplicación en la presente tesis.

Se evaluó la actividad biológica de diez compuestos sobre el estadio adulto de *H. contortus*, de los cuales 3 resultaron activos (compuestos 10, 15 y 17). El análisis de la relación estructura actividad sugiere que el dominio benzimidazólico resulta necesario para la actividad observada, aunque no es una condición suficiente para la presencia de actividad. . El dominio lactámico en cambio, parece no ser activo de forma aislada frente a *H. contortus*. Sin embargo, la modulación estructural en el dominio lactámico, ejerce influencia sobre el perfil de actividad de los compuestos híbridos, aunque no fue posible establecer una relación entre la conformación de esta región y la actividad antihelmíntica.

Los compuestos 1a, 10, 15 y 17 fueron evaluados en el ensayo de eclosión de huevos. Los compuestos 1a y 10 resultaron inactivos mientras que 15 y 17 fueron activos. Estos resultados permiten suponer que el dominio benzimidazólico de los compuestos híbridos no estaría teniendo el mismo perfil de actividad que en los benzimidazoles antihelmínticos, sugiriendo un mecanismo distinto de acción para ambos grupos de compuestos.

Se puso a punto un ensayo *in vitro* de polimerización de tubulinas, con el fin de evaluar la posible participación de este blanco molecular en el mecanismo de acción de los nuevos compuestos activos sintetizados. Ninguno de los compuestos ensayados modificó el perfil de polimerización de tubulinas de origen porcino, por lo que no se pudo constatar actividad frente a este blanco molecular.

Se buscó aislar tubulinas nativas de helmintos, para ser utilizadas en el ensayo de polimerización, mediante la aplicación de la cromatografía de afinidad-TOG. La metodología de purificación demostró ser inadecuada para aislar tubulinas procedentes de *H.contortus*, dado que las mismas se obtenían impurificadas con la enzima glutamato deshidrogenasa, y en muy bajo rendimiento. Por otra parte se pudo purificar tubulinas procedentes del cestodo *Mesocestoides vogae*, aunque la cantidad y la funcionalidad de las tubulinas obtenidas, resultaron inadecuadas para su implementación en ensayos *in vitro* de actividad biológica.

Se aplicaron herramientas de química *in silico*, con el objetivo de ahondar en la comprensión sobre posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos sintetizados, que habían presentado actividad antihelmíntica.

El modelo tridimensional de la β tubulina 1 de *H.contortus*, creado aplicando la estrategia de modelado por homología, cumplió con los criterios de validación y pudo ser utilizado para los estudios de docking molecular.

El programa Autodock 4.2.6, utilizado en los estudios de docking, demostró ser adecuado para el sistema en estudio, arrojando valores de sensibilidad y especificidad aceptables, para los compuestos utilizados como control.

Los resultados del docking molecular sugieren que los compuestos 15 y 17 podrían ejercer su acción biológica mediante la unión a la β tubulina, de forma similar a los benzimidazoles antihelmínticos. Los compuestos 1a y 10 en cambio, no pueden ubicarse correctamente en este sitio descrito, sugiriendo, o bien un mecanismo de acción distinto para estos compuestos, o su unión a otra región de las tubulinas.

PERSPECTIVAS

Continuar con el diseño y síntesis de nuevas moléculas con potencial actividad antihelmíntica, basadas en el modelo de moléculas híbridas, con el objetivo de ampliar la biblioteca de compuestos disponibles, buscando optimizar perfiles fisicoquímicos y de actividad biológica. Por otra parte continuar con el diseño de moléculas que permitan ahondar en la comprensión de la relación estructura-actividad de los nuevos compuestos híbridos y sus derivados, haciendo hincapié en esclarecer el rol que juega el dominio lactámico en el perfil de actividad de estos compuestos.

Implementar nuevos bioensayos de actividad antihelmíntica que permitan ampliar la caracterización del perfil de actividad de los compuestos sintetizados, y que sirvan de insumo para el diseño de nuevas moléculas. En este sentido, el grupo de Farmacología-LEA ha venido trabajando en la instalación de nuevos ensayos de screening fisiología guiados basados en el nematodo *Haemonchus contortus*. Puntualmente se ha trabajado en un ensayo de motilidad, utilizando el estadio larvario L3 desenvainado (xL3), y un ensayo de desarrollo larvario del estadio xL3, para dar larvas L4.

En línea de lo anteriormente expuesto, sería de gran interés, poder contar con ejemplares adultos de *H. contortus* con fenotipo salvaje, provenientes de infecciones naturales, para ser utilizados en ensayos de motilidad, lo que permitiría evaluar el potencial antihelmíntico de los compuestos sintetizados frente a infecciones naturales. En este sentido nuestro equipo de trabajo ha estado intentado establecer conexiones con frigoríficos que se dedican a la producción ovina, para obtener el material parasitario.

Aislar tubulinas nativas de parásitos helmintos para utilizarlas en ensayos *in vitro* de polimerización de tubulinas, con el objetivo de evaluar la actividad de los compuestos sintetizados sobre este blanco molecular. Para ello se pueden probar técnicas como la purificación mediante ciclos de precipitación, las cuales han sido ampliamente descritas para aislar tubulinas de origen mamífero, pero con limitada aplicación en helmintos.

Continuar con los estudios *in silico* sobre la proteína β tubulina, para ahondar en la comprensión del posible mecanismo de acción de los compuestos sintetizados. Poder implementar la herramienta de dinámica molecular sería de gran utilidad para profundizar en los resultados preliminares obtenidos aplicando docking molecular.

**PUBLICACIONES REALIZADAS EN EL MARCO DE LA PRESENTE TESIS
DE MAESTRÍA**



Purification of native *M. vogae* and *H. contortus* tubulin by TOG affinity chromatography



Beatriz Munguía^a, Ramiro Teixeira^a, Victoria Veroli^b, Elisa Melian^a, Jenny Saldaña^a, Mahia Minteguiaga^a, Mario Señorale^b, Mónica Marín^b, Laura Domínguez^{a,*}

^aÁrea de Farmacología, Depto. CIENFAR, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), Uruguay

^bSección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Udelar, Uruguay

ABSTRACT

Microtubules are non-covalent cylindrical polymers formed by alpha- and beta-tubulin heterodimer units, crucial for cell division, intracellular transport, motility and differentiation. This makes them very attractive pharmacological targets exploited to develop different drugs such as anthelmintics, antifungals, and antineoplastics. In this work, in order to establish an *in vitro* target-based screen to integrate to the search for new anthelmintics, we explored the extraction of native assembly-competent tubulin from two helminth parasites: *Mesocestoides vogae* tetrathyridia (syn. corti, Cestoda: Cyclophyllidea), a useful cestode biological model, and *Haemonchus contortus*, a sheep gastrointestinal nematode of interest in livestock production. For this purpose, a novel tubulin affinity chromatography procedure was employed, based on the binding capacity of TOG (Tumor Overexpressed Gene) domain from MAPs (microtubule-associated proteins). The TOG domain of the protein Stu2 from *Saccharomyces cerevisiae* fused to GST (glutathione S-transferase) were produced in *E. coli*, and the immobilized recombinant proteins allowed for native tubulin extraction from parasites. The binding capacity of TOG 1 affinity column (3.6%) was estimated using commercial porcine brain tubulin. A total amount of up to 126 µg of *M. vogae* tubulin was purified, whereas *H. contortus* tubulin co-eluted with glutamate dehydrogenase enzyme. The identity of tubulins was confirmed by western blotting and mass spectrometry. The abundance of tubulin estimated in *M. vogae* was 10% soluble extract, which probably could explain differences observed between tubulin purification results of both helminth parasites.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vprsr



Original article

Molecular analysis of benzimidazole-resistance associated SNPs in *Haemonchus contortus* populations of Uruguay



Beatriz Munguía^{a,*}, Ramiro Teixeira^a, Maria Victoria Veroli^b, Mónica Marín^b, Laura Domínguez^a

^aÁrea de Farmacología, Depto. CIENFAR, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

^bSección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Udelar, Igúí 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

ABSTRACT

Haemonchus contortus is one of the most important parasite nematodes of small ruminants around the world and causes great economic losses in livestock production. Control of gastrointestinal nematode infections, like haemonchosis, relies mainly on anthelmintic drugs, but its excessive and inappropriate use has caused serious drug resistance issues in many countries, including Uruguay, where sheep production occupies an important place in the country's economy. Benzimidazole (BZ) anthelmintics have been used for decades to treat sheep against *H. contortus* infection and resistance to this anthelmintic group has been widely described. Molecularly, BZ resistance in *H. contortus* has been correlated with single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the β -tubulin isotype 1 gene at codon 200 and 167 (both TTC to TAC, F167Y and F200Y) and at codon 198 (GAA to GCA, E198A). The aim of this work was to explore the presence of these tubulin SNPs in *H. contortus* adult worms recovered from sheep abomasas from a slaughterhouse in Uruguay. The mean resistant allelic frequencies at positions F167Y and F200Y were 20.25 and 47.45%, respectively, for worms recovered from naturally infected sheep slaughtered in 2013, while those that were slaughtered in 2014 presented only F200Y SNP with a frequency of 86.89%. Also *H. contortus* Kirby adult worms (anthelmintic-susceptible McMaster isolate), recovered from artificially infected sheep, were analyzed as reference for comparative purposes. This analysis showed susceptible genotype at 167 and 198 position, and a low level of the resistance allele at the 200 position (3.66%). This is the first study for the presence of SNPs in the isotype-1 β -tubulin gene of *H. contortus* populations in Uruguay, which is consistent with the previous epidemiological studies carried out through the method of fecal egg count reduction test (FECRT), thus confirming the serious resistance levels to BZ anthelmintics also in this country.