



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

POLIFARMACOLOGÍA Y REPOSICIONAMIENTO COMO ESTRATEGIA FRENTE A ENFERMEDADES PARASITARIAS DESATENDIDAS

Pilar Terra Olivera

Tesina de Grado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Licenciada en Bioquímica

del Plan 2017 de la Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Mayo de 2025

Montevideo, Uruguay

**Polifarmacología y reposicionamiento como estrategia
frente a enfermedades parasitarias desatendidas**

Tribunal:

Dra. Elena Aguilera

Dr. Santiago Chávez

Dra. Macarena Eugui

Tutora de tesina: Dra. Elena Aguilera

Co-tutora de tesina: Dra. Paola Lepanto

Agradecimientos

Quiero dar gracias en primer lugar a mis tutoras, Elena y Paola, por su disposición y apoyo durante todo el desarrollo de mi tesina, en especial a Elena, quien me acompañó en las largas horas de síntesis, columnas, cultivo y escritura en el rol de tutora, quién me supo sobrellevar (mérito relevante) como estudiante en mis cursos de grado, y quién además, me aconsejó y acompañó en mis primeros viajes de la ciencia.

Decir gracias a mi familia: a Mamá, por traerme a tierra e impulsarme en mis ideas, a “Labuela”, por heredarme su pasión y arte, al tío Pablo, por mostrarme mis primeros documentales y la buena música, a mi hermano Ro, por sus abrazos y sus vicios, a mi hermana Lau, por su intensidad y cariño, y a mi tía Nati, por sus locuras de siempre. También dar gracias a mi segunda familia, Claudia, Lilián, Silvana, Alberto, Germán, Emma, Matías, mi abuela Nely, y a mi Papá, por auspiciarme.

Agradecer también a mis amigos: a Bruno, por enseñarme la no ética y ser mi instrumental en cuerdas, a Facundo, por hacerme más llevadero y entretenido las primeras largas horas universitarias de zoom pandémicas, a Federico, por acompañarme en viajes y enseñarme más sobre la música, a Gerónimo, por sorprenderme y hacer de todo una comedia, a Johana, por estar y acompañarme siempre (literalmente), a Josefina, por enseñarme la definición de delicadeza y patria gaucha, y a Sofía, por ser mi equipo desde mis primeras pipeteadas de agua (para aquellos que analizan con más detalle, están en orden alfabético). También agradecer a las Fuerzas Especiales, a los demás compañeros de facultad que me acompañaron en los laboratorios, y a todos las demás personas que estuvieron presentes dándome sostén en mis años universitarios.

Dar las gracias a todo el Grupo de Química Orgánica, del cual me llevo amigos que van más allá de lo académico. Gracias por acompañarme y aconsejarme en todos mis desafíos de la ciencia (y la no ciencia), por mostrarme caminos cuando más lo necesitaba, y por dejarme ser parte del laboratorio y del equipo. También a Hugo, por sus anécdotas y enseñanzas sobre sus experiencias, por su docencia y por ser mi chaperón.

Por otra parte, agradezco al IICS por hospedarme y hacerme sentir como en casa durante mi pasantía en Paraguay, por mostrarme y enseñarme sus instalaciones y, además, los rincones inolvidables de su país, y en especial a Viviana y Belén, a quienes extraño y espero poder ver pronto.

Agradecer al equipo del BRT, por darme las herramientas para llevar adelante mis últimos meses como estudiante, y en especial a Gonza, por darme un lugar en su trabajo y aconsejarme con nuevas perspectivas, por los buenos momentos, la confianza y las palabras de ánimo.

A mi novio Mate, por esperarme y quererme sin entender el mundo en el que se metía. Por sus detalles cuando sentía que los últimos momentos de mi carrera eran interminables, por escucharme ser científica mientras cocinaba nuestro plato preferido o me acompañaba con una de sus melodías.

Agradezco también a la Facultad de Ciencias, por formarme, permitirme encontrar mi profesión, a mis amigos y a mis compañeros de vida.

Por último, el mayor de los gracias a mi casi border collie, Pochito, y mi gato/a indomable, Mochongo, por esperarme siempre cuando vuelvo a casa.

Polifarmacología y reposicionamiento como estrategia frente a enfermedades parasitarias desatendidas

Pilar Terra Olivera

Estudiante de grado para la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias
Universidad de la República

2025

Tutora

Dra. Elena Aguilera

Grupo de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Co- tutora

Dra. Paola Lepanto

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur Montevideo

Las enfermedades causadas por parásitos tripanosomátidos como la enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis son categorizadas por la Organización Mundial de la Salud como enfermedades desatendidas, declaradas como endémicas en distintas regiones del mundo como América Latina. La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, con una incidencia anual de 30.000 casos únicamente en el continente americano. Por otro lado, la Leishmaniasis es causada por protozoarios del género *Leishmania spp.*, caracterizados por reproducirse e invadir los macrófagos del sistema inmune del hospedero. Actualmente, las terapias disponibles para ambas enfermedades muestran efectos adversos graves para el ser humano, con eficacias limitadas en las distintas etapas de la infección y

una creciente resistencia, siendo necesario en un gran porcentaje de los casos la interrupción del tratamiento.

El reposicionamiento de fármacos (reutilizar medicamentos ya aprobados para otras indicaciones) y la terapia combinada de medicamentos frente a una enfermedad en busca de efectos sinérgicos o aditivos son estrategias que buscan superar las limitaciones de los tratamientos actuales y superar los desafíos del desarrollo de nuevos fármacos, como pueden ser: alto costo, tiempo requerido para el desarrollo, alta tasa de fracaso, entre otras. En este trabajo se combinaron tres moléculas sintéticas derivadas de arilidenonas (**C1**, **C2** y **C3**) con actividad y selectividad descrita anteriormente frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum* junto con medicamentos comerciales obtenidos previamente por reposicionamiento con el fin de obtener efectos sinérgicos o aditivos frente a los parásitos. Para esto, se sintetizó en primer lugar una de las arilidenonas, **C1**, para continuar más adelante con los ensayos de actividad *in vitro* de las distintas combinaciones frente a las formas no infectivas epimastigota y promastigota en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum* respectivamente. Se obtuvieron cuatro combinaciones sinérgicas y una aditiva para *Leishmania infantum* y una única combinación aditiva para *Trypanosoma cruzi*. A partir de las combinaciones sinérgicas o aditivas obtenidas se realizaron estudios de citotoxicidad inespecífica utilizando como modelo de células mamíferas macrófagos murinos (J774.1), donde se obtuvo una combinación selectiva tanto para *Leishmania infantum* como para *Trypanosoma cruzi*. Por otro lado, para evaluar la seguridad de las combinaciones se realizaron estudios de mutagenicidad y toxicidad en embriones zebrafish. Finalmente, se seleccionó la combinación con los mejores resultados de los ensayos previos para continuar con estudios en el modelo murino agudo *in vivo* de la enfermedad de Chagas.

Este trabajo demuestra que la combinación de moléculas sintéticas con fármacos reposicionados puede ofrecer terapias alternativas más seguras, efectivas y económicas, atendiendo a los problemas de salud global en regiones con recursos limitados. Por otro lado, los resultados abren nuevas vías para futuros ensayos preclínicos en la búsqueda de soluciones sostenibles para mejorar la calidad de vida de las poblaciones afectadas por estas enfermedades.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	9
1.INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Enfermedad de Chagas.....	13
1.2 Leishmaniasis.....	16
1.3 Reposicionamiento.....	18
1.4 Terapia combinada de fármacos.....	19
2.ANTECEDENTES.....	22
3.PROPOSTA Y OBJETIVOS.....	29
4.METODOLOGÍA.....	32
4.1 Reactivos químicos.....	33
4.2 Síntesis química.....	33
4.3 Actividad de las combinaciones frente a <i>T. cruzi</i> y <i>L. infantum</i>	35
4.4 Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos.....	36
4.5 Ensayo de mutagenicidad (Test de Ames).....	36
4.6 Toxicidad en embriones de zebrafish.....	37
4.7 Ensayos <i>in vivo</i> en el modelo murino agudo para la enfermedad de Chagas.....	38
5.RESULTADOS.....	40
5.1 Síntesis química.....	41

5.2 Evaluación de actividad <i>in vitro</i> frente a <i>T. cruzi</i> y <i>L. infantum</i>	46
5.3 Ensayo de mutagenicidad (Test de Ames).....	54
5.4 Estudios de toxicidad en embriones zebrafish.....	58
5.5 Ensayos <i>in vivo</i> en el modelo murino agudo para la enfermedad de Chagas.....	61
6.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	64
7.REFERENCIAS.....	66

Lista de abreviaturas

A0c – Absorbancia del control negativo al día 0

A0p – Absorbancia en el día 0

Ac – Absorbancia del control negativo al día 5

AC1 – Lapatinib

ADME – Absorción, distribución, metabolismo y eliminación

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Ai – Dosis individual molécula A

Aj – Dosis en combinación molécula A

AMP – Adenosín monofosfato cíclico

Ap – Absorbancia al día 5

ARN – Ácido ribonucleico

Bi – Dosis individual molécula B

Bj – Dosis en combinación molécula B

Bnz – Benznidazol

COSY – Espectroscopía de correlación homonuclear ^1H - ^1H

CYP – Citocromo P450

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

E1 – (E)-3-(3-fenil-2-propen-1-il)acrilaldehído

EC – Enfermedad de Chagas

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

^1H RMN – Resonancia Magnética Nuclear de Protón

FDA – Food and Drug Administration

FICI – Índice de fracción inhibitoria

IC₅₀ – Concentración que inhibe el 50 % de la proliferación

IICS – Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud

IFN- γ – Interferón gamma
IgG – Inmunoglobulina G
IS – Índice de selectividad
L. braziliensis – *Leishmania braziliensis*
L. infantum – *Leishmania infantum*
LC – Leishmaniasis cutánea
LD₅₀ – Dosis letal al 50% de los embriones
LV – Leishmaniasis visceral
MTT – Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
ND – No determinado
Nfx – Nifurtimox
OECD – Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PBS – Buffer fosfato salino
PCR – Reacción en cadenas de polimerasas
PI – Porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito
Rf – Factor de retención
RF5 – Doxiciclina
RF10 – Simvastatina
RF14 – Climodin
RF16 – Sertralina
RF23 – Nitrofurantoina
RF37 – Bromuro de Pinaverio
RF58 – Naftazona
RF86 – Amlodipina
RF88 – Gabapentina
RF 89 – Profenamina
RF95 – Carvedilol
RF98 – Clomipramina clh
S. typhimurium – *Salmonella typhimurium*

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TcTIM – Enzima triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*

Th1 – Células T helper 1

TLC – Cromatografía en capa fina

TNF- α – Factor de necrosis tumoral beta

334 – Benznidazol

486 – Ketoconazol

487 – Terbinafine

1475 – Dipirona

1483 – Loratadina

1 - INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria sistémica causada por el protozoo heteroxénico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Es endémica en 21 países de América Latina continental y es reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades tropicales desatendidas.¹

La principal forma de transmisión es vectorial mediante un insecto vector como la vinchuca, pero también es posible por transfusión de hemoderivados, trasplante de órganos, vertical (madre a hijo) y raramente por ingesta de alimentos contaminados. La EC presenta dos fases clínicas: aguda (4-8 semanas) y crónica. Dentro de las manifestaciones clínicas en la fase aguda se reporta fiebre y linfadenopatía, entre otras, sin embargo la mayoría de los pacientes son asintomáticos.² En la fase crónica, el 20-30% desarrollan síntomas como daño visceral cardíaco (siendo la cardiomiopatía la primera causa de muerte por esta enfermedad en América Latina) y/o digestivo.¹ En el mundo existen 6 millones de personas con EC, con una incidencia anual de 30.000 casos en la región de las Américas y 9.000 recién nacidos infectados durante la gestación.³

Durante el ciclo de vida del parásito se puede hospedar en vectores invertebrados (insectos triatominos) y especies mamíferas, para esto sufre cambios en la morfología, forma nuclear, remodelación de la cromatina, expresión genética, metabolismo, entre otros. Debido a su gran heterogeneidad, *T. cruzi* es capaz de afectar una amplia gama de tejidos. Se definen tres etapas de desarrollo inicialmente: tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes. El ciclo comienza en el insecto (**Figura 1**), el cual succiona del torrente sanguíneo del humano la forma infectiva tripomastigote del parásito. Una vez dentro del estómago del insecto, los parásitos se transforman en esferomastigotes para pasar finalmente a epimastigotes, su forma no infectiva. En su forma epimastigotes, los parásitos se trasladan al intestino donde se dividen y adhieren a membranas perimicrovillares, las cuales son secretadas por las células intestinales del vector. Este paso es esencial para la división y metaciclogénesis (desencadenada por distintos factores como la inanición nutricional, AMP cíclico ó la adenilato ciclasa), donde el parásito se transforma de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (altamente infecciosos) y es excretado. En esta etapa del ciclo el parásito sufre cambios morfológicos (elongación del cuerpo celular y flagelo) y cambios en su expresión génica: expresan glicoproteínas de superficie capaces de interactuar con células mamíferas, entre ellas la proteína gp82, la cual desencadena un cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular esencial para que penetre el parásito. El parásito logra interactuar con las células mamíferas debido a que la piel del huésped vertebrado está lesionada por la picadura del insecto, lo que provoca la infección a través de las heces del insecto.⁴

Una vez dentro del huésped, el parásito alterna entre formas replicativas no infecciosas (amastigote), y la forma infecciosa (tripomastigote) circulando en el torrente

sanguíneo. Ésta última, invade las células en el sitio de inoculación y se transforma en la forma amastigote, la cual posteriormente regresa a la forma sanguínea al completar un ciclo replicativo como amastigote intracelular.⁴

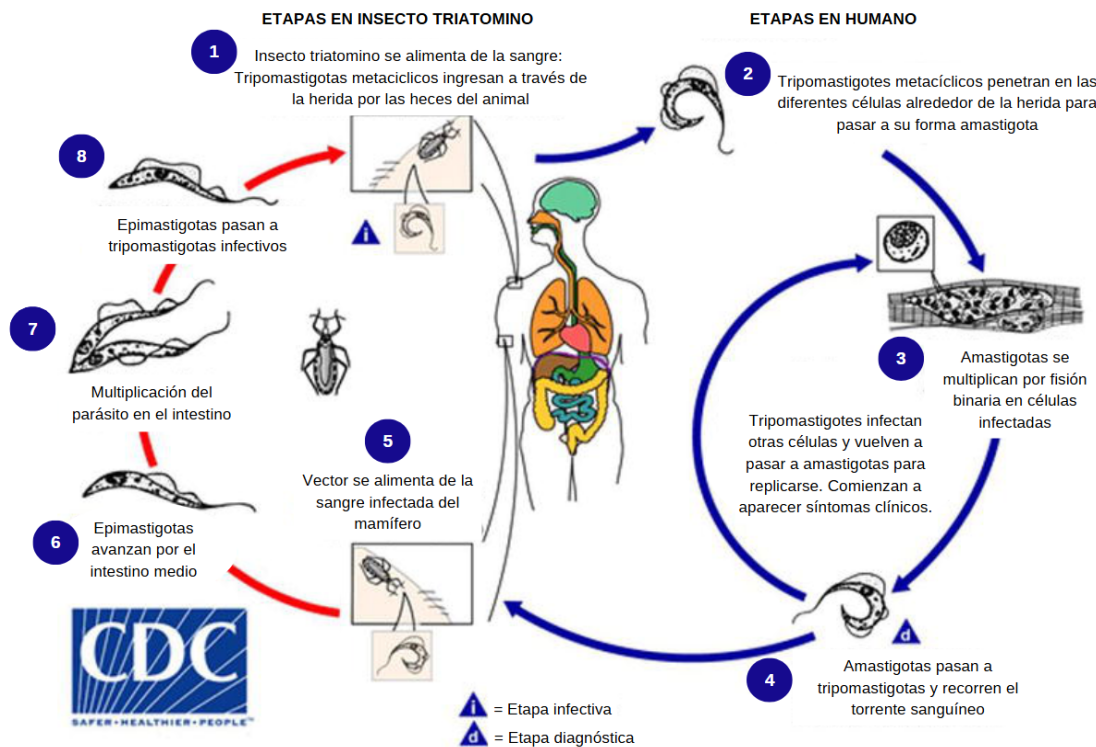


Figura 1. Ciclo de vida *T. cruzi* en el insecto (vector invertebrado) y mamíferos (huésped vertebrado), donde se observan las diferentes formas del protozoo (figura modificada a partir de la referencia ⁴).

Inicialmente, la EC se restringía a áreas rurales de Latinoamérica, sin embargo, en los últimos años la inmigración de latinoamericanos a países en Europa, Norteamérica, Asia y Oceanía han causado que la EC sea un problema de salud global, reportando un 10% de los casos de EC fuera de Latinoamérica. Dentro de Centro y Sudamérica la prevalencia más elevada de EC ocurre en Bolivia (alrededor del 20%), seguido de Paraguay (sobre el 5,5%), Nicaragua (4,6%), Honduras (4,2%) y El Salvador (3,8%). Por otro lado, de los países fuera de Latinoamérica, España es el país no endémico con mayor número de casos de EC (el 75% de los casos de la Unión Europea, aproximadamente 65.000 personas afectadas), sin embargo, debido a la ausencia del vector no hay transmisión vectorial.¹

Tanto en la infección en fase aguda como en la EC congénita o en la reactivación en pacientes inmunodeprimidos, es posible diagnosticar la EC mediante visualización directa de tripomastigotes al microscopio o métodos moleculares como PCR. Sin embargo, durante la fase crónica los niveles de parasitemia son bajos por lo que el diagnóstico se basa únicamente en pruebas positivas con IgG frente a antígenos de *T. cruzi*.²

Los fármacos tripanocidas disponibles en la actualidad son benznidazol (**Bnz**) y nifurtimox (**Nfx**) (comercializados hace 50 años, **Figura 2**) que buscan eliminar el *T. cruzi* de forma que no logre establecerse y provocar daños viscerales, sin embargo estos fármacos en general no son bien tolerados causando efectos secundarios en el 44% de los pacientes, particularmente exantema cutáneo, obligando a interrumpir el tratamiento en ciertos casos.¹ Además, el efecto de estos fármacos se ve afectado por la edad del paciente, pacientes inmunodeprimidos o embarazadas, la fase de infección, siendo menos efectivos los tratamientos cuanto más avanzada la infección.^{5,6}

El **Bnz** (*N*-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida)⁷ es un profármaco derivado del sistema nitroimidazol, es decir que se administra de forma inactiva y ejerce su efecto una vez es metabolizado por el organismo. Actualmente, es el tratamiento de primera línea tanto en fase aguda como crónica. Dentro del metabolismo del parásito es activado por la nitroreductasa pudiendo unirse y bloquear a la guanina en el ADN y ARN, generando un ambiente susceptible al daño oxidativo para el parásito en todas las etapas de su ciclo de vida.² Dentro de los efectos adversos de mayor a menor frecuencia se encuentran: dermatitis, hipersensibilidad, intolerancia digestiva, polineuritis, depresión de la médula ósea, toxicidad hepática, entre otras. En el 12-18% de los casos la medicación debe ser interrumpida debido a los efectos secundarios, siendo responsable dentro de este porcentaje en un 89% la dermatitis.⁵

El Nifurtimox (**Nfx**, (*E*)-*N*-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitrofuran-2-il) metenamina es un derivado del nitrofurano y su tratamiento varía según la fase de la enfermedad, edad del paciente, entre otras.⁸ El **Nfx** genera radicales nitroaniónicos mediante la nitroreductasa que en presencia de oxígeno produce radicales libres que generan daño en el parásito, bloqueando la síntesis del ADN y estimulando su degradación. Es efectivo en las fases amastigote y epimastigote de *T. cruzi*. Debido a su perfil altamente tóxico el **Nfx** no está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y se utiliza únicamente como tratamiento de segunda línea.²

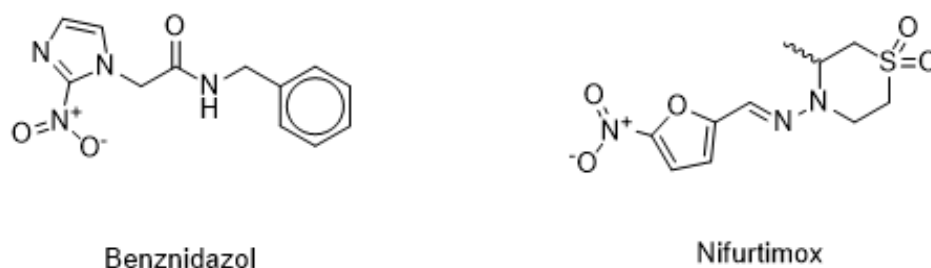


Figura 2. Estructura de los fármacos comerciales **Bnz** y **Nfx** disponibles actualmente para la EC.

Además ambos fármacos son compuestos reconocidos por su capacidad para inducir mutaciones en el material genético, lo que los clasifica como sustancias mutagénicas.⁹

Debido a los efectos secundarios mencionados y a la escasa disponibilidad de fármacos para tratar esta enfermedad, en las últimas dos décadas se han buscado nuevas estrategias terapéuticas para la EC. Entre ellas se destacan el reposicionamiento de fármacos y la síntesis de nuevas moléculas, con el objetivo de lograr tratamientos más eficaces y accesibles para todas las fases clínicas de la enfermedad, especialmente en países tercermundistas, los cuales en su mayoría son de ingresos bajos.²

1.2. Leishmaniasis

Las manifestaciones clínicas más comunes de la leishmaniasis son la leishmaniasis visceral (LV), con un efecto más sistémico, y la leishmaniasis cutánea (LC), con una patología centrada en gran medida en la piel, ambas distribuidas globalmente en aproximadamente 100 países endémicos. Los protozoarios causantes de las distintas manifestaciones de la leishmaniasis pertenecen a 20 especies distintas del género *Leishmania* que se transmiten entre mamíferos por hembras de flebótomos. En la última década se reportó una incidencia anual de menos de 50.000 casos de LV y 1.2 millones de LC siendo las regiones más afectadas Centro y Suramérica, Etiopía y el Norte de África. El acceso a programas de diagnóstico y tratamiento han disminuído el número de casos, sobre todo en regiones como India. Debido a que la LC puede curarse sin tratamiento (entre 3-18 meses) es una de las manifestaciones menos atendidas, dando lugar a múltiples variantes de la enfermedad.¹⁰

Dentro del vector, el parásito existe en su forma promastigota flagelada (**Figura 3**), la cual se diferencia para formar formas metacíclicas infectivas. La transmisión a partir de este vector se ve favorecida por la secreción de un gel similar a la mucina que se acumula en el intestino y aparato bucal del vector. Por otro lado, la infección dentro del mamífero se establece en la piel, donde ingresan las formas infectivas promastigotes rodeados por una capa del gel que los protege para resistir y evadir las defensas del huésped. Una vez dentro del mamífero invade los macrófagos perdiendo su flagelo, desarrollando su forma intracelular amastigota dentro del fagolisosoma. El progreso de la enfermedad tanto para LV como LC depende del mantenimiento de un estado inmunosupresor específico del parásito.^{10,11}

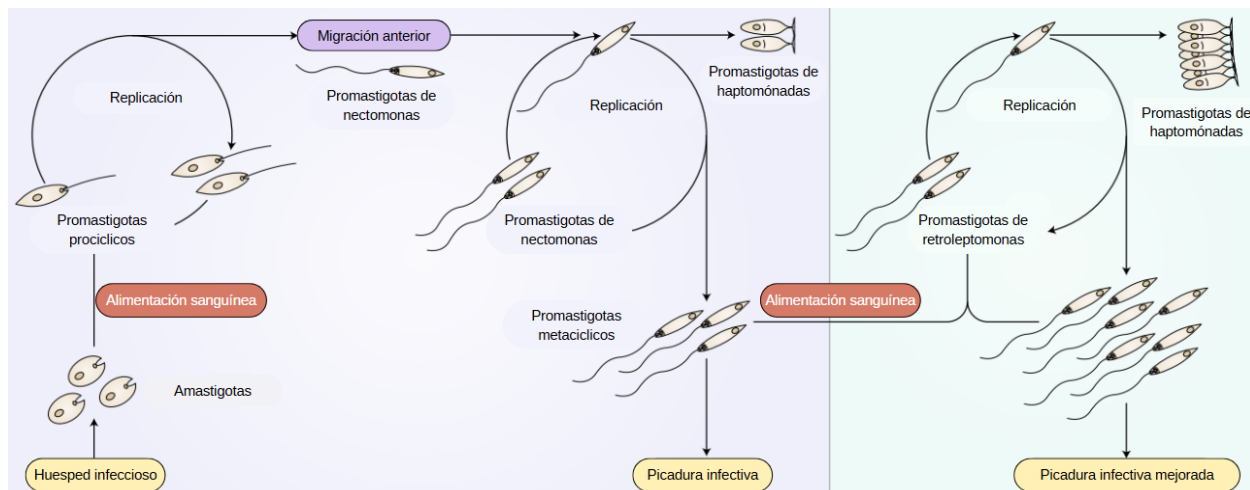


Figura 3. Ciclo de vida de los parásitos pertenecientes al género *Leishmania* entre los vectores flebótomos y huéspedes mamíferos (figura modificada a partir de la referencia). Se diferencian dos fases replicativas: en el torrente sanguíneo el parásito se desarrolla en su forma promastigote procíclico para dar lugar a promastigotes metacíclicos (etapa infectiva), y una segunda etapa donde se observan promastigotes haptomonádicos (transmisión).¹⁰

Actualmente, debido a su pleomorfismo clínico el procedimiento estándar para su diagnóstico es mediante microscopía.⁷ Con respecto a los mecanismos de defensa frente al parásito se ha demostrado que la inducción de la citoquina interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α por parte de las células T helper 1 (Th1), junto con los neutrófilos son las células esenciales para la respuesta inflamatoria frente a la infección de leishmaniasis; en base a esto se han diseñado varias vacunas pero ninguna de ellas ha tenido eficacia notable.¹²

Por otro lado, el tratamiento de primera línea frente a esta infección es mediante medicamentos, pero debido a su alto costo, toxicidad y efectos secundarios hace que su uso sea limitado. Además, la larga duración del tratamiento mediante fármacos aumenta la posibilidad de resistencia. Dentro de los efectos adversos se han reportado arritmias cardíacas, hepatitis y disfunción renal, entre otros.¹²

Dentro de los fármacos de primera línea se encuentra el antimonio pentavalente (Sb^{5+}) como quimioterapia contra la leishmaniasis, sin embargo el aumento de la resistencia al fármaco ha restringido sus beneficios. Por otro lado, existen fármacos de segunda línea como la pentamidina y la anfotericina B (**Figura 4**), no obstante ambos presentan una alta toxicidad pudiendo, en el caso del último, inducir toxicidad aguda con hospitalización. La miltefosina (**Figura 5**) (agente anticanceroso) es otra alternativa frente al tratamiento a la LV y la LC debido a su eficacia oral y corto curso de tratamiento que lo hacen beneficioso, sin embargo, tiene grandes limitaciones debido a sus efectos de teratogenicidad y su larga vida útil, siendo propenso a generar resistencia.¹³

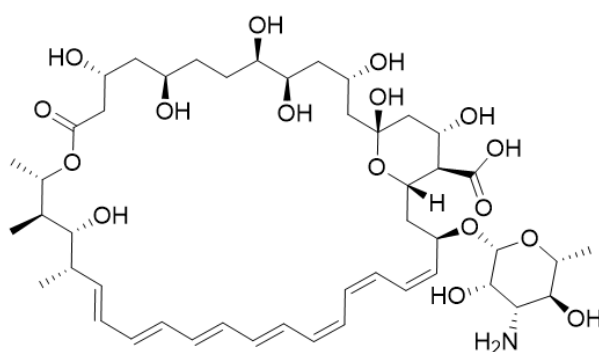


Figura 4. Estructura de la anfotericina B, uno de los fármacos de segunda línea disponibles frente a la leishmaniasis.¹⁴

Los modos de acción de estos medicamentos incluyen inhibición de la biosíntesis de nucleótidos, alteración de la membrana o intervención en la síntesis de proteínas del parásito. En algunos países como la India, se ha recomendado la terapia combinada de diferentes medicamentos (como la anfotericina B con miltefosina) la cual podría ser más efectiva, con una duración de tratamiento menor y menos efectos secundarios.¹⁴

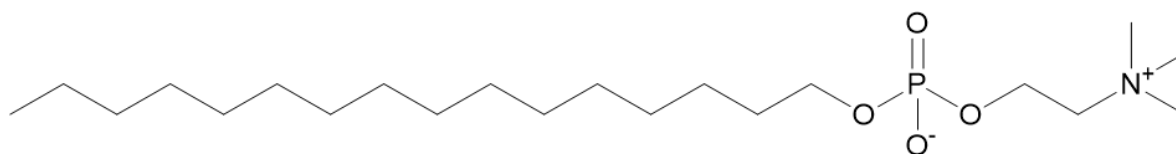


Figura 5. Estructura de la miltefosina, uno de los fármacos disponibles frente a la leishmaniasis.

Debido a todos estos factores tanto la terapia farmacológica como la terapia mediante vacunas hasta el momento no ha sido eficaz para erradicar la enfermedad, lo que hace necesario el desarrollo e investigación de terapias alternativas frente a la leishmaniasis.¹²

1.3. Reposicionamiento

El reposicionamiento de fármacos se basa en reutilizar un fármaco del mercado para una nueva indicación, es decir, encontrar nuevos usos para medicamentos ya existentes con el fin de superar los desafíos en el desarrollo de nuevos fármacos como pueden ser: alto costo, tiempo requerido para el desarrollo, entre otras.¹⁵ Este método se basa, por lo tanto, fundamentalmente en el concepto de fármacos pleiotrópicos (acción sobre múltiples dianas biológicas) y enfermedades con blancos biológicos comunes. Esta técnica no solo abarca medicamentos en el mercado, sino que se ha ampliado a compuestos activos que no superaron una fase clínica de desarrollo o medicamentos retirados del mercado por múltiples razones. Sin embargo, no abarca aquellas sustancias que aún no han sido sometidas a investigación clínica (compuestos en bibliotecas químicas de grupos

académicos, entre otras), o modificaciones estructurales de los fármacos.¹⁶

Esta herramienta muestra una ventaja al utilizar la información ya disponible acerca de las propiedades biológicas (seguridad, absorción, distribución, metabolismo, excreción, entre otras) de un medicamento que ya han sido aprobadas, o efectos secundarios que podrían llegar a ser ventajosos para otra enfermedad a través de una formulación diferente, nueva dosis y vía de administración alternativa. Asimismo, el crecimiento de datos estructurales permite utilizar la técnica a este nivel, analizando interacciones fármaco-blanco para predecir el potencial polifarmacológico y posibles oportunidades de posicionamiento. Aún más, en estudios más recientes es posible combinar el acoplamiento molecular (docking) con el análisis de interacciones proteína-ligando (cribado virtual) para identificar nuevos candidatos.¹⁶

Anteriormente, varios estudios han encontrado posibles candidatos para el reposicionamiento contra la EC como son: amiodarona, utilizada como agente antiarrítmico, trimetoprima/sulfametoxazol, empleado como tratamiento para la infección por *Pneumocystis carinii*, ó el posaconazol y ravuconazol, los cuales lograron llegar a ensayos clínicos de fase II con una eficacia menor en comparación con el **Bnz**.¹⁷

Por otro lado, la anfotericina B además de tener un efecto anti leishmaniasis, inicialmente fue empleado por sus propiedades antifúngicas. Además, se han utilizado otros candidatos con posible acción antileishmania como la hidroxiurea ó el cisplatino, ambos agentes antitumorales eficaces contra diferentes especies del género *Leishmania*.¹⁸

Dada la necesidad de medicamentos más efectivos y menos tóxicos tanto para la EC como para la leishmaniasis, junto con el bajo interés comercial de las compañías farmacéuticas, provocan que estas enfermedades sean un candidato ideal para el reposicionamiento de fármacos.¹⁶⁻¹⁸

1.4. Terapia combinada de fármacos

En los últimos años, la búsqueda de nuevas terapias frente a distintas enfermedades se ha centrado principalmente en explorar nuevas moléculas que apunten a un blanco preestablecido. Sin embargo, los compuestos dirigidos a un único objetivo presentan una eficacia, seguridad y resistencia limitada. Esto se debe a que existe intercomunicación y redundancia entre las distintas vías metabólicas lo que impide la acción precisa de la molécula sobre el blanco molecular deseado. Además, también se puede observar actividad sobre otras moléculas no dianas, neutralización del compuesto por parte del metabolismo o incluso respuestas compensatorias.¹⁹

Debido a estos factores, se han planteado diferentes estrategias que involucran múltiples dianas terapéuticas como pueden ser las terapias combinadas. Este tipo de terapia puede actuar de distintas formas, entre ellas: sobre un mismo blanco molecular en un mismo o diferente sitio en la célula, diferentes dianas en una misma vía, diferentes moléculas involucradas en distintas vías, entre otras. Los fármacos administrados en combinación

pueden producir efectos mayores o menores que su efecto individual al regular de forma negativa respuestas compensatorias, neutralizadoras o de resistencia de la célula. Una combinación es sinérgica, aditiva o antagónica desde el punto de vista farmacodinámico si el efecto es mayor, igual o menor que la suma de los fármacos utilizados en forma independiente, respectivamente. Para poder distinguir los distintos efectos posibles mencionados anteriormente entre los fármacos es necesario realizar un isoblograma, un gráfico construido a partir de las dosis individuales de los agentes de estudio (línea de aditividad). Es decir que, aquellos compuestos con una potencia relativa constante dan lugar a isoblogramas aditivos lineales (**Figura 6**) que permiten distinguir efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos.²⁰

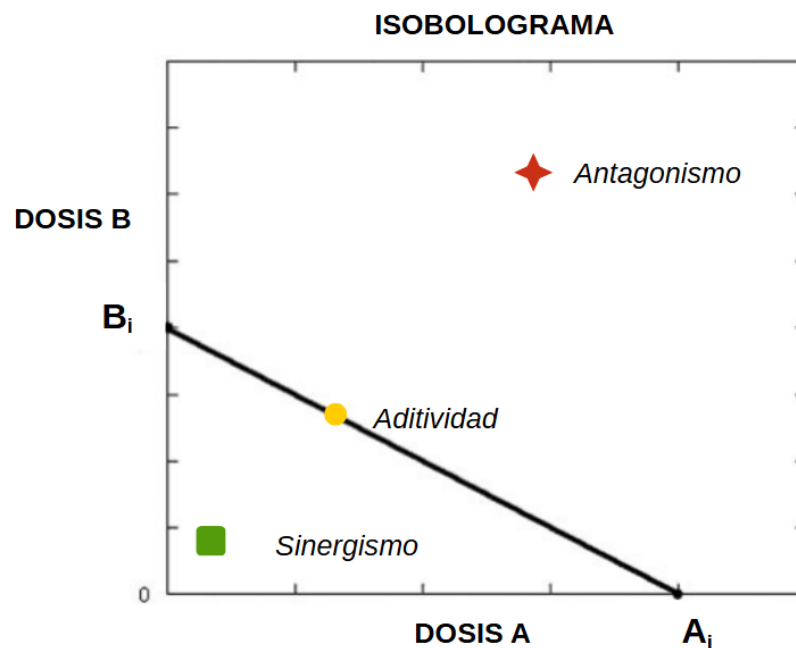


Figura 6. Representación adaptada de Tallarida, R, J., de un isoblograma aditivo, donde se observa la línea de aditividad construida a partir de las dosis individuales de los fármacos (B_i y A_i). Además, se observan los distintos efectos posibles: sinergismo (verde, cuadrado) por debajo de la línea de aditividad, aditividad (amarillo, círculo) sobre la línea y antagonismo (rojo, estrella) arriba de la línea.²⁰

Dependiendo de si el nuevo punto obtenido a partir de los valores de las dosis en combinación (B_j y A_j) cae por debajo, sobre o por encima de la línea de aditividad, el efecto obtenido será sinérgico, aditivo o antagónico respectivamente.²⁰

Los estudios sobre los mecanismos moleculares de los fármacos, interacciones moleculares, efectos farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos permiten el desarrollo de nuevas terapias combinadas que apunten a diferentes dianas. Actualmente, se han explorado las combinaciones de fármacos en las enfermedades desatendidas con el fin de lograr una mayor eficacia a una dosis menor, evitar resistencia al medicamento, mejorar

la acción terapéutica y evitar acciones no deseadas, entre otras.¹⁹ En el caso de la leishmaniasis, anteriormente se ensayó la combinación de heliangina (compuesto bioactivo derivado de extractos) y la glucantime en el modelo *in vivo* de la LC, mostrando una reducción significativa en la progresión de la lesión de la enfermedad y la carga parasitaria en comparación con el grupo control tratado con vehículo y con el grupo tratado con los compuestos individuales.²¹ Con respecto a la EC, se ha descrito que los antimicóticos son potenciales agentes antiparasitarios, particularmente el ketoconazol. A partir de esto, se han probado distintas combinaciones del ketoconazol con otros agentes antimicóticos, mostrando efectos sinérgicos tanto en la forma epimastigote como amastigota de *T. cruzi*.^{22,23}

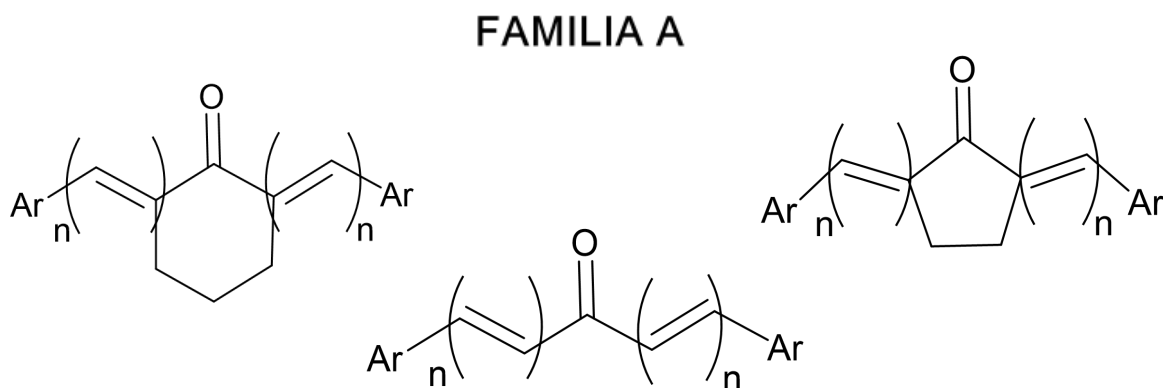
Este tipo de terapia es ideal para enfermedades desatendidas, dado el bajo interés comercial de desarrollar nuevos fármacos y la alta toxicidad de los compuestos disponibles, al mejorar la acción, efectividad y dosis de los candidatos en combinación.¹⁹⁻²⁴

2 - ANTECEDENTES Y FUNDAMENTOS DEL TRABAJO

2.ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO

Anteriormente, en el Grupo de Química Orgánica Medicinal del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, la Dra. Elena Aguilera desarrolló en el marco de su tesina de grado y tesis doctoral la obtención de nuevas moléculas derivadas de 1,5-diaril-1,4-pentadien-3-ona (**Familia A, Esquema 1**). Estos compuestos tienen como característica que su síntesis es de bajo costo y amigable con el ambiente, teniendo en cuenta el principio de eficiencia energética de la química verde (la reacción se realiza a temperatura y presión ambiente), además de su simplicidad estructural. Se obtuvieron diferentes compuestos de los cuales se evaluó su actividad tripanosomicida *in vitro* frente a la forma epimastigote de *T. cruzi*, considerando activos aquellos compuestos con una concentración que inhibe el 50 % de la proliferación (IC_{50}) menor a 25 μM y empleando como fármacos de referencia el Nfx y Bnz. Por otro lado, se realizaron además ensayos de citotoxicidad para estudiar la toxicidad inespecífica en macrófagos murinos (células mamíferas) y de esta forma obtener el índice de selectividad (IS) como el cociente entre el IC_{50} en macrófagos y el IC_{50} en el parásito, considerando selectivos aquellos compuestos con un IS mayor a 10.²⁴

Además, se realizaron estudios de mutagenicidad mediante el test de Ames, teratogenicidad en embriones de zebrafish, toxicidad oral aguda, crónica y genotoxicidad *in vivo* en ratones. Aquellos compuestos con actividad tripanosomicida y baja toxicidad fueron evaluados *in vivo* en el modelo murino agudo de la EC.²⁴



Esquema 1. Esquema general de las moléculas sintéticas pertenecientes a la familia A, derivadas de diarilidenona con diferentes modificaciones químicas.²⁴

Dentro de los derivados de la **Familia A** se seleccionaron en esta tesina de grado tres de las moléculas más activas (**Esquema 2**), el compuesto **C1** con una actividad 200 veces mayor y casi 10 veces más selectivo que el Nfx, el compuesto **C2** con un IC_{50} menor a 1 μM

Tabla 1. Actividad antiproliferativa de los derivados de la **Familia A** y el fármaco de referencia (**Nfx**) frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y promastigote de *L. infantum*. Además, se observa la citotoxicidad no específica sobre macrófagos murinos J774.1 y fibroblastos NCT929, junto al índice de selectividad (IS). Por otro lado, se muestran los resultados de las diferentes combinaciones ensayadas: efecto de la combinación (en verde se observan las combinaciones sinérgicas), Índice de fracción inhibitoria (FICI) y relación molar óptima para el sinergismo.²⁴⁻²⁶

Compuesto	IC ₅₀ <i>T.cruzi</i> ± SD (μM)	IC ₅₀ J774.1 ± SD (μM)	IC ₅₀ NCTC ± SD (μM)	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> ± SD (μM)	IS J774.1/ <i>T.cruzi</i>	IS NCTC/ <i>L.Infantum</i>
C1	0.04 ± 0.01	15 ± 4	4909 ± 36	11 ± 3	375	446
C2	0.6 ± 0.2	10 ± 2	ND*	ND	17	ND
C3	5.0 ± 0.4	60 ± 3	494 ± 25	31 ± 9	12	16
Nfx	8 ± 1	316 ± 23	ND	ND	40	ND
COMBINACIONES						
	Efecto		FICI	Proporción molar		
C1 + C3	Sinergismo		0.5	1 / 125		
C3 + Bnz	Sinergismo		0.5	1 / 1		
C3 + C2	Sinergismo		0.75	1 / 8		

*ND: No determinado.

Como muestra la **Tabla 1**, los resultados se expresaron como concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀) acompañadas de su desviación estándar (SD), y se calcularon los índices de selectividad (IS) correspondientes. El compuesto **C1** demostró la mayor potencia frente a *T. cruzi*, con un IC₅₀ de 0.04 ± 0.01 μM, y presentó altos índices de selectividad: 375 frente a células J774.1 y 446 frente a células NCTC929 en relación con su actividad sobre *L. infantum*. Estos valores indican una excelente ventana terapéutica. Por su parte, **C2** mostró una menor actividad frente a *T. cruzi* (IC₅₀ = 0.6 ± 0.2 μM) y una selectividad inferior a la de **C1**. A pesar de ello, mantuvo un perfil de selectividad favorable. El compuesto **C3** resultó ser el menos potente (IC₅₀ de 5.0 ± 0.4 μM) y con índices de selectividad más bajos, aunque sigue siendo más activo que el control **Nfx** (IC₅₀ de 8 ± 1 μM frente a *T. cruzi*).

Adicionalmente, se evaluaron combinaciones binarias de **C3** con otros compuestos. Todas las combinaciones que se muestran en la **Tabla 1** muestran efectos sinérgicos, con

valores de índice de fracción inhibitoria (FICI) entre 0.5 y 0.75. Destacan especialmente la combinación de **C1 + C3** y **C3 + Bnz**, ambas con un FICI de 0.5, lo que indica una interacción fuertemente sinérgica, lo que demuestra que la terapia combinada podría representar una estrategia terapéutica eficaz con potencial para reducir la dosis de los fármacos individuales y mejorar la selectividad.

Finalmente, en el marco de la tesis de posgrado en desarrollo actualmente de la Lic. Claudia Viera y la Lic. Rachel Ramos se seleccionaron fármacos comerciales (**Tabla 2**) utilizados para distintas patologías en Uruguay y se evaluó su actividad tanto en *T. cruzi* como *L. infantum* mediante reposicionamiento.²³ En la **Tabla 2** se presenta la actividad *in vitro* de una serie de fármacos comerciales frente a *Trypanosoma cruzi* (forma epimastigote) y *Leishmania infantum* (forma promastigote), así como su citotoxicidad sobre macrófagos murinos J774.1. A partir de estos datos, se calcularon los índices de selectividad (IS) correspondientes. Dentro del conjunto de compuestos evaluados, la naftazona (**RF58**) se destacó por su elevada potencia frente a *T. cruzi* ($IC_{50} = 0.7 \mu M$) y *L. infantum* ($IC_{50} = 2.1 \mu M$), junto con una baja citotoxicidad ($IC_{50} = 101.8 \mu M$), lo que se tradujo en altos índices de selectividad (IS = 135.7 y 47.6, respectivamente). De manera similar, la loratadina (**1483**) mostró una marcada actividad frente a *T. cruzi* ($IC_{50} = 0.9 \mu M$) con un IS aceptable de 8.2, aunque sin efecto aparente sobre *L. infantum* ($IC_{50} > 100 \mu M$). Por otro lado, el fármaco de referencia **Bnz** presentó una buena actividad frente a *T. cruzi* ($IC_{50} = 4.9 \mu M$) y *L. infantum* ($IC_{50} = 9.7 \mu M$), con índices de selectividad elevados (50.2 y 25.6, respectivamente), lo que valida su uso como control positivo. Otros compuestos con actividad moderada y niveles aceptables de selectividad frente a *T. cruzi* incluyeron el bromuro de pinaverio (**RF37**) ($IC_{50} = 2.9 \mu M$, IS = 2.9), gabapentina (**RF88**) ($IC_{50} = 6.0 \mu M$, IS = 3.1) y nitrofurantoína (**RF23**) ($IC_{50} = 13.3 \mu M$, IS = 4.6).

En contraposición, varios fármacos, como dipirona (**1475**), profenamina (**RF89**), carvedilol (**RF95**), clomipramina (**RF98**) y sertralina (**RF16**), no evidenciaron actividad significativa frente a *T. cruzi* ($IC_{50} > 25 \mu M$) y carecieron de datos de citotoxicidad, imposibilitando la evaluación de su selectividad. Algunos compuestos, como lapatinib (**AC1**) y simvastatina (**RF10**), mostraron una relación desfavorable entre actividad antiparasitaria y toxicidad, reflejada en índices de selectividad bajos (<1).

Estos resultados, aún preliminares y en proceso de validación como parte de dos tesis de posgrado, sugieren que ciertos fármacos comerciales podrían constituir candidatos prometedores para el reposicionamiento como agentes tripanosomicidas y leishmanicidas, destacándose especialmente la naftazona y la loratadina.

Tabla 2. Actividad tripanosomicida de los distintos fármacos comerciales evaluados frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y promastigote de *L. infantum*. Además, se observa la citotoxicidad no específica sobre macrófagos murinos J774.1 junto al índice de selectividad (IS).²³

Compuesto	Fármaco comercial	IC ₅₀ <i>T.cruzi</i> (μM)	IC ₅₀ <i>L. Infantum</i> (μM)	IC ₅₀ J774.1 (μM)	IS J774.1/ <i>T.cruzi</i>	IS J774.1/ <i>L.</i> <i>infantum</i>
334	Benznidazol	4.9	9.7	247.3	50.2	25.6
486	Ketoconazol	5.1	4.8	13.3	2.6	2.8
487	Terbinafine	21.3	>100.0	65.0	3.0	ND*
1475	Dipirona	> 25.0	57.6	ND	ND	ND
1483	Loratadina	0.9	>100.0	7.8	8.2	ND
AC1	Lapatinib	16.6	<100,0	7.6	0.5	ND
RF5	Doxiciclina	19.1	>100,0	23.8	1.2	ND
RF10	Simvastatina	7.4	24.0	6.5	0.9	0.3
RF14	Climodin	22.7 (μg/mL)	19.9 (μg/mL)	18.1 (μg/mL)	0.8	0.9
RF16	Sertralina	> 25.0	27,2	ND	ND	ND
RF23	Nitrofurantoina	13.3	20.6	61.1	4.6	3,0
RF37	Bromuro de Pinaverio	2.9	28.0	8.6	2.9	0.3
RF58	Naftazona	0.7	2.1	101.8	135.7	47.6
RF 86	Amlodipina	13.7	45.2	95.7	7.0	2.1
RF 88	Gabapentina	6.0	>100.0	19.1	3.1	ND
RF 89	Profenamina	> 25.0	72.1	ND	ND	ND
RF 95	Carvedilol	> 25.0	74.9	ND	ND	ND
RF 98	Hidrocloruro de clomipramina	> 25.0	74.6	ND	ND	ND

*ND: No determinado.

Los datos presentados en la **Tabla 2** aún no han sido reportados en su totalidad, ya que forman parte de la tesis de posgrado en curso de las Licenciadas Claudia Veira y Rachel Ramos.

A partir de estos resultados se planteó el estudio del comportamiento de los compuestos sintéticos (**C1, C2 y C3**) en combinación con fármacos comerciales frente a las formas no infectivas de *T. cruzi* y *L. infantum* (*in vitro*), además de posibles ensayos *in vivo* para *T. cruzi*, con el fin de buscar efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos.

3 - PROPUESTA DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1 PROPUESTA Y OBJETIVOS

En esta propuesta se pretende, a partir de los antecedentes mencionados anteriormente, evaluar el efecto al combinar las moléculas sintéticas más activas generadas en nuestro laboratorio con los fármacos activos, identificados por reposicionamiento en nuestro laboratorio, frente a los parásitos.

Para esto, se propone sintetizar **C1** de las arilidenonas antes mencionadas y el aldehído precursor (E)-3-(tien-2-il)acrilaldehído (**E1**), **C2** y **C3** no fueron sintetizadas en este trabajo dado que, previamente en el marco del trabajo de la Dra. Elena Aguilera, fueron preparadas a gran escala y se encontraban disponibles en nuestro laboratorio. Las reacciones llevadas a cabo consisten en condensaciones aldólicas de bajo costo y amigables con el medio ambiente (química verde).

Además, se determinarán valores de IC_{50} a los 5 días de incubación de las combinaciones en los modelos no infectivos epimastigotas y promastigotas de los parásitos *T. cruzi* y *L. infantum*, respectivamente. Asimismo, se evaluará la citotoxicidad inespecífica en macrófagos murinos J774.1 como modelos de células de mamífero para obtener los índices de selectividad hacia el parásito ($IS = IC_{50}$ en macrófagos / IC_{50} en parásitos). El fármaco de referencia empleado para la caracterización biológica será el Nfx para *T. cruzi*, y la miltefosina para *L. infantum*.

Aquellas combinaciones con una actividad de IC_{50} menor a 25 μM serán consideradas con actividad tripanosomicida. Con respecto a la selectividad, se define de forma estándar en el área de investigación una alta selectividad para aquellos compuestos que presenten un IS mayor a 10.

Durante el desarrollo del proyecto también se realizará el test de Ames como ensayo de mutagenicidad y se estudiará la toxicidad en embriones zebrafish. Además, dependiendo del comportamiento de las combinaciones en los ensayos anteriores, se proponen ensayos de toxicidad oral aguda *in vivo* en el modelo murino agudo de la EC.

Se esperan identificar combinaciones promisorias como líderes con efecto sinérgico o aditivo, además de obtener IC_{50} en el rango de micromolar y alta selectividad.

3.2 Objetivos Generales

Estudiar biológicamente la combinación entre las moléculas sintéticas y los medicamentos comerciales seleccionados con el objetivo de evaluar posibles efectos sinérgicos, aditivos o antagonísticos frente a los parásitos *T. cruzi* y *L. infantum*.

3.3 Objetivos Específicos

1. Sintetizar **C1** (molécula líder del Grupo de Química Orgánica Medicinal) con acción tripanosomicida y leishmanicida.
2. Evaluar la actividad en las formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigota de *L. infantum* de la combinación entre las moléculas sintéticas y los fármacos disponibles en Uruguay, obtenidos anteriormente por reposicionamiento con actividad tripanosomicida, en busca de sinergismo o aditividad.
3. Estudiar la citotoxicidad inespecífica de las combinaciones.
4. Determinar el potencial mutagénico mediante el test de Ames efectos mutagénicos de las combinaciones con efectos sinérgicos o aditivos.
5. Evaluar la toxicidad en embriones de zebrafish de las combinaciones más selectivas y activas frente a los parásitos.
6. Seleccionar las mejores combinaciones y estudiar su efecto *in vivo* en el modelo murino de la EC.

4 - METODOLOGÍA

4.METODOLOGÍA

4.1. Reactivos químicos

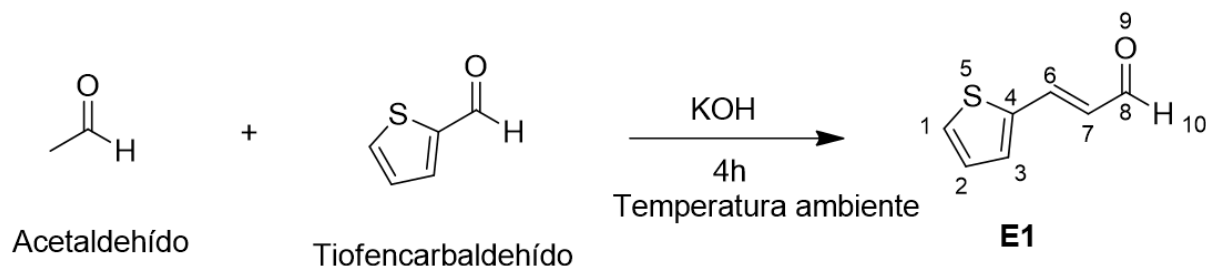
Los reactivos químicos empleados durante la síntesis química en el desarrollo de la tesina de grado fueron obtenidos en fuentes comerciales obtenidas en: Baker Analyzed, Janssen, Fluka, Sigma-Aldrich y/o Merck. Por otro lado, los disolventes fueron destilados previamente a su uso, a excepción del etanol absoluto de origen comercial (Dorwil). La pureza relativa y avance de las reacciones químicas fueron controladas mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de poliéster recubiertas con sílica y reveladas con luz ultravioleta de 254 nm o con una disolución hidroetanólica de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), un compuesto orgánico que se utiliza para identificar grupos carbonilos de aldehídos o cetonas en compuestos orgánicos (reactivo de Brady). Además, las fases móviles empleadas consisten en mezclas de distintas proporciones de hexano y acetato de etilo, por lo general, 7 de hexano y 3 de acetato de etilo respectivamente.

Una vez obtenido el producto de interés se procede al secado, utilizando técnicas convencionales como el secado en sílica gel, para eliminar exceso de disolvente y se realizan los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H RMN}$) en un equipo Bruker Dpx-400 (400 MHz) empleando cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano como estándar interno.

4.2. Síntesis química ^{24,27}

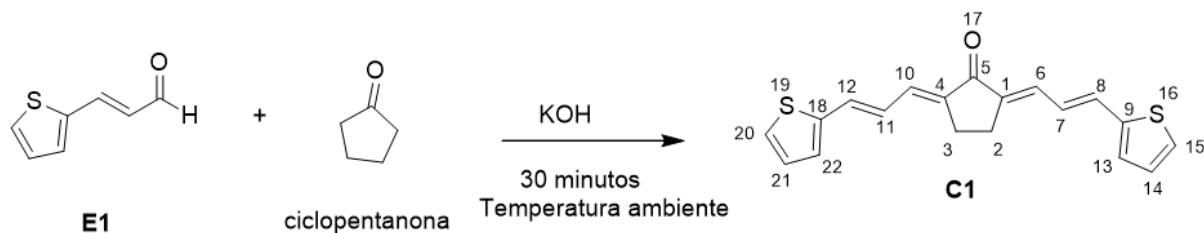
Durante la tesina se realizó la síntesis de **C1** en dos etapas de reacción, ambas condensaciones aldólicas, con el fin de obtener en una primera etapa a **E1** y en una segunda el producto de interés. Para la primera reacción (**Esquema 3**) se utiliza una relación 3:1 (4.5 mmol) de acetaldehído (13.5 mmol) y tiofencarbaldehído respectivamente. La mezcla se disuelve en 4.4 mL de agua y 3.5 mL de etanol (95%), agregando una relación 1:1 de hidróxido de potasio (KOH) con respecto al acetaldehído para posteriormente dejar en agitación magnética durante 4 h a temperatura ambiente. Debido a la nucleofilia del **E1** puede reaccionar a su vez con acetaldehído para dar una mezcla de productos, es por esto que es necesario controlar el avance de reacción mediante TLC de sílica gel (fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3), de forma tal de evitar la mezcla de productos no deseados. Posteriormente, el disolvente se destila a vacío y se extrae por decantación la mezcla de productos orgánicos, para posteriormente purificar mediante cromatografía en columna con sílica como fase estacionaria. Se eluye con un gradiente de mezclas de hexano:acetato de etilo, partiendo de una relación de (97:3) hasta (9:1) a medida que se observa la separación de las manchas. Es necesario variar de forma progresiva la proporción de disolventes dado que los productos obtenidos en la mezcla son moléculas con polaridades similares. A su vez,

es posible purificar los productos mediante una preparativa, utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo 9:1 sobre una placa de TLC de sílica gel.



Esquema 3. Ecuación de la reacción aldólica partiendo de acetaldehído y tiofencarbaldehído para obtener el aldehído precursor E1 para la síntesis final de C1.

A partir del producto puro obtenido en la reacción anterior, se procede a realizar la segunda condensación aldólica (**Esquema 4**) para obtener finalmente el compuesto **C1** de interés. En este caso se utiliza una relación 2:1 de tiofencarbaldehído y ciclopentanona y se disuelve nuevamente en 4.4 mL de agua y 3.5 mL de etanol (95%), agregando una relación 2:1 de KOH con respecto al aldehído para posteriormente dejar en agitación con pastillas magnéticas durante 30 minutos hasta observar un cambio en la coloración de la mezcla de amarillo a rojo intenso. La reacción además se controla por TLC de sílica gel. Para purificar **C1** se recrystaliza en etanol.



Esquema 4. Ecuación de la segunda condensación aldólica partiendo de ciclopentanona y E1 para obtener la arilidenona final C1.

La caracterización estructural de los compuestos de **E1** y **C1** tiene las siguientes características:

(E)-3-(tien-2-il)acrilaldehído (E1): Sólido amarillo pálido. $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 9.54 (1H, dd, H_{10}), 7.49 (1H, d, $J = 15.64$ Hz, H_6), 6.45 (1H, dt, $J = 15.64$ Hz, H_7), 7.46 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H_1), 7.3 (1H, dd, $J = 5.0, 3.6$ Hz, H_2), 7.04 (1H, m, H_3).

(2E,5E)-2,5-Di[3-(furan-2-il)aliliden]ciclopentanona (C1) ²⁴: sólido marrón, R=82%, P.F.= 129-132 °C, $^1\text{HRMN}$, δ (ppm): 7.30 (2H, d, $J=5.0$ Hz, $\text{H}_{15,20}$), 7.18 (2H, d, $J=12.0$ Hz, $\text{H}_{6,10}$), 7.13 (2H,d, $J=3.4$ Hz, $\text{H}_{14,21}$), 7.09 (2H, m, $\text{H}_{13,22}$), 6.76 (2H, dd, $J=11.0$ Hz, $\text{H}_{7,11}$), 6.73 (2H, dd, $J=11.0$ Hz, $\text{H}_{8,12}$), 2.90 (4H, s, $\text{H}_{2,3}$). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm):198 (C5), 149 (C12,13), 145 (C16,19), 141 (C1,4), 132 (C6,7), 129 (C8,9), 128 (C10,11), 113 (C15,20), 111 (C14,21), 30 (C2,3).

MS (EI) m/z (%): 292(M +• , 100); 159(C11H11O • , 53). Análisis elemental: C, 78.06; H, 5.52; O, 16.42

4.3. Actividad de las combinaciones frente a *T. cruzi* y *L. infantum* ^{24, 27}

Se cultivan epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2, y *L. infantum* cepa (MHOM MA6717/MAP263) a 28°C en medio axénico (infusión cerebro-corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, hemina 0,02 g/L, D-(+)-glucosa 0.3 g/L, estreptomycin 0.2 g/L, penicilina 200000 U/L) complementado con 10% de suero fetal bovino en condiciones aeróbicas. Los ensayos se realizan con los parásitos en fase exponencial (5-7 días de crecimiento) partiendo de una concentración de 5x10⁶ parásitos/mL. Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4x10⁶ parásitos/mL y se inoculan 0.6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos.

Por otro lado, los compuestos a evaluar se preparan en una disolución stock de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agregan a cada pocillo en concentraciones decrecientes partiendo de su IC₅₀, ¾ IC₅₀, ½ IC₅₀ y ¼ IC₅₀. Las cuatro concentraciones fueron evaluadas por duplicado, colocando en cada pocillo 2.5 µL de cada compuesto de la combinación (5 µL de compuestos en total por pocillo, 0.5% DMSO). Posteriormente se incuban durante 5 días a 28°C. El crecimiento de los parásitos se mide por absorbancia a 610 nm para posteriormente calcular el porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento del parásito como:

$$PI = \left\{ 1 - \left[\frac{(Ap - A0p)}{(Ac - A0c)} \right] \right\} \times 100$$

Donde Ap es la absorbancia al día 5, A0p es la absorbancia en el día 0, Ac es la absorbancia del control negativo (DMSO) al día 5 y A0c es la absorbancia del control negativo en el día 0. El IC₅₀ (concentración del compuesto capaz de inhibir al 50% el crecimiento) se obtiene al graficar el PI en función del logaritmo en base 10 de la concentración, ajustando a una curva sigmoide de Boltzmann. A partir de esto se calcula el FICI para definir si la combinación fue sinérgica, aditiva o antagónica como:

$$FICI = \frac{IC_{50} \text{ del compuesto A en combinación}}{IC_{50} \text{ del compuesto B en combinación}} + \frac{IC_{50} \text{ del compuesto A solo}}{IC_{50} \text{ del compuesto B solo}}$$

Un valor de FICI menor a 1 indica sinergismo, mayor a 1 antagonismo e igual a 1 aditividad. Además, se realizan los isoblogramas para evaluar el tipo de interacción, donde se representa una recta que conecta los dos puntos que corresponden a los IC₅₀ de los compuestos en forma independiente, y se observa el nuevo punto de los IC₅₀ en combinación. Si el punto cae sobre la línea es aditividad, mientras que si cae por debajo o por encima es sinergismo o antagonismo respectivamente (**Figura 6**).

4.4. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos ^{24,27}

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos y posteriormente la selectividad se siembra una concentración de 5×10^4 células/mL de macrófagos murinos J774.1 en una placa de 96 pocillos y se incuban por un período de 24 h a 37°C para que se adhieran a la superficie (80% confluencia). Posteriormente, se retira el medio de cultivo de la placa y se adicionan 200 μ L de las diluciones seriadas (partiendo de 200 μ M) de los compuestos. Éstos partieron de una disolución stock con DMSO a una concentración tal que en placa no supere el 0.5 % v/v para luego añadir medio de cultivo fresco y estéril. Se incuba durante 48 h a 37° C, 5% CO₂.

Previo a la lectura de viabilidad se observa la placa al microscopio para estudiar posible precipitación de compuestos, confluencia en los pocillos, morfología de las células. Para la lectura de viabilidad celular se adicionan 100 μ L de una disolución de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de 0.1 mg/mL en buffer fosfato salino (PBS) estéril, a excepción del blanco donde se agregan 100 μ L de PBS estéril sin MTT. La placa preparada se incuba durante 3 h a 37°C. Finalmente se retira la disolución de MTT y se agregan por pocillo 180 μ L de DMSO y 20 μ L de la disolución amortiguadora glicina para MTT (glicina 0.1 M, NaCl 0.1 M, EDTA 0.5 M). Se agita la placa en agitador orbital por 1 minuto y se realiza la lectura de absorbancia a 560 nm. Los controles empleados durante el ensayo fueron: células con disolvente revelado con MTT y el blanco de lectura (células con disolvente sin MTT).

A partir de los resultados se calcula el %citotoxicidad según la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 1 - [(\text{Absmuestra con MTT} / \text{Abscontrol con DMSO con MTT})] \times 100$$

4.5. Ensayo de mutagenicidad (Test de Ames) ²⁸

El ensayo se llevó a cabo en conjunto con la Lic. Belén Dávila del Grupo de Química Orgánica Medicinal, Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Universidad de la República.

Mediante esta prueba se detectan mutaciones que reversion mutaciones preexistentes en las cepas de prueba (para este ensayo se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* (S. typhimurium) restaurando la capacidad de las bacterias de producir un aminoácido esencial. Para esto se exponen células bacterianas con los compuestos, para posteriormente contar las colonias de bacterias capaces de producir el aminoácido.

Se utiliza la cepa bacteriana dependiente de histidina de *S. typhimurium* TA98 (en fase exponencial 2×10^9 UFC/mL). La preparación de las suspensiones bacterianas se realizan en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar y con material estéril.

Cada compuesto se evalúa por duplicado en 5 dosis realizando diluciones seriadas al $\frac{1}{5}$, partiendo de una dosis no tóxica estimada a partir de los resultados obtenidos de toxicidad. La dosis máxima corresponde a la concentración más alta que resultó ser no tóxica en el ensayo en 50 μ L. Los compuestos se incuban durante 1 h a 37° C y posteriormente se añaden bajo mechero 2 mL de agar con 10 mL de disolución de histidina por cada 100 mL. Esto se incuba en agar mínimo glucosa durante 48 h a 37° C, para finalmente contar el número de revertientes de forma manual. Los valores se expresan como el promedio de duplicados junto a la desviación estándar correspondiente.

En caso de que el número de colonias revertientes duplique al control negativo en al menos dos dosis consecutivas, el compuesto es mutagénico.

Se emplea como control positivo 20.0 μ g/placa de 4-nitro-o-fenilendiamina en el caso de mutagenicidad sin activación. Por otro lado, para el control negativo se utilizan 50 μ L/placa de DMSO y control de resistencia a ampicilina, tetraciclina, cristal violeta y luz UV sensible.

4.6. Toxicidad en embriones de zebrafish^{24,25,26,29}

Con el fin de observar los aspectos toxicológicos de las mejores combinaciones sinérgicas obtenidas, se realizaron estudios *in vivo* utilizando embriones de zebrafish. Para ello se tomó como referencia el protocolo de la OECD²⁸ y realizamos las modificaciones que consideramos necesarias para que el ensayo fuese realizable. Este ensayo ya ha sido utilizado en nuestro grupo previamente. Los adultos de pez cebra fueron mantenidos en el acuario de pez cebra del Institut Pasteur de Montevideo, de acuerdo con el protocolo aprobado por la Comisión de Ética en Experimentación Animal del IPMon (009-19) . La referente autorizada para la manipulación de los adultos fue la Dra. Paola Lepanto.

Para obtener los embriones se dejan cuatro peces macho y cuatro peces hembra (4x4) cepa salvaje dentro de una pecera. A la mañana siguiente se cambia el agua para estimular la puesta de los huevos. Luego de 30 minutos se coloca en una placa de petri de plástico agua con azul de metileno y se recolectan los huevos fecundados. Una vez se verifica bajo lupa que los embriones están en etapa inicial se traspasan los huevos fecundados a una nueva placa de Petri con azul de metileno, dejando posibles restos o huevos no fecundados en la placa anterior, y se incuban en la estufa a 33°C por aproximadamente 8 h. Este período de incubación se realiza con el fin de acelerar el desarrollo de los embriones hasta la etapa final de epibolia, fase en la que son más resistentes y por lo tanto más fácil su manipulación para decorionarlos.

Una vez se encuentran finalizando la epibolia, se colocan los embriones en un vaso de Bohemia para decorionarlos mediante el uso de la enzima pronasa. Se parte de una $[Pronasa]_{inicial} = 20 \mu\text{g/mL}$ y se realiza una dilución 1/40 agregando 4 mL de agua de acuario y 0,1 mL de enzima en el vaso de Bohemia donde se encuentran los embriones. Posteriormente, se incuban durante 5 minutos en la estufa a 27,5° C mientras actúa la

enzima, una vez terminado el período de incubación se retira la mayoría del agua utilizando una pipeta Pasteur y se agregan nuevamente 4 mL de agua para realizar el primer lavado. Se agita lentamente el vaso de Bohemia para lentamente ir despegando la membrana del embrión. Los lavados se repiten 3 veces hasta observar bajo la lupa que todos los embriones fueron decorionados.

Previamente, se prepara la placa de 96 pocillos con un volumen final de 200 μ L por pocillo y 2 μ L de compuesto, es decir una dilución 1/10. Se ensayaron en total 5 condiciones utilizando 20 embriones por cada una de ellas: 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M y 12,5 μ M. Para esto se agrega en un falcón 9 mL de agua de acuario y 30 μ L de una disolución 200X de cada compuesto de la combinación. A partir de esta dilución se realizan las diluciones seriadas para obtener las demás concentraciones colocando 4,5 mL de la disolución anterior y 4,5 mL de agua de acuario. Se agregan 150 μ L en cada pocillo de cada concentración y 50 μ L de agua junto con el embrión. Para esta última parte se corta la punta de un tip de 200 μ L y mediante una micropipeta de 200 μ L se toman los 50 μ L junto con el embrión para evitar dañarlo durante la manipulación. Se utilizaron dos controles negativos, uno con DMSO (1%) y otro únicamente con agua de acuario, y un control positivo descrito anteriormente con cafeína a una concentración igual a su dosis letal al 50% de los embriones (LD_{50}) [Cafeína] = 2.4 mM.

El ensayo dura un total de 48 h, pasadas las primeras 24 h se renueva el compuesto en estudio, removiendo 150 μ L de cada pocillo y agregando 150 μ L de disolución nueva. Finalmente, pasadas las 48 h se observa bajo la lupa cada embrión, se fotografían las distintas morfologías observadas por cada condición clasificando los embriones en categorías y cuantificando la cantidad de individuos en cada una.

4.7. Ensayos *in vivo* en el modelo murino agudo para la enfermedad de Chagas ^{24,27}

El ensayo de actividad antiparasitaria en el modelo agudo *in vivo* se realizó en colaboración con el grupo de la Lic. Gloria Yaluff en el Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. La referente autorizada para la manipulación de los animales fue la Dra. Elva Serna.

Se utilizaron 5 ratones Balb/c por grupo, de 3 meses de edad con un peso aproximado de 20 g. Los compuestos se administran por vía oral mediante una cánula intragástrica. La formulación utilizada para administrar la combinación fue mediante emulsión lipídica, la cual consiste en 1,0 g de tensioactivo (460 mg de aceite de ricino hidrogenado polioxil-40, 360 mg de oleato de sodio y 180 mg de fosfatidilcolina de soya), 1,0 g de colesterol y disolución tampón fosfato suficiente para completar 10 mL del vehículo. Para preparar la emulsión se pulveriza cada compuesto en un mortero y se mezcla con el colesterol, fosfatidilcolina y aceite de ricino hidrogenado polioxil-40. La mezcla se disuelve en cloroformo y, posteriormente, se evapora al vacío para eliminar el solvente. Para verificar que el cloroformo se eliminó de forma completa se pasa una corriente de nitrógeno gaseoso

durante 5 minutos. En paralelo, el oleato de sodio se disuelve en buffer fosfato y se agita durante 12 h a temperatura ambiente. Esta disolución se agrega a la mezcla con los compuestos para ser homogeneizada en baño ultrasónico por 40-60 minutos.

Los ratones se inocularon con una carga de 1×10^4 parásitos/mL y posteriormente se verificó la infección positiva de los individuos mediante conteo y análisis de muestra sanguínea. La combinación se administra de forma diaria durante 15 días, mientras que la carga parasitaria se controla semanalmente hasta los 60 días de la primera dosis. Al finalizar el ensayo se obtiene una curva de parasitemia para observar el efecto de las combinaciones con respecto a los controles. Además, durante el ensayo se observa el aspecto general y el comportamiento de los animales como medida de toxicidad.

Se utilizó como control positivo el fármaco de referencia **Bnz** a una concentración de 50 mg/kg por peso de ratón. Por otro lado, el control negativo empleado fue el vehículo (la emulsión) sin compuestos.

Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical.

5 - RESULTADOS

5.RESULTADOS

5.1. Síntesis química

Como fue mencionado anteriormente, el producto preparado en esta tesina de grado se realizó en dos etapas, una primera etapa para obtener el aldehído **E1**, reactivo necesario para posteriormente obtener en una segunda etapa el compuesto **C1**. Para ambas etapas de síntesis se realiza, una vez obtenido el producto de reacción puro y sin disolvente extra, el análisis espectroscópico de ^1H RMN con el fin de confirmar la estructura de los productos obtenidos. Además, se realiza experimentos COSY (espectroscopía de correlación homonuclear ^1H - ^1H), una técnica bidimensional utilizada para determinar las correlaciones entre protones acoplados en una molécula, es decir, permite identificar que protones están acoplados entre sí con el fin de establecer la conectividad estructural.

En la **Figura 7** se observa el espectro ^1H RMN del **E1**, el cual contiene un sistema conjugado que incluye protones del anillo de tiofeno sustituido, del grupo aldehído y de la olefina. Por lo tanto, en el espectro se espera integrar un total de 6 protones distribuidos en tres grupos: tres protones aromáticos (representados en azul en la **Figura 7**), dos protones olefínicos (representados en verde) y un protón del aldehído (representado en rojo). La señal más alta es a 9.63 ppm e integra uno, la cual corresponde al protón del grupo aldehído, el cual aparece como un doblete debido a que el carbono α del grupo carbonilo tiene un solo protón, por lo que el protón del aldehído ve un único spin vecino. Por otro lado, las señales a 7.46, 7.3 y 7.04 ppm se asignan a los tres protones aromáticos del anillo de tiofeno representados en azul, los cuales a diferencia con el aldehído aparecen como dobletes, las dos primeras, al presentar acoplamiento con un protón vecino y como doblete de doblete para la última por acoplarse dicho protón a dos protones vecinos. Finalmente, las señales próximas a 7.5 y 6.5 ppm mostradas en verde corresponden a los dos protones olefínicos de la molécula, los cuales al igual que los aromáticos se observan como dobletes o doblete de doblete.

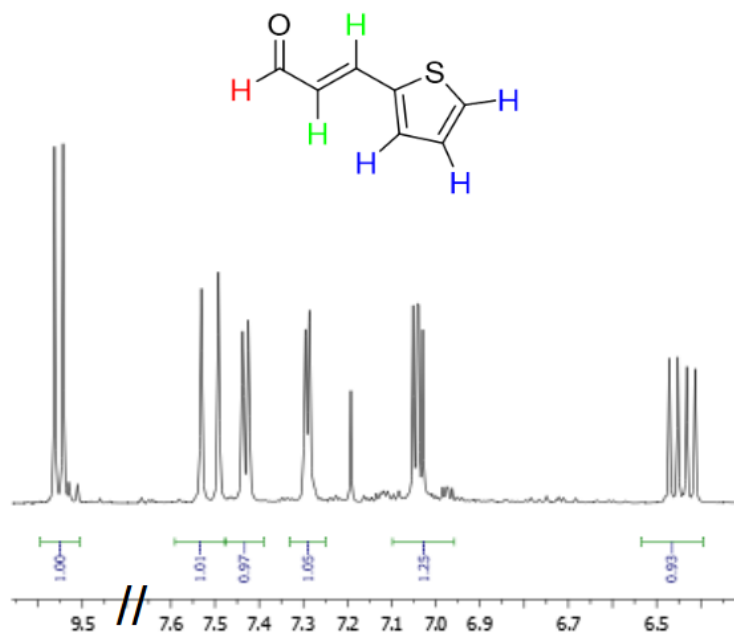


Figura 7. Espectro ^1H -RMN del compuesto **E1** obtenido en la primera etapa sintética. Además, se observa la estructura de la molécula con los distintos grupos de protones señalados: protones aromáticos (azul), protones olefinicos (verde) y el protón del aldehído (rojo).

Por otro lado, con el experimento COSY (**Figura 8**) se confirman las asignaciones anteriormente mencionadas.

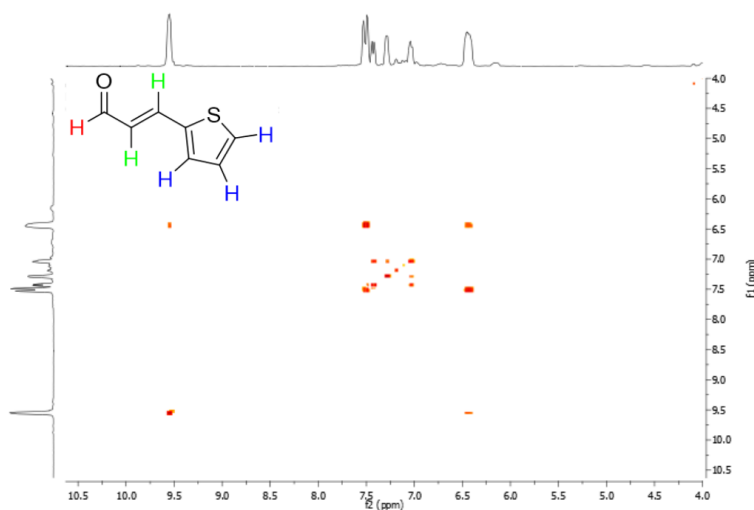


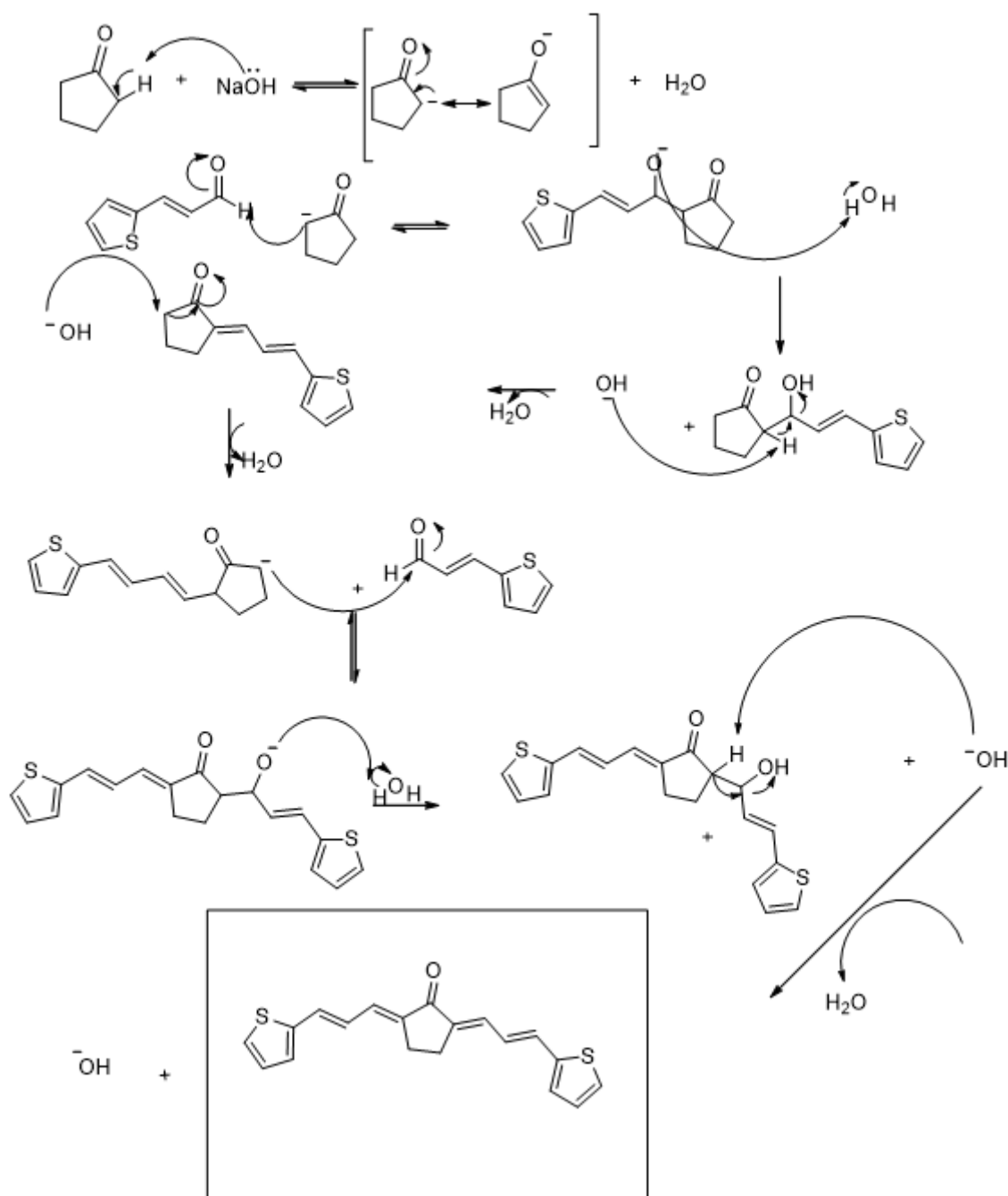
Figura 8. Experimento COSY del compuesto **E1** obtenido en la primera etapa de reacción. Además, se observa la estructura de la molécula con los distintos grupos de protones señalados: protones aromáticos (azul), protones olefinicos (verde) y el protón del aldehído (rojo).

En conjunto, ambos espectros dan la información necesaria para poder concluir que el compuesto obtenido fue el de interés, y que por lo tanto es posible continuar con la segunda etapa de reacción para obtener el compuesto **C1**. Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de reacción empleado para obtener, tanto a **C1** como a **E1**, corresponde a una condensación aldólica (**Esquema 5**), una reacción donde un enol o enolato reacciona con un grupo carbonilo de un aldehído o cetona para obtener como producto final un sistema conjugado de un carbonilo α,β -insaturado.

La reacción se divide en dos etapas: una etapa de adición aldólica y una etapa de condensación aldólica. En este caso, la reacción se da entre la ciclopentanona y el aldehído obtenido anteriormente (**E1**). En la primera etapa de reacción, la base desprotona el carbono α de la ciclopentanona para dar lugar al enolato, un nucleófilo estabilizado por resonancia. Posteriormente, se da un ataque nucleofílico del enolato sobre el carbono aldehídico de **E1**, donde el oxígeno del aldehído acepta los electrones formando un intermedio del tipo alcóxido, como resultado de un nuevo enlace entre la cadena hidrocarbonada del enolato y del aldehído. El oxígeno alcóxido se protona con el agua, dando lugar a una cetona β -hidroxilada, aldol, producto final de la primera etapa de reacción.

A partir del producto anterior, se da la segunda etapa de reacción (condensación aldólica) donde se elimina una molécula de agua. Nuevamente, dado el medio básico de la reacción se desprotona el carbono α de la cetona, formándose a partir del par de electrones un nuevo doble enlace y eliminando el hidroxilo como agua, dando lugar a una α,β -insaturación conjugada con el anillo aromático. Finalmente, se desprotona el último protón α activo para dar lugar a un nuevo enolato, el cual actúa como nucleófilo para atacar a una nueva molécula de **E1**. A partir de este punto se repiten los pasos de reacción antes mencionados (ambas etapas de reacción) para dar lugar al producto final **C1**, una molécula simétrica con un grupo cetónico central proveniente de la ciclopentanona original, con cadenas α,β -insaturadas que terminan en un anillo de tiofeno, proveniente de la molécula **E1** original. En el caso de la síntesis del compuesto **E1**, el mecanismo transcurre de manera similar; sin embargo, en este caso, los reactivos utilizados son acetaldehído y tiofencarbaldehído.

Como se explicó previamente, a diferencia del aldehído precursor **E1**, el compuesto **C1** posee un eje de simetría en el grupo carbonilo (**Figura 9**) característico de las arilidenonas, lo que se interpreta como menos señales esperadas en el espectro de $^1\text{HRMN}$, es decir que, protones en posiciones equivalentes darán lugar a una única señal en el espectro. A su vez, como varios protones contribuyen a la misma señal, la integración de estas señales será mayor, reflejando el número total de protones equivalentes, además, debido a que los protones tienen vecinos equivalentes es esperable observar patrones de multiplicidad simplificados.



Esquema 5. Esquema del mecanismo de reacción compatible con la generación de **C1**. En la figura se ilustra el mecanismo partiendo de la ciclopentanona y del aldehído precursor **E1** para obtener a **C1**, sin embargo, este mecanismo es análogo para **E1**, a diferencia de que en este caso se parte de acetaldehído y del tiofenocarbaldehído.

El desplazamiento químico de la molécula **C1** en el $^1\text{HRMN}$ (**Figura 14**) se encuentra en un rango de entre 3-8 ppm, dado que los protones de la ciclopentanona están más protegidos. Dentro de este rango de señales se espera integrar un total de 16 protones, distribuidos en tres grupos: protones aromáticos (señalados en azul), olefínicos (señalados en verde) y los protones alifáticos (representados en rojo). Las señales más altas en el espectro se encuentran en la región de 6-8 ppm y corresponden a los protones aromáticos y olefínicos (protones más desprotegidos), los cuales integran 12 protones de los 16 totales. Al

igual que en los protones aromáticos y olefínicos del compuesto anterior, se observa acoplamiento de la señal por los protones vecinos. Por otro lado, los protones alifáticos integran los 4 protones restantes y se observan a un desplazamiento más bajo, 2.89 ppm, esto es debido a que se encuentran cercanos a metilenos próximos a un carbonilo que los protegen del efecto del campo magnético externo.

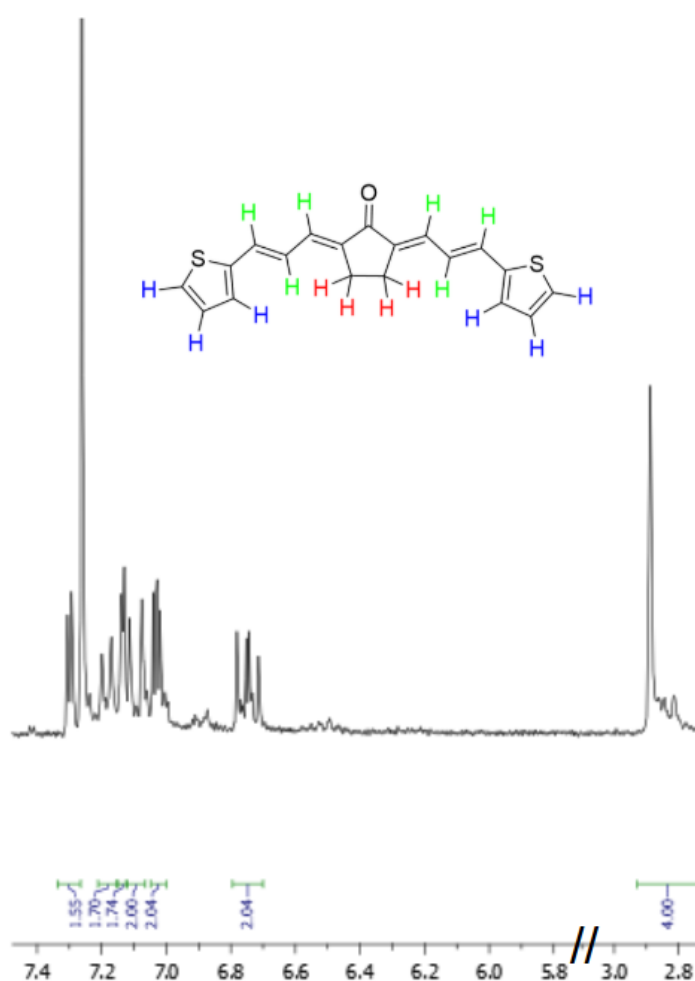


Figura 9. Espectro ^1H -RMN del compuesto **C1** obtenido en la segunda etapa de reacción. Además, se observa la estructura de la molécula con los distintos grupos de protones señalados: protones aromáticos (azul), olefínicos (verde) y protones alifáticos (rojo).

Por otro lado, en el experimento COSY (**Figura 10**) se observa la correlación clara entre los protones aromáticos en una región de 6-8 ppm, mientras que a desplazamientos más bajos no se observa la correlación correspondiente entre los 4 protones de la ciclopentanona por ser magnéticamente equivalentes.

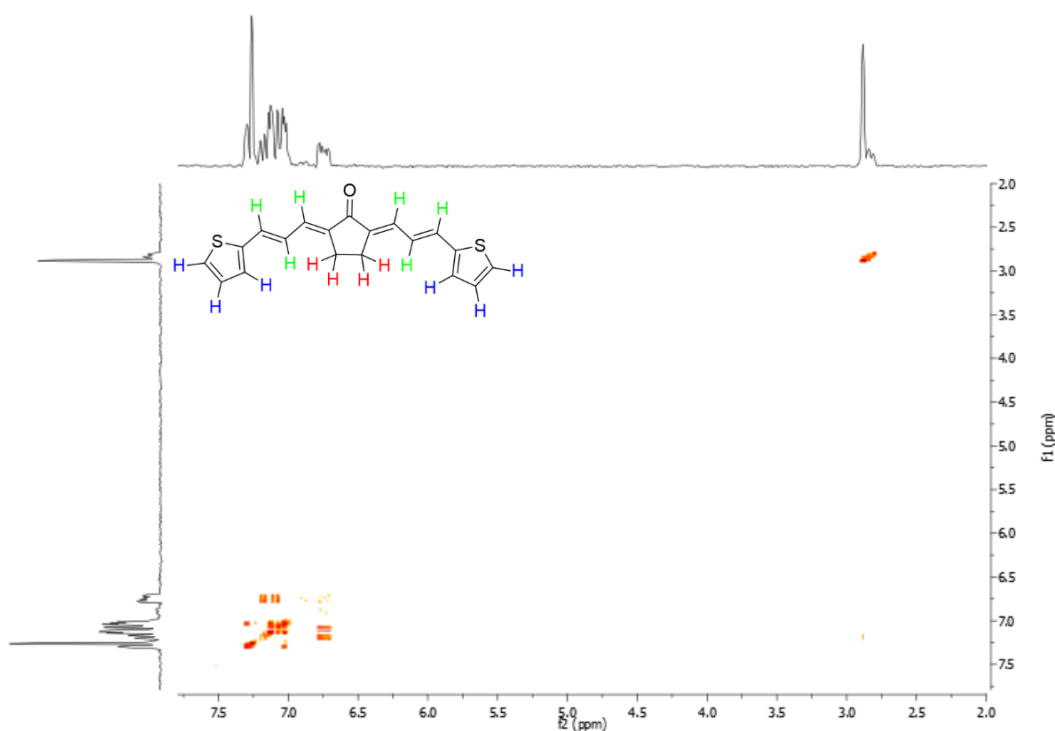


Figura 10. Experimento COSY del compuesto **C1** obtenido en la segunda etapa de reacción. Además, se observa la estructura de la molécula con los distintos grupos de protones señalados: protones aromáticos (azul), olefinicos (verde) y protones alifáticos (rojo).

Además de los análisis espectrales y elucidación estructural de las moléculas, se comparó el factor de retención (R_f), por TLC, de los patrones puros con respecto a las moléculas sintéticas obtenidas, donde se obtuvo una coincidencia entre el R_f de las nuevas moléculas con respecto a los reactivos puros disponibles en nuestro laboratorio.

A partir del análisis de los espectros, elucidación estructural y validación de los R_f mediante TLC de las moléculas obtenidas, se puede concluir que se obtuvo el compuesto **C1** de interés, y que a partir de estos resultados, es posible continuar con los ensayos biológicos propuestos.

5.2. Evaluación de actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* y *L. infantum*

Con el objetivo de evaluar la potencialidad como agentes antiparasitarios de las combinaciones entre las moléculas sintéticas (compuestos **C1**, **C2** y **C3**) y los distintos fármacos comerciales se ensayan combinaciones binarias *in vitro* sobre la forma no infectiva

epimastigote de *T. cruzi* y la forma promastigote axénica de *L. infantum*. Se utilizan concentraciones decrecientes partiendo de su IC_{50} , $\frac{3}{4} IC_{50}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$ y $\frac{1}{4} IC_{50}$, determinando los nuevos valores de IC_{50} luego de 5 días de tratamiento. En paralelo, se estudió la citotoxicidad inespecífica sobre macrófagos murinos (J774.1) como células mamíferas modelo determinando el valor de IC_{50} a los 48 h de incubación, para evaluar la selectividad de la actividad observada, calculando el IS.

En la **Tabla 3** se observan los distintos PI obtenidos para las combinaciones en la concentración más alta ensayada de los compuestos (la suma de los IC_{50} en monodosis de cada compuesto), además de los distintos efectos resultantes señalados en colores: antagónico (rojo), aditividad (amarillo) y sinergismo (verde). A partir de los valores, es posible observar que, a pesar de que muchas combinaciones superan el 50 % de inhibición a la concentración más alta ensayada, su efecto en la mayoría resultó antagónico. Esto es dado que, su comportamiento a concentraciones menores ($\frac{3}{4} IC_{50}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$ y $\frac{1}{4} IC_{50}$) no mostró la misma tendencia que a la concentración más alta, es decir, que no inhibieron el 50% de proliferación del parásito a diferencia de las combinaciones sinérgicas y aditivas.

Tabla 3. Valores del PI obtenidos a la concentración más alta estudiada (suma de los IC₅₀ de cada compuesto solo). Además, se observan los distintos efectos obtenidos a partir de las combinaciones ensayadas sobre la forma epimastigote no infectiva de *T. cruzi*: sinergismo (verde), aditividad (amarillo) y antagonismo (rojo).

<i>T. cruzi</i>			
<i>PI de la suma del IC₅₀ de cada compuesto solo</i>			
Fármaco	Compuesto C1	Compuesto C2	Compuesto C3
334	0.00 %	36.7 %	0.00 %
486	29.3 %	0.00 %	13.9 %
487	54.6 %	6.2 %	70.4 %
RF58	59.9 %	30.6 %	5.3 %
1483	61.9 %	56.2 %	17.4 %
RF37	0.00 %	15.6 %	21.5 %
RF88	13.9 %	0.00 %	10.9 %
RF10	1.58 %	7.59 %	58.2 %
RF23	36.6 %	0.00 %	30.0 %
RF86	0.00 %	21.6 %	23.3 %
AC1	12.6 %	11.6 %	22.8 %
RF5	7.44 %	7.59 %	35.9 %
RF14	100 %	59.6 %	25.4 %

Para *T. cruzi* se obtuvo una combinación aditiva entre el compuesto **C1**, la molécula sintética más activa y selectiva de las tres seleccionadas, y el climodin (**RF14**), un fármaco fitoterápico de venta libre en Uruguay utilizado para tratar los síntomas de la menopausia. El efecto aditivo se puede evidenciar en el isoblograma (**Figura 11**), donde se observa el punto correspondiente a los nuevos IC₅₀ en la línea de aditividad (construida a partir de los IC₅₀ individuales de los compuestos). Además, se obtuvo un valor de FICI = 0.99, lo que indica que el efecto obtenido fue aditivo, y que por lo tanto el valor de los nuevos IC₅₀ obtenidos será la mitad con respecto a los IC₅₀ individuales de las moléculas.

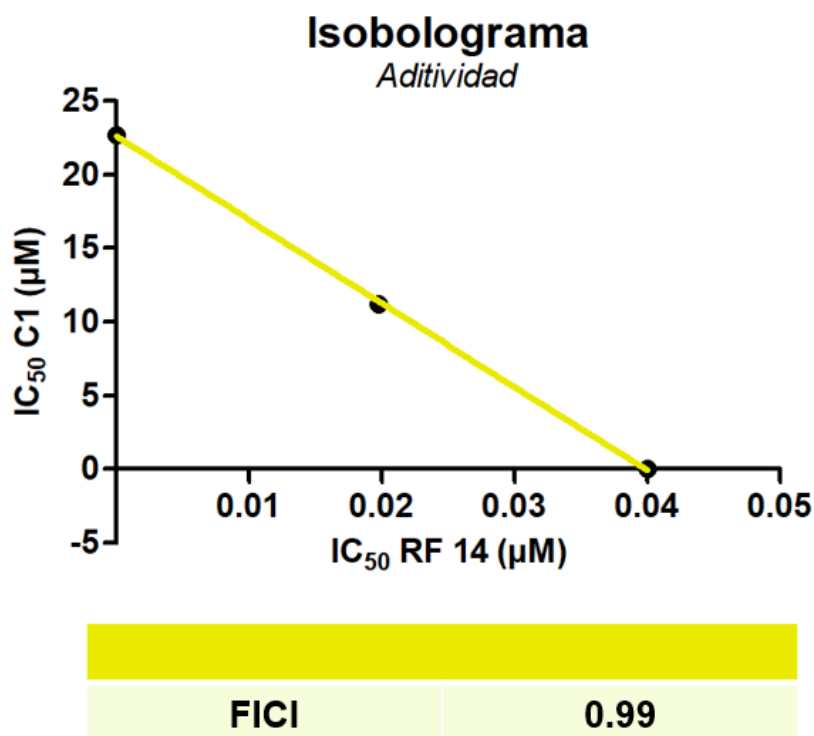


Figura 11. Gráfica del isoblograma obtenido para la combinación aditiva entre **C1 + RF14** obtenida en *T. cruzi*, donde se observa una línea aditiva conectada entre los puntos de los IC_{50} en monoterapia y el punto sobre la línea obtenido a partir de los IC_{50} en combinación. Además, se muestra el valor $FICI = 0.99$ que corrobora el efecto aditivo.

Por otro lado, en la **Figura 12** se observa un gráfico comparativo entre los IC_{50} de **C1** y **RF14** en monoterapia contra los IC_{50} de ambas moléculas en combinación. Además, se observa en la figura los valores de los IC_{50} calculados en combinación, donde es posible observar que, tal como se esperaba, disminuyeron a la mitad respecto a los IC_{50} en monoterapia ($0.04\mu M$ y $22.7\mu M$ para **C1** y **RF14** respectivamente), manteniéndose en el rango de nanomolar para la molécula sintética **C1**, siendo 400 veces menor con respecto al fármaco de referencia **Nfx**.

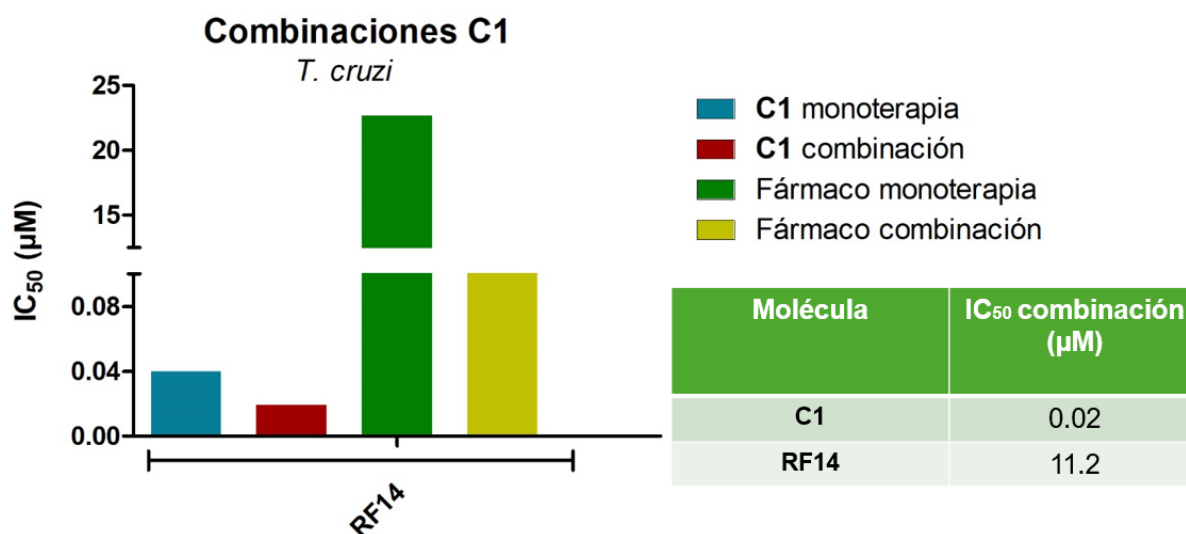


Figura 12. Gráfico en columnas comparativo entre los IC₅₀ de **C1** y **RF14** en monoterapia (azul y verde respectivamente) contra los IC₅₀ de ambas moléculas en combinación (rojo y amarillo respectivamente). Además, se observa una tabla con los valores exactos de los IC₅₀ calculados.

Con respecto a la composición molecular, la formulación del climodin (**RF14**) contiene extractos de trébol rojo, una terapia natural y no hormonal, donde los principales componentes declarados por el fabricante corresponden a: biochanina A, formononetina, genisteína y daidzeína. Anteriormente, la genisteína fue descrita con actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi*, sin embargo, el mecanismo de acción de esta molécula frente al parásito aún es desconocido.³⁰ Además, también se debe considerar los demás componentes desconocidos del extracto y la posible interacción entre ellos como posibles moléculas activas. Por otro lado, el mecanismo de acción del compuesto **C1** fue estudiado dentro de la tesis de doctorado de la Dra. Elena Aguilera, donde se obtuvo que incrementa la producción de glicina y succinato, lo que indica una posible acción en la actividad de las enzimas fumarato reductasa glicosomal dependiente de NADH y/o acetil-CoA:glicina C-acetiltransferasa.^{24,25}

Por otro lado, para *L. infantum* se obtuvieron cuatro combinaciones sinérgicas y una aditiva (**Tabla 4**), es decir con FICI ≤ 1 . Al igual que en la tabla anterior, se observan los valores de PI para la concentración más alta ensayada, donde es posible ver nuevamente combinaciones antagónicas con PI cercanos al 100%, sin embargo, esta tendencia no se mantuvo para concentraciones más bajas (no se inhibió más del 50% en ninguna de las otras concentraciones ensayadas). Por otro lado, para las combinaciones sinérgicas o aditivas no se obtuvieron valores de PI del 100% en todos los casos, sin embargo, se inhibió más del 50% en concentraciones más bajas, lo que resulta en el efecto sinérgico o aditivo obtenido.

Tabla 4. Valores del PI obtenidos a la concentración más alta estudiada (suma de los IC₅₀ de cada compuesto solo). Además, se observan los distintos efectos obtenidos a partir de las combinaciones ensayadas sobre la forma promastigote no infectiva de *L. infantum*: sinergismo (verde), aditividad (amarillo) y antagonismo (rojo).

<i>L. infantum</i>			
PI de la suma del IC ₅₀ de cada compuesto solo			
Fármaco	Compuesto C1	Compuesto C2	Compuesto C3
334	58.9 %	56.4 %	74.8 %
486	65.8 %	21.2 %	77.4 %
1475	99 %	13.2 %	48.6 %
RF10	0.00 %	42.2 %	71.5 %
RF14	50.7 %	63.5 %	81.0 %
RF16	8.59 %	47.3 %	44.8 %
RF23	0.00 %	0.00 %	69.6 %
RF37	100 %	86.3 %	76.8 %
RF58	53.7 %	67.6 %	74.7 %
RF86	89.8 %	100 %	100 %
RF89	54.4 %	51.8 %	72.4 %
RF95	20.8 %	91.3 %	66.1 %
RF98	88.9 %	98.5 %	91.2 %

La mayoría de los efectos observados resultaron de la combinación de los fármacos con el compuesto **C3**. Los sinergismos obtenidos se dieron entre: el compuesto **C2** y la amlodipina (**C2 + RF 86**), el compuesto **C3** y el ketoconazol (**C3 + 486**), el compuesto **C3** y el bromuro de pinaverio (**C3 + RF 37**), y el compuesto **C3** y la amlodipina (**C3 + RF 86**). Por otro lado, el efecto aditivo se observó entre la combinación entre el compuesto **C3** y el clorhidrato de clomipramina (**C3 + RF 98**).

A modo representativo para todas las combinaciones sinérgicas se observa, en la **Figura 13**, el isoblograma de la combinación sinérgica entre **C3 + 486**, donde el punto está por debajo de la línea de aditividad. Además, se observa el valor FICI = 0.64 obtenido, el cual confirma el efecto sinérgico.

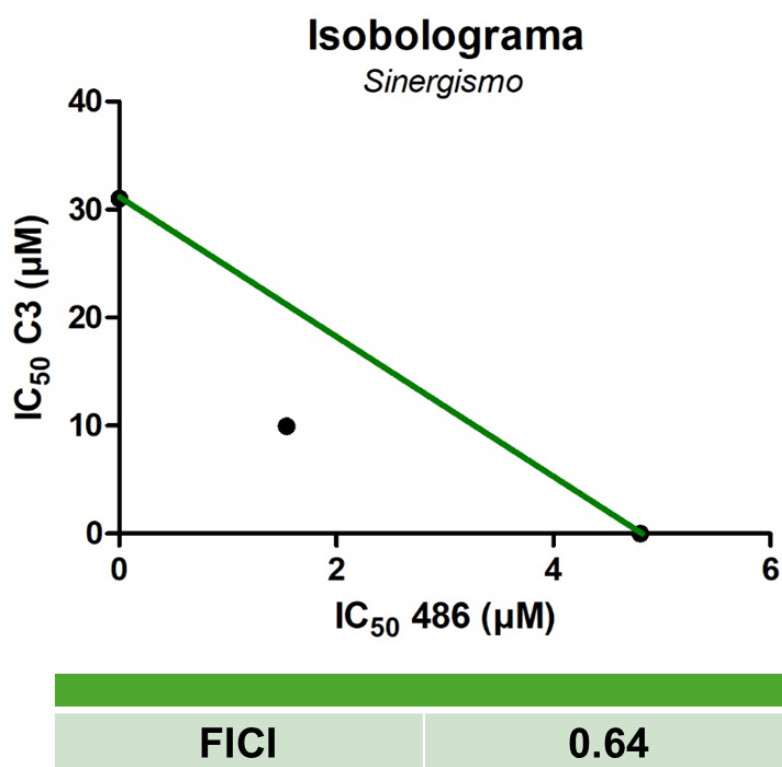


Figura 13. Gráfica del isobolograma obtenido para la combinación sinérgica entre **C3 + 486** obtenida en *L. infantum*, donde se observa una línea aditiva conectada entre los puntos de los IC_{50} en monoterapia y el punto por debajo de la línea obtenido a partir de los IC_{50} en combinación. Además, se muestra el valor $FICI = 0.64$ que corrobora el efecto sinérgico.

Por otro lado, en la **Figura 14** se observa el gráfico comparativo (para las combinaciones sinérgicas y aditivas obtenidas) entre los IC_{50} de las distintas moléculas sintéticas y fármacos en monoterapia y los IC_{50} de las moléculas en combinación. Además, se observa una tabla con los IC_{50} calculados en combinación. A partir de los valores obtenidos, es posible observar que los IC_{50} en combinación disminuyen más de la mitad con respecto a los IC_{50} en monoterapia, consecuencia directa del efecto sinérgico. Por otro lado, para la combinación aditiva entre el compuesto **C3 + RF98** los IC_{50} disminuyeron a la mitad. La combinación con el IC_{50} más bajo obtenido fue entre **C3 + 486**, con un valor de 1.54 μM para la molécula sintética, **C3**, y 9.96 μM para el fármaco.

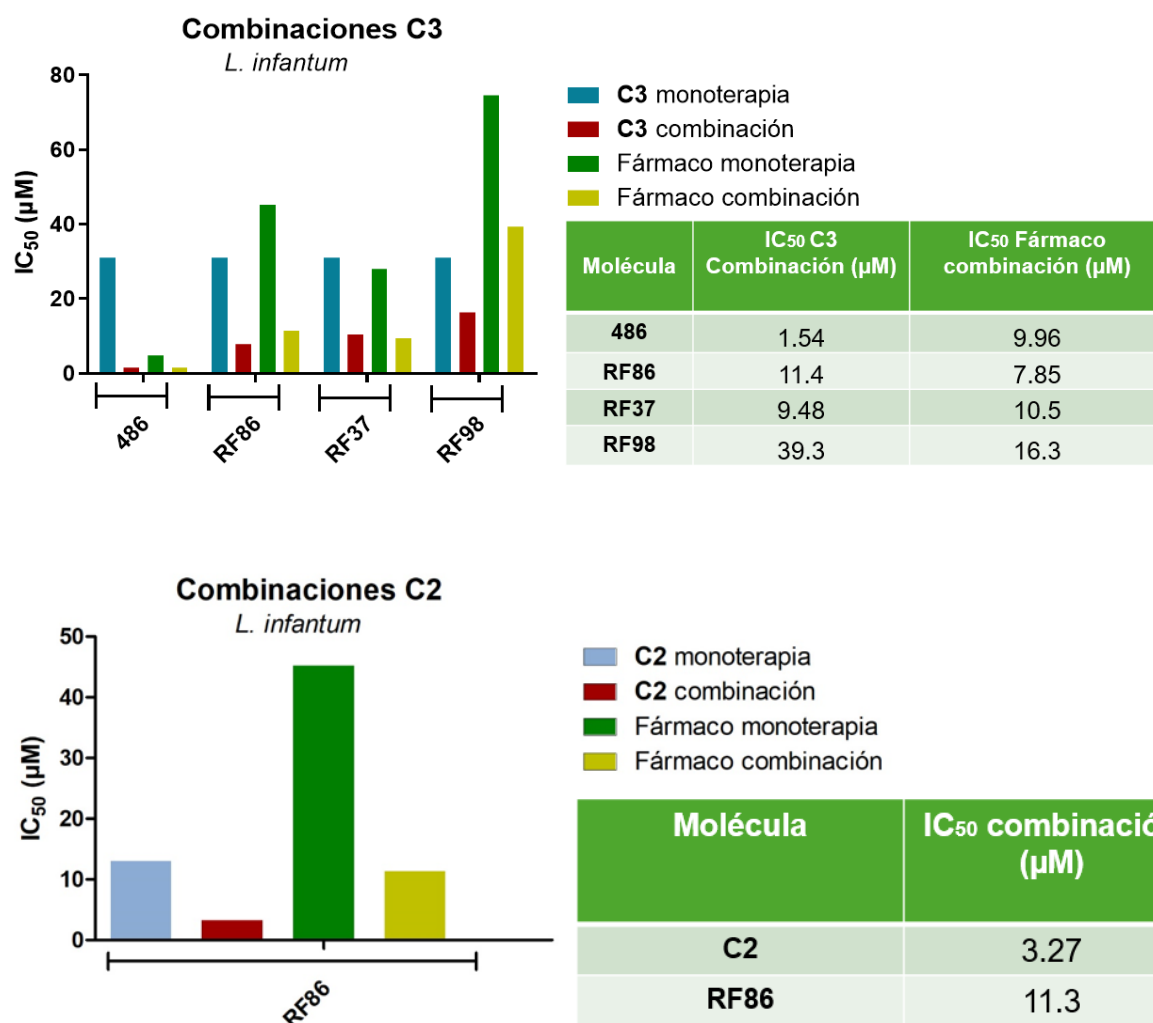


Figura 14. Gráfico en columnas comparativo entre los IC₅₀ de las moléculas sintéticas y los fármacos en monoterapia (azul y verde respectivamente) contra los IC₅₀ de ambas moléculas en combinación (rojo y amarillo respectivamente). Además, se observa una tabla con los valores exactos de los IC₅₀ calculados.

A partir de los resultados *in vitro* obtenidos frente a las formas no infectivas de *T. cruzi* y *L. infantum*, se realizaron los estudios de citotoxicidad inespecífica frente a macrófagos murinos J774.1 de las combinaciones con efectos sinérgicos o aditivos. Como se mencionó anteriormente, se probaron diferentes concentraciones de las combinaciones con el fin de obtener el valor del IC₅₀ en células mamíferas. A partir de este valor, se calcula el IS con el fin de identificar aquellas combinaciones selectivas frente al parásito (IS > 10). En este caso, se espera que la combinación frente a macrófagos muestre un efecto antagónico, es decir un IC₅₀ con respecto a los compuestos de forma independiente.

En la **Figura 15**, se muestran los IS obtenidos para las combinaciones con respecto al IC₅₀ de la molécula con el IC₅₀ más bajo. Además, se observan los distintos valores de IC₅₀ calculados para todas las combinaciones. La combinación más selectiva corresponde a la

combinación binaria con efecto aditivo entre **C1 + RF14** (obtenida para *T. cruzi*), la cual mostró un IS = 718 para la molécula **C1** (la cual obtuvo el IC₅₀ más bajo dentro de la combinación), aumentando casi el doble con respecto al IS de **C1** en monoterapia (IS = 375). Por otro lado, de todas las combinaciones sinérgicas obtenidas para *L. infantum* solo una resultó selectiva (**C3 + 486**) únicamente para el fármaco **486**, el cual obtuvo el IC₅₀ más bajo en la combinación, con un IS = 12.2. Para aquellas combinaciones que no fueron selectivas, se deduce que el efecto sinérgico observado en parásitos también resultó en macrófagos, el cual se refleja en un aumento de citotoxicidad frente a células mamíferas.

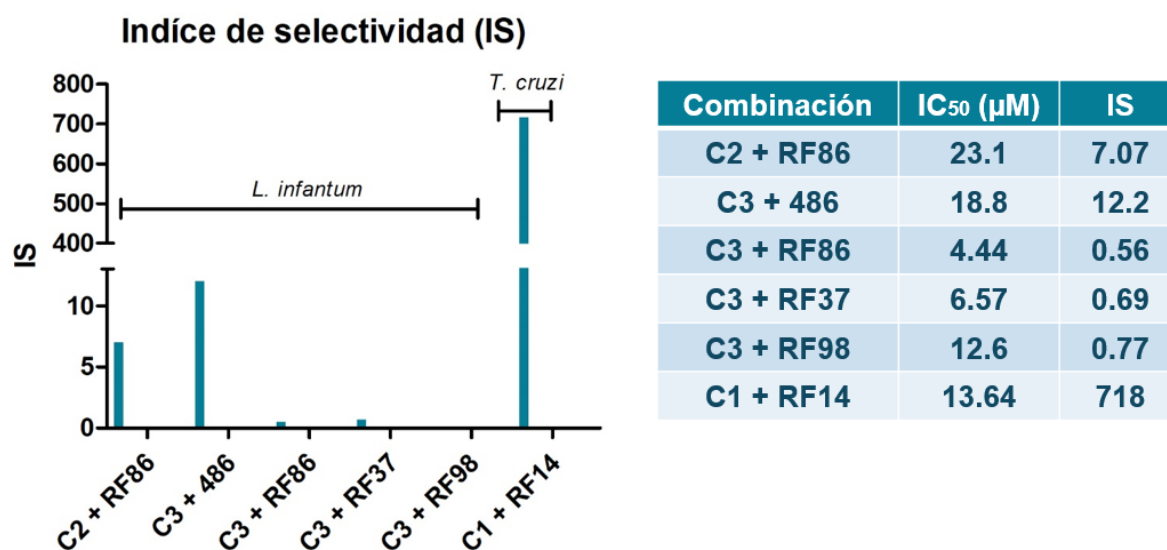


Figura 15. Gráfico en columnas comparativo entre los distintos IS obtenidos para todas las combinaciones entre las moléculas sintéticas y los fármacos. Además, se observa una tabla con los valores exactos de los IC₅₀ calculados en macrófagos murinos y los datos de IS.

A partir de estos resultados, se seleccionó la combinación más activa y selectiva frente a *T. cruzi* (**C1 + RF14**) para continuar con los estudios de toxicidad en embriones de zebrafish y ensayos *in vivo* en el modelo murino agudo de la EC. Por otro lado, con respecto a los estudios de mutagenicidad, se estudió la combinación sinérgica entre **C3 + RF86** dado que era la única combinación con efecto sinérgico o aditivo obtenida al momento de realizar el ensayo.

5.3. Test de mutagenicidad (Test de Ames)

Un fármaco mutagénico significa que es capaz de causar mutaciones en el material genético, pudiendo dar lugar a cáncer, malformaciones congénitas o enfermedades genéticas. Es por estas razones que la ausencia de mutagenicidad es uno de los requisitos

mínimos que debe cumplir un agente terapéutico para poder continuar con estudios pre-clínicos. Los estudios de mutagenicidad, como fue mencionado anteriormente, se realizan *in vitro* con diferentes cepas de *S. typhimurium* con mutaciones en genes esenciales, en este caso, dependientes de histidinas. Es decir que, las bacterias no son capaces de crecer en un medio sin histidina a menos que sufran una mutación reversa que restaure la función de biosíntesis del aminoácido esencial. Por lo tanto, un compuesto se considera mutagénico cuando provoca un aumento significativo en la frecuencia de mutaciones de las bacterias en comparación con el grupo control (sin exposición al compuesto). Cuando el número de colonias mutadas (revertientes) duplica el número de colonias del control negativo (revertientes espontáneos) al menos en dos niveles de dosis consecutivas la molécula se considera mutagénica.

Previo al test de mutagenicidad es necesario realizar un test de toxicidad, donde se obtiene la dosis máxima no tóxica a partir de la cual se realiza el test de Ames. Es decir, la concentración a la cual hubo un crecimiento bacteriano uniforme en toda la placa (césped) y sin precipitaciones del compuesto.

Anteriormente, en el desarrollo de la tesina de grado y doctorado de la Dra. Elena Aguilera, se realizó el test de mutagenicidad para las tres moléculas sintéticas seleccionadas (compuesto **C1**, **C2** y **C3**), donde se obtuvo que todos los compuestos resultaron no mutagénicos. Con respecto a los fármacos de venta libre seleccionados, han pasado las pruebas mínimas de seguridad, por lo que no se esperaba que fueran mutagénicos. Por lo tanto, partiendo de estos antecedentes se espera que las combinaciones sean no mutagénicas.

A partir de lo mencionado anteriormente, se seleccionó para el estudio de mutagenicidad la combinación sinérgica obtenida hasta el momento del ensayo en *L. infantum* entre el compuesto **C2** y la amlodipina (**C2 + RF86**). Con respecto al ensayo de toxicidad previo al test de Ames (**Tabla 5**) se puede concluir que la combinación fue no tóxica a partir de 500 µg/placa, mostrando precipitaciones en la concentración más alta ensayada.

Tabla 5. Efectos sobre el crecimiento bacteriano de las distintas concentraciones ensayadas de la combinación sinérgica obtenida para *L. infantum* entre el compuesto 2 y la amlodipina (RF86).

Test de Toxicidad	
Compuesto C2 + Amlodipina (RF86)	
Dosis (µg/placa)	Crecimiento bacteriano
500	Césped con poco precipitado
50	Césped
5	Césped
0.5	Césped
0.05	Césped

En base a las observaciones y resultados obtenidos, se definió como dosis máxima no tóxica para la combinación 400 µg/placa. Por lo tanto, para el test de Ames se realizaron diluciones al tercio a partir de la dosis máxima no tóxica obtenida (Tabla 6).

Tabla 6. Número de colonias revertientes (mutadas) a distintas dosis ensayadas de la combinación sinérgica obtenida para *L. infantum* entre el compuesto 2 y la amlodipina (RF86). Además, se observan las colonias revertientes para el control negativo y para el control positivo.

Test de Ames (<i>S.Typhimurium</i> TA98)			
Compuesto C2 + Amlodipina (RF86)			
Dosis (µg/placa)	N° de Colonias		
	Placa 1	Placa 2	Promedio ± SD
400	4	0	2.0 ± 2.8
133	4	1	2.5 ± 2.1
44.4	2	3	2.5 ± 0.7
14.8	6	4	5.0 ± 1.4
4.90	1	3	2.0 ± 1.4
Control Negativo	2	4	3.0 ± 1.0
Control Positivo	160	ND*	ND

*ND: No determinado.

No se observaron dos dosis consecutivas con el doble de promedio del número de colonias con respecto al control negativo, además, tampoco se observa una tendencia entre el número de colonias y el aumento de la concentración, por lo que se concluye que la combinación es no mutagénica, siendo una de las posibles candidatas a continuar con ensayos pre-clínicos.

A modo ilustrativo, se observa en la **Figura 16** imágenes de las placas de cultivo del control negativo y control positivo (compuesto mutagénico), donde se observan pocas colonias revertientes para el control negativo en comparación con el control positivo, en el cual se observa un mayor número de colonias.

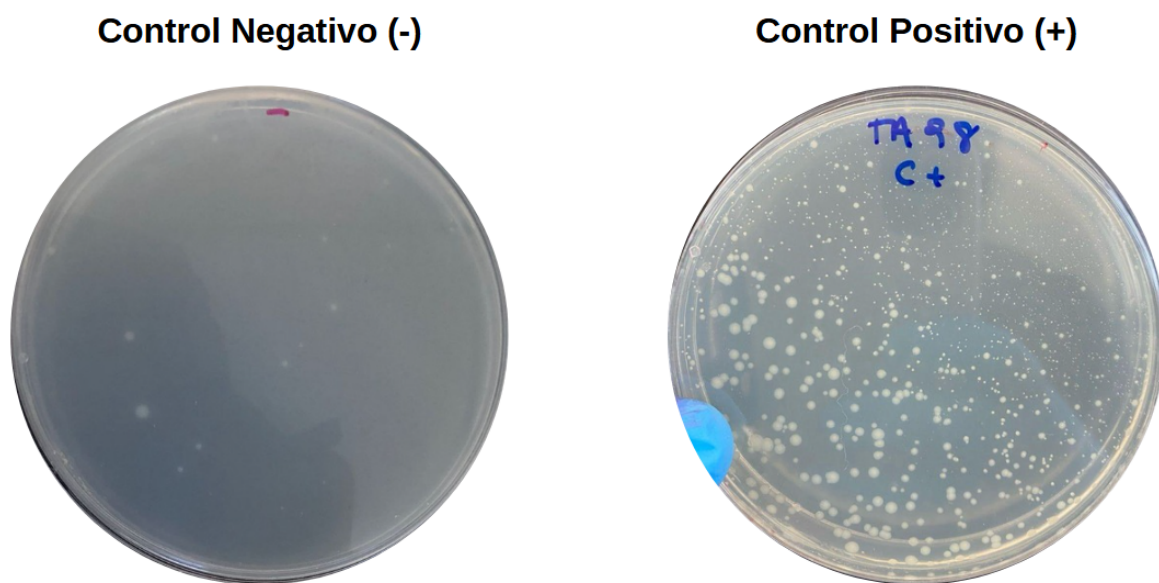


Figura 16. Imágenes de las placas de cultivo para el control negativo y el control positivo, donde se observan pocas colonias revertientes para el control negativo en comparación con el control positivo, en el cual se observa un mayor número de colonias.

5.4. Estudios de toxicidad en embriones zebrafish

Para el estudio de toxicidad en embriones de pez cebra se realizó el *test de Toxicidad de Embriones de Peces* recomendado en la guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) con modificaciones. Para el ensayo se utilizan embriones en la etapa final de epibolia, fase en la que son más resistentes y de fácil manipulación. En esta etapa se incuban los compuestos a distintas concentraciones con el fin de hallar su LD₅₀. El análisis de toxicidad se observa mediante parámetros morfológicos dispuestos por la OCDE bajo lupa, de forma tal de estudiar el comportamiento dosis-respuesta de los compuestos durante 48 h de exposición.

Para el ensayo se seleccionó la combinación más activa y selectiva en ensayos *in vitro* obtenida para *T. cruzi* entre el compuesto **C1** y el climodín (**RF14**). Se utilizaron 20 embriones por condición, y para validar el ensayo se empleó 1% DMSO (disolvente de los compuestos) como control negativo y cafeína en una dosis de su LD₅₀ = 2.4 mM como control positivo (control utilizado anteriormente en ensayos de toxicidad del grupo). Además, se utilizó un control negativo adicional donde se incubaban los embriones sin compuesto o DMSO, es decir, solo con agua de acuario. Se consideran tóxicos aquellos compuestos que provocan en los embriones alguna de las siguientes características: coagulación del embrión, falta de latido cardíaco, falta de formación de somites y anormalidades en la cola.

En la **Figura 17** se observan las imágenes obtenidas de los embriones a las 48 h de exposición para los distintos controles. Para ambos controles negativos se observó, en los 20 embriones, el desarrollo de somites (señalado con el triángulo amarillo en la parte dorsal del embrión). Además, no se evidenció falta de latido cardíaco ó anormalidades en la cola. Con respecto al control positivo, se observa la falta de formación de somites y anormalidades en la cola, además, se registró la disminución de latido cardíaco. A partir de estos resultados en los controles, es posible validar el ensayo y continuar analizando los resultados para la combinación.

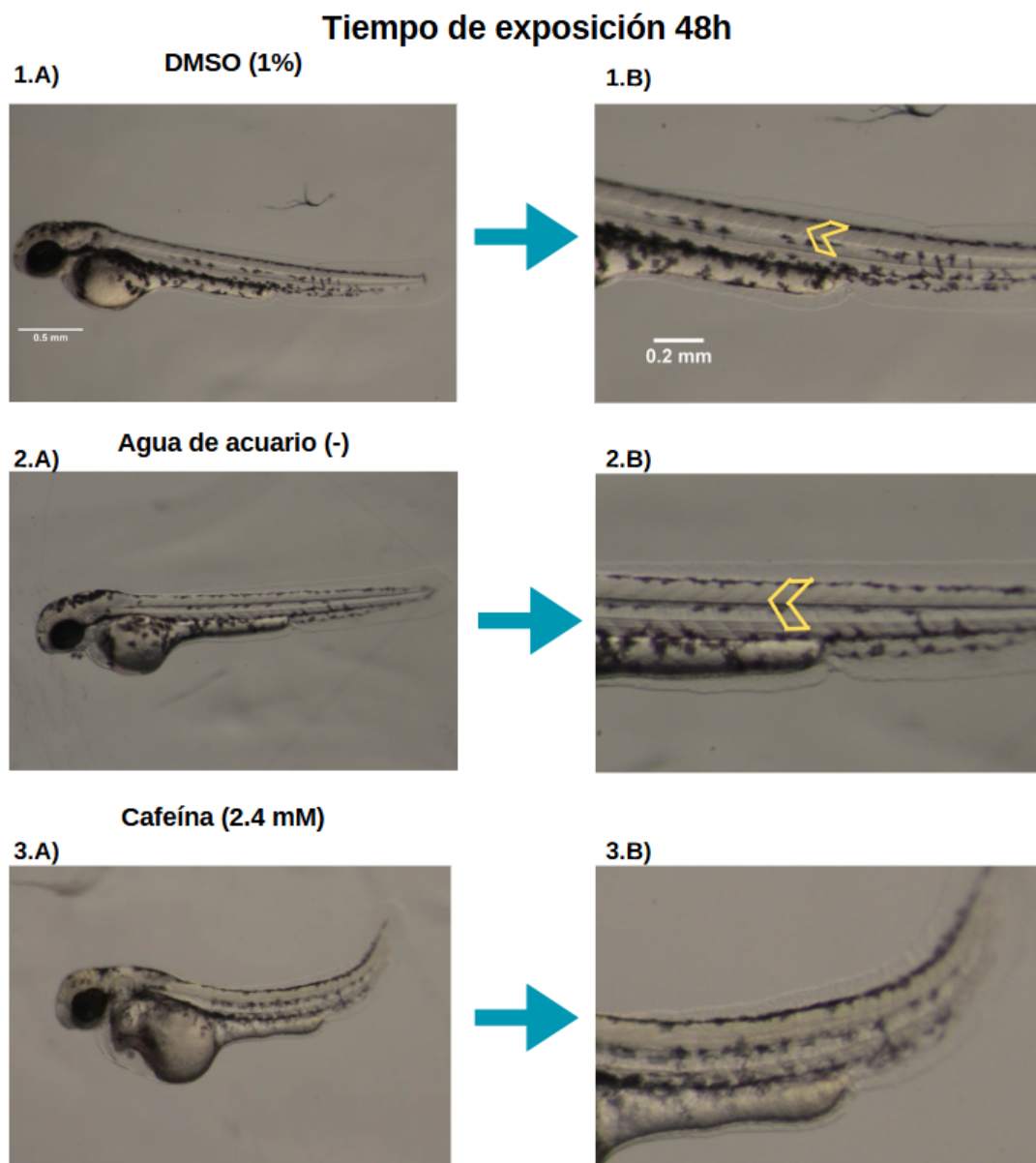


Figura 17. Estudio de toxicidad en embriones zebrafish de la combinación **C1** + RF14. Se observan las imágenes obtenidas de los embriones a las 48 h de exposición para los distintos controles (todas las imágenes se encuentran en un aumento 3X). Se observa además la escala, en representación para todas las imágenes, en la imagen del control negativo con DMSO a 0.5 mm y en la aumentada sobre la cola una escala de 0.2 mm. 1. A) Control negativo con 1% DMSO 1. B) Enfoque sobre la cola con los somites señalados mediante una flecha amarilla. 2. A) Control negativo con agua de acuario. 2. B) Enfoque sobre la cola con los somites señalados mediante una flecha amarilla. 3. A) Control positivo con Cafeína a su $LD_{50} = 2.4$ mM. 3. B) Enfoque sobre la cola.

Por otro lado, para la combinación se obtuvo que las concentraciones mayores a 25 μM (siendo la más alta de 200 μM) a las 48 h son letales para los 20 embriones, sin embargo, a las concentraciones de 25 μM y 12.5 μM (**Figura 18**) en las mismas condiciones sobrevivieron 15 y 19 embriones respectivamente. Además, se observó a 12.5 μM el desarrollo de somites, sin anomalías en la morfología de la cola ó en la frecuencia cardíaca, por lo que es posible afirmar que a esta concentración la combinación no es tóxica para los embriones. Sin embargo, a 25 μM se observa menor supervivencia de los embriones y anomalías en el desarrollo como son curvatura en la cola y falta de somites, en 17 de 20 de los embriones. A partir de estos resultados, es posible concluir que la LD_{50} es menor a 12.5 μM , es decir, 625 veces mayor al IC_{50} en parásitos para el compuesto **C1** obtenido para la combinación ($\text{IC}_{50} = 0.02\mu\text{M}$).

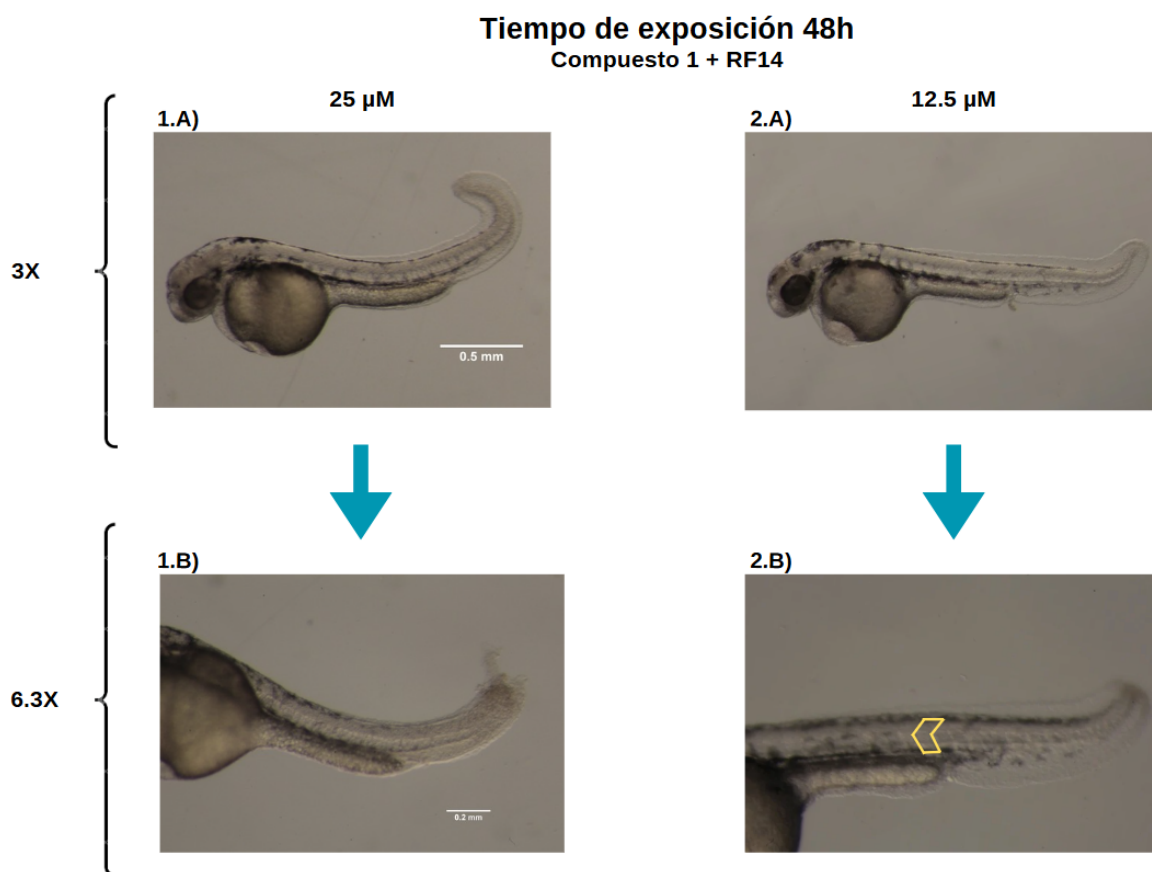


Figura 18. Estudio de toxicidad en embriones zebrafish de la combinación **C1 + RF14**. Se observan las imágenes obtenidas de los embriones a las 48 h de exposición para las concentraciones donde se observó el desarrollo de los embriones: 25 μM y 12.5 μM . Se observa además la escala, en representación para todas las imágenes, en la imagen a 25 μM a 0.5 mm y una de 0.2 mm para la imagen de la cola a 6.3X. **1. A)** Embriones tratados a 25 μM de la combinación **1. B)** Enfoque sobre la cola **2. A)** Embriones tratados a 12.5 μM . **2. B)** Enfoque sobre la cola con los somites señalados mediante una flecha amarilla.

5.5. Ensayos *in vivo* en el modelo murino agudo para la enfermedad de Chagas

Los ensayos *in vivo* en modelos murinos son de gran utilidad para evaluar la acción de una molécula dado que, aunque hay diferencias, los ratones comparten vías genéticas, celulares y fisiológicas con los humanos, asemejando más los resultados esperados en humanos para posteriormente avanzar a ensayos pre-clínicos. Además, a diferencia de cultivos celulares, los ensayos murinos permiten evaluar la respuesta inmunitaria completa ante enfermedades o tratamientos. Sin embargo, es importante seleccionar un buen candidato a fármaco antes de avanzar en este tipo de modelos dado que los estudios en animales son costosos, éticamente sensibles y requieren de una inversión significativa de tiempo y recursos. Para esto, es necesario comprobar la eficacia en estudios *in vitro*, realizar ensayos de seguridad o toxicidad inicial en cultivos celulares y analizar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del candidato para asegurar una absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) favorables, asegurando que el fármaco llegue a su blanco molecular sin generar metabolitos tóxicos. Se selecciona el candidato que logre cumplir con lo anteriormente mencionado con el fin de minimizar la cantidad de animales utilizados, priorizando compuestos con mayor probabilidad de éxito.

Por lo tanto, a partir de los resultados *in vitro* sobre la forma no infectiva de *T. cruzi* y los ensayos de toxicidad en embriones de zebrafish, se decidió continuar con ensayos *in vivo* en el modelo murino para la EC con la combinación entre el compuesto **C1** y el climodin (**C1** + **RF14**), para la cual se había obtenido un IS = 718, superando la selectividad de los compuestos en monoterapia^{24,25}, y un IC₅₀ < 1 µM para la molécula sintética. Con respecto a estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos, se realizaron para todas las moléculas sintéticas seleccionadas (incluido el compuesto **C1**) durante la tesis de doctorado de la Dra. Elena Aguilera predicciones rápidas y robustas de parámetros fisicoquímicos, farmacocinéticos, solubilidad, interacciones o potencial toxicidad metabólica mediante el software SwissADME.²⁴ Los datos obtenidos sugirieron que todas las moléculas seleccionadas para esta tesina poseen un perfil tipo fármaco para la EC, ya que, no reducen la actividad de enzimas del citocromo P450 (CYP), presentan buenos parámetros de permeabilización de membrana y alta absorción gastrointestinal, lo que sugieren que los compuestos podrían metabolizarse fácilmente por el organismo. En particular, el compuesto **C1** mostró una solubilidad en agua moderada, lo que indica que al igual que el **Bnz** no atravesaría la barrera hematoencefálica, y que por lo tanto, podría solubilizarse en el organismo sin tener acción sobre el sistema nervioso central. Por otro lado, con respecto al climodin (**RF14**), al ser un fármaco de venta libre ha superado anteriormente estudios de seguridad y ensayos de farmacocinética o farmacodinamia, lo que permite continuar con este compuesto en fases *in vivo*.

Para estudiar el efecto de la combinación sobre animales infectados con *T. cruzi* se realizó el estudio de la evolución de la parasitemia semanalmente (cada 7 días) de los distintos ratones, simulando la etapa aguda de la EC. El ensayo tuvo una duración total de

60 días, donde se sacrificaron los animales. La administración se realiza diariamente vía oral durante 15 días, utilizando como vehículo una emulsión lipídica de forma de asegurar una administración homogénea de la combinación y una metabolización más lenta de los compuestos. Se utilizó como fármaco de referencia el **Bnz**, administrando una dosis de 50 mg/kg peso ratón, y como control negativo el vehículo empleado (emulsión lipídica). Por otro lado, la combinación se administró en una dosis de 0.1 mg/kg peso ratón para el compuesto **C1** y 50 mg/kg peso ratón para el **RF14**, manteniendo la relación entre los IC₅₀ obtenida en los ensayos *in vitro*.

En la **Figura 19** se observa la curva de parasitemia obtenida a partir del ensayo para la combinación, el fármaco de referencia (**Bnz**), y el control negativo con la emulsión lipídica.

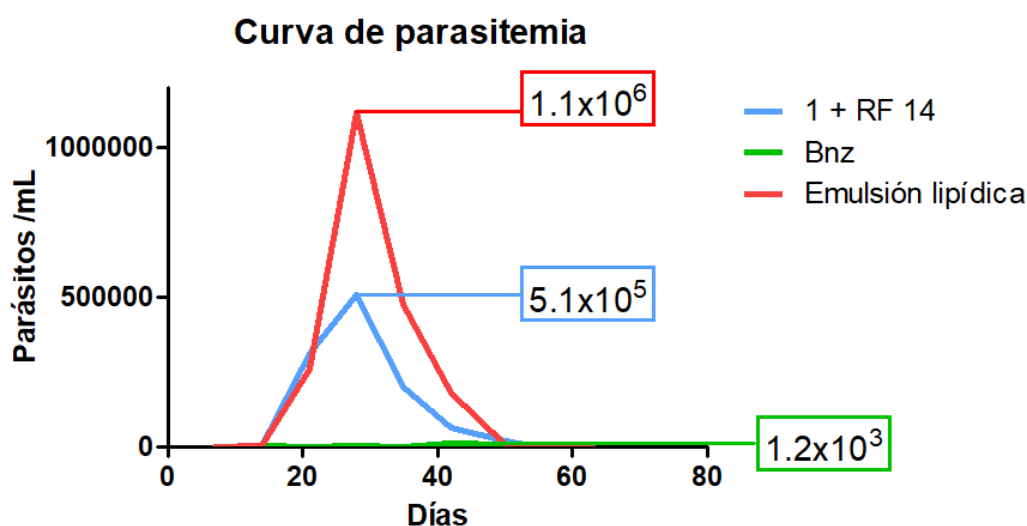


Figura 19. Curva de parasitemia obtenida para las distintas condiciones ensayadas: **Bnz** (verde), **Emulsión lipídica** (rojo) y **[C1 + RF14]** (azul). Se muestran los valores de parasitemia para los distintos máximos obtenidos para las diferentes condiciones: 1.1×10^6 parásitos/mL (**Emulsión Lipídica**), 5.1×10^5 parásitos/mL (**C1 + RF14**) y 1.2×10^4 parásitos/mL (**Bnz**).

La combinación logró disminuir más de la mitad el pico de parasitemia en sangre en comparación con el control negativo. Además, durante los 60 días de ensayo mostró una sobrevida de 100%, es decir que, todos los ratones sobrevivieron al ensayo al igual que el fármaco de referencia (**Bnz**), mientras que en el control negativo mostró una sobrevida del 67%. Por otro lado, previamente, en el marco de la tesis de doctorado de la Dra. Elena Aguilera, el compuesto **C1** fue administrado en monoterapia frente al modelo *in vivo* en una dosis de 62 mg/kg peso ratón, donde mostró cierto efecto tóxico, observándose una sobrevida del 40% en las mismas condiciones de ensayo.²³ Con respecto al **RF14**, anteriormente fue administrado en el modelo *in vivo* de forma independiente a la misma dosis ensayada en combinación con **C1** (50 mg/kg peso ratón), donde se observó, al igual

que con **C1**, cierta toxicidad, dando como resultado una sobrevida del 67% en las mismas condiciones de ensayo (estos datos no están reportados aún ya que son parte de la tesis de posgrado de la Lic. Claudia Veira).

A partir de estos resultados, es posible concluir que la combinación demostró ser menos tóxica, tanto para la molécula **C1** como para el fármaco **RF14**, con respecto a su comportamiento en monoterapia, siendo lo esperado debido al IS obtenido en ensayos en cultivo celular. Además, el ajuste de dosis planteado para la molécula **C1** a partir del efecto aditivo obtenido para la combinación en ensayos *in vitro*, mejoró la respuesta del modelo murino frente a los compuestos.

6 - CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró caracterizar, purificar, y obtener el compuesto **C1** en rendimientos moderados tal y como se pudo observar en los distintos espectros.

Por otro lado, se analizaron y estudiaron un total de 78 combinaciones frente a las formas no infectivas de *T. cruzi* y *L. infantum*, 39 en cada parásito respectivamente, entre las distintas moléculas sintéticas (compuesto **C1**, **C2** y **C3**) y los fármacos comerciales seleccionados. Se obtuvieron tres combinaciones sinérgicas y una combinación aditiva para *L. infantum*, de las cuales fueron selectivas únicamente dos de las tres combinaciones sinérgicas. Además, la combinación sinérgica entre el compuesto **C2** y el **RF 86** resultó no mutagénica a concentraciones iguales o menores a la dosis máxima no tóxica de 400 µg/placa.

Por otro lado, se obtuvo una combinación aditiva (**C1** + **RF14**) para *T. cruzi*, obteniendo un IC_{50} igual a 0.02 µM para la molécula sintética (400 veces más activo que el fármaco de referencia **Nfx**) y 11.2 µM para el fármaco de venta libre. Además, el IS para el compuesto **C1** en combinación aumentó casi el doble con respecto al de monoterapia. Con respecto a la toxicidad en embriones, la combinación obtuvo un LD_{50} al menos 625 veces mayor que el IC_{50} de la molécula sintética. A partir de los resultados obtenidos para la combinación entre el compuesto **C1** y el fármaco **RF14**, y de los resultados obtenidos en los antecedentes con respecto a estudios ADME para el compuesto **C1**, se continuó con ensayos *in vivo* frente a la EC donde se obtuvieron resultados prometedores, mostrando una sobrevida del 100% (al igual que el fármaco de referencia **Bnz**), y una disminución del pico de parasitemia del 55%.

Como perspectivas se debe profundizar en estudios farmacocinéticos de la combinación para poder continuar ajustando dosis de la combinación entre el compuesto **C1** y el fármaco **RF14** con el fin de encontrar dosis efectivas en el modelo murino agudo crónico de la EC. Se comprobó además que el reposicionamiento y la combinación con otros compuestos mejora el perfil farmacológico de los compuestos, pudiendo obtener terapias más económicas y de fácil acceso para las enfermedades desatendidas, y que por lo tanto, es importante continuar estudiando nuevas combinaciones entre moléculas activas u obtener nuevos compuestos activos mediante reposicionamiento para lograr encontrar una respuesta terapéutica efectiva sin efectos secundarios nocivos para la salud del paciente.

7 - REFERENCIAS

7.REFERENCIAS

1. Ramos-Rincón, J. M. (2021). Chagas disease in Spain. *Medicina Clínica*, 156(8), 390-392.
2. Pérez-Molina, J. A., Crespillo-Andújar, C., Bosch-Nicolau, P., & Molina, I. (2021). Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(9), 458-470.
3. Grave, I. (2022). Tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nuevos esquemas. *Revista Médica de Chile*, 150, 1689–1692.
4. Onyekwelu, K. C. (2019). Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. In *Biology of Trypanosoma cruzi*. IntechOpen.
5. Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armentì, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(2), 157-163
6. Arrúa, E. C., Seremeta, K. P., Bedogni, G. R., Okulik, N. B., & Salomon, C. J. (2019). Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of Chagas Disease: A review. *Acta Tropica*, 198, 105080.
7. Soares-Sobrinho J.L., Cunha-Filho M.S., Rolim Neto P.J., Torres-Labandeira J.J., Dacunha-Marinho B. (2008). Benznidazole. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 64(3), o634.
8. National Center for Biotechnology Information. (2021). PubChem compound summary.
9. Cabrera, M., Lavaggi, M. L., Hernández, P., Merlino, A., Gerpe, A., Porcal, W., Boiani, M., Ferreira, A., Monge, A., de Cerain, A. L., González, M., & Cerecetto, H. (2009). Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicology Letters*, 190(2), 140–149.
10. Kaye, P. M., Cruz, I., Picado, A., Van Bocxlaer, K., & Croft, S. L. (2020). Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *In Seminars in Immunopathology*, 42(2), 247–264.
11. Bates, P. A. (2018). Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature Microbiology*, 3(5), 529-530.
12. Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2017). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 25-40.
13. Lemke, A., Kiderlen, A. F., & Kayser, O. (2005). Amphotericin b. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 151-162.
14. Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576-2597.
15. Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 673-683.
16. Jourdan, J. P., Bureau, R., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2020). Drug repositioning: a brief overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(9), 1145-1151.

17. Freitas, C. S., Lage, D. P., Machado, A. S., Vale, D. L., Martins, V. T., Cardoso, J. M., Oliveira-da-Silva, J.A., Reis, T.A.R., Tavares, G.S.V., Ramos, F.F., Ludolf, F., Pereira, I.A.G., Bandeira, R.S., Fujiwara, R.T., Bueno, L.L., Roatt, B.M., Chávez-Fumagalli, M.A., & Coelho, E. A. (2023). Exploring drug repositioning for leishmaniasis treatment: Ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 164, 156143.
18. Adasme, M. F., Bolz, S. N., Adelmann, L., Salentin, S., Haupt, V. J., Moreno-Rodríguez, A., Nogueira-Torres, B., Castillo-Campos, V., Yopez-Mulia, L., De Fuentes-Vicente, J.A., Rivera, G., & Schroeder, M. (2020). Repositioned drugs for chagas disease unveiled via structure-based drug repositioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8809.
19. Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z. W., Li, Y. X., & Chen, Y. Z. (2009). Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), 111-128.
20. Tallarida, R. J. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 1-7.
21. Nápoles Rodríguez, R., Arreguez, M. L., Corlatti, A. M., Bach, H. G., Catalán, C. A., Laurella, L. C., Barroso, P.A., & Sülsen, V. P. (2025). Bioactive Compounds with Leishmanicidal Potential from *Helianthus tuberosus* and *Vernonanthura squamulosa*. *Molecules*, 30(5), 1039.
22. Aguilera, E., Alvarez, G., Cerecetto, H., & González, M. (2019). Polypharmacology in the treatment of Chagas disease. *Current Medicinal Chemistry*, 26(23), 4476-4489.
23. Veira, C., Benítez, D., Pérez-Díaz, L., Álvarez, G., Cerecetto, H., & Aguilera, E. (2025). Looking for approved-medicines to be repositioned as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Identification of new chemotypes with good individual-or in combination-biological behaviours. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 120, e240183.
24. Aguilera, E. (2020). Desarrollo preclínico de compuestos tripanosmocidas sin efectos tóxicos ni mutagénicos : optimización de su actividad *in vivo*. Tesis de doctorado, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
25. Aguilera, E., Sánchez, C., Cruces, M. E., Dávila, B., Minini, L., Mosquillo, F., Pérez-Díaz, L., Serna, E., Torres, S., Schini, A., Sanabria, L., Vera de Bilbao, N. I., Yaluff, G., Zolessi, F. R., Ceilas, L. F., Cerecetto, H., Alvarez, G. (2023). Preclinical studies and drug combination of low-cost molecules for Chagas disease. *Pharmaceuticals*, 16(1), 20.
26. Álvarez, G., Perdomo, C., Coronel, C., Aguilera, E., Varela, J., Aparicio, G., Zolessi, F.R., Cabrera, N., Vega, C., Rolón, M., Rojas de Arias, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., & González, M. (2017). Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* *Molecules*, 22(5), 709.

27. Aguilera, E., Varela, J., Birriel, E., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Mazariegos, S.D., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Minini, L., Merlino, A., Cerecetto, H., Gonzalez, M., & Alvarez, G. (2016). Potent and selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: inhibition of parasite growth through multitarget activity. *ChemMedChem*, 11(12), 1328-1338.
28. OECD. (2020). *Test No. 471: Bacterial reverse mutation test* (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
29. OECD. (2013). *Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test* (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
30. Planer, J. D., Hulverson, M. A., Arif, J. A., Ranade, R. M., Don, R., & Buckner, F. S. (2014). Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2977.