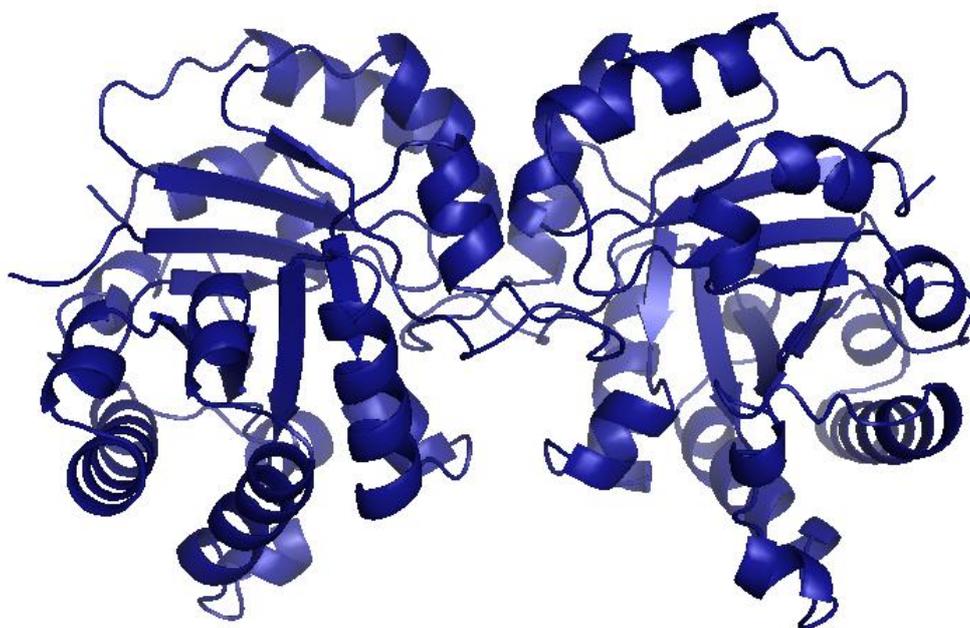


Bis – tiazoles como agentes disruptores de la interfase de Triosafofato Isomerasa: potenciales agentes anti-*T. cruzi* sin efectos mutagénicos

Jennyfer Martínez

Tutor: Dr. Hugo Cerecetto
Co-tutor: Lic. Guzmán Álvarez



Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Química Orgánica

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Diciembre 2012



*A mis padres y mis hermanos por
su amor y comprensión...*

Agradezco a todas aquellas personas que me han acompañado en este recorrido y me han ayudado a que este proyecto salga adelante:

A *Merche* y *Hugo* por abrirme las puertas del laboratorio, brindarme su confianza y alentarme a seguir adelante.

A mis padres por apoyarme en los buenos y no tan buenos momentos, por darme la oportunidad de estudiar y ser feliz.

A mis hermanos *Damián* y *Nicolás* su amistad; a *Damito* por “el aguante” del día a día.

A *Rafael* por su amor, su respeto y su apoyo incondicional.

A *Guzmán* por las explicativas, la ayuda, los retos y su humor que desde el primer día me brindó.

A mis amigas de siempre *Flor*, *Naty*, *Paula*, *Virginia* y *Lucía* por su eterna amistad, sus locuras y por nuestros momentos.

A todos mis compañeros del laboratorio por hacer que las horas trabajando sean muy agradables; especialmente a mis amigas *Estefania*, *Stefani*, *Elena*, *Verónica* y *Agustina* por los almuerzos y las salidas.

A mis amigas y amigos de generación que nos conocemos desde los primeros cursos, *Mariana*, *Caro*, *Cami*, *Patricia*, *Ceci*, *Pablo* y *Martín*.

A *Diro* y *Gerardo* por *Gonchi* y *Flopi*, además a *Lucy* y *Tomás* por los almuerzos de los domingos.

A *Javier* y *Estefania* por los ensayos *in vitro* de *T. cruzi* y citotoxicidad respectivamente.

A la Dra. *Beatriz Garat* por permitirme realizar los experimentos en el *LIM*; y a la Dra. *Leticia Pérez* por darme una mano, por su tiempo y por aguantarme a cada rato.

A la ANII por la beca de Iniciación a la Investigación.

Índice

Resumen	8
1. Introducción y antecedentes	
1.1. Generalidades de la enfermedad de Chagas	10
1.2. Triosafosfato isomerasa de <i>T. cruzi</i>	15
1.3. Antecedentes	18
2. Propuesta de trabajo y objetivos	
2.1 Propuesta de trabajo	21
2.2 Objetivos generales	21
2.3 Objetivos específicos	21
3. Materiales y métodos	
3.1. Química	24
3.1.1. Generalidades	24
3.1.2. Síntesis de los compuestos diseñados	25
3.2. Puesta a punto de la técnica de disrupción del dímero de <i>TcTIM</i> mediante espectroscopía de fluorescencia	35
3.3. Evaluación de disrupción del dímero de <i>TcTIM</i> mediante crosslinking y electroforesis SDS-PAGE	35
3.4. Ensayo de inhibición de la actividad de la <i>TcTIM</i>	37
3.5. Evaluación de la actividad frente a <i>T. cruzi</i>	38
3.6. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos	39
3.7. Estudio de relación estructura-actividad	40
4. Resultados y discusión	
4.1. Química	45
4.2. Puesta a punto de la técnica de disrupción del dímero de <i>TcTIM</i> mediante espectroscopía de fluorescencia	57
4.3. Evaluación de disrupción del dímero de <i>TcTIM</i> mediante <i>cross-linking</i> y electroforesis SDS-PAGE	65
4.4. Ensayo de inhibición de triosafosfato isomerasa de <i>T. cruzi</i>	71
4.5. Evaluación de actividad frente a <i>T. cruzi</i>	73
4.6. Citotoxicidad inespecífica en macrófagos murinos	75
4.7. Estudio de relación estructura-actividad	77

5. Conclusiones y perspectivas

5.1.	Conclusiones	86
5.2.	Perspectivas	88

6. Bibliografía	90
------------------------	----

Resumen

La triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) ha sido propuesta como un blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad que éste agente causa, la enfermedad de Chagas.

En el presente trabajo de Tesina de Grado, se diseñaron y sintetizaron siete nuevos derivados bis – tiazólicos. Los mismos fueron caracterizados estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas habituales y, además, se estudiaron propiedades fisicoquímicas de los mismos.

Se realizaron diferentes estudios de manera de evaluar estos compuestos como disruptores de la interfase de TcTIM, trabajando en la puesta a punto de una técnica basada en la fluorescencia intrínseca de la proteína blanco, además se realizaron ensayos con geles desnaturalizantes y *cross – linking*. Dado que utilizando estas metodologías no fue posible estudiar la disrupción de TcTIM se trabajó con el ensayo de inhibición enzimática convencional. De estos estudios se identificaron tres compuestos con muy buenas capacidades inhibitorias de TcTIM, siendo el bis – tiazol **JM12** el mejor inhibidor en las condiciones de trabajo.

Los compuestos sintetizados (bis – tiazoles e intermedios) fueron evaluados frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y se estudiaron sus citotoxicidades frente a macrófagos murinos. Particularmente, se obtuvieron muy buenos resultados con el bis – tiazol **JM09**, el cual resultó ser un excelente y selectivo inhibidor de *T. cruzi*.

De manera de estudiar la relación entre la estructura y la actividad, algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados se determinaron empleando herramientas informáticas on-line. De este estudio, se obtuvo información relevante acerca de que grupos funcionales mejoran la actividad de estos compuestos en TcTIM y en *T. cruzi*.

Se plantea seguir trabajando en el diseño de nuevos bis – tiazoles como forma de profundizar en los aspectos químicos y biológicos de esta familia de moléculas. Y así, mejorar la bioactividad y selectividad como agentes anti – *T. cruzi*.

Palabras claves: Triosafosfato isomerasa, *Trypanosoma cruzi*, Chagas, bis – tiazol.

1. Introducción y antecedentes

1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, fue descubierta en 1909 por Carlos Chagas, se dispersó progresivamente a través del continente Latinoamericano afectando millones de personas en el ámbito rural con un alto impacto de morbilidad y mortalidad [1]. Se estima que actualmente existen entre 15 – 17 millones de personas infectadas en Latinoamérica y entre 90 – 100 millones de personas expuestas a la enfermedad [2 – 5]. Además, el número de pacientes infectados ha aumentado en países desarrollados donde la enfermedad no es endémica (Australia, Canadá, Japón, España y Estados Unidos) debido al creciente movimiento de inmigrantes latinoamericanos que desconocen ser portadores del parásito [6].

El agente causante de esta enfermedad parasitaria es el protozooario monoflagelado hemotesidial *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*); el cual se transmite al hombre y a otros animales a través de deyecciones de insectos del orden hemíptera, familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, conocido como “vinchucas”. En Uruguay existen diez especies de vinchucas, de las cuales una es la responsable del ciclo doméstico, *Triatoma infestans*; además la especie *Triatoma rubrovaria* es la responsable de un ciclo silvestre autóctono [7 – 9]. Existen además otros mecanismos de transmisión de la enfermedad, como transfusiones de sangre de personas infectadas, transmisión congénita, ingesta de alimentos contaminados con heces de insectos vectores y accidentes laborales [10].

Los signos que deja el parásito al infectar al humano son característicos, signo de Romaña, cuando ingresa vía membrana ocular; o chagoma a través de la piel (figura 1.1.1). Sin embargo, en la mayoría de los individuos la infección es asintomática, debido a que la parasitemia inicial es baja; pero algunas veces se pueden presentar ciertos síntomas como fiebre, agrandamiento del hígado y del bazo, entre otros [9].

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* comienza cuando un insecto vector (*Triatoma infestans*), succiona sangre de un mamífero infectado, ingiriendo parásitos en su forma tripomastigotes. Estos parásitos pasan al intestino medio del insecto y se diferencian a la forma epimastigote; los cuales se replican por fisión binaria. Los epimastigotes migran al intestino grueso y al recto del insecto donde se diferencian como resultado

de cambios en el ambiente, en tripomastigotes metacíclicos. Cuando el insecto se alimenta de sangre humana, defeca sobre la piel del hospedero, liberando en las heces parásitos en la forma tripomastigote metacíclicos. Estos últimos son capaces de ingresar al hospedero a través del frotamiento de la herida de picadura del insecto o a través de permisivas superficies mucosas o conjuntivas. Dentro del hospedero los tripomastigotes son capaces de ingresar a cualquier célula nucleada, a través de un mecanismo de reclutamiento de lisosomas pertenecientes a la célula hospedera. Los tripomastigotes ingresan a la célula, escapan del lisosoma y son liberados al citoplasma por un mecanismo inusual, donde se transforman en amastigotes esféricos que son capaces de replicarse. Los amastigotes se replican hasta provocar la lisis celular y se vuelven a la forma tripomastigote. Los tripomastigotes liberados invaden células y tejidos adyacentes. Además, vía linfa y flujo sanguíneo son transportados a sitios distantes (células musculares, tejido liso y esqueleto) y células ganglionares, donde logran mas ciclos intracelulares de replicación (figura 1.1.1) [10 – 13].

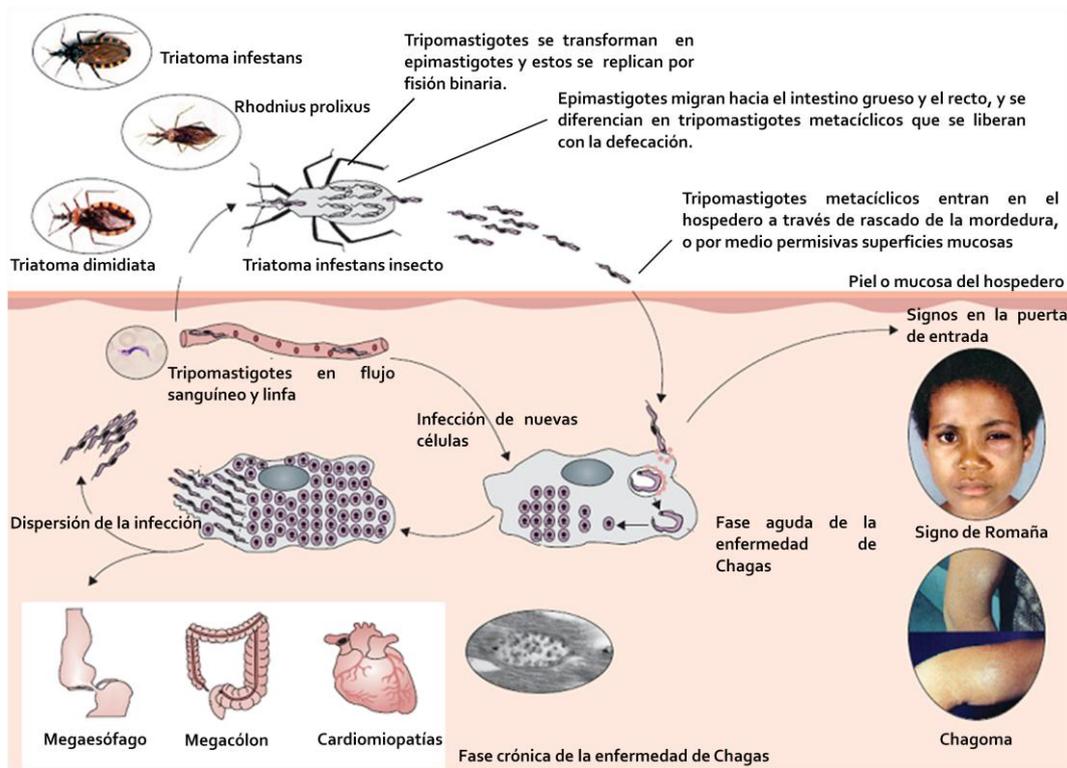


Figura 1.1.1. En la figura se muestra el ciclo de *Trypanosoma cruzi*, los principales signos que marcan la entrada del parásito al individuo (signo de Romaña y Chagoma de inoculación) y los principales síntomas durante la fase crónica de la enfermedad (megaesófago, megacolon y cardiomiopatías). Además se muestran las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de la enfermedad al hombre (Adaptado de [10]).

En la actualidad no existe terapia adecuada debido a la falta de seguridad, eficacia, resistencia, toxicidad y costo de los medicamentos empleados para el tratamiento de esta enfermedad. Además el apoyo de las industrias farmacéuticas no es suficiente, por desinterés de las mismas en enfermedades de "pobres".

Actualmente se emplean dos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad Nifurtimox y Benznidazol (figura 1.1.2), a continuación se realiza una breve reseña de los mismos.

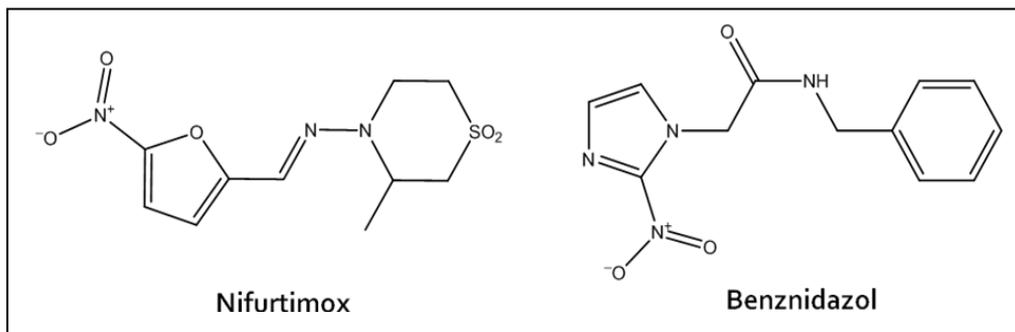


Figura 1.1.2. Estructura química de los dos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Nifurtimox (Nfx) es un 5-nitrofurano (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenamina)tetrahidro-4*H*-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Lampit[®], Bayer). Fue el más activo de los derivados del 5-nitrofurfural experimentalmente analizados [14]. Se ha propuesto que Nfx podría inhibir la enzima tripanotona reductasa, que cataliza la eliminación de especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi*, sin embargo aún hoy en día no existe consenso sobre el mecanismo de acción exacto por el que ejerce su efecto tóxico sobre el parásito [15, 16].

Benznidazol (Bz) es un 2-nitroimidazol (*N*-bencil-2-nitroimidazolacetamida) (Rochagan[®], Radanil[®], Roche). La acción del Bz podría involucrar la formación de enlaces covalentes u otras interacciones de intermedios de la nitroreducción con los componentes del parásito [17]; o uniones con el ADN, lípidos o proteínas [18].

Se han realizado varios estudios en los cuales se emplearon los fármacos Nfx y Bz; obteniéndose diferentes resultados con respecto a la terapéutica de las distintas fases de la enfermedad de Chagas. Existiendo mucha variación en el periodo del

tratamiento, las dosis, la edad y el origen geográfico de los pacientes. Si bien ambos fármacos presentan buena actividad durante la fase aguda, infección crónica reciente y accidentes en laboratorios, ninguno de los dos fármacos resulta eficaz en casos de infecciones crónicas tardías, debido a tolerancia al fármaco y aparición de efectos secundarios. Además, ambos compuestos están contraindicados durante el embarazo. Los principales efectos colaterales causados por el Nfx son anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, manifestaciones digestivas, entre otras. Las reacciones adversas del Bz involucran granulocitosis, dolor de garganta, ampollas hemorrágicas y hemorragias de las mucosas [19]. También se han encontrado linfomas y actividad mutagénica y carcinogénica en animales de experimentación [20, 21]. Además, por parte del grupo de investigación de Química Medicinal, de la Universidad de la República, se han encontrado efectos de citotoxicidad y mutagenicidad por parte de ambos fármacos [22].

Entonces, es importante la identificación de nuevas moléculas que cumplan con los ensayos pre – clínicos y clínicos, de manera de garantizar seguridad, tolerancia y selectividad por el agente causante de esta enfermedad.

En un trabajo reciente del Grupo de Química Medicinal, se realizó una revisión de los compuestos desarrollados y registrados en patentes en los últimos tiempos para el tratamiento de trypanosomiasis y leishmaniasis [23]. En la figura 1.1.3 se muestran las estructuras de algunos de los compuestos más relevantes divulgados como agentes anti – *T. cruzi*. Entre los compuestos más destacados se encuentran quimiotipos como en el compuesto **1**, el cual corresponde a un azol hidroxialquilado, el mismo presentó actividad anti – *T. cruzi in vivo*, al igual que algunas tiadiazinas (ejemplo, compuesto **2**) que además presentaron mayor selectividad por *T. cruzi* que por macrófagos de mamíferos. Complejos metálicos (compuesto **3**), han mostrado ser activos en *T. cruzi*, involucrando mecanismos de acción como unión al ADN, estrés oxidativo e inhibición de tripanotiona reductasa. Los compuestos **4** (tiazoles combinados con azoles), **5** (benzoxaboroles) y **7** (indazoles) han sido compuestos muy activos en *T. cruzi in vitro*, además de presentar elevada selectividad. Otros compuestos que fueron identificados como buenos inhibidores de la proliferación de *T. cruzi in vitro* e *in vivo*, fueron los

derivados de etenilbenzofuranos (compuesto **6**), que además no presentaron toxicidad en células de mamíferos.

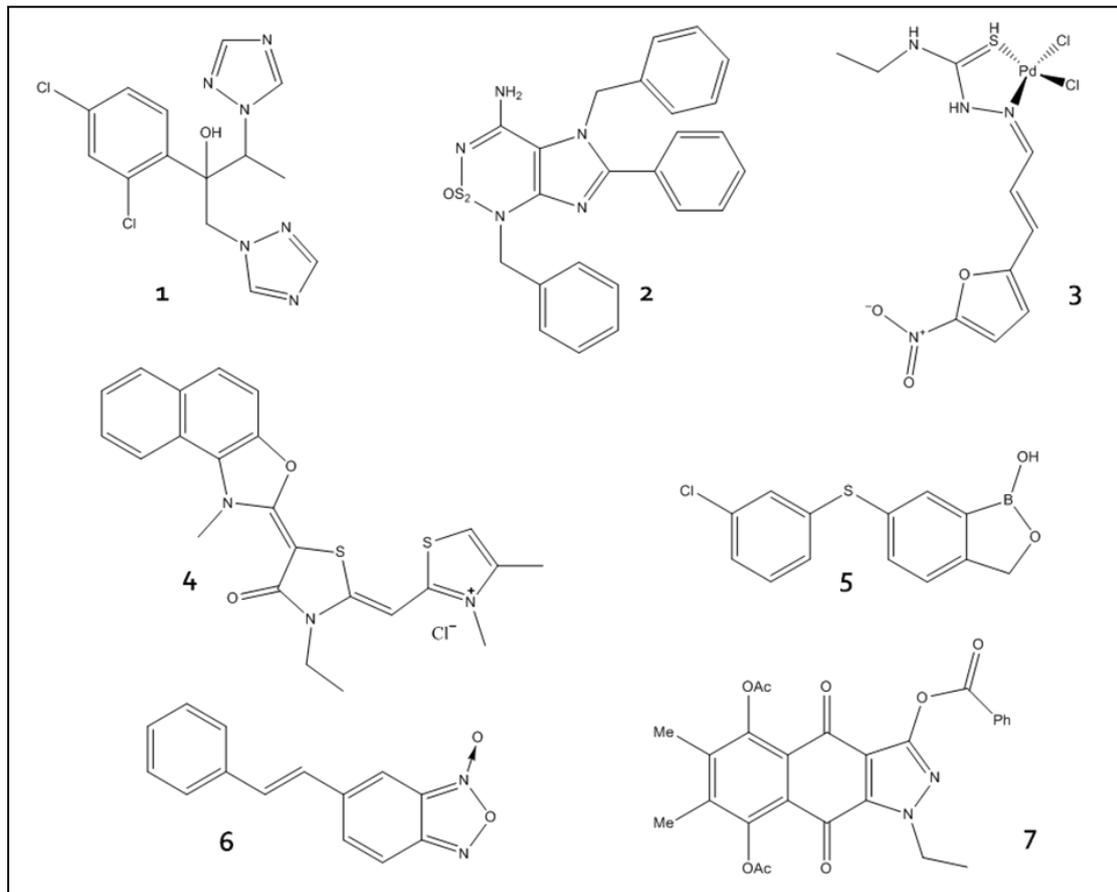


Figura 1.1.3. Principales estructuras químicas recientemente patentadas como inhibidores de *T. cruzi*.

A pesar de que estos compuestos, entre otros, han sido buenos candidatos a fármacos para la enfermedad de Chagas por su capacidad de inhibir la proliferación de *T. cruzi*; han fracasado en las etapas finales del desarrollo (por problemas de toxicidad inespecífica) a un medicamento. Entonces, sigue siendo un gran desafío desarrollar compuestos que además de presentar alta selectividad por el parásito, no presenten efectos de mutagenicidad y toxicidad, entre otros.

Una importante característica en el metabolismo de *T. cruzi* es su dependencia de la glicólisis como una fuente de energía para la supervivencia celular. Por lo que, enzimas de esta etapa bioquímica representan excelentes blancos para la identificación de nuevas moléculas que inhiban selectivamente a los mismos, afectando selectivamente las funciones metabólicas de *T. cruzi* y por ende puedan ser excelentes fármacos para

esta patología [24 – 26]. En este sentido, la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (*TcTIM*) ha sido propuesta como un posible blanco para el diseño de nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas [27 – 29].

1.2 Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*

Las TIMs son proteínas “house – keeping” que están presentes en todos los organismos. Participan en la quinta etapa de la ruta glicolítica, catalizando la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato mediante un mecanismo enzimático conocido [30].

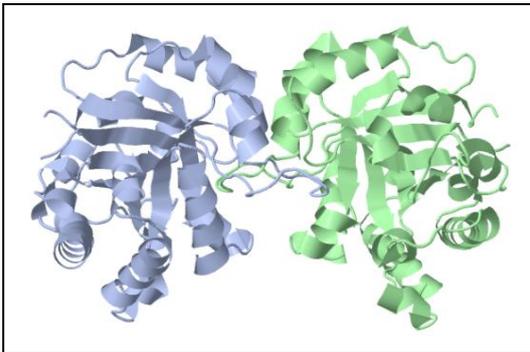


Figura 1.2.1. Representación gráfica de la estructura de la *TcTIM* obtenida mediante difracción de rayos X. PDB: 1TCD

Estructuralmente, muchas de las TIMs conocidas son homodímeros en la mayoría de los organismos [31 – 33] (figura 1.2.1), donde cada monómero consiste en ocho cadenas beta paralelas rodeadas por ocho alfa – hélices, formando una estructura tipo barril. La interfase entre los monómeros ocupa una porción significativa de la superficie de cada monómero, cerca de

1496 Å² en *TcTIM* [34]. Por experimentos de rayos X, se observa que esta proteína es capaz de ligar dos moléculas de hexano en el bolsillo hidrofóbico que se encuentra en la superficie de la interfase del dímero [35]; por lo tanto esta región sería un blanco dentro de la proteína para moléculas orgánicas hidrofóbicas que se introduzcan en esta región.

La estructura dimérica de esta proteína es importante para su estabilidad y su función catalítica; a pesar que cada monómero presenta sus residuos catalíticos, la proteína sólo es capaz de realizar su función en su estado dimérico [36 – 39]. Para explicar este fenómeno, ha sido propuesto que la dimerización induce rearrreglos moleculares en los monómeros, promoviendo la correcta orientación de los residuos catalíticos; por lo tanto la catálisis de uno de los monómeros requiere el soporte de la otra subunidad [39 – 41]. Entonces moléculas que actúen a nivel de la interfase inducirán

modificaciones estructurales y alterarán la integridad del dímero provocando inactivación de la enzima y la pérdida de su actividad catalítica [26, 42].

Se sabe que la conservación de residuos aminoacídicos, en TIMs de distintas especies, es mayor en ciertas regiones de la proteína que en otras; por ejemplo los residuos que se encuentran en regiones interfaciales están significativamente menos conservados que los residuos catalíticos [43 – 45]. Esto dificulta el diseño de moléculas específicas dirigidas al sitio catalítico conservado. De esta manera, se sabe que la TIM de homo sapiens (HTIM) y las enzimas de los parásitos poseen los mismos residuos catalíticos; sin embargo, la identidad de 32 residuos interfaciales de TIM de parásitos y HTIM es aproximadamente del 52 % [46]. En *Tc*TIM el sitio hidrofóbico en la interfase está formado por residuos aromáticos; mientras que en HTIM se encuentra formado por residuos alifáticos y aromáticos [43]. Entonces, es posible diseñar moléculas que exhiban especificidad por las interfases de las enzimas parasitarias y no afecten las enzimas de los humanos, de manera que no alteren el metabolismo del mismo [43, 47].

El grupo de investigación del Dr. Ruy Perez Montfort, de la UNAM-México, el cual trabaja en colaboración con nuestro grupo de investigación, identificó algunos inhibidores de *Tc*TIM interesantes, específicamente los compuestos I y II (figura 1.2.2)

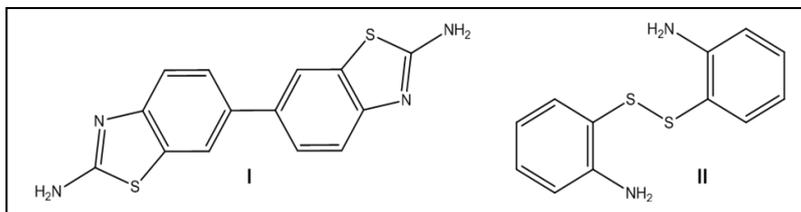


Figura 1.2.2. Estructuras químicas de los compuestos I y II, identificados por el grupo de investigación del Dr. Ruy Pérez Montfort.

[43, 46]. Además, se investigaron las posibles interacciones que estos compuestos eran capaces de establecer

con la proteína en estudio. Se observó que el compuesto II se une irreversiblemente, según lo que indican los correspondientes estudios de rayos X; sin embargo para el compuesto I se cree, por los estudios de cinética (ya que no se han obtenido cristales adecuados para la difracción de rayos X), que la unión es reversible.

Se ha demostrado que se unen en la interfase dimérica de *Tc*TIM dos moléculas derivadas del quimiotipo benzotiazol (compuesto III, figura 1.2.3), por molécula de

enzima interviniendo en su función catalítica [48]. Una característica importante de esta molécula es la presencia del grupo sulfónico, el cual se observó que aumenta la solubilidad de los benzotiazoles; y además por estudios teóricos se ha demostrado que el agrupamiento ácido sulfónico interacciona con aminoácidos específicos de la interfase de la *TcTIM* [25]. Por otro lado, el homólogo del compuesto I (el compuesto IV, figura 1.2.3) no causa el mismo efecto que éste. Por lo tanto, esto indica que se requieren interacciones específicas entre el disruptor y la proteína.

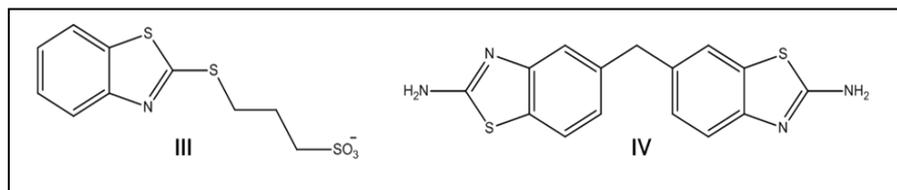


Figura 1.2.3. Estructuras químicas de los compuestos III y IV con los cuales se han realizado ensayos de inhibición de *TcTIM*.

Una característica de estas proteínas, es que alrededor del 8,5 % del total de los aminoácidos son aromáticos [49]. Cada monómero de *TcTIM* tiene 251 aminoácidos, de los cuales 18 son aromáticos: 5 triptófanos (Trp), 6 tirosinas (Tyr) y 7 fenilalaninas (Phe) [50]. Esta proporción de residuos, capaces de emitir fluorescencia, le aporta a esta enzima su característica de fluorescencia intrínseca. Además, se conoce por ensayos experimentales, que la intensidad de la fluorescencia en estado dimérico es mayor que en su estado monomérico [51 – 53].

Reuniendo las propiedades de la *TcTIM* anteriormente detalladas, es posible trabajar sobre la posibilidad de diseñar moléculas orgánicas capaces de intervenir en la interfase de la estructura dimérica de la *TcTIM*. Además que sean capaces de desestabilizar esta estructura inactivando la enzima, por lo tanto interrumpiendo la ruta glicolítica de tal manera de frenar la proliferación del parásito. Trabajando sobre la propiedad de fluorescer que presenta esta proteína, sería posible discriminar compuestos que sean capaces de interponerse en la interfase de la *TcTIM*, ya que los mismos provocarían una marcada disminución en la intensidad de fluorescencia.

1.3 Antecedentes

Se realizó una búsqueda de inhibidores de *TcTIM* con alrededor de 250 compuestos de nuestra quimioteca [54, 55]. De esta manera, se identificaron nuevos prototipos moleculares para la obtención de nuevos inhibidores de *TcTIM*. Se identificaron cinco compuestos, los cuales pertenecen a tres diferentes quimiotipos: 1,2,6-tiadiazinas, 5,9-dióxidos de fenazinas y tiazoles (figura 1.3.1).

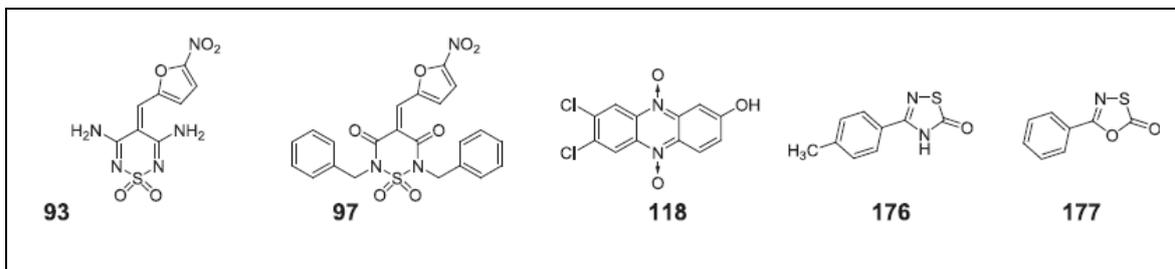


Figura 1.3.1. Estructuras químicas de compuestos identificados como inhibidores de la actividad enzimática de *TcTIM*, los compuestos inhiben a $IC_{50} < 30 \mu M$ (se mantiene la numeración original de la publicación) [54].

También fueron identificados otros prototipos moleculares relevantes para este trabajo, entre los que se destacan los compuestos tiazólicos [56]. Los compuestos **V** y **VI** (figura 1.3.2), a $100 \mu M$ resultaron ser inhibidores de *TcTIM* en 64 y 63 % respectivamente. Estos dos compuestos poseen la desventaja de presentar un agrupamiento nitro; esto podría ser causante de una actividad mutagénica indeseable [56, 57]. Por lo tanto, para el diseño de los compuestos del presente trabajo, se decide

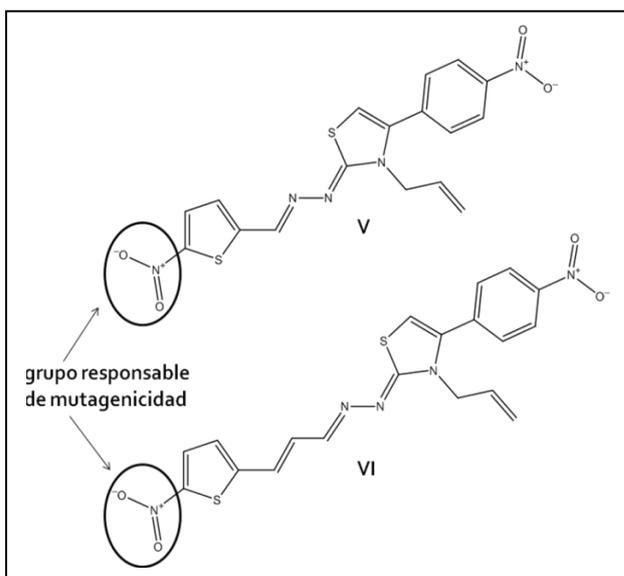


Figura 1.3.2. Estructuras químicas de los compuestos **V** y **VI** identificados como inhibidores de *TcTIM*. Se señalan los agrupamientos nitro, posibles causantes de la actividad mutagénica de los compuestos.

no incluir este tipo de grupo funcional dentro de los mismos, ya que al poseer capacidad mutagénica no serían buenos candidatos para el desarrollo de futuros fármacos.

Desde el punto de vista estructural, teniendo en cuenta todos los compuestos anteriormente analizados, se ha observado que aquellos compuestos que presenten

ciertos agrupamientos simétricos enlazados por un simple enlace y que contienen aminas y grupos sulfónicos, como los bis – benzotiazoles **I** y **III** (figuras 1.2.2 y 1.2.3, respectivamente), pueden convertirse en inhibidores de *TcTIM*, interponiéndose en la interfase de la misma. De esta manera, se estaría perturbando una ruta metabólica muy importante de *T. cruzi*.

Así se desarrollan los derivados bis-tiazólicos **VII** y **VIII**, carentes de funcionalidad nitro (figura 1.3.3). El compuesto **VII** carece de actividad frente a *TcTIM* y además no es inhibidor del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, sin embargo, el análogo oxigenado y homólogo **VIII**, presenta una excelente inhibición de *TcTIM* (100 % a 100 μM) con la concomitante inhibición del crecimiento de epimastigotes y amastigotes (IC_{50} 3,5 μM y 1,6 μM , respectivamente) [56].

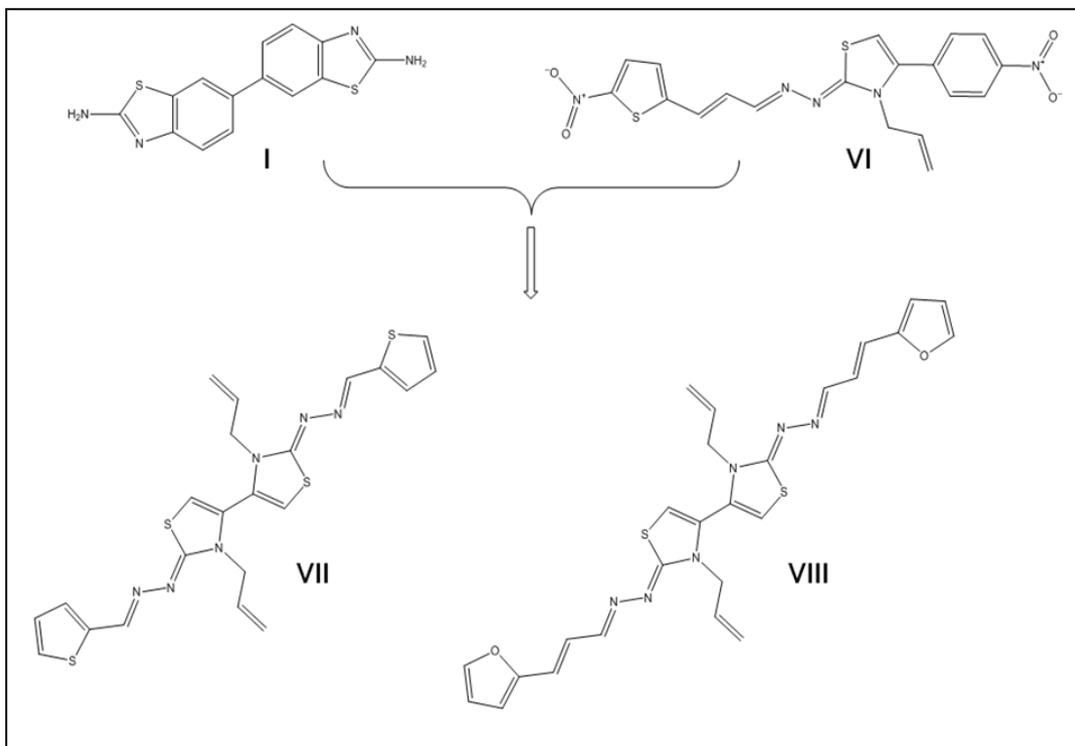


Figura 1.3.3. Estructuras químicas de los compuestos bis – tiazólicos diseñados en el marco de la tesis doctoral de Guzmán Álvarez [56].

2. Propuesta de trabajo y objetivos

2.1 Propuesta de trabajo

En el presente trabajo de finalización de carrera de grado, se pretende analizar las exigencias químicas para que bis – tiazoles posean la capacidad de promover la

disrupción del dímero TcTIM, con la consecuente inhibición del crecimiento del parásito *T. cruzi*. Por ello se ha diseñado una serie de estructuras químicas (fórmula general 1 y 2, figura 2.1) que

permitan analizar el espacio multidimensional de los descriptores fisicoquímicos de los

sustituyentes del bis – tiazol. Los sustituyentes a modificar son a nivel del *N*-tiazólico (grupos R) o a nivel de la cadena lateral (Ars).

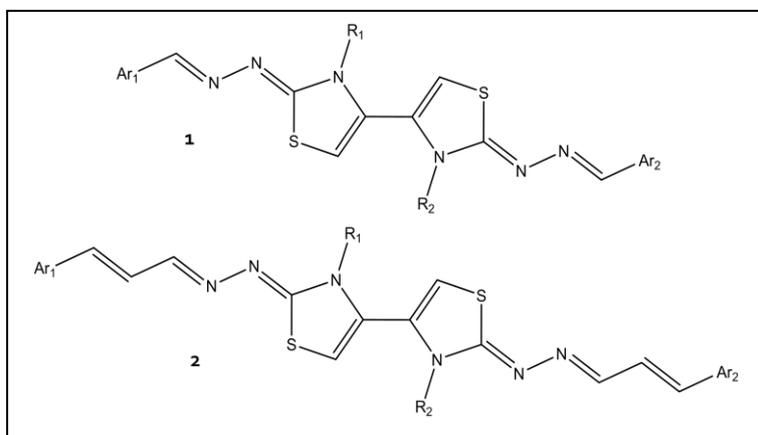


Figura 2.1. Estructuras generales diseñadas para la síntesis de los compuestos bis – tiazólicos simétricos o asimétricos. Los sustituyentes R₁ o R₂ representan agrupamientos -CH₂-CH-CH₂(alilo) y -Ph (fenilo); los sustituyentes aromáticos Ar₁ y Ar₂ representan agrupamientos -Ph, -2-naftil, -2-furil, -(5-sulfo)-2-furil, -(5-bromo)-3-pirimidinil.

2.2 Objetivos generales:

Desarrollar nuevos bis-tiazoles con capacidad de inhibir la TcTIM y el crecimiento de *T. cruzi* sin efectos mutagénicos. Además, puesta a punto de una técnica alternativa al ensayo enzimático convencional, para evaluar la disrupción del dímero de TcTIM.

2.3 Objetivos específicos:

1. Síntesis química de las estructuras diseñadas empleando metodologías de química orgánica previamente desarrolladas por nuestro grupo.

2. Puesta a punto de la técnica de evaluación de la disrupción de TcTIM utilizando espectroscopía de fluorescencia¹.
3. Evaluación de los productos sintetizados frente a *T. cruzi*. Los compuestos obtenidos en el objetivo 1 serán evaluados sobre la forma epimastigote de *T. cruzi*, siguiendo metodologías previamente desarrolladas en nuestro grupo de investigación.
4. Evaluación de la citotoxicidad de los productos con actividad anti-*T. cruzi*. Luego de identificar los productos activos en la objetivo 4, se llevará a cabo el estudio de citotoxicidad en macrófagos murinos para identificar aquellos productos que no lo sean, y por lo tanto serán considerados candidatos a estudios *in vivo*.
5. Realizar estudios de relación estructura – actividad (SAR). Como forma de racionalizar los resultados obtenidos, tanto en TcTIM como sobre parásitos enteros, se realizará un estudio cualitativo de relación estructura – actividad. Para ello, se utilizarán metodologías previamente utilizadas en nuestro grupo de investigación.

¹ Dado que, por un lado la técnica tradicional para evaluar la disrupción de TcTIM es a través de un ensayo con el sustrato natural (gliceraldehído-3-fosfato) en un proceso complejo metodológicamente y costoso. Por otro lado la enzima TcTIM presenta fluorescencia intrínseca en su forma dimérica de mayor intensidad que en su forma monomérica. Por lo que se propone en este trabajo desarrollar una técnica para evaluar nuevos disruptores aplicando espectroscopía por fluorescencia.

3. Materiales y métodos

3.1 Química

3.1.1. Generalidades

Los disolventes empleados en el presente trabajo experimental fueron destilados previamente a su uso. Además, algunos de ellos son secados mediante procedimientos preestablecidos [58, 59]. El etanol absoluto empleado es de origen comercial (DORWIL[®]), al igual que otros de los reactivos empleados como el benzaldehído (BAKER ANALIZED[®]), 1,4-dibromo-2,3-butanodiona (SIGMA-ALDRICH[®]), *N*⁴-feniltiosemibarbazida (Alfa Aesar[®]) y ácido 5-furfural-2-sulfónico (Alfa Aesar[®]).

El avance de las reacciones y pureza de los productos se evalúan empleando cromatografía en capa fina (CCF o TLC) en placas de poliéster recubiertas con sílica o alúmina y para revelado con luz ultravioleta de 254 nm. Las fases móviles que se han utilizado consisten en mezclas, en distintas proporciones, de *n*-hexano y acetato de etilo, o diclorometano y metanol. Para llevar a cabo el revelado de los cromatogramas se emplean diferentes técnicas:

- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm)
- Exposición a vapores de yodo
- Rociado con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidracina etanólico) y quemado posterior
- Rociado con una mezcla de *p*-anisaldehído:H₂SO₄:etanol en una proporción 1:4:95 v:v:v y quemado posterior

Una vez lograda la síntesis de un producto, se procede al análisis de las propiedades fisicoquímicas del mismo, para lo cual primero el producto es secado mediante técnicas convencionales del laboratorio, para eliminar excesos de disolventes empleados para su síntesis.

Los espectros de ¹H-RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes indicados con cada producto y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt) y señal ancha (sa). Las constantes de acoplamiento (J)

se expresan en Hz. Para obtener los espectros de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC y HMBC, se utilizan las secuencias de pulso disponibles en el software del equipo.

Los espectros de masa se realizan en un espectrómetro de masas SHIMADZU GC-MS QP 1100 EX. La ionización de la muestra es por impacto electrónico a 70 eV por inyección directa.

Los puntos de fusión de los compuestos se determinan utilizando un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100 y no están corregidos.

3.1.2. Síntesis de compuestos diseñados [56]

Síntesis de N¹-benciliden-N⁴-feniltiosemicarbazida (JM01). En un balón de 50 mL se hacen reaccionar $4,72 \times 10^{-3}$ moles (0,48 mL) de benzaldehído, $4,72 \times 10^{-3}$ moles (789 mg) de N⁴-fenil-3-tiosemibarbazida, en 7 mL de tolueno anhidro como disolvente y cantidad catalítica del ácido *p*-toluensulfónico. La reacción se lleva a cabo en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂; y transcurre a temperatura ambiente durante 6 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por TLC en sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. En la mezcla de reacción se observa un precipitado blanco, el cual es filtrado a vacío y lavado con tolueno. Se obtienen 1,08 g de un sólido blanco.

1-benciliden-4-fenil-3-tiosemicarbazida (JM01). Sólido blanco, R = 89 %, PF = 187 – 190 °C. ¹H-RMN, δ_H (ppm): 7,27 (1H, t, J = 7,4, CH_p – Ar), 7,43 (5H, m, CH_{m,p} – Ar, CH_m – Ar), 7,68 (4H, m, CH_o – Ar, CH_o – Ar – N), 7,92 (1H, s, N = CH – Ar), 9,21 (1H, s, NH), 9,81 (1H, s, NH). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 124 (CH_o – Ar – N), 126 (CH_p – Ar), 127 (CH_o – Ar), 129 (CH_m – Ar), 130 (2C, CH_{m,p} – Ar), 137 (C – Ar), 143 (C – Ar – N), 144 (N = CH – Ar), 176 (C = S). MS (EI) *m/z* (%): 256 (M⁺, 100); 163 (C₈H₇N₂S⁺, 99).

Síntesis de 2,2'-bencilidenhidrazono-3,3'-difenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM02). En un balón de 25 mL se hacen reaccionar $1,96 \times 10^{-4}$ moles (47,8 mg) de 1,4-

dibromo-2,3-butanodiona con $3,92 \times 10^{-4}$ moles (100 mg) de *N*¹-benciliden-*N*⁴-feniltiosemicarbazida (JM01) en 5 mL de etanol absoluto. Se trabaja en ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂. Se calienta a reflujo durante 4 horas, tiempo al cual se observó la desaparición del reactivo de partida JM01. El seguimiento de la reacción se realiza por TLC en alúmina con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2, v:v) como fase móvil. Finalizada la reacción se destila la totalidad del disolvente a presión reducida. Se obtiene un aceite al cual se le agrega acetato de etilo, lográndose así la precipitación de un sólido. El mismo se filtra a vacío y se lava con acetato de etilo, obteniéndose 0,120 g de un sólido rojizo.

2,2'-bencilidenhidrazono-3,3'-difetil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM02). Sólido rojizo, R = 99 %, PF = 221 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm): 6,49 (2H, s, CH – tiazólico), 6,91 (4H, dd, J = 6,5, CH_o – Ar – N), 7,33 (12H, m, CH_{m,p} – Ar – N, CH_{m,p} – Ar), 7,68 (4H, dd, J = 1,7, CH_o – Ar), 8,15 (1H, s, N = CH – Ar). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 107 (CH – tiazólico), 127 (CH_o – Ar – N), 128 (CH_o – Ar), 129 (4C, CH_{m,p} – Ar – N, CH_{m,p} – Ar), 128 (Ar – C = N), 129 (C₄ – tiazólico), 130 (C – Ar), 154 (2C, N – CH – Ar), 168 (2C, C₂ – tiazólico). MS (EI) *m/z* (%): 557 (M⁺, 26); 453 (C₂₅H₁₈N₅S₂⁺, 99); 349 (C₁₈H₁₂N₄S₂⁺, 20).

Síntesis de 1-benciliden-S-(4-bromo-2,3-dioxobutil)-4-fenilisotiosemicarbazida (JM04) y de 2-bencilidenhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol (JM03). En un balón de dos bocas de 25 mL, en un ambiente anhidro con una campana de CaCl₂, se colocan $2,49 \times 10^{-3}$ (717 mg) de 1,4-dibromo-2,3-butanodiona en 5 mL de tetrahidrofurano. Desde un ecuilizador se adiciona gota a gota, y a temperatura ambiente, $2,06 \times 10^{-3}$ moles (525,3 mg) de 1-benciliden-4-feniltiosemicarbazida (JM01) en 10 mL tetrahidrofurano. Si la reacción se detiene se obtienen 0,160 g de un sólido marrón que corresponde con el producto JM04. Si al terminar el agregado se calienta a una temperatura no mayor de 66 °C durante 2 horas y 30 minutos, para promover la ciclación de la isotiosemicarbazida (JM04) formada en el paso anterior. Es importante el seguimiento de la reacción en esta etapa específicamente, ya que se trata de evitar la formación de compuestos bis-tiazólicos. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en alúmina con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2, v:v) como fase móvil.

Durante el calentamiento se observa precipitación de un sólido claro. Una vez terminada la reacción se deja alcanzar la temperatura ambiente, para posterior filtración a vacío del sólido. El sólido se lava con etanol absoluto. Se obtienen 0,421 g de un sólido ocre.

1-benciliden-S-(4-bromo-2,3-dioxobutil)-4-fenilisotiosemicarbazida (JM04). Sólido marrón, R = 98 %, PF = 108 – 112 °C. $^1\text{H-RMN}$, δ_{H} (ppm): 3,95 (2H, dd, J = 15,4, O = CH₂ – Br), 4,00 (2H, dd, J = 12,2, S – CH₂ – C = O), 7,4 (8H, m, CH_{m,p} – Ar, CH_{o,m,p} – Ar – N), 7,67 (2H, d, J = 7,2, CH_o – Ar), 8,26 (1H, s, NH), 9,15 (1H, s, N = CH – Ar). $^{13}\text{C-RMN}$, δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 31 (O = C – CH₂ – Br), 37 (S – CH₂ – C = O), 127 (CH – Ar), 127 - 130 (8C, CH_{m,p} – Ar, CH_{o,m,p} – Ar – N), 131 (C – Ar), 156 (N = CH – Ar), 196 (O = C – CH₂ – S), 198 (O = C – CH₂ – Br). MS (EI) m/z (%): 420 (M⁺, 100); 328 (C₁₇H₁₄N₃O₂S⁺, 23); 296 (C₁₆H₁₄N₃OS⁺, 77); 223 (C₁₄H₁₂N₃⁺, 19).

2-bencilidenhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol (JM03). Sólido ocre, R = 53 %, PF = 144 – 146 °C. $^1\text{H-RMN}$, δ_{H} (ppm): 4,06 (2H, s, O = C – CH₂ – Br), 7,35 (1H, s, CH – tiazólico), 7,39 (5H, m, CH_m – Ar, CH_{m,p} – Ar – N), 7,49 (3H, m, CH_{o,p} – Ar – N), 7,72 (2H, m, CH_o – Ar), 8,26 (1H, s, N = CH – Ar). $^{13}\text{C-RMN}$, δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 30 (O = C – CH₂ – Br), 119 (CH – tiazólico), 127 (2C, CH_o – Ar), 128 – 129 (8C, CH_m – Ar, CH_{m,p} – Ar – N, CH_{o,p} – Ar – N), 135 (C – Ar), 136 (C₄ – tiazólico), 138 (C – Ar – N), 153 (N = CH – Ar), 169 (C₂ – tiazólico), 180 (O = C – CH₂ – Br). MS (EI) m/z (%): 402 (M⁺, 100); 217 (C₁₀H₆N₃OS⁺, 99).

Síntesis de 3-alil-2'-bencilidenhidrazono-2-(5-bromopiridin-3-il)metilhidrazono-3'-fenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bis-tiazol (JM05). En un balón de 25 mL se colocan a reaccionar $1,25 \times 10^{-4}$ moles (37,3 mg) de 4-alil-1-[(5-bromopiridin-3-il)metil]tiosemicarbazida (GAT10107) y $1,25 \times 10^{-4}$ moles (50 mg) de 2-bencilidenhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol (JM03) en 5 mL de tolueno anhidro. Se emplea una campana de CaCl₂ para mantener un ambiente anhidro. Se calienta a reflujo durante 4 horas hasta observar la desaparición de los reactivos de partida. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. Se detiene la reacción y

una vez alcanzada la temperatura ambiente, se filtra a vacío el sólido precipitado. Se obtienen 31,5 mg de un sólido rojizo.

3-alil-2'-bencilidenedrazono-2-(5-bromopiridin-3-il)metilhidrazono-3'-fenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bis-tiazol (JM05). Sólido rojizo, R = 53 %, PF = 97 – 101 °C. $^1\text{H-RMN}$, δ_{H} (ppm), J (Hz): 4,44 (2H, dd, J = 5,0, N – CH_2 – CH = CH_2), 5,18 (2H, dd, J = 10,2, N – CH_2 – CH = CH_2), 5,84 (1H, m, N – CH_2 – CH = CH_2), 6,33 (1H, s, CH – tiazólico), 6,51 (1H, s, CH – tiazólico), 7,38 (6H, m, $4\text{CH}_{\text{o,m}}$ – Ar – N, 2CH_{o} – Ar), 7,45 (2H, m, CH_{p} – Ar, CH_{p} – Ar – N), 7,73 (2H, m, CH_{m} – Ar), 8,20 (1H, t, J = 1,92, C_4H – piridina), 8,31 (1H, s, N = CH – 5-bromopiridina), 8,32 (1H, s, N = CH – Ar), 8,62 (1H, d, J = 2,16, C_6H – piridina), 8,72 (1H, d, J = 1,64, C_2H – piridina). $^{13}\text{C-RMN}$, δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 48 (1C, N – CH_2 – CH = CH_2), 108 (1C, CH – tiazólico), 109 (1C, CH – tiazólico), 127 (2C, CH_{m} – Ar), 121 (1C, C – Br – piridina), 127 (1C, C – Ar), 128 (6C, $4\text{CH}_{\text{o,m}}$ – Ar – N, 2CH_{o} – Ar), 129 (1C, C_4 – tiazólico), 129 (2C, CH_{p} – Ar, CH_{p} – Ar – N), 130 (1C, C_4 – tiazólico), 130 (1C, N – CH_2 – CH = CH_2), 135 (1C, C_3 – 5-bromopiridina), 135 (1C, C_4H – piridina), 136 (1C, C – Ar – N), 146 (1C, C_2H – piridina), 147 (1C, N = CH – Ar), 151 (1C, C_6H – piridina), 153 (1C, N = CH – 5-bromopiridina), 169 (1C, C_2 – tiazólico), 170 (1C, C_2 – tiazólico). MS (EI) m/z (%): 599 (M^+ , 87); 558 ($\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{BrN}_7\text{S}_2^+$, 8); 417 ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{S}_2^+$, 13); 375 ($\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{S}_2^+$, 9).

Síntesis de 3-alil-4-(bromometilcarbonil)-2-[3-(2-furil)-2-propenilidenedrazono]-2,3-dihidrotiazol (JM06). En un balón de dos bocas de 100 mL se colocan $1,82 \times 10^{-3}$ moles (445 mg) de 1,4-dibromobutan-2,3-diona en 6 mL de tetrahidrofurano. En un equalizador se colocan $1,28 \times 10^{-3}$ moles (300 mg) de 4-alil-1-[3-(2-furil)-2-propeniliden]tiosemicarbazida (GAT1030) en 6 mL tetrahidrofurano. Para mantener un ambiente anhidro se utiliza una campana de CaCl_2 . La primera etapa de la reacción consiste en el agregado lento del reactivo GAT1030, a temperatura ambiente. Luego de terminar el agregado se calienta la reacción (a una temperatura no mayor de 66 °C) durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. Durante el calentamiento se observa la aparición de un precipitado. Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, se detiene la reacción y se deja alcanzar temperatura ambiente. El

precipitado se filtra a vacío y se lava con tetrahidrofurano. Obteniéndose 476 mg de un sólido ocre.

3-alil-4-(bromometilcarbonil)-2-[3-(2-furil)-2-propenilidenhidrazono]-2,3-dihidrotiazol (JM06). Sólido ocre, R = 98 %, PF = 180 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm), J (Hz): 4,35 (2H, s, O = C – CH₂ – Br), 5,27 (2H, t, J = 7,96, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,52 (2H, d, J = 4,52, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,93 (1H, m, N – CH₂ – CH = CH₂), 6,43 (1H, m, C₄H – furánico), 6,51 (1H, d, J = 3,36, C₃H – furánico), 6,73 (1H, dd, J = 9,64, furano – CH = CH – CH = N), 6,85 (1H, d, J = 15,8, furano – CH = CH – CH = N), 6,84 (1H, s, CH – tiazólico), 6,88 (1H, s, furano – CH = CH – CH = N), 7,44 (1H, d, J = 1,52, C₅H – furánico), 8,94 (1H, d, J = 9,28, furano – CH = CH – CH = N). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 29 (1C, O = C – CH₂ – Br), 49 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 104 (1C, CH – tiazólico), 119 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 112 (1C, C₃H – furánico), 113 (1C, C₄H – furánico), 122 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 123 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 123 (1C, CH – tiazólico), 130 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 135 (1C, C₄ – tiazólico), 144 (1C, C₅H – furánico), 144 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 153 (1C, C₂ – furánico), 180 (1C, O = C – CH₂ – Br), 181 (1C, C₂ – tiazólico). MS (EI) *m/z* (%): 379 (M⁺,69); 300 (C₁₅H₁₄N₃O₂S⁺,19); 259 (C₁₂H₉N₃O₂S⁺,17); 79 (Br⁺,100).

Síntesis de 4-fenil-1-[(5-sulfo-2-furil)metiliden]tiosemicarbazida (JM07). En un balón de 25 mL se hacen reaccionar $1,01 \times 10^{-3}$ moles (200 mg) del ácido-5-furfural-2-sulfónico, con $1,01 \times 10^{-3}$ moles (169 mg) de 4-fenil-3-tiosemibarbazida. Se emplean 7 mL de tolueno anhidro como disolvente y cantidad catalítica del ácido *p*-toulensulfónico. La reacción se lleva a cabo en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂; y transcurre a temperatura ambiente. Al observar que uno de los reactivos no se disolvió completamente en tolueno; parte de este último se evaporó a vacío y se agregaron 5 mL de metanol. Se calienta la reacción a reflujo (64 °C) aproximadamente 6 horas. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con una mezcla de diclorometano:metanol (8:2, v:v) como fase móvil. Se observa la aparición de un precipitado. Una vez culminada la reacción, el sólido se filtra a vacío y se lava con tolueno. Se obtienen 258 mg de un sólido ocre.

4-fenil-1-[(5-sulfo-2-furil)metiliden]tiosemicarbazida (JM07). Sólido ocre, R = 83 %, PF = 260 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm), J (Hz): 6,56 (1H, d, J = 3,4, C₃H – 5-sulfo-furano), 7,03 (1H, d, J = 3,4, C₄H – 5-sulfo-furano), 7,19 (1H, m, CH_p – Ar), 7,36 (2H, t, J = 7,6, CH_m – Ar), 7,58 (2H, dd, J = 8,0, CH_o – Ar), 8,06 (1H, s, 5-sulfo-furano – CH = N – NH), 9,91 (1H, s, Ar – NH – C = S), 11,82 (1H, s, 5-sulfo-furano – CH = N – NH). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 109 (1C, C₃H – 5-sulfo-furano), 113 (1C, C₄H – 5-sulfo-furano), 124 (2C, CH_o – Ar), 125 (1C, CH_p – Ar), 128 (2C, CH_m – Ar), 133 (1C, 5-sulfo-furano – CH = N – NH), 139 (1C, Ar – C – NH), 148 (1C, C₂ – 5-sulfo-furano), 159 (1C, C₅ – 5-sulfo-furano), 176 (1C, Ar – NH – C = S). MS (EI) *m/z* (%): 185 (C₆H₇N₃O₂S⁺,20); 171 (C₅H₃N₂O₃S⁺,16); 157 (C₅H₃NO₃S⁺,16); 152 (C₇H₈N₂S⁺,30).

Síntesis de 2,2'-bis[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-3,3'-difenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM08). En un balón de 25 mL se hacen reaccionar 1,67x10⁻⁴ moles (47,8 mg) de 1,4-dibromobutan-2,3-diona con 3,24x10⁻⁴ moles (100 mg) 4-fenil-1-[(5-sulfo-2-furil)metiliden]tiosemicarbazida (JM07) en 6 mL de etanol absoluto. Se trabaja en ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂. Se calienta a reflujo durante 11 horas, tiempo al cual se observó la desaparición del reactivo de partida JM07. Durante el calentamiento se observa precipitación de un sólido anaranjado. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con una mezcla de diclorometano:metanol (8:2, v:v) como fase móvil. Al terminar la reacción se deja alcanzar la temperatura ambiente y se prosigue a filtrar a vacío el sólido, lavando con etanol absoluto. Se obtienen 73 mg de un sólido marrón.

2,2'-bis[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-3,3'-difenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM08). Sólido marrón, R = 65 %, PF = 240 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm), J (Hz): 6,48 (2H, d, J = 3,36, C₃H – 5-sulfo-furano), 6,65 (2H, d, J = 3,36, C₄H – 5-sulfo-furano), 6,94 (4H, m, CH_m – Ar), 7,10 (2H, s, CH – tiazólico), 7,39 (4H, m, CH_o – Ar), 7,43 (2H, m, CH_p – Ar), 7,87 (2H, s, 5-sulfo-furano – CH = N – N). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 109 (2C,CH – tiazólico), 110 (2C, C₃H – 5-sulfo-furano), 114 (2C, C₄H – 5-sulfo-furano), 127 (4C, CH_m – Ar), 128 (4C, CH_o – Ar), 129 (2C, CH_p – Ar), 129 (2C, C₂ – tiazólico), 136 (2C, Ar – C – N), 142 (2C, 5-sulfo-furano – CH = N

– N), 149 (2C, C₁ – 5-sulfo-furano), 159 (2C, C₅ – 5-sulfo-furano), 168 (2C, C₄ – tiazólico). MS (EI) *m/z* (%): 662 (M⁺ – 2OH,4); 205 (100).

Síntesis de 3-alil-2'-bencilidenedhidrazono-3'-fenil-2-[3-(2-furil)-2-propenilidenedhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM09). En un balón de 25 mL se hacen reaccionar $2,50 \times 10^{-4}$ moles (100 mg) de 2-bencilidenedhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol (JM03) con $2,50 \times 10^{-4}$ moles (60 mg) de 4-alil-1-[3-(2-furil)-2-propenilidened]tiosemicarbazida (GAT1030) en 4 mL de etanol absoluto. Se trabaja en ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂. Se calienta a reflujo durante 10 horas, tiempo al cual se observó la desaparición de los reactivos de partida. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con una mezcla de diclorometano:metanol (8:2, v:v) como fase móvil. Ya que no se observa la precipitación de un sólido en el transcurso de la reacción; una vez transcurrida la misma, se destila la mitad del disolvente a presión reducida. El balón conteniendo la mezcla de reacción se almacena durante 24 horas en freezer a -20 °C. Luego de este procedimiento se observa un sólido. Se filtra a vacío el sólido, y se lava con etanol absoluto. Se obtienen 70 mg de un sólido marrón oscuro.

3-alil-2'-bencilidenedhidrazono-3'-fenil-2-[3-(2-furil)-2-propenilidenedhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM09). Sólido marrón oscuro, R = 54 %, PF = 210 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm), J (Hz): 5,11 (2H, m, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,12 (1H, d, J = 7,9, furano – CH = CH – CH = N), 5,36 (2H, m, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,93 (1H, m, N – CH₂ – CH = CH₂), 6,48 (1H, d, J = 3,4, C₄H – furano), 6,48 (1H, s, CH – tiazólico), 6,55 (1H, d, J = 3,28, C₃H – furano), 6,69 (1H, m, furano – CH = CH – CH = N), 6,87 (1H, s, CH – tiazólico), 7,46 (1H, d, J = 1,72, C₅H – furano), 7,38 – 7,51 (8H, m, CH_{m,p} – Ar, CH_{o,m,p} – Ar), 7,71 (2H, sa, CH_o – Ar), 8,53 (1H, s, Ar – CH = N), 9,02 (1H, t, J = 9,8, furano – CH = CH – CH = N). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 51 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 112 (1C, C₄H – furano), 114 (1C, C₃H – furano), 119 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 120 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 121 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 125 (1C, CH – tiazólico), 127 (1C, CH – tiazólico), 128 – 130 (8C, CH_{m,p} – Ar, CH_{o,m,p} – Ar), 129 (1C, N – CH – CH = CH₂), 129 (1C, C₄ – tiazólico), 130 (1C, C₄ – tiazólico), 135 (1C, Ar – C – N), 144 (1C, C₅H – furano), 144 (1C, C – Ar), 148 (1C, C₂ – furano), 153 (1C, Ar – CH = N), 156

(1C, furano – CH = CH – CH = N), 173 (1C, C₂ – tiazólico), 176 (1C, C₂ – tiazólico). MS (EI) *m/z* (%): 536 (M⁺, 100); 495 (C₂₆H₁₉N₆OS₂⁺, 3); 417 (C₂₀H₁₃N₆OS₂⁺, 8).

Síntesis de 3-alil-2'-bencilidenedhidrazono-3'-fenil-2-(2-naftilmetiliden)hidrazono-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM10). En un balón de 25 mL se hacen reaccionar 2,05x10⁻⁴ moles (82 mg) de 2-bencilidenedhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol (JM03) con 2,05x10⁻⁴ moles (55 mg) de 4-alil-1-(2-naftilmetiliden)tiosemicarbazida (GAT10106) en 5 mL de etanol absoluto. Se emplea una campana de CaCl₂ para mantener un ambiente anhidro. Se calienta a reflujo durante 24 horas, tiempo al cual se observó la desaparición de los reactivos de partida. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en alúmina con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2, v:v) como fase móvil. En el transcurso de la reacción se observa la aparición de un precipitado. Al terminar el tiempo de reacción, se realiza filtración a vacío y se lava con etanol; obteniéndose 98 mg de un sólido ocre.

3-alil-2'-bencilidenedhidrazono-3'-fenil-2-(2-naftilmetiliden)hidrazono-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM10). Sólido ocre, R = 83 %, PF = 236 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm), J (Hz): 4,30 (2H, d, J = 4,8, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,09 (2H, dd, J = 1,32, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,83 (1H, m, N – CH₂ – CH = CH₂), 6,84 (1H, s, CH – tiazólico), 7,03 (1H, s, CH – tiazólico), 7,41 – 7,53 (10H, m, CH – Ar), 7,70 (2H, m, C_{7,8}H – naftilo), 7,90 – 7,93 (4H, sa, C_{3,4,6,9}H – naftilo), 8,04 (1H, s, C₁H – naftilo), 8,21 (1H, s, naftilo – CH = N), 8,35 (1H, s, Ar – CH = N). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 48 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 108 (1C, CH – tiazólico), 109 (1C, CH – tiazólico), 117 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 123 (1C, C₃H – naftilo), 127 – 130 (10C, CH – Ar), 128 (2C, C_{7,8}H – naftilo), 129 (1C, C₁H – naftilo), 128 (1C, C₄ – tiazólico), 129 (3C, C_{4,6,9}H – naftilo), 129 (1C, C₁₀ – naftilo), 130 (1C, C₂ – naftilo), 131 (1C, C₄ – tiazólico), 132 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 133 (1C, Ar – C), 134 (1C, C₅ – naftilo), 138 (1C, Ar – C – N), 151 (1C, Ar – CH = N), 153 (1C, naftilo – CH = N), 168 (2C, C₂ – tiazólico). MS (EI) *m/z* (%): 570 (M⁺, 100); 417 (C₂₂H₁₈N₅S₂⁺, 9).

Síntesis de 2'-bencilidenedhidrazono-3,3'-difeníl-2-[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM11). En un balón de 25

mL se hacen reaccionar $2,26 \times 10^{-4}$ moles (91 mg) de 2-bencilidenedhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol (JM03) con un $2,26 \times 10^{-4}$ moles (70 mg) de 4-fenil-1-[(5-sulfo-2-furil)metiliden]tiosemicarbazida (JM07) en 6 mL de etanol absoluto. Se trabaja en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl_2 . Se calienta a reflujo durante 24 horas, tiempo al cual se observó la desaparición de los reactivos de partida. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2, v:v) como fase móvil. Al finalizar la reacción se coloca el balón en el freezer ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Luego de este procedimiento, se observa un precipitado que se filtra a vacío y se lava con etanol absoluto. Se obtienen 70 mg de un sólido marrón (rendimiento 53 %).

2'-bencilidenedhidrazono-3,3'-difenil-2-[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahydro-4,4'-bistiazol (JM11). Sólido marrón, R = 53 %, PF = $219\text{ }^\circ\text{C}$ (desc.). ^1H -RMN, δ_{H} (ppm), J (Hz): 6,47 (1H, d, J = 3,28, C_3H – 5-sulfo-furano), 6,64 (1H, d, J = 3,36, C_4H – 5-sulfo-furano), 6,93 (1H, s, CH – tiazólico), 6,94 (1H, m, CH_p – Ar), 7,06 (1H, s, CH – tiazólico), 7,39 (12H, sa, $\text{CH}_{o,p}$ – Ar, $\text{CH}_{o,m,p}$ – Ar, $\text{CH}_{o,m}$ – Ar), 7,64 (2H, m, CH_m – Ar), 7,86 (1H, s, 5-sulfo-furano – $\text{CH} = \text{N}$), 8,08 (1H, s, Ar – $\text{CH} = \text{N}$). ^{13}C -RMN, δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 104 (1C, CH – tiazólico), 109 (1C, CH – tiazólico), 110 (1C, C_3H – 5-sulfo-furano), 114 (1C, C_4H – 5-sulfo-furano), 127 – 129 (15C, $\text{CH}_{o,m,p}$ – Aromáticos), 129 (2C, C_4 – tiazólico), 128 (1C, Ar – C), 136 (2C, Ar – C – N), 142 (1C, 5-sulfo-furano – $\text{CH} = \text{N}$), 153 (1C, Ar – $\text{CH} = \text{N}$), 159 (1C, C_2 – 5-sulfo-furano), 160 (1C, C_5 – 5-sulfo-furano), 167 (1C, C_2 – tiazólico), 168 (1C, C_2 – tiazólico). MS (EI) m/z (%): 356 ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2^+$, 53); 207 ($\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2\text{S}^+$, 100).

Síntesis de 3'-alil-3-fenil-2'-[3-(2-furil)-2-propenilidenhidrazono]-2-[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahydro-4,4'-bistiazol (JM12). En un balón de 25 mL se hacen reaccionar $1,94 \times 10^{-4}$ moles (74 mg) de 3-alil-4-(bromometilcarbonil)-2-[3-(2-furil)-2-propenilidenhidrazono]-2,3-dihidrotiazol (JM06) con $1,94 \times 10^{-4}$ moles (60 mg) de 4-fenil-1-[(5-sulfo-2-furil)metiliden]tiosemicarbazida (JM07) en 5 mL de etanol absoluto. Se trabaja en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl_2 . Se calienta a reflujo durante 20 horas, tiempo al cual se observó la desaparición de los reactivos de partida. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC en sílica con

una mezcla de hexano:acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. Al finalizar la reacción se observa un precipitado, el cual se filtra a vacío y se lava con etanol absoluto. Se obtienen 62 mg de un sólido marrón claro (rendimiento 53 %).

3'-alil-3-fenil-2'-[3-(2-furil)-2-propenilidenedhidrazono]-2-[(5-sulfo-2-furil)metilidenedhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol (JM12). Sólido marrón claro, R = 53 %, PF = 245 °C (desc.). ¹H-RMN, δ_H (ppm), J (Hz): 4,60 (2H, dd, J = 12,44, N – CH₂ – CH = CH₂), 5,04 (1H, dd, J = 10,0, furano – CH = CH – CH = N), 5,16 (2H, dd, J = 10,48, N – CH₂ – CH = CH₂), 6,02 (1H, m, N – CH₂ – CH = CH₂), 6,51 (1H, d, J = 3,24, C₄H – furano), 6,57 (1H, sa, C₃H – furano), 6,71 (1H, d, J = 6,28, C₃H – 5-sulfo-furano), 6,88 (1H, s, CH – tiazólico), 7,25 (1H, d, J = 6,0, C₄H – 5-sulfo-furano), 7,34 (1H, s, CH – tiazólico), 7,37 – 7,53 (5H, sa, CH_{o,m,p} – Ar), 7,48 (1H, sa, furano – CH = CH – CH = N), 7,74 (1H, s, N – CH – 5-sulfo-furano), 8,01 (1H, d, J = 6,64, furano – CH = CH – CH = N), 8,02 (1H, d, J = 9,0, C₅H – furano). ¹³C-RMN, δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 48 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 110 (1C, C₄H – furano), 112 (1C, C₃H – furano), 115 (C₃H – 5-sulfo-furano), 117 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 118 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 123 (C₄ – tiazólico), 125 (CH – tiazólico), 128 (C₄ – tiazólico), 128 (C₄H – 5-sulfo-furano), 128 – 130 (5C, CH_{o,m,p} – Ar), 129 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 129 (CH – tiazólico), 132 (1C, N – CH₂ – CH = CH₂), 142 (1C, furano – CH = CH – CH = N), 145 (N – CH – 5-sulfo-furano), 150 (C₂ – furano), 153 (1C, C₅H – furano), 153 (C₂ – tiazólico), 156 (C₅ – 5-sulfo-furano), 160 (C₂ – 5-sulfo-furano), 169 (C₂ – tiazólico). MS (EI) *m/z* (%): 526 (C₂₇H₂₁N₆O₂S₂⁺,100); 433 (C₂₂H₁₈N₅OS₂⁺,10); 407 (C₂₀H₁₅N₅OS₂⁺,12).

3.2 Puesta a punto de la técnica de interrupción del dímero de TcTIM mediante espectroscopía de fluorescencia

Se propone trabajar en la puesta a punto de una técnica basada en la fluorescencia intrínseca de la Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*; para evaluar la interrupción del dímero debida a la acción de los compuestos sintéticos. El ensayo se realiza en un lector de placas VARIOSKAN FLASH – Thermo Fisher Scientific Inc, empleando una placa negra de 96 pocillos. Se emplea solución amortiguadora TE pH 7,4 (trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM), la concentración de DMSO es menor al 10 % y la temperatura de incubación es 37 °C. El $\lambda_{\text{excitación}}$ es 280 nm y el $\lambda_{\text{emisión}}$ es 314 nm. Las diferentes muestras analizadas se prepararon como se muestra en la tabla 3.2.1; siendo 200 μL el volumen final de todas para mantener el paso óptico del haz de luz constante. Se analizan muestras con diferentes relaciones de TcTIM:compuesto (como por ejemplo: 1:2, 1:4, 1:8, 1:20), siempre manteniendo la concentración de TcTIM constante, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 3.2.1. Composición y tratamiento de las muestras analizadas mediante espectroscopía de fluorescencia.

Muestras	Composición y tratamiento
Blanco	TcTIM 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; DMSO 1 %; TE c.s.p 200 μL
TcTIM desnaturalizada (control mínimo de IF)	TcTIM 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; DMSO 1 %; TE c.s.p 200 μL 15 minutos a 80 °C
TcTIM:compuesto	TcTIM 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; DMSO 1 %, Compuesto a diferentes concentraciones; TE c.s.p 200 μL

3.3 Evaluación de interrupción del dímero de TcTIM mediante cross-linking y electroforesis SDS-PAGE

Se siguieron protocolos experimentales ya establecidos en el *Laboratorio de Interacciones Moleculares* del Instituto de Química Biológica.

Se ensayaron dos condiciones de cross-linking: UV cross-linking y cross-linking con formaldehído. En ambos casos, se realiza la incubación previa de la TcTIM 5 $\mu\text{g}/20 \text{ mL}$

con el compuesto a evaluar a determinada concentración, luego se procede a realizar el crosslinking.

El UV-crosslinking se realiza en un transiluminador Hoefer UVC 500 Ultraviolet Crosslinker mediante la exposición de la muestra a la luz ultravioleta de 254 nm y 0,7 Joules/cm², durante 30 minutos a una distancia de 1,5 cm de la lámpara. Las muestras se mantienen sobre hielo durante la práctica. Luego de culminado el tiempo establecido, se agregan 5 µL de solución amortiguadora de carga 4x (tris/HCl 0,25 M, SDS 8 %, glicerol 40 %, β-mercaptoetanol 20 %, azul de bromofenol 0,1 %). El crosslinking con formaldehído se ensaya a dos concentraciones finales diferentes, 1 y 4 %. El mismo se lleva a cabo agregando formaldehído directamente a la muestra durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción de crosslinking se detiene agregando 5 µL de solución amortiguadora de carga 4x.

Se preparan dos geles, un gel separador y un gel stacking con 14 % y 5 % de poliacrilamida respectivamente. Para preparar 10 mL de *gel separador* se mezclan en un tubo falcon de 15 mL:

- 3,75 mL de Acrilamida:Bisacrilamida
- 3,6mL de agua milliQ
- 2,5 mL de solución amortiguadora Tris/HCl 0,25 M (pH 8,8)
- 100 µL de SDS 10 %
- 100 µL APS
- 10 µL TEMED

Luego se vierte rápidamente la mezcla entre vidrios de electroforesis y se deja polimerizar aproximadamente 15 minutos. Luego se preparan 6 mL de gel stacking, para ello se mezclan en un tubo falcon de 15 mL:

- 1 mL de Acrilamida:Bisacrilamida
- 3,5 mL de agua milliQ
- 1,5 mL de solución amortiguadora upper gel 4x Tris/HCl 0,5 M (pH 6.8)
- 100 µL de APS
- 10 µL de TEMED

Posteriormente se vuelca rápidamente el contenido sobre el gel anteriormente polimerizado, y se coloca un peine de diez pocillos. Una vez polimerizado el gel, se prepara la cuba de electroforesis con el solución amortiguadora Tris/Glicina/SDS pH 8,3 (tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %); se coloca el gel en la cuba y se lavan los pocillos del gel con solución amortiguadora. Las muestras se hierven durante 5 minutos, luego se cargan en el gel en el pocillos correspondiente; además se utiliza un marcador de peso, Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas® (figura 3.3.1).

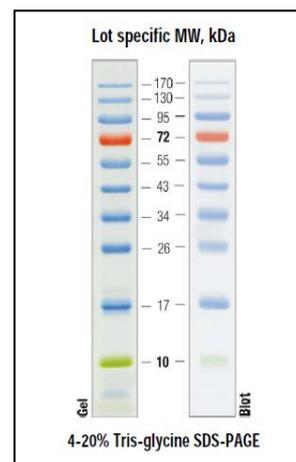


Figura 3.3.1. Marcador de peso molecular.

Luego de cargar las muestras se conectan los electrodos y se fija el voltaje de la corriente en 80 mV, el tiempo de corrida es de aproximadamente 2 a 3 horas, a temperatura ambiente.

Finalizado el tiempo de corrida, se procede a revelar el gel con una solución de azul de Coomassie (etanol 30 %, ácido acético 7 %, coomassie R 0,25 %). El gel se sumerge en la solución de azul de Coomassie y se calienta durante 1 minuto en microondas. Luego se realiza la destinción del gel sumergiéndolo en una solución de agua destilada con ácido acético 1 %; al principio es necesario cambiar con frecuencia la solución cuando toma color azul intenso. Las bandas aparecen a medida que se retira la solución del azul de Coomassie.

3.4 Ensayo de inhibición de la actividad de TcTIM

Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Beatriz Aguirre López del Dpto. de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

La actividad se determina en la dirección de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato [27, 60, 61]. La mezcla de reacción (pH 7,4) contiene trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0,2 mM, gliceraldehído-3-fosfato 1 mM y

0,9 unidades de α -glicerol-fosfato deshidrogenasa. Los compuestos a evaluar se disuelven en 10 % v/v de DMSO. Los mismos se pre – incuban durante dos horas con la enzima (5 μ g/mL) a 37 °C. La reacción enzimática comienza con el agregado de 5 μ L de la mezcla de pre – incubación a la mezcla de reacción (volumen final 1 mL). Se mide el descenso en la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard, a 25 °C.

3.5 Evaluación de la actividad frente a *T.cruzi* [62]

Estos ensayos fueron realizados por el Lic. Javier Varela (responsable en el Grupo de Química Medicinal de dichos ensayos).

Los cultivos de *T. cruzi*, epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 o cepa Y, se cultivan a 28 °C en medio axénico (infusión cerebro-corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, hemina 0,02 g/L, D-(+)-glucosa 0,3 g/L, estreptomina 0,2 g/L, penicilina 200000 U/L, complementado con 10 % de suero fetal bovino). Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones aeróbicas. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0,6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Los compuestos a evaluar se preparan en una solución stock de DMSO (solución madre de 24 mM) y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (25 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M). Los parásitos son incubados con las fracciones a 28 °C por 5 días.

El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células [63]. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula como: $PI = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde A_p es $A_{610 \text{ nm}}$ del cultivo conteniendo el compuesto al día 5; A_{0p} es $A_{610 \text{ nm}}$ del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); A_c es $A_{610 \text{ nm}}$ del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A_{0c} es $A_{610 \text{ nm}}$ en ausencia del compuesto al día 0. El IC_{50} corresponde a la concentración de

fracción capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar Log (concentración) vs % Inhibición de crecimiento, ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

3.6 Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos [22]

Estos ensayos fueron realizados por la estudiante Estefanía Birriel (responsable en el Grupo de Química Medicinal de dichos ensayos).

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos sintetizados se realizó el ensayo de citotoxicidad por MTT. Los compuestos evaluados mediante esta metodología fueron aquellos que presentaron actividad tripanosomicida. Se emplean macrófagos murinos J774. Se siembra una placa de 96 pocillos transparente con confluencia, con 50000 células/pocillo, la misma se incuba durante 24 horas a 37 °C. Luego de este período, las células deben estar en un 70-80% de confluencia. Se preparan soluciones stock de los compuestos a ensayar con el disolvente adecuado (DMSO) a una concentración tal que en la placa el disolvente no supere el 0.5%. Luego se coloca medio de cultivo fresco en eppendorfs estériles y se realizan las diluciones seriadas de los compuestos. Se retira el medio de cultivo de la placa y se adiciona el compuesto ya disuelto en medio de cultivo fresco (volumen final 200 µL). Se incuba durante 48 horas en estufa a 37 °C, 5 % CO₂. Se realizan los siguientes controles: células con disolvente y MTT, células sin disolvente y con MTT, blanco de lectura: células con disolvente y sin MTT.

Luego del período de incubación se observan las células en el microscopio y se realizan anotaciones acerca del estado de las mismas. El medio de cultivo se retira, se prepara la solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 0.1 mg/mL) en PBS estéril 0,2 % glucosa (*D*-(+)-glucosa 200 mg, PBS 10x 10 mL, agua milliQ 90 mL); y se adicionan 100 µL de esta solución en cada pocillo. En el blanco de lectura se colocan 100 µL de PBS estéril 0,2 % glucosa sin MTT. Posteriormente, se incuba durante 3 horas a 37 °C. Luego de este procedimiento se retira la solución de MTT y se adicionan en cada pocillo 180 µL de DMSO y 20 µL de solución amortiguadora glicina para MTT

(glicina 0.1 M, NaCl 0.1M, EDTA 0.5 M). Se agita la placa en *shaker* por lo menos durante un minuto y se realiza la lectura de absorbancia a 560 nm. Se calcula el % citotoxicidad según la fórmula: % citotoxicidad = $1 - [(Abs_{\text{muestra}}/Abs_{\text{control con DMSO y MTT}}) \times 100]$.

3.7 Estudio de relación estructura-actividad

Las herramientas empleadas para el cálculo de las propiedades teóricas moleculares de los compuestos sintéticos se encuentran disponibles en los siguientes sitios web:

1. <http://www.organic-chemistry.org/proq/peo>: de donde se extrajeron datos relevantes como potencial mutagénico, tumorogénico, irritabilidad, efectos en la reproducción, solubilidad en agua, LogP, “Drug-likeness” y “Drug-score”.
2. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>: de donde se extrajeron datos como TPSA, número de grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, número de grupos dadores de enlace de hidrógeno y el volumen.

Los posibles riesgos de toxicidad de un compuesto están dados por la mutagenicidad, toxicidad, los efectos en la reproducción e irritabilidad. Estos valores se obtienen a partir de la comparación estructural con una base de datos de más de 3000 medicamentos comercializados actualmente; partiendo del hecho de que los mismos no poseen efectos tóxicos.

La absorción de un compuesto y su distribución dependen fuertemente de la solubilidad acuosa del mismo. Generalmente una baja solubilidad indica una mala absorción, por lo tanto se trata de evitar compuestos poco solubles. Los valores estimados son descritos como el logaritmo en base 10 de la solubilidad medida en mol/L (LogS). Se sabe que más del 80% de los medicamentos en el mercado tienen una LogS (estimado) mayor que -4 [64].

EL LogP de un compuesto es el logaritmo en base 10 de su coeficiente de partición entre *n*-octanol y el agua. El mismo se calcula a partir de las contribuciones atómicas de los fragmentos de la molécula; y está fundamentado en una base de datos de más de 5000 compuestos. Proporciona información sobre la hidrofobicidad de un

compuesto. Un LogP alto corresponde a una hidrofobicidad alta; y por lo tanto puede ser causa de una absorción pobre. Se ha demostrado que para valores de LogP menores a 5.0 la probabilidad de que los compuestos sean bien absorbidos, por vía oral, es alta [65].

El parámetro “Drug-likeness” está basado en descriptores topológicos, las huellas dactilares de la estructura, LogP y peso molecular. Se encuentra basado en una lista de unos 5300 fragmentos subestructurales distintos con puntuaciones “Drug-likeness” asociados. El “Drug-likeness” se calcula con la siguiente ecuación sumando los valores de puntuación de aquellos fragmentos que están presentes en la molécula estudiada:

$$d = \frac{\sum v_i}{\sqrt{n}}$$

Permite evaluar cuanto el compuesto se parece a un fármaco [66]. El parámetro “Drug-score” combina los parámetros “Drug-likeness”, LogP, LogS, PM y el riesgo de toxicidad. Se emplea para evaluar el potencial de total de un compuesto para ser clasificado como fármaco. Se aplica la siguiente ecuación:

$$ds = \prod \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} s_i \right) \cdot \prod t_i$$

$$s = \frac{1}{1 + e^{ap+b}}$$

Este valor se calcula multiplicando las aportaciones de las propiedades individuales con la primera ecuación. El parámetro ds corresponde al “Drug-score”, si son las contribuciones calculadas directamente de LogP, LogS, PM y “Drug-likeness”. Los parámetros a y b están relacionados con cLogP, LogS, PM y “Drug-likeness”, si se relaciona con las contribuciones de los cuatro tipos de riesgo de toxicidad [67].

TPSA (área polar topológica de la superficie molecular) está definida por la suma de las superficies polares de una molécula. Es un buen descriptor de la absorción del fármaco, incluyendo la absorción intestinal, biodisponibilidad, penetración de la

barrera hemato-encefálica, entre otros. Brinda información sobre el transporte del fármaco [68].

El cálculo del volumen la molécula está basado en las contribuciones de cada grupo funcional. Éste parámetro puede estar relacionado con el transporte de las moléculas a través de membranas, como absorción intestinal o penetración de la barrera hemato-encefálica.

En el sitio web 2, además se puede aplicar la opción *Galaxy 3D Generator*; que permite generar estructuras 3D de los compuestos estudiados e incluye la visualización de propiedades de superficie como:

- MLP (potencial de lipofilicidad molecular): que permite observar cuáles son las partes superficiales más hidrófobas [69]. Se calcula a partir de las contribuciones hidrofóbicas atómicas (LogP). Se genera una estructura superficial 3D (violeta/azul mayor lipofilia – rojo/naranja menor lipofilia, pasando por amarillo/verde lipofilia intermedia).
- PSA (área superficial polar): es un parámetro muy útil para la predicción de las propiedades de transporte de drogas, se define como la suma de las superficies de los átomos polares. Es un cálculo lento, ya que se debe generar una estructura 3D para determinar la superficie [70].

A continuación se muestran imágenes de posibles resultados que se pueden obtener aplicando los programas descritos anteriormente (figura 3.7.1 y figura 3.7.2).

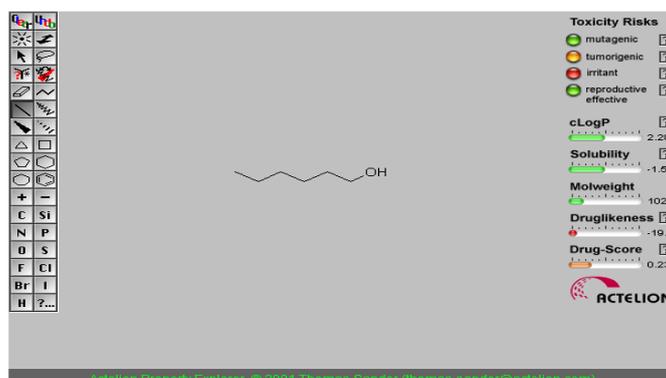
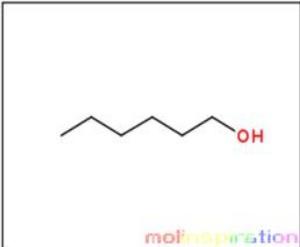


Figura 3.7.1. Resultados que se esperarían obtener aplicando el sitio web 1.

molinspiration

miSMILES CCCCCO

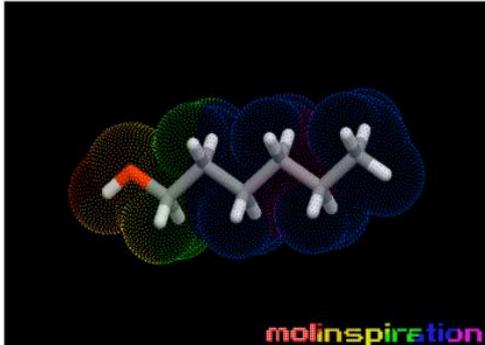


Molinspiration property engine v2011.04

miLogP	2.129
TPSA	20.228
natoms	7.0
MW	102.177
nON	1
nOHNH	1
nviolations	0
nrotb	4
volume	121.223

[Get data as text](#) (for copy / paste).

[Get 3D geometry](#) BETA



Rendering:

-
-
-
-

Surface coloring:

-
-
-
-
-

molinspiration

Figura 3.7.2. Resultados que se esperarían obtener al aplicar el sitio web 2.

4. Resultados y discusión

4.1 Química

La síntesis de compuestos bis – tiazólicos se llevó a cabo con pequeñas modificaciones de acuerdo a lo descrito en la literatura [56, 71]. Para la obtención de compuestos bis – tiazólicos simétricos un equivalente del aldehído se condensó en presencia de un catalizador ácido, en general *p* – TsOH, con un equivalente de la tiosemicarbazida N^A – sustituida, para la formación de la tiosemicarbazona correspondiente. A partir de dos equivalentes de esta última y un equivalente de 1,4-dibromo-2,3-butanodiona en etanol como disolvente se obtuvo el correspondiente bis – tiazol y los compuestos bis – tiazólicos simétricos que se obtuvieron fueron **JM02** y **JM08** (figura 4.1.1).

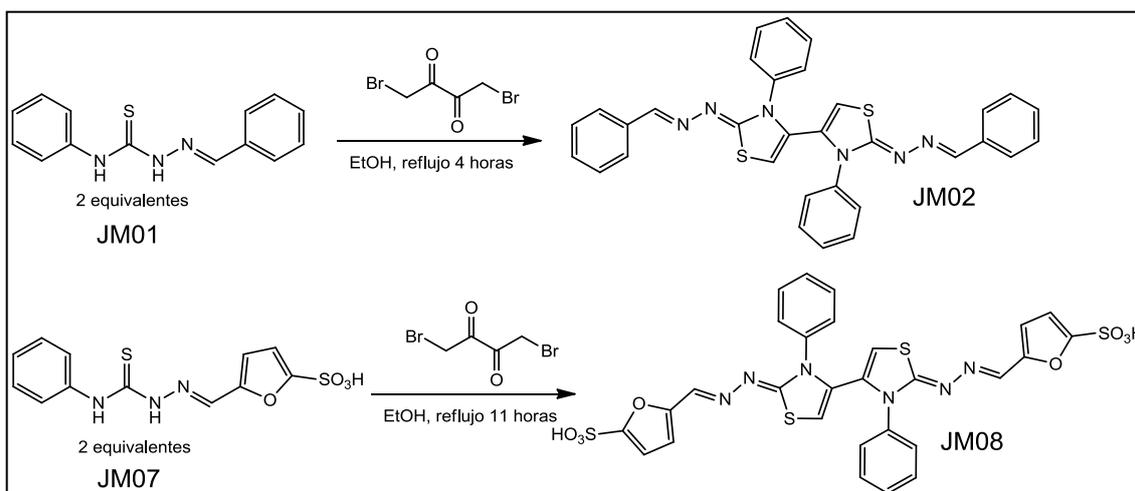


Figura 4.1.1. Esquema de síntesis de los dos compuestos bis – tiazólicos simétricos. Arriba se muestra la síntesis de JM02. Abajo, síntesis de JM08.

En la obtención de compuestos bis – tiazólicos asimétricos se realizó un paso previo de obtención de los compuestos tiazólicos *N*–sustituidos (figura 4.1.2).

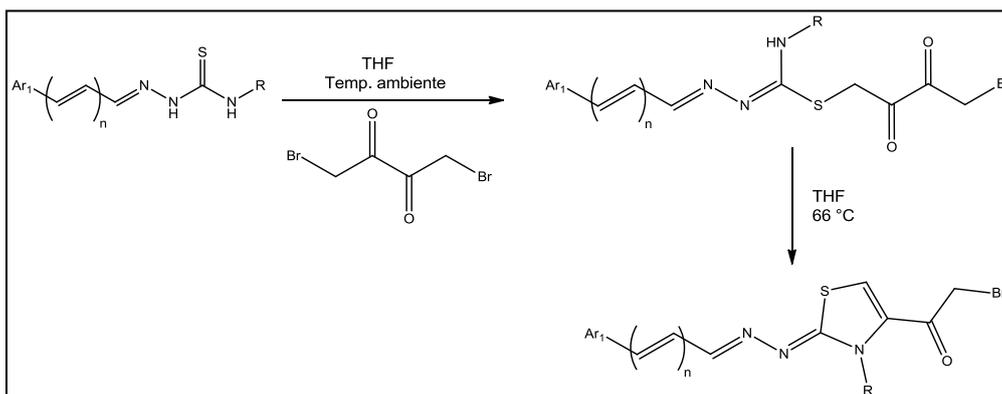


Figura 4.1.2. Ruta sintética para la obtención de 4-bromometilcarbonitiazoles. Paso previo a la síntesis de bis – tiazoles asimétricos.

Así se realizó una reacción entre la tiosemicarbazona de interés y exceso de 1,4-dibromo-2,3-butanodiona, de manera que ocurra la adición de sólo una tiosemicarbazona, siendo la relación molar establecida de 1,4-dibromo-2,3-butanodiona:tiosemicarbazona de 1:0,7.

En primera instancia se realizó el agregado de la tiosemicarbazona, a temperatura ambiente desde un eculizador, para obtener las correspondientes isotiosemicarbazidas sustituidas (por ejemplo **JM04**, tabla 4.1.1). La ciclación de los mismos requiere un control estricto de la temperatura, por ese motivo se emplea tetrahidrofurano como disolvente y el calentamiento controlado no excede la temperatura de ebullición del mismo, 66 °C. El montaje experimental empleado en este paso sintético se ilustra en la figura 4.1.3. El empleo de campana de CaCl₂ permite mantener un ambiente anhidro, ya que en la reacción se produce la pérdida de dos moléculas de H₂O; por lo que es necesario este ambiente para que la reacción sea irreversible (ver propuesta mecanística en figura 4.1.4).

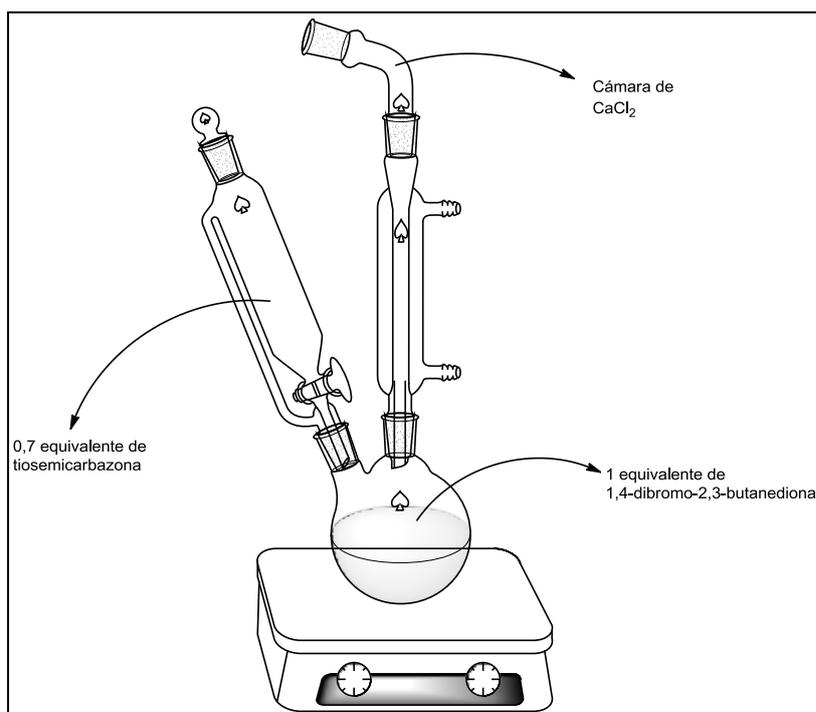


Figura 4.1.3. Montaje experimental para la síntesis de tiazoles *N*-sustituidos.

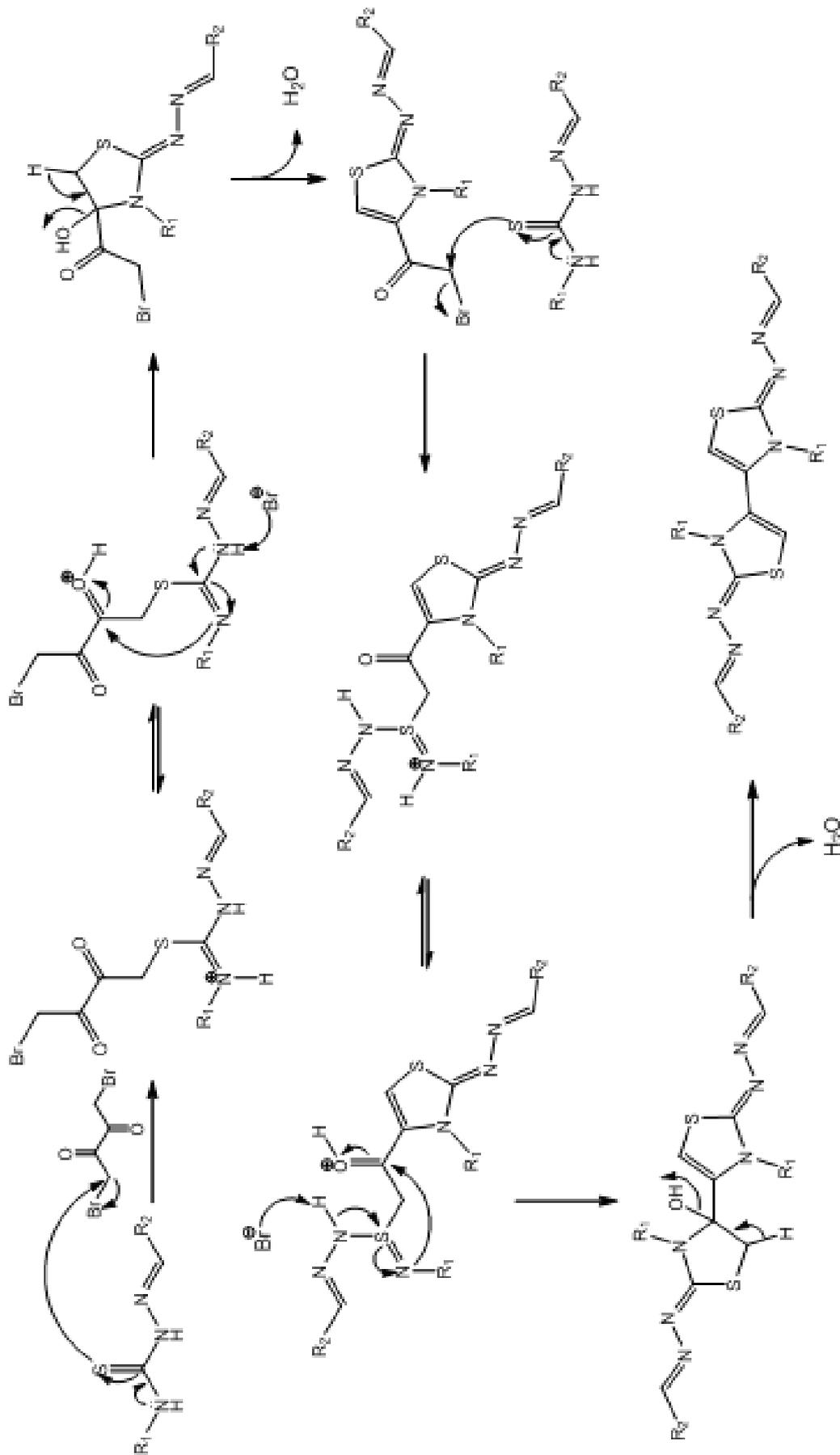


Figura 4.1.4. Mecanismo de reacción para la formación de compuestos bis – tiazólicos.

Posteriormente, a partir de un equivalente del 4-bromometilcarboniltiazol *N*-sustituido y de un equivalente de una tiosemicarbazona diferente a la de partida², se realizó la condensación de los mismos en etanol o tolueno como disolvente a temperatura de reflujo (78,5 °C ó 110 °C, respectivamente) (figura 4.1.5).

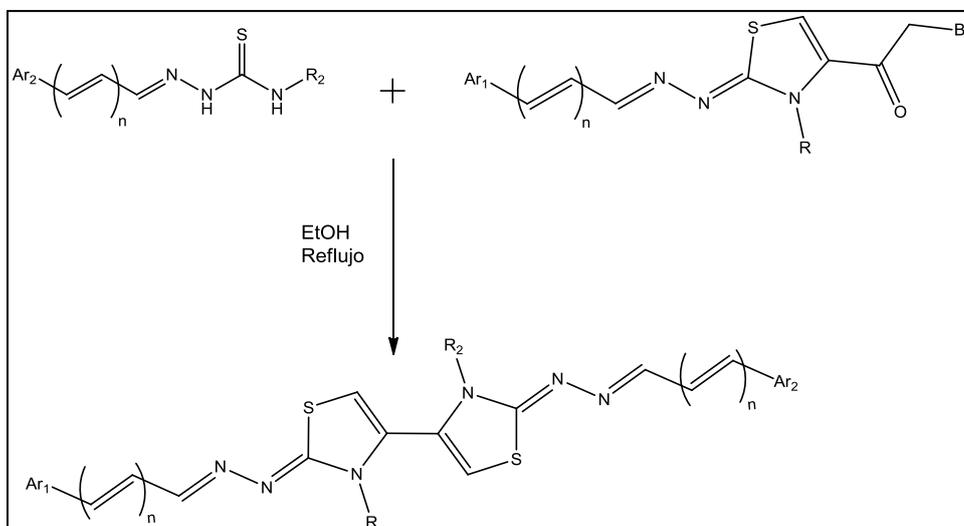


Figura 4.1.5. Paso final para la obtención de compuestos bis – tiazólicos asimétricos.

Los resultados obtenidos de la etapa sintética del presente trabajo se resumen en la tabla 4.1.1.

Los rendimientos de las reacciones en general fueron de muy buenos a excelentes; siendo las reacciones enteramente reproducibles. En general, la estrategia de síntesis aplicada no presentó mayores dificultades; ya que al terminar el tiempo de reacción establecido se obtiene un precipitado el cual es filtrado sin mayores inconvenientes. En alguno de los casos, especificados en la sección *materiales y métodos*, fue necesario mantener en frío durante 24 horas para promover la precipitación del sólido.

² Para la preparación de **JM05**, **JM09**, **JM10** y **JM12** (tabla 4.1.1) se utilizan tiosemicarbazonas previamente desarrolladas en nuestro grupo de investigación, en el marco de la tesis doctoral de Guzmán Álvarez [56].

Tabla 4.1.1. Resultados de la síntesis química. Los compuestos **JM02**, **JM05** y **JM08 - JM12** son compuestos bis-tiazólicos; mientras que el resto corresponde a intermedios sintéticos.

Código	Estructura	R (%)*	Nomenclatura**
JM01		89	1-benciliden-4-fenil-3-tiosemicarzida
JM02		100	2,2'-bencilidenhidrazono-3,3'-difenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bis-tiazol
JM03		51	2-bencilidenhidrazono-4-(bromometilcarbonil)-3-fenil-2,3-dihidrotiazol
JM04		100	1-benciliden-5-(4-bromo-2,3-dioxibutil)-4-fenil-isotiosemicarbazida
JM05		53	3-alil-2'-bencilidenhidrazono-2-((5-bromopiridin-3-il)metilidenhidrazono)-3'-fenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bis-tiazol
JM06		98	3-alil-4-(bromometilcarbonil)-2-[3-propenilidenhidrazono]-2,3-dihidrotiazol
JM07		83	4-fenil-1-[(5-sulfo-2-furil)metiliden]tiosemicarbazida

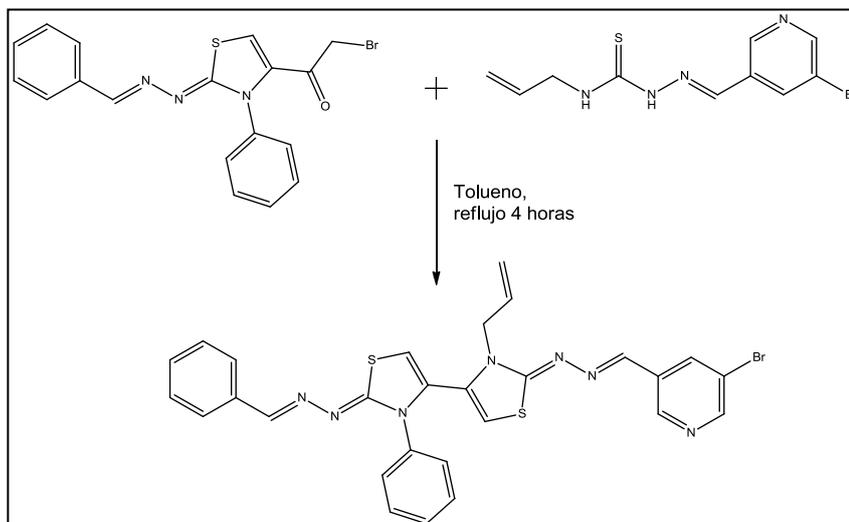
Código	Estructura	R (%)*	Nomenclatura**
JM08		65	2,2'-bis[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-3,3'-difenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol
JM09		54	3-alil-2'-bencilidenhidrazono-3'-fenil-2-[3-(2-furil)-2-propenilidenhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol
JM10		83	3-alil-2'-bencilidenhidrazono-3'-fenil-2-(2-naftilmetiliden)hidrazono-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol
JM11		53	2'-bencilidenhidrazono-3,3'-difenil-2-[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol
JM12		53	3'-alil-3-fenil-2'-[3-(2-furil)-2-propenilidenhidrazono]-2-[(5-sulfo-2-furil)metilidenhidrazono]-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bistiazol

*R (%) indica el rendimiento, después del aislamiento de los productos por cristalización o cromatografía.

**Nomenclatura indica el nombre IUPAC de cada uno de los compuestos.

Como se mencionó anteriormente el control de la temperatura fue clave para la obtención de bis – tiazoles asimétricos, dado el paso previo de síntesis que involucra este procedimiento. Por ejemplo, para la obtención del compuesto **JM05** (figura 4.1.6),

inicialmente se realizó la síntesis del tiazol **JM03**, a una temperatura máxima entre 50 – 60 °C. Posteriormente, a partir de un equivalente del



compuesto **JM03** y un equivalente de la

Figura 4.1.6. Síntesis de 3-alil-2'-bencilidenedihazono-2-((5-bromopiridin-3-il)metilidenedihazono)-3'-fenil-2,2',3,3'-tetrahidro-4,4'-bis-tiazol (**JM05**).

tiosemicarbazona 4-alil-1-[(5-bromopiridin-3-il)metilen]tiosemicarbazida, se obtuvo la condensación de los mismos, utilizando tolueno como disolvente y a reflujo. Se utilizó tolueno, por inconvenientes con la solubilidad de los reactivos de partida. En tanto, los demás compuestos bis – tiazólicos se obtuvieron empleando etanol como disolvente.

La elucidación estructural de los compuestos se realizó combinando varias técnicas espectroscópicas ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, mediante experimentos de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC y HMBC y espectrometría de masas [72]. A continuación se analizan algunos ejemplos característicos de la espectroscopía de intermedios y productos finales.

En la figura 4.1.7 se muestran los espectros ^1H -RMN de los compuestos **JM03** (A) y **JM06** (B). Se analizan en conjunto, ya que se tratan de tiazoles y presentan protones equivalentes en la molécula. Las tres señales características de ambas moléculas se muestran resaltadas en colores. En amarillo se marca el protón en la posición 5 del tiazol, el mismo presentó un desplazamiento de 7,35 ppm en el compuesto **JM03** y 6,84 ppm en el compuesto **JM06**. El carbono enlazado a este protón, presentó un desplazamiento de 119 ppm en **JM03** y 123 ppm en **JM06**.

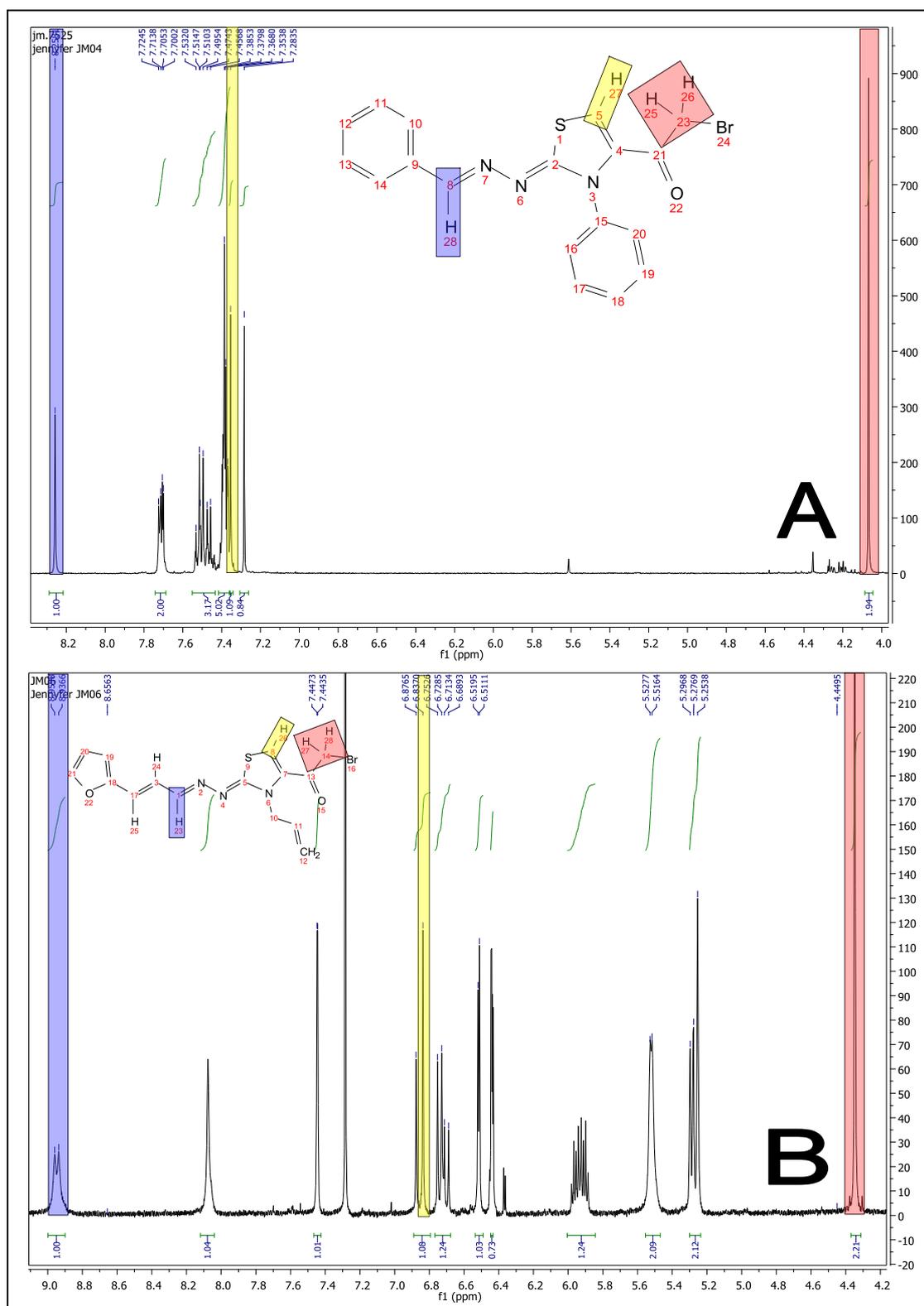


Figura 4.1.7. Espectros ^1H -RMN de los compuestos JM03 (A) y JM06 (B) en CDCl_3 adquiridos a 25°C .

Otra señal característica se muestra en rojo, la misma corresponde al metileno (CH_2) enlazado al átomo de bromo y al carbonilo, en el espectro correspondiente a JM03

aparece en 4,06 ppm (protón) y 30 ppm (carbono) y en el compuesto **JM06** en 4,35 ppm (protón) y 29 ppm (carbono).

La tercera señal (azul) que se analiza de estos compuestos es la que corresponde al protón ilidénico (CH=N) del carbono que se encuentra enlazado a un nitrógeno mediante un doble enlace, grupo imina, y a un anillo aromático. Esta señal aparece en **JM03** en 8,26 ppm (protón) y 153 ppm (carbono) y en **JM06** en 8,94 ppm (protón) y en 144 ppm (carbono).

A continuación se analizan cuatro señales presentes en todos los compuestos bis-tiazólicos asimétricos; las mismas corresponden a los protones de los dos carbonos metínicos de los tiazoles y las otras dos a los protones de los carbonos ilidénicos de los grupos iminas y a los protones de un sustituyente aromático que varía dependiendo del compuesto (figura 4.1.8.). Estas señales fueron asignadas a partir del análisis de experimentos de correlación homonuclear (COSY, figura 4.1.11) y heteronuclear (a un enlace: HSQC, figura 4.1.9; y a larga distancia: HMBC, figura 4.1.10).

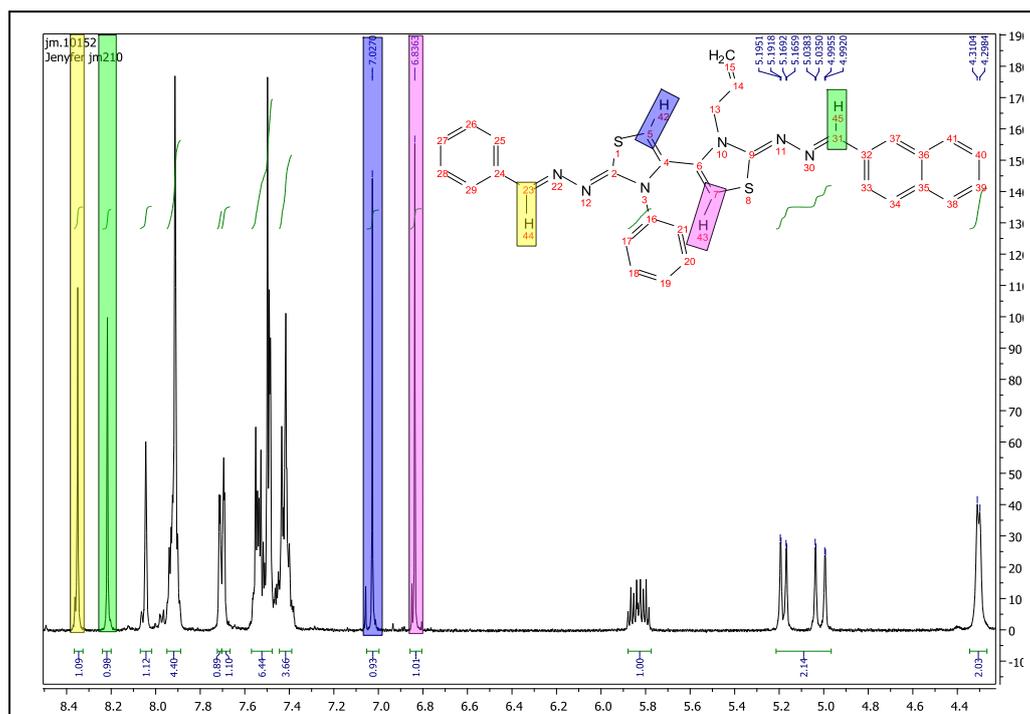


Figura 4.1.8. Espectro ^1H -RMN del compuesto bis-tiazólico **JM10** en $\text{DMSO}-d_6$ adquirido a 25°C . En colores se referencian las distintas señales que se analizan y su respectiva ubicación en la molécula.

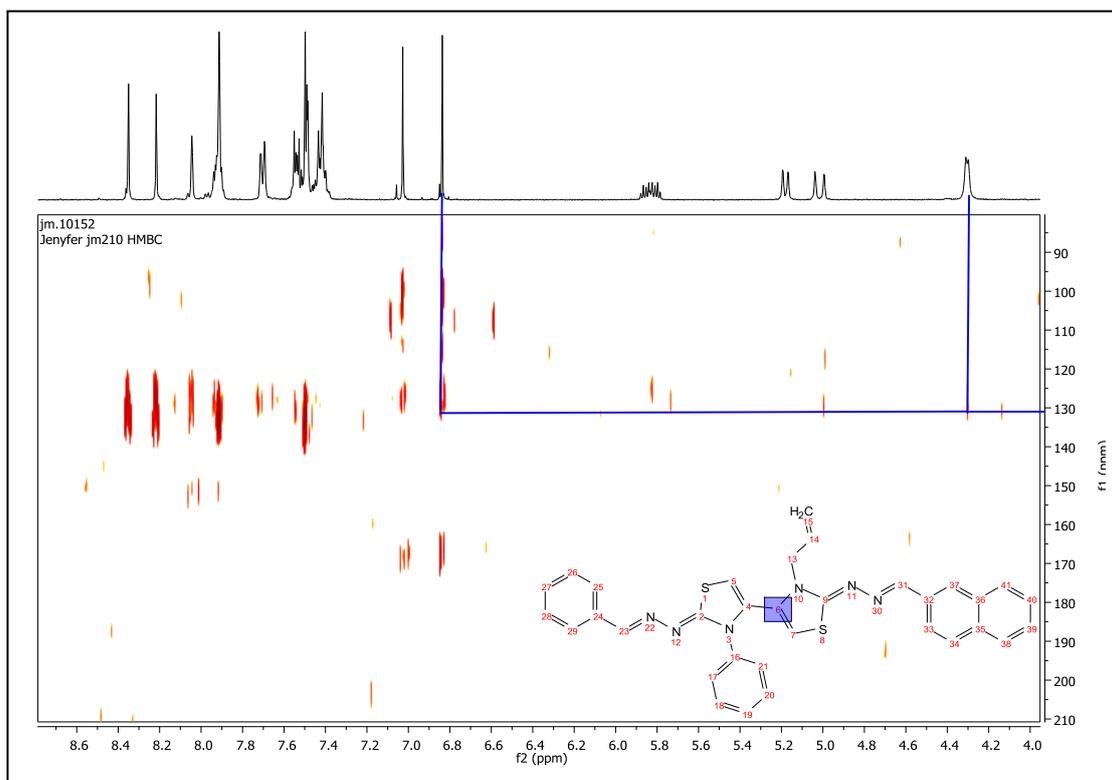


Figura 4.1.10. Resultado del experimento de correlación heteronuclear a larga distancia (HMBC) del compuesto **JM10**. Las líneas coloreadas indican correlaciones a larga distancia de relevancia para la elucidación estructural.

El experimento de correlación homonuclear COSY, permite estudiar la conectividad de una molécula mediante la determinación del acoplamiento escalar protón – protón. En el caso de este compuesto, sirvió para determinar las señales correctas de los protones que se encuentran en la posición alidénica o en la posición 1 del grupo naftilo. En la figura 4.1.11 se muestra mediante líneas rojas la conectividad de los protones marcados en la estructura como cuadrados rojos. El análisis de esta conectividad resulta que el protón en la posición 1 del naftilo, presenta una señal característica y aparece como un singulete aislado, a diferencia de los protones del fenilo. A pesar de que esta señal de conectividad se observa muy débilmente, permite identificar cual de los protones presenta tal desplazamiento.

A modo de ejemplo, en el cuadrado verde de la misma figura, se observa la conectividad entre los protones del agrupamiento alilo. Estas señales características aparecen en todos los compuestos que presentan este sustituyente.

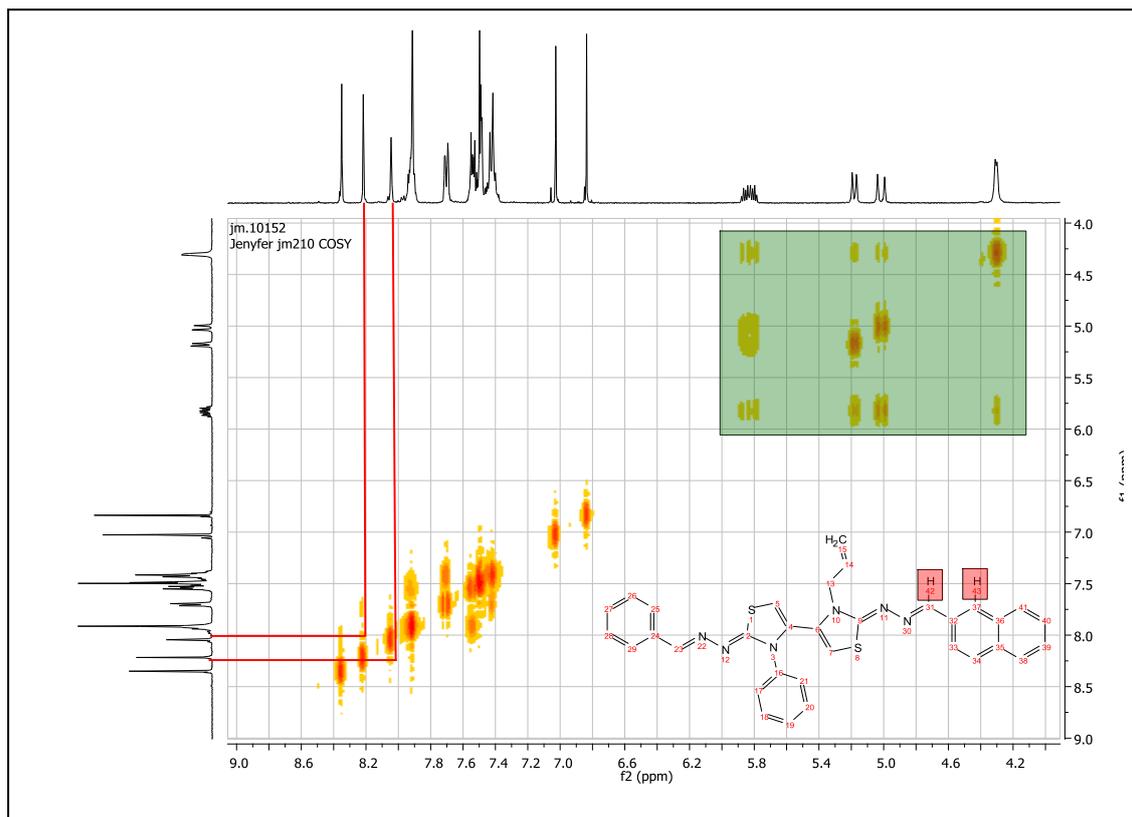


Figura 4.1.11. Resultado del experimento de correlación homonuclear (COSY) del compuesto **JM10**. En colores se muestran las correlaciones y sus respectivos protones en la molécula.

Los análisis espectroscópicos de los compuestos bis – tiazólicos simétricos son similares, solo que las señales que se analizaron para el compuesto bis-tiazol asimétrico, presentan el mismo desplazamiento. Por ejemplo, existe una única señal que corresponde a los dos hidrógenos tiazólicos y otra señal que corresponde a los dos protones ilidénicos de la imina, cada uno de cada plano de la molécula.

A continuación se analiza el resultado del experimento de espectrometría de masas obtenido para el compuesto **JM10**. Como se puede observar en la figura 4.1.12, aparece un ion de relación m/z de 570, el cual corresponde al ión molecular (M^+). Además, se muestra un ion de relación m/z de 417; que se corresponde a un fraccionamiento característico que además aparece en los espectros de los compuestos **JM05** y **JM09**, los cuales también presentan este patrón estructural (ver tabla 4.1.1).

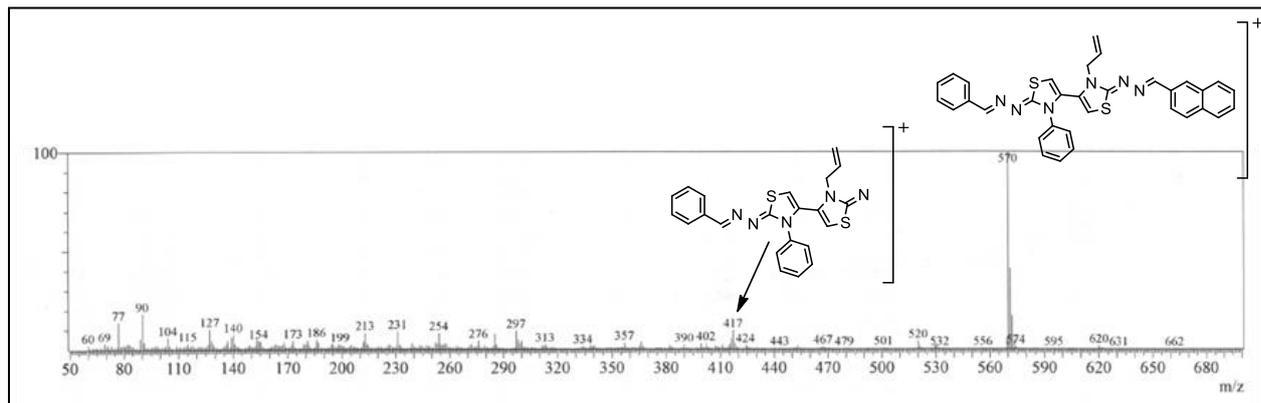


Figura 4.1.12. Resultado de espectrometría de masas para el compuesto JM10.

4.2 Puesta a punto de la técnica de disrupción del dímero de TcTIM mediante espectroscopía de fluorescencia

Se propone trabajar en la puesta a punto de una técnica basada en la fluorescencia

intrínseca de la Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM);

para evaluar la disrupción del dímero debida a la acción de los compuestos sintetizados.

Como se explicó anteriormente, TcTIM posee

fluorescencia intrínseca de mayor intensidad en su estado dimérico que en su

estado monomérico. Entonces se esperaría que aquellos compuestos que perturben la interfase de la proteína provoquen una disminución en la intensidad de la fluorescencia (IF). Para validar la metodología se emplearon varios compuestos anteriormente evaluados como inhibidores de la actividad de TcTIM [54] (figura 4.2.1). Para poder establecer un mínimo en la IF, se expone la proteína a una temperatura de aproximadamente 80 °C en la cual la misma se desnaturaliza. Se ha descrito el desplegamiento debido a la temperatura de TcTIM, donde se observa que a 80 °C se

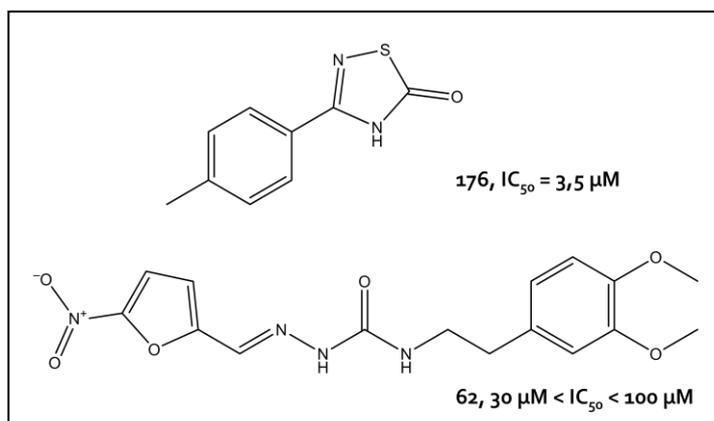


Figura 4.2.1. Compuestos empleados en la estandarización del ensayo de fluorescencia. IC_{50} = concentración inhibitoria 50% de TcTIM.

producen cambios en el microambiente de los residuos triptófanos, observado por una disminución en la IF [73]. Este desplegamiento estaría acompañado de la disociación del dímero de *TcTIM* en sus monómeros [74, 75] y por ende perdería su actividad catalítica.

Para realizar la estandarización de la técnica se propuso trabajar en condiciones similares que en el ensayo de actividad de *TcTIM*, ya que parecen ser las propicias para la actividad y estabilidad de la misma [27].

Lo que se pretende con este ensayo, es evaluar la capacidad de los compuestos de intervenir en la interfase de la *TcTIM*, de modo de provocar la disociación del dímero en sus respectivos monómeros. Para ello, se incubó la proteína utilizando un compuesto de referencia, compuesto **176** (figura 4.2.1). El mismo, es un inhibidor de la actividad catalítica de *TcTIM*, con un IC_{50} de $3,5 \mu M$.

Además de acuerdo a estudios de *docking* (trabajos realizados por parte de nuestro grupo de investigación) este compuesto estaría interviniendo en el sitio catalítico de *TcTIM*,

provocando modificaciones estructurales en la interfase de la proteína; entonces se

esperaría que esos cambios promuevan la desestabilización de la estructura dimérica de la proteína. Por lo tanto se empleó como un control positivo de desestabilización de la estructura dimérica de la proteína. Los resultados obtenidos, incubando la *TcTIM* en presencia de diferentes concentraciones del compuesto **176** se muestran en la figura 4.2.2.

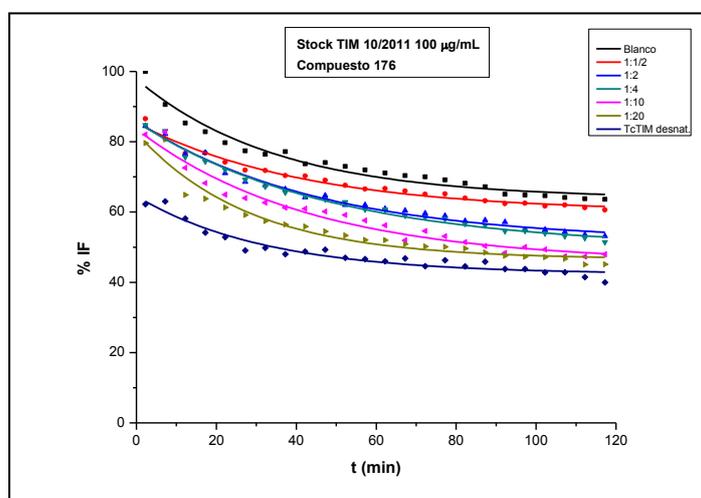


Figura 4.2.2. Gráfico % IF vs. t (min) empleando diferentes concentraciones del compuesto **176**, inhibidor de *TcTIM* (IC_{50} $3,5 \mu M$).

En principio, el resultado obtenido en esta prueba (figura 4.2.2) fue el esperable para el efecto de la disrupción enzimática; es decir, se esperaba que al incubar la proteína en presencia de este compuesto la IF disminuyese. Se observó que a diferentes

relaciones de $TcTIM$:compuesto, el decaimiento es distinto. A

medida que se aumenta la concentración de compuesto **176** el decaimiento es más pronunciado, por lo que se especula que a mayor concentración de compuesto más enzima está siendo disociada o su interfase interrumpida. Es importante destacar que a una relación $TcTIM$:compuesto 1:40, el efecto causado por el mismo provoca un decaimiento muy similar a la desnaturalización de la enzima a 60 °C. Anticipadamente, se podría decir que a esa relación, la enzima se encontraría totalmente disociada en sus monómeros.

Para discriminar entre compuestos disruptores y no disruptores de la interfase de $TcTIM$, se empleó el compuesto **62** (figura 4.2.1) que presenta un IC_{50} entre 30

y 100 μM . Se realizó el mismo procedimiento experimental, que el efectuado con el anterior compuesto, se midió la IF en función del tiempo, y se emplearon diferentes concentraciones del compuesto **62**. Los

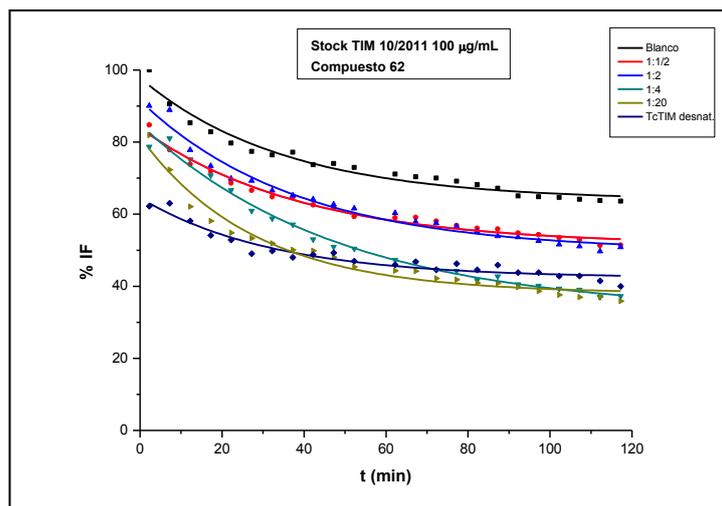


Figura 4.2.3. Gráfico % IF vs. t (min) empleando diferentes concentraciones del compuesto **62**, inhibidor de $TcTIM$ ($30 \mu M < IC_{50} < 100 \mu M$).

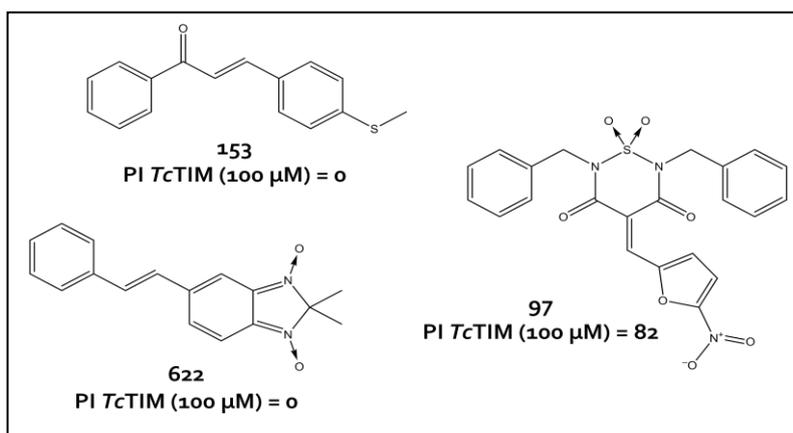


Figura 4.2.4. Se muestran otros compuestos utilizados para la estandarización de la técnica de disrupción mediante espectroscopía de fluorescencia. PI $TcTIM$ (100 μM): porcentaje de inhibición de $TcTIM$ a 100

resultados obtenidos se pueden apreciar en la figura 4.2.3. Se observa que el compuesto **62** provoca una marcada disminución en la IF de fluorescencia. Además, es posible apreciar, que en una relación 1:4 y 1:20 de TcTIM:compuesto, la disminución es similar a la de la proteína desnaturalizada. Este resultado, no es concordante con el ensayo de actividad enzimática; ya que se esperaba que el compuesto **176** produjera mayor decaimiento, al ser un inhibidor más potente y al inducir cambios en la interfase de la proteína, dado que su IC₅₀ es menor.

Se probaron, en este ensayo, otros compuestos que han mostrado diferentes características como disruptores de TcTIM. Los compuestos **97**, **153** y **622**³ fueron evaluados, previamente [54], mediante ensayo de actividad por parte de nuestro grupo de investigación y se conocen cuáles de ellos fueron capaces de inhibir la actividad enzimática de la TcTIM (figura 4.2.4).

En la figura 4.2.5 se muestran los resultados obtenidos con estos compuestos. La primera observación importante que se realiza, es que la disminución en la IF de la proteína desnaturalizada no es tan marcada como en el ensayo anterior y la diferencia con el blanco no es significativa. Independientemente de este detalle se prosigue al análisis de los efectos provocados por los distintos compuestos. Se puede observar que el compuesto **97**, que presenta un PI TcTIM (100 µM) de 82 %, provoca una marcada disminución en la IF y es aun mayor a medida que se aumenta la concentración del mismo. En principio, este sería un resultado alentador si relacionamos su porcentaje de inhibición con el efecto producido sobre la IF de TcTIM en este ensayo. El compuesto **153** (PI TcTIM a 100 µM de 0 %) provoca disminución en la IF, aunque no tan aumentada como el compuesto **97**. En cambio, el último compuesto evaluado, el **622** (PI TcTIM a 100 µM de 0 %), produce un efecto similar al compuesto **97**.

Se podría decir que los compuestos **97** y **153**, producirían una disminución en la IF concordante con su inhibición de la actividad de la proteína, ya que el **97** presenta alto porcentaje de inhibición y produce un marcado efecto en la estructura de la TcTIM, el cual estaría provocando la disociación de los dímeros; y el compuesto **153** parece

³ La numeración de los compuestos es la original de la referencia bibliográfica [54].

provocar un mínimo efecto sobre la estructura dimérica de TcTIM. Sin embargo, el resultado obtenido con el compuesto **622**, no concuerda con lo esperado; ya que el mismo no es un inhibidor de la actividad catalítica, sin embargo promueve cambios en la estructura tridimensional en la enzima que hacen que la misma disminuya su IF.

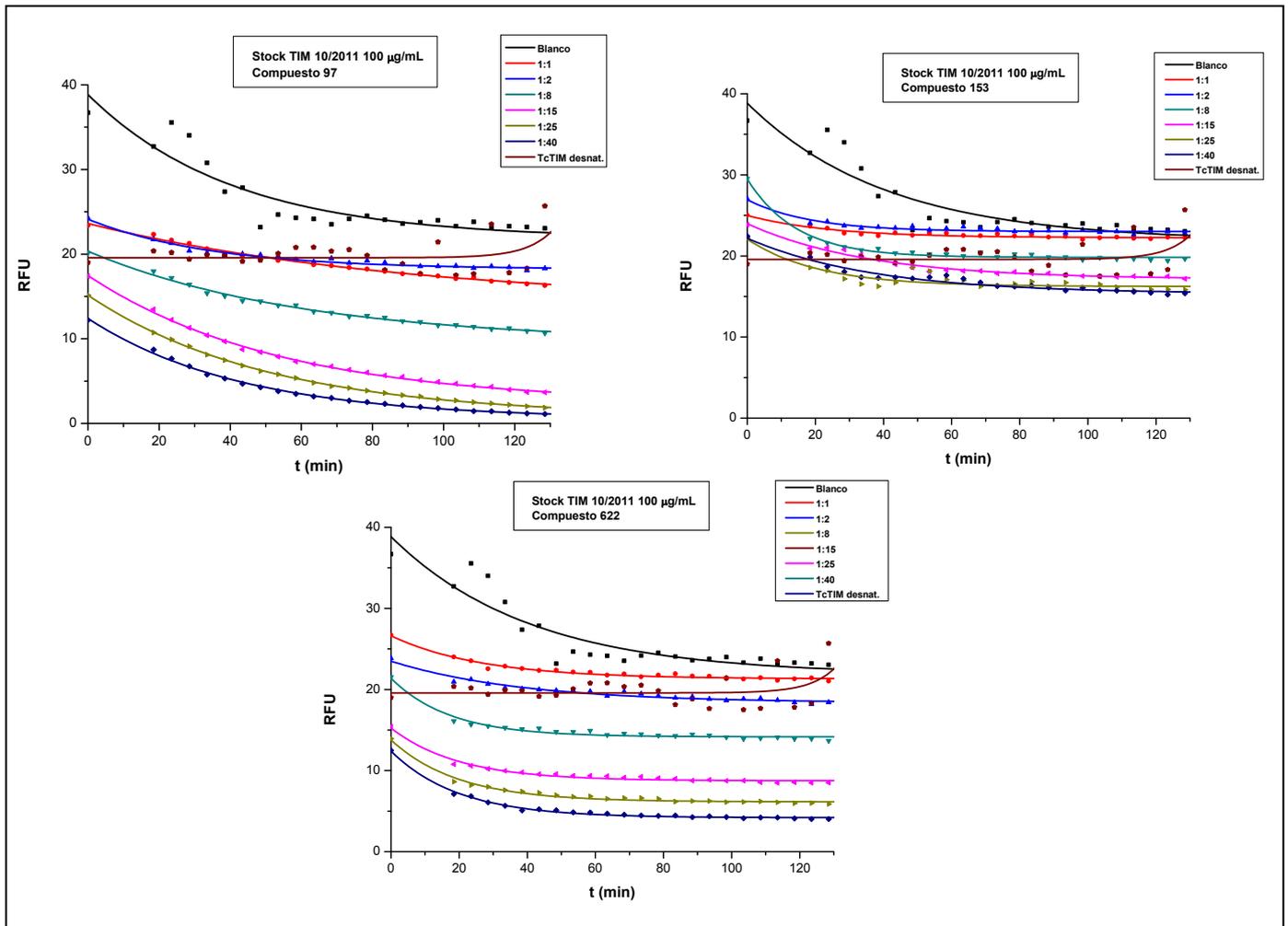


Figura 4.2.5. Resultados obtenidos de la estandarización de la técnica empleando los compuestos **97**, **153** y **622**, como se indica en cada gráfico. RFU: Relative Fluorescence Units.

A partir de estos resultados, que no fueron lo que se esperaba obtener, se plantean hipótesis de otros fenómenos que podrían estar ocurriendo en el ambiente de la proteína o del sistema en sí. Uno de los fenómenos que podrían estar ocurriendo, es el de *quenching de fluorescencia*. Este término se refiere a cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia, el mismo puede existir de diferentes maneras:

- quenching estático
- quenching colisional o dinámico
- RET o FRET
- transferencia de carga
- reacciones de estado excitado

En este caso, se analizan los tres primeros fenómenos. Para que exista *quenching estático o dinámico*, se requiere el contacto físico del fluoróforo y el *quencher*. En nuestro sistema, los fluoróforos son los aminoácidos aromáticos de la TcTIM, la principal contribución es por parte de los triptófanos (Trp), luego las tirosinas (Tyr) y fenilalaninas (Phe) [76]. Para estudiar la posibilidad de que estos fenómenos pudiesen estar ocurriendo, se procedió a analizar la estructura tridimensional de la proteína y analizar la ubicación de estos residuos aminoacídicos; para ello se empleó la herramienta informática PyMol versión 1.3. En la figura 4.2.6A, se muestra la ubicación de los Trp (5); mientras que en la figura 4.2.6B se muestran todos los residuos aromáticos (5 Trp, 6 Tyr y 7 Phe) de la proteína.

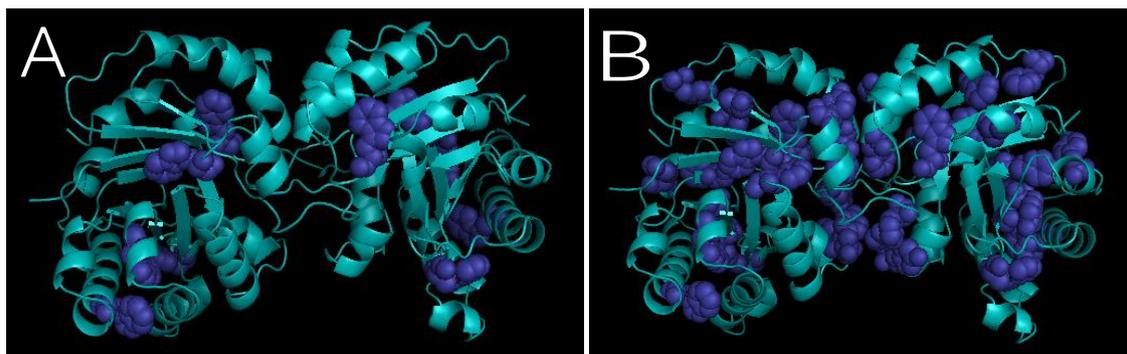


Figura 4.2.6. Visualización tridimensional de TcTIM en el programa PyMol. **A.** se muestran en azul los Trp presentes en la proteína; **B.** se muestran todos los residuos aromáticos (Trp, Tyr y Phe). Protein Data Bank, PDB: 1TCD,

En la figura 4.2.6A se puede observar que algunos de los Trp de la molécula se encuentran en la superficie de la misma, al igual que muchas de las Tyr y Phe. Esta disposición espacial de los aminoácidos, podría promover fenómenos de *quenching* en el sistema; ya que los mismos se encuentran accesibles al disolvente y por lo tanto a los componentes del mismo. Como posibles *quenchers*, se plantea la posibilidad de

que el DMSO (utilizado como disolvente en los experimentos) y los mismos compuestos pudiesen estar actuando de esta manera.

Otro de los procesos que se estudiaron fue el de *transferencia de energía o FRET*. Cuando una molécula del donante absorbe un fotón y hay una molécula de aceptor

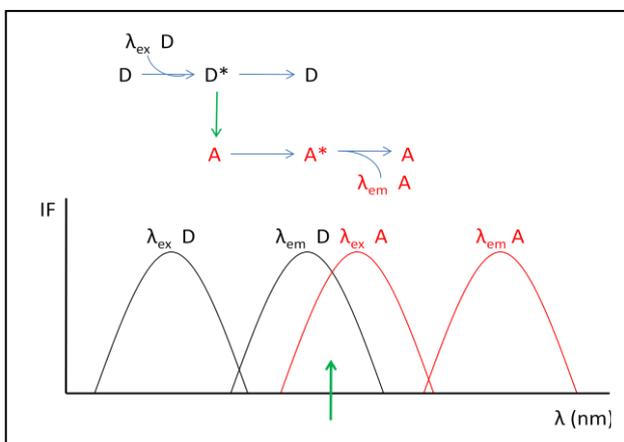


Figura 4.2.7. Arriba se muestra un esquema del mecanismo molecular que ocurre en un proceso de FRET. Abajo se observan los espectros de excitación (ex) y emisión (em) del dador D (negro) y del aceptor A (rojo), la flecha verde indica la zona de solapamiento de los espectros de emisión del dador y excitación del aceptor.

cerca, puede ocurrir la transferencia de energía del estado excitado del donante al aceptor por una vía no radiante.

Como resultado de la transferencia de energía se observa una disminución en la IF por el donante y, si el aceptor es fluorescente, la aparición de una nueva señal fluorescente (figura 4.2.7) [76].

Entonces, para estudiar la posibilidad de que este fenómeno esté ocurriendo, se analizaron los espectros de excitación/absorción de los compuestos estudiados. En la figura 4.2.8 se pueden ver los

espectros de todos los compuestos utilizados (176, 97, 622 y 153). La

proteína presenta un $\lambda_{emisión}$ en 314 nm, por lo tanto, es necesario para que el fenómeno de FRET no ocurra, que estos compuestos no presenten absorción a esa

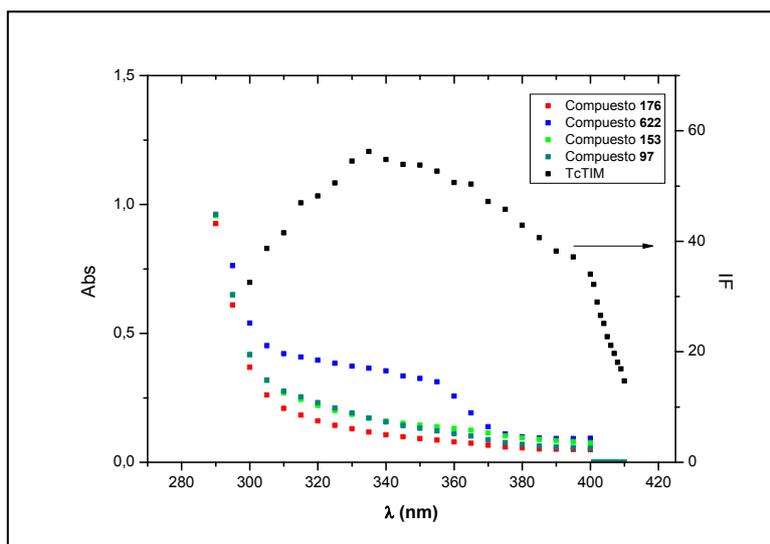


Figura 4.2.8. Espectros de absorción de los compuestos 176, 622, 153 y 97. También se muestra (en negro) el espectro de emisión de TcTIM a 100 $\mu\text{g/mL}$.

longitud de onda. Se puede observar que todos los compuestos presentan cierta absorción, pero es más notoria la absorción que presenta el compuesto **622**; además si se analiza el resultado del ensayo de disrupción junto con este resultado se podría decir que el compuesto **622**, en el sistema, podría promover FRET. En cuanto a los otros compuestos, se observa que la absorción no es nula, por lo tanto si bien no se puede afirmar que este fenómeno podría estar ocurriendo, tampoco se descarta totalmente esta posibilidad. Para seguir estudiando este proceso de FRET, se realizaron espectros de absorción (figura 4.2.9) de otros compuestos de la quimioteca de nuestro grupo de investigación; de modo de estudiar posibles estructuras que podrían causar este proceso en nuestro sistema de trabajo. En este ensayo, la concentración de TcTIM que se utilizó fue la misma que en los ensayos anteriores (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); y todos los compuestos fueron ensayados a una concentración de 50 μM . Como se puede observar, la mayoría de los compuestos probados, presentan cierta absorción en el rango de emisión de la TcTIM. Cabe destacar el resultado obtenido con el compuesto **VIII** ya que este es un compuesto bis – tiazólico (figuras 1.3.3 y 4.2.10). El mismo presenta una marcada absorción dentro del rango de emisión de la proteína. Esto es importante ya que los compuestos diseñados y desarrollados en el presente trabajo presentan la misma estructura base que el compuesto **VIII**.

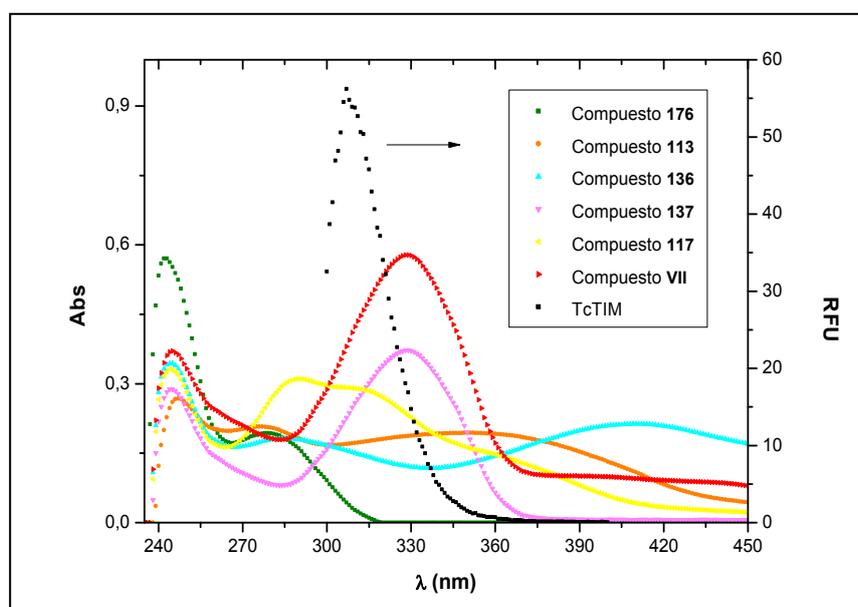


Figura 4.2.9. Espectros de absorción de algunos compuestos (50 μM) presentes en la quimioteca del grupo de investigación. También se muestra (en negro) el espectro de emisión de TcTIM a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

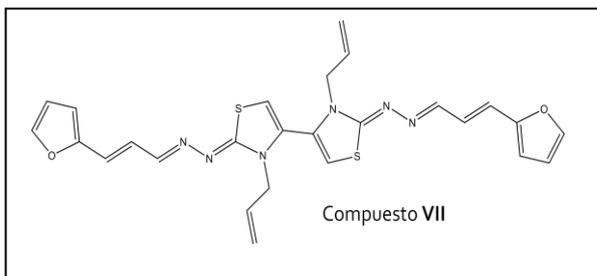


Figura 4.2.10. Estructura del compuesto VIII.

Resumiendo en lo que respecta a este ensayo, los resultados obtenidos hasta el momento permiten extraer algunas conclusiones respecto a este método de evaluación de disrupción mediante espectroscopía de fluorescencia. La

TcTIM posee residuos aromáticos en su superficie, responsables de su capacidad intrínseca de fluorescer, que podrían ser blancos del fenómeno de *quenching*. Además, muchos de los compuestos que se emplearon para estandarizar la técnica, presentan absorción alrededor de 314 nm y cabe destacar, en especial, el compuesto **VIII**, el cual posee la misma estructura base que los compuestos a sintetizar en el presente trabajo.

Este método no fue adecuado para identificar compuestos que pudiesen estar interviniendo en la interfase de la *TcTIM*, de manera que tampoco nos valió para diferenciar compuestos inhibidores de compuestos que no presentan inhibición de la actividad de *TcTIM*.

4.3 Evaluación de disrupción del dímero de *TcTIM* mediante *cross-linking* y electroforesis SDS-PAGE

Dado que la metodología de fluorescencia no es conveniente para discriminar compuestos disruptores de los no disruptores, se planteó como método de evaluación de la disrupción el empleo de geles desnaturizantes de poliacrilamida para diferenciar la presencia de *TcTIM* monomérica de *TcTIM* dimérica. Previo a la

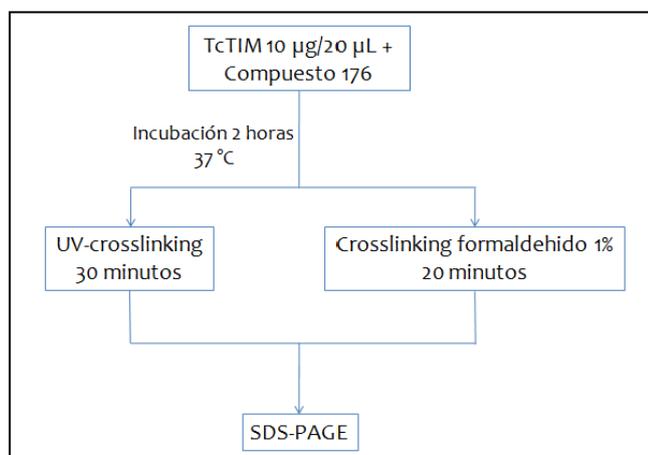


Figura 4.3.1. Otra de las estrategias experimentales ensayada para la evaluación de compuestos como disruptores de la interfase de *TcTIM*.

electroforesis desnaturizante se realiza UV *cross – linking* de las muestras a analizar (figura 4.3.1).

Cross – linking

Es un proceso de unión química de dos o más moléculas mediante enlaces covalentes. Los reactivos “cross – linkers” son moléculas que contienen dos o más extremos reactivos capaces de atacar grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfidrilos, etc.) en las proteínas u otras moléculas [77]. La irradiación con luz ultravioleta también causa la formación de enlaces covalentes entre proteínas y proteínas – ácidos nucleicos que se encuentran en contacto cercano [78]. En esta instancia, se ensayaron dos opciones: UV *cross – linking* y *cross – linking* con formaldehído.

Geles desnaturizantes de poliacrilamida

Se empleó electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada PAGE (acrónimo del inglés de electroforesis de geles de poliacrilamida). El agente desnaturizante empleado fue SDS (acrónimo del inglés de duodecilsulfato sódico) el cual es un detergente iónico que se une a las proteínas y es capaz de romper todas las interacciones no covalentes de las mismas. La unión masiva de moléculas de SDS a la proteína, bloquea la carga de la misma; y le confiere carga neta negativa. De esta manera, todas las moléculas presentan la misma forma, en tanto que su carga es proporcional a su tamaño. Por lo tanto, la separación de las proteínas en un campo eléctrico ya no será dependiente de estos dos factores. Sin embargo, al estar migrando dentro de una red porosa, las proteínas de menor peso molecular se desplazaran con mayor velocidad, mientras que las de mayor peso molecular migrarán más lentamente [79].

A partir de estos métodos bioquímicos se espera observar en los geles que aquellos compuestos que sean capaces de inducir cambios o desestabilicen la interfase de la proteína, provoquen la separación de los monómeros. Entonces se espera, visualizar una banda correspondiente a la proteína monomérica. En primera instancia, se

procedió a analizar el tipo de *cross – linking* que confiriera mayor información y posibilidades de observar este fenómeno.

En primer lugar se ensayó el *cross – linking* con 1 y 4 % de formaldehído o con exposición a luz UV, a la proteína en ausencia de compuestos. En la figura 4.3.2 se pueden ver los resultados obtenidos. En los carriles 1 – 4 se observa una banda intensa a la altura de 27 kDa, correspondiente a la proteína monomérica. Además en los carriles 1, 3 y 4 se observan otras bandas alrededor de 54 kDa. En el carril 1 se observa una banda ancha y difusa correspondiente a

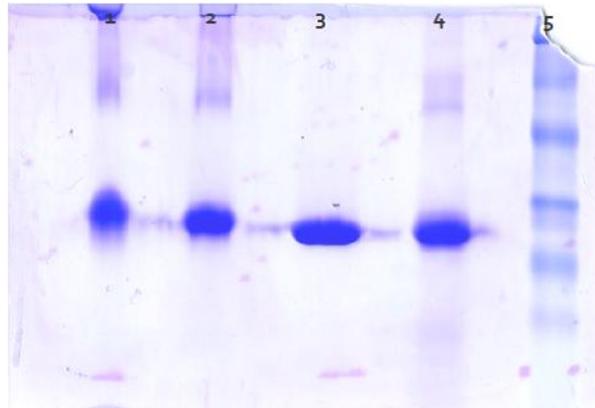


Figura 4.3.2. Corrida electroforética luego de someter a la TcTIM a diferentes procedimientos de *cross-linking*. Referencias: 1- TcTIM, *cross – linking* 4 % de formaldehído. 2- TcTIM, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 3- TcTIM sin *cross – linking*. 4- TcTIM, UV *cross – linking*. 5- Marcador de peso molecular.

la proteína en su estado dimérico; lo mismo se observa en el carril 2, pero en este caso la banda se ve más definida y clara. En el carril 3, como era de esperar, no se observa proteína en estado dimérico, ya que la misma no fue expuesta a ningún proceso de *cross – linking* previo. En el carril 4 se observa, una banda de aproximadamente 27 kDa, y una banda muy tenue de un peso molecular mayor.

A partir de estos resultados, se decidió trabajar en el siguiente ensayo utilizando UV *cross – linking* y con 1 %

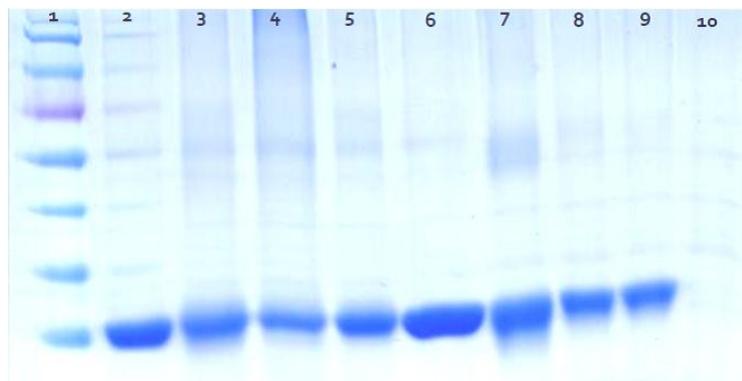


Figura 4.3.3. Corrida electroforética luego de someter a la TcTIM a diferentes procedimientos de *cross – linking*. Referencias: 1- Marcador de peso molecular. 2- TcTIM, sin *cross – linking*. 3- TcTIM, UV *cross – linking*. 4- TcTIM + compuesto 176 a 3,5 μ M, UV *cross – linking*. 5- TcTIM + compuesto 176 a 35 μ M, UV *cross – linking*. 6- Ídem 2. 7- TcTIM, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 8- TcTIM + compuesto 176 a 3,5 μ M, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 9- TcTIM + compuesto 176 a 35 μ M, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 10- Compuesto 176, *cross – linking* 1 % de formaldehído.

de formaldehído.

En la siguiente experiencia se decidió emplear el compuesto **176** (figura

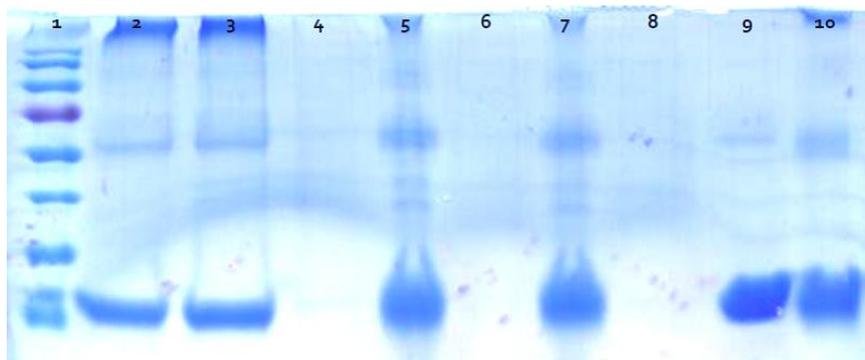
4.2.1), como un control positivo de la monomerización de la TcTIM. Por lo tanto se esperaba una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al estado dimerico de la misma. En la figura 4.3.3 se muestra el gel correspondiente a este ensayo. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En el carril 2 y 6, se sembró la proteína sin previo *cross – linking*, por lo que se observa una banda intensa de aproximadamente 27 kDa correspondiente a la proteína en su estado monomérico; además se observan en el carril 2, bandas correspondientes a contaminación con el marcador de peso molecular. En el carril 3 se sembró la TcTIM sometida previamente un proceso de UV cross-linking. En este carril se esperaba observar proteína dimerica. Se observa una banda muy tenue a un peso de aproximadamente 54 kDa. En el carril 4 y 5 se sembró la TcTIM con 3,5 y 35 μM de compuesto **176**, respectivamente, sometida a un proceso de UV *cross – linking*, luego de la incubación. Entonces, se espera observar que la banda que aparece en el carril 3 correspondiente al dímero de TcTIM, disminuya su intensidad. Sin embargo, no se observa tal fenómeno; sino que la banda correspondiente al dímero del carril 3, se ve aun más intensa en el carril siguiente y también se observa en el carril 5. En el carril 7 se observa el resultado del *cross – linking* de TcTIM con 1 % de formaldehído, se observa una banda de aproximadamente 54 kDa no muy definida, pero bastante intensa. En el carril 8 y 9 se sembró la TcTIM 3,5 y 35 μM de compuesto **176**, respectivamente, sometida a un proceso de *cross – linking* con 1 % de formaldehído, luego de la incubación. Se observa que en el carril 8 la intensidad de la banda correspondiente al dímero disminuye su intensidad; y es aun más notoria la disminución cuando la proteína fue incubada con una concentración de compuesto 10 veces más alta. Este es un resultado coherente a lo esperado, ya que al aumentar la cantidad de compuesto, menor es la estabilidad de la estructura dimerica de la TcTIM. En el carril 10 se sembró el compuesto **176** a una concentración de 35 μM con previo *cross – linking* con 1 % de formaldehído, de manera de analizar si se producían interacciones inespecíficas entre el compuesto y el formaldehído; no observándose ninguna banda en este carril.

Empleando la exposición a luz UV como proceso para realizar un *cross – linking* no se obtuvieron buenos resultados, ya que se esperaba que la intensidad de la banda correspondiente al dímero de TcTIM, disminuya su intensidad a concentraciones

crecientes de compuesto **176**. Sin embargo, el *cross – linking* con formaldehído arrojó resultados más alentadores, ya que a medida que se aumenta la concentración del compuesto **176** se ve que la banda correspondiente a la proteína dimérica, se va desvaneciendo. A partir de los resultados obtenidos en esta instancia experimental se decidió que en ensayos posteriores, el *cross – linking* se realizaría con 1 % de formaldehído, ya que se obtuvieron mejores resultados.

Una vez realizada la puesta a punto del ensayo, se decide analizar el efecto de los compuestos bis – tiazólicos **JM09** y **JM12** previamente sintetizados en este trabajo y del compuesto que resultó poseer ciertas características como inhibidor de la actividad catalítica de TcTIM

de estructura bis – tiazólica, el compuesto **VIII**. Estos compuestos fueron ensayados a una



concentración de 25 μM ; y también se empleó el compuesto **176** a una concentración de 35 μM como un

Figura 4.3.4. Corrida electroforética luego de someter a la TcTIM a diferentes procedimientos de *cross – linking*. Referencias: 1- Marcador de peso molecular. 2- TcTIM, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 3- TcTIM + compuesto **VIII**, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 4- Compuesto **VIII**, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 5- TcTIM + compuesto **JM12**, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 6- Compuesto **JM12**, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 7- TcTIM + compuesto **JM09**, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 8- Compuesto **JM09**, *cross – linking* 1 % de formaldehído. 9- Ídem 2. 10- TcTIM + compuesto **176** a 35 μM , *cross – linking* 1 % de formaldehído.

control positivo. En la figura 4.3.4 se observa el gel resultante de este ensayo. En los carriles 2 y 9 se sembraron la misma muestra, la TcTIM sometida a un proceso de *cross – linking* con 1 % de formaldehído, por lo que se observa una banda de aproximadamente 54 kDa que pertenece a la estructura dimérica de la proteína. En los carriles 4, 6 y 8 se sembraron los compuestos **VIII**, **JM12** y **JM09** respectivamente luego de ser sometidos a *cross – linking* con formaldehído 1 %. No se observan bandas en estos carriles. En el carril 3 se observa la muestra de TcTIM tratada con el compuesto **VIII** y posterior *cross – linking* con 1 % de formaldehído. En caso de que este compuesto disrumpa la interfase del dímero, o provoque inestabilidad del mismo, se

esperaría observar que la banda correspondiente al dímero, pierda intensidad. Lo mismo esperaríamos en los carriles 5, 7 y 10 en los cuales se realizó la incubación de la TcTIM con los compuestos **JM12**, **JM09** y **176**, respectivamente. Sin embargo, no se obtienen resultados alentadores, ya que no se observa tal efecto. La banda correspondiente al dímero de TcTIM presenta aun más intensidad cuando fue incubada en presencia de compuestos que en ausencia de estos.⁴

En la tabla 4.3.1 se resumen los resultados obtenidos en ésta instancia experimental. En un principio, el proceso para realizar el *cross – linking* con 1 % de formaldehído y exposición a luz UV parecieron ser los procedimientos adecuados con respecto a los resultados que se obtuvieron; ya que se logró formar interacciones covalentes entre los monómeros de TcTIM. En la segunda instancia se emplearon estos procedimientos, pero además se realizó incubación previa de la TcTIM en presencia de compuesto **176**; el cual se empleó como un control positivo de desestabilización de la estructura dimérica de la proteína. Los mejores resultados se obtuvieron empleando 1 % de formaldehído para realizar el *cross – linking*, ya que se observó disminución de la banda, correspondiente al dímero de TcTIM, a medida que aumenta la concentración de compuesto **176**. Entonces en un ensayo, en el cual se realizó la incubación previa de TcTIM con diferentes compuestos (**176**, **VIII**, **JM09** y **JM12**), se evaluó la capacidad de cada uno de los compuestos de provocar el efecto deseado en la estabilidad del dímero de TcTIM. No se obtuvieron resultados claros, ya que las bandas correspondientes al dímero, no parecen disminuir su intensidad en presencia de ninguno de los compuestos; inclusive en presencia del compuesto **176**.

No se obtuvieron resultados reproducibles empleando esta técnica; tal vez por la formación de interacciones inespecíficas entre el formaldehído, los compuestos y los aminoácidos de la proteína. Por lo tanto, se descartó la misma como metodología de evaluación de la disrupción de la interfase de TcTIM.

⁴ Además, como se presentará en el próximo apartado, el compuesto **JM12** posee una buena capacidad de disrupción de TcTIM a la concentración de trabajo en estos experimentos.

Tabla 4.3.1. Resumen de los resultados obtenidos a partir de los ensayos para evaluar la desestabilización del dímero de TcTIM, mediante *cross-linking* y SDS – PAGE.

Condiciones de <i>cross-linking</i> .	TcTIM	Compuestos	Resultados
1 % de formaldehído	(10 µg/20 µL)	—	Banda definida de 54 kDa aprox. y banda correspondiente al monómero.
4 % de formaldehído			Banda menos definida de 54 kDa aprox. y banda correspondiente al monómero.
UV			Banda definida 54 kDa aprox., banda de mayor peso molecular de menor intensidad y banda correspondiente al monómero.
1 % de formaldehído	(10 µg/20 µL)	Compuesto 176 (3,5 y 35 µM).	La banda correspondiente al dímero (54 kDa) disminuye su intensidad a medida que aumenta concentración de compuesto 176 .
UV			No se observa desaparición de banda de 54 kDa a medida que aumenta la concentración de compuesto 176 .
1 % de formaldehído	(10 µg/20 µL)	Compuestos 176 (35 µM), VIII , JM09 y JM12 (25 µM).	No se observa el efecto de los compuestos como disruptores de la interfase de TcTIM.

4.4 Ensayo de inhibición de la actividad de TcTIM

Dado que ninguna de las aproximaciones realizadas (ver secciones 4.2 y 4.3) para sustituir el ensayo tradicional de inhibición de TcTIM dio los resultados deseados, se decidió evaluar la capacidad de los compuestos de inhibir la actividad catalítica de la TcTIM por la metodología habitual.

Para esto, se realizó el ensayo enzimático convencional en la dirección gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.4.1.

Tabla 4.4.1. Resultados del ensayo de inhibición de TcTIM. PI (25 μ M): porcentaje de inhibición de la catálisis a una concentración de 25 μ M de compuesto.

Código	PI (25 μ M)
JM02	0
JM03	20 \pm 3
JM04	20 \pm 2
JM05	23 \pm 3
JM06	30 \pm 3
JM08	50 \pm 5
JM09	0
JM10	0
JM11	40 \pm 5
JM12	60 \pm 6
VIII	100 \pm 10 (a 100 μ M)

Como se puede observar en la tabla 4.4.1 los compuestos **JM03**, **JM04**, **JM05**, **JM06**, **JM08**, **JM11** y **JM12** desarrollan cierta capacidad de inhibición de la enzima.

Así, los bromometil intermedios **JM03**, **JM04** y **JM06**, resultaron inhibir la actividad enzimática en un 20 a 30 %. **JM03** y **JM06** son, además, compuestos tiazólicos; ambos presentan un fragmento idéntico en su estructura, sin embargo los sustituyentes en el nitrógeno de la cadena lateral y en el nitrógeno tiazólico son diferentes. Al sustituir los anillos aromáticos, que presenta el compuesto **JM03** en ambas posiciones, por un furano y un agrupamiento alilo (compuesto **JM06**) (tabla 4.1.1), se obtuvo una leve mejoría en la inhibición de la TcTIM.

Por otro lado, respecto a los bis – tiazoles, se observa que el compuesto **JM05** es un inhibidor leve, 23 % a 25 μ M. Los resultados más destacados se obtuvieron con los bis – tiazoles **JM08**, **JM11** y **JM12**. Al analizar las estructuras de estos tres compuestos, se

destaca la presencia del sustituyente 5-sulfo2-furilo en una o las dos posiciones Ar (figura 2.1). Entonces, esto aporta información sobre los agrupamientos que más contribuyen en la inhibición de la proteína. Tal como se destaca en los antecedentes, el grupo sulfónico ha sido identificado previamente (figura 1.2.3), evidenciándose a través de estudios teóricos que interaccionaría con aminoácidos de la interfase de la TcTIM. Otra observación destacable, es que la presencia del sustituyente alilo en el nitrógeno tiazólico y el furilo a cuatro enlaces del nitrógeno de la cadena lateral, mejoran la actividad (compuesto **JM12**).

Los demás compuestos bis – tiazólicos **JM02**, **JM09** y **JM10** no resultaron inhibir la actividad catalítica de TcTIM.

4.5 Evaluación de actividad frente a *T. cruzi*

Se estudia si los compuestos sintetizados en el presente trabajo de tesina, poseen actividad anti – *T. cruzi* como forma de reconocer su potencial actividad como agentes antichagásicos. Se trabaja con la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2. En primera instancia se determina el porcentaje de inhibición del crecimiento (PI) a una concentración fija de 25 μ M de un cultivo de 5 días de crecimiento; y luego se trabaja a concentraciones variables para determinar el IC₅₀ de cada compuesto. Este último corresponde a la concentración necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento de los parásitos [80, 81]. En la Tabla 4.5.1 se muestran los resultados de este ensayo utilizando los compuestos desarrollados en el presente trabajo.

Observando los resultados biológicos y haciendo un análisis de las modificaciones estructurales realizadas se pueden extraer ciertas observaciones relevantes (figura 4.5.1). Así, el primer bis – tiazol sintetizado que fue el compuesto **JM02** (simétrico) resultó carecer de actividad antiproliferativa frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* a la dosis de ensayo; luego se realizaron distintas sustituciones, a nivel del nitrógeno tiazólico y se variaron los sustituyentes aromático de las cadenas imínicas. De esta forma, el bis - tiazol **JM05** con dos sustituyentes diferentes a **JM02**, un grupo alilo en el nitrógeno tiazólico y un bromopirimidinilo en la correspondiente cadena imínica,

presentó un PI de 18 % a 25 μM ; mostrando un incremento de la actividad. Mientras que **JM10**, que mantiene el patrón de sustitución de **JM05** excepto la sustitución del bromopirimidinilo por un sustituyente más lipófilo como el 2-naftilo, no resultó inhibir el crecimiento de *T. cruzi* a la concentración del ensayo. Por ello, cuando se sustituye manteniendo el mismo patrón de sustitución que en **JM05**, el bromopirimidinilo por un grupo algo más hidrofílico como el propenilfurilo, en **JM09**, se obtiene el compuesto más activo con IC_{50} de 11 μM . Cabe destacar que este valor es del mismo orden que el fármaco de referencia en este ensayo, **Nfx**. Por otro lado, es levemente menos activo en el parásito entero que el compuesto padre, **VIII** (IC_{50} menor a 3,5 μM), lo que estaría indicando que un aumento de la lipofilia en **JM09**, por la sustitución de un alilo por fenilo por un lado y de un propenilfurilo por fenilo por el otro, conduce a un pequeño detrimento en la actividad antiproliferativa. Similarmente ocurre cuando a **JM02** se le cambia uno de los sustituyentes fenilo, en la posición imínica, por un sulfonilfuranilo, más hidrofílico aún, dando lugar a **JM11** que presentó un PI de 40 % lo que indica que hubo un incremento considerable de la actividad antiproliferativa, respecto a **JM02**.

Tabla 4.5.1. Resultados de actividad antiproliferativa de los compuestos sintetizados sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. PI= porcentaje de inhibición de crecimiento a 25 μM . IC_{50} = concentración

CÓDIGO	PI (%)	IC_{50} (μM)
JM01	60 \pm 8	19 \pm 2
JM02	0	>> 25
JM03	94 \pm 9	5,3 \pm 0,1
JM04	96 \pm 9	2,5 \pm 0,1
JM05	18 \pm 5	>> 25
JM06	90 \pm 7	5,5 \pm 0,2
JM07	3,0 \pm 0,3	>> 25
JM08	0	>> 25
JM09	80 \pm 6	11 \pm 1
JM10	3,0 \pm 2	>> 25
JM11	40 \pm 7	~ 25
JM12	25 \pm 2	54 \pm 6
Nfx	100 \pm 9	7,7 \pm 1

Finalmente, combinando los sustituyentes sulfonilfurano y propenilfurano se obtienen los compuestos **JM08** y **JM12** resultando compuestos más hidrofílicos y este último el tercero en actividad.

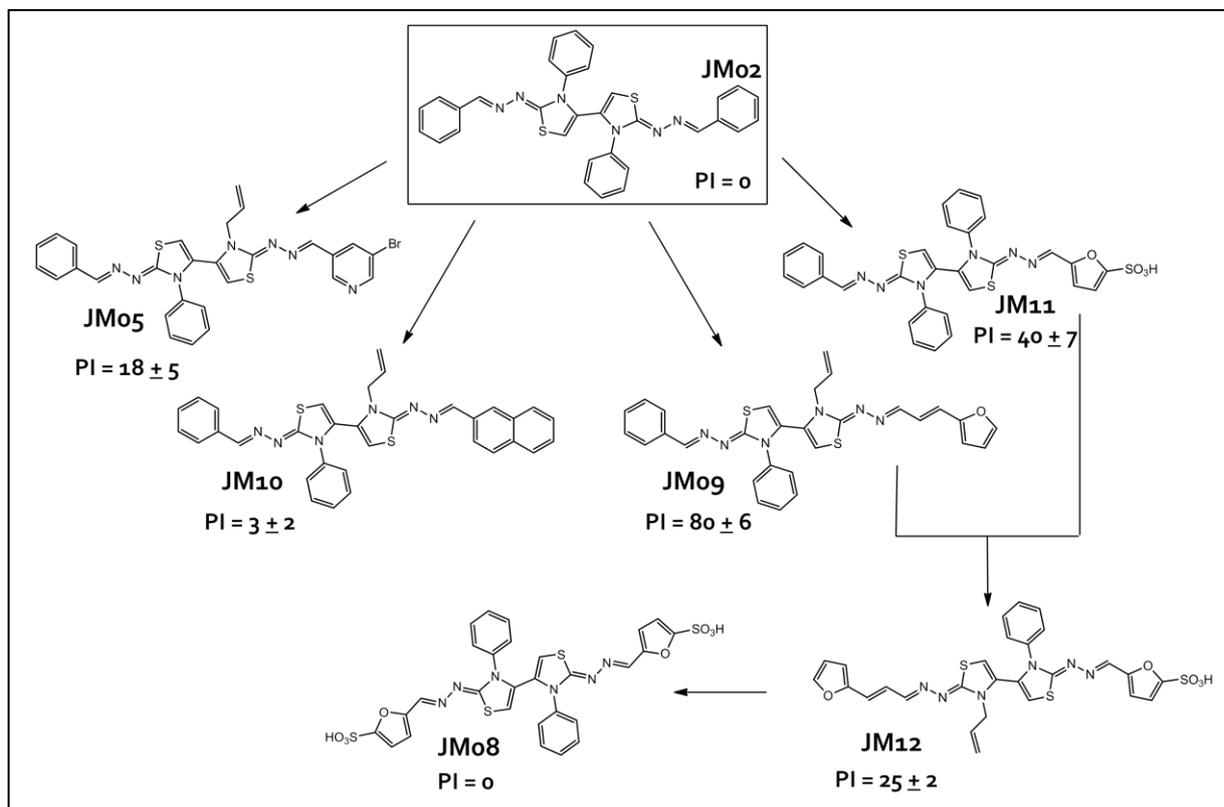


Figura 4.5.1. Estructuras moleculares de los compuestos bis-tiazólicos sintetizados. Se indica el PI de cada compuesto.

Los compuestos intermedios **JM03**, **JM04** y **JM06** resultaron ser los más activos con IC_{50} entre 2,5 y 5,5 μM siendo esto esperable dado que los mismos poseen un fragmento bromometilo muy reactivo que puede reaccionar con nucleófilos biológicos [82].

4.6 Citotoxicidad inespecífica en macrófagos murinos

Para determinar la toxicidad inespecífica en células mamíferas de los compuestos se utilizó la técnica de evaluación de citotoxicidad en macrófagos murinos [22], de manera de obtener una relación entre la capacidad anti – *T. cruzi* y la citotoxicidad en

mamíferos. Lo que se pretende con este ensayo es analizar la selectividad de los compuestos por los parásitos; por lo tanto, se espera que aquellos compuestos que presenten actividad anti – *T. cruzi*, no sean citotóxicos en macrófagos murinos [83, 84]. En la tabla 4.6.1 se muestran los resultados obtenidos de este ensayo; en el mismo se evaluaron los compuestos **JM03**, **JM04**, **JM06** y **JM09** que fueron aquellos que presentaron mayor actividad anti – *T. cruzi*.

Tabla 4.6.1. Resultados del ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos J774. Referencias: IC_{50} : concentración a la cual elimina el 50 % de macrófagos; IS: Índice de selectividad, $IS = IC_{50, \text{macrófagos murinos}} / IC_{50, T. cruzi}$.

Compuesto	IC_{50} macrófagos (μM)	IS
JM03	< 25	< 4,7
JM04	33	13,2
JM06	46	0,8
JM09	200	18,2
Nfx*	316	41,0
Tbf*	339	19,9
Ktz*	< 100	< 10

*Datos bibliográficos [85]. **Nfx**: nifurtimox; **Tbf**: terbinafina; **Ktz**: ketoconazol.

Para evaluar la selectividad de cada compuesto se determina el índice de selectividad, mediante el cociente: $IC_{50, \text{macrófagos murinos}} / IC_{50, T. cruzi}$. Entonces, se espera que aquellos que sean más selectivos a *Trypanosoma cruzi* que a macrófagos murinos, presenten un índice de selectividad alto (tabla 4.6.1).

Se emplearon tres agentes de referencia (**Nfx**, **Tbf** y **Ktz**) de manera de comparar los resultados obtenidos.

Como se puede ver en la tabla 4.1.1, los compuestos **JM03**, **JM04** y **JM06** son intermedios para la obtención final de los compuestos bis – tiazólicos, que presentan un fragmento muy reactivo (bromometilcarbonilo), resultan con selectividad hacia los parásitos variables destacándose el intermedio **JM04** con una correcta selectividad. Sin embargo, se debe destacar el resultado obtenido con **JM09**, el único bis – tiazol

ensayado, que presenta casi veinte veces mayor selectividad hacia la forma epimastigote de *T. cruzi* que a macrófagos murinos. Comparando este compuesto con los agentes de referencia, se puede observar que el compuesto **JM09** es más selectivo que el ketoconazol, empleado actualmente para el tratamiento de infecciones micóticas y propuesto como agente antichagásico. Además, el compuesto **JM09** presenta una selectividad similar a la terbinafina, un antimicótico de amplio espectro utilizado para combatir dermatofitos e infecciones por levaduras y de igual forma propuesto como agente antichagásico. Una característica importante de este compuesto bis – tiazólico es su insolubilidad a altas concentraciones; ya que a la concentración ensayada (200 μ M), se observaron al microscopio agregados del mismo. Por lo tanto, se sabe que a esa concentración no presentó citotoxicidad; sin embargo no se puede conocer su efecto a concentraciones mayores. Entonces podría ocurrir que el IS del compuesto **JM09** fuese aún mayor.

4.7 Estudio de relación estructura-actividad

Se emplearon herramientas informáticas online <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> y <http://www.organic-chemistry.org/proq/peo>, de manera de estudiar los parámetros teóricos moleculares de los compuestos sintetizados, estas herramientas permiten analizar la capacidad de los compuestos como posibles fármacos. Se obtienen resultados de cálculos teóricos de diferentes propiedades fisicoquímicas, importantes en el momento de estudiar un posible fármaco; entre estas propiedades se destacan: ADME (absorción, distribución, metabolización y eliminación), permeabilidad, solubilidad, toxicidad, mutagenicidad, entre otras [86, 87]. En la tabla 4.7.1 se muestran los resultados teóricos obtenidos. Las propiedades son definidas en la sección *materiales y métodos*.

Como se explica anteriormente, la toxicidad de un compuesto está dada por parámetros como mutagenicidad y tumorigenicidad, entre otros. En la tabla los resultados del análisis de estas dos propiedades se muestran en colores: verde

(probablemente sin efecto), anaranjado (probablemente con efecto medio) y rojo (probablemente con efecto máximo).

Tabla 4.7.1. Resultados obtenidos de cálculos teóricos. Referencias: **IC₅₀ (μM)**: concentración a la cual inhibe el 50 % del crecimiento de *T. cruzi*; **LogP**: log₁₀ de la lipofilia; **LogS**: log₁₀ de la solubilidad; **Mut.**: mutagenicidad; **Tum.**: tumorigenicidad; **PM**: peso molecular; **Drug-likeness**: permite evaluar cuánto el compuesto se parece a un fármaco, **Drug-score**: permite evaluar el potencial de un compuesto para ser clasificado como fármaco, **TPSA**: área polar topológica de la superficie molecular, **Aceptores de EDH**: número de átomos presentes en la molécula capaces de aceptar EDH, **Dadores de EDH**: número de átomos en la molécula capaz de ceder H para formar un EDH; y **Vol.**: volumen.

Comp.	IC ₅₀ (μM)	LogP	LogS	Mut.	Tum.	PM	Drug-likeness	Drug-score	TPSA	Acep de EDH	Dadores de EDH	Vol.
JM01	19	3,42	-4,05			240	-1,52	0,45	24,391	2	1	218,976
JM02	>>25	8,79	- 10,35			556	4,03	0,17	59,324	6	0	486,286
JM03	5,3	4,68	-6,13			399	-2,85	0,05	46,733	4	0	303,131
JM04	2,5	4,2	-5,58			417	-9,51	0,06	70,897	5	1	321,96
JM05	>> 25	7,76	-9,05			599	0,56	0,14	72,216	7	0	473,139
JM06	5,5	3,74	-4,68			393	-6,51	0,07	59,873	5	0	285,24
JM07	>> 25	0,27	-2,37			325	1,56	0,83	103,928	7	3	252,396
JM08	>>25	2,36	-6,45			696	4,34	0,31	194,344	14	2	528,32
JM09	11	7,61	-8,99			536	2,31	0,11	72,464	7	0	468,395
JM10	>> 25	9,32	-10,62			570	-0,07	0,1	59,324	6	0	503,402
JM11	~ 25	5,58	-8,4			626	4,38	0,21	126,834	10	1	507,303
JM12	50	4,39	-7,04			606	2,59	0,16	139,974	11	1	516,288

El parámetro “*Drug – likeness*” aporta información sobre una posible interacción del compuesto con una biomolécula, o sea su semejanza al comportamiento de un fármaco; no se encuentra acotado a ningún valor, sino que cuanto más grande es este valor, mejor es tal interacción.

El “*Drug – score*” de un compuesto (valores entre 0 y 1), da una idea del carácter, de este compuesto, como fármaco; por lo tanto cuanto más se acerque este valor a 1, mas características de fármaco posee el mismo.

También se trabaja aplicando las reglas de Lipinski. El mismo establece que para que un compuesto sea considerado como un fármaco debe cumplir con 5 reglas, que se denominan Reglas de los cinco [88]; las mismas son:

- n° de dadores de EDH < 5
- n° de aceptores de EDH < 10
- LogP < 5
- PM < 500 g/mol
- se consideran excepciones los sustratos de transportadores y los productos naturales

La biodisponibilidad de un fármaco vía oral, depende de un balance entre su lipofilia e hidrofilia. Para poder absorberse un fármaco debe encontrarse en solución y su velocidad de absorción adecuada, de manera que sea proporcional a la concentración de ambos lados de la pared intestinal; sin embargo si un compuesto es demasiado polar, se encontrarán dificultades para atravesar membranas biológicas [89, 90].

Se decide analizar sólo el LogP, ya que los parámetros de lipofilia (LogP) y solubilidad en agua (LogS) tienen cierta correlación, porque la solubilidad en agua condiciona el coeficiente de reparto octanol/agua.

De manera de analizar ordenadamente, los compuestos sintetizados en el presente trabajo, se comienza con el análisis de los compuestos intermedios. Los compuestos **JM03**, **JM04** y **JM06** fueron lo que presentaron mejor IC₅₀ frente a *T. cruzi*, 5,3, 2,5 y 5,5 µM respectivamente. Esto significa que a esas concentraciones, estos compuestos, fueron capaces de inhibir el crecimiento de los parásitos en un 50 %. Estos tres compuestos cumplen con todas las reglas de Lipinski, ya que el número de dadores de EDH no supera 5, el número de aceptores de EDH no supera 10, sus LogP son menores a 5 unidades y el peso molecular de estos compuestos se encuentra por debajo de 500 g/mol. Sin embargo, en las columnas Mut. y Tum. se observan los resultados de mutagenicidad y tumorigenicidad respectivamente, y como se puede ver estos compuestos probablemente presenten efectos de tal índole. Además, mediante el ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos, se pudo comprobar que los compuestos **JM03** y **JM06** resultaron ser compuestos citotóxicos, mas aun que el

compuesto **JM04**, que presentó mayor selectividad por *T. cruzi*. Este hecho, que estas herramientas informáticas evidencian, ya había sido predicho cuando se observaba en su estructura la presencia del agrupamiento bromometilcarbonilo. Los datos de “Drug – likeness” de estos compuestos son negativos, por lo tanto no se asemejarían a fármacos. Por lo tanto, los resultados de “Drug – score” de **JM03** (0,05), **JM04** (0,06) y **JM06** (0,07) son muy bajos, esto significa que los mismos, no presentarían características de un fármaco.

Mientras que para los productos de partida **JM01** y **JM07**, tiosemicarbazonas (tabla 4.1.1), los “Drug – score” son 0,45 y 0,83 respectivamente, además cumplen con las reglas de Lipinski, aparentemente estos presentarían mas semejanza a un fármaco; sin embargo, estos compuestos no se destacaron por su capacidad de inhibir el crecimiento de *T. cruzi*.

A continuación se analizan los resultados obtenidos con los compuestos bis – tiazólicos.

JM02 infringe algunas de las reglas de Lipinski, su LogP es mayor a 5 y su peso molecular supera 500 g/mol; sin embargo, este compuesto no presenta fragmentos que puedan contribuir a actividad mutagénica y tóxica. El “Drug – likeness” obtenido, es relativamente bueno 4,03; pero el “Drug – score” es bajo, por lo tanto no presentaría características de fármaco. A pesar de estos resultados teóricos, este compuesto no presentó actividad anti – *T. cruzi*.

El bis – tiazol **JM05**, presenta parámetros similares, y tampoco presentó actividad relevante anti – *T. cruzi*.

El compuesto **JM08**, resultó ser inactivo en *T. cruzi*, pero sus características como fármaco son mejores que **JM05**, infringe dos reglas de Lipinski, el PM y el numero de aceptores de EDH. Sin embargo posee, un “Drug – likeness” alto, y un “Drug – score” de 0,31; y además parecería no poseer fragmentos moleculares asociados a actividad mutagénica o tumorogénica.

El compuesto bis – tiazólico que presentó mejor actividad anti – *T. cruzi in vitro* fue el **JM09**, el mismo presenta un LogP de 7,61 lo que indica que es un compuesto

hidrofóbico y podría presentar poca absorción. Su peso molecular es de 536 g/mol, presenta un “Drug – likeness” relativamente bueno pero su “Drug – score” no es muy importante. Además, por el resultado de mutagenicidad, el mismo presentaría fragmentos que podrían causar mutaciones en ácidos nucleicos; para poder confirmar este fenómeno es necesario realizar un ensayo experimental.

El compuesto **JM10** presenta alta hidrofobicidad, su “Drug – score” es muy bajo y no presentó actividad anti – *T. cruzi in vitro*.

JM11 y **JM12**, aunque no fueron capaces de inhibir el crecimiento de *T. cruzi in vitro* en gran medida, presentan un “Drug- likeness” relativamente bueno, sin embargo no sucede lo mismo con sus “Drug – score”. Además, el compuesto **JM12** presentaría actividad mutagénica.

Es importante destacar que los compuestos bis – tiazólicos en su mayoría poseen alto peso molecular; en general son hidrofóbicos, lo que dificulta su solubilidad en agua; y por lo tanto afectaría la absorción de los mismos. El compuesto **JM09**, fue el que presentó mayor capacidad inhibitoria del crecimiento parasitario *in vitro* y su IC₅₀ frente a macrófagos murinos fue alto. Por lo tanto, son necesarios otros ensayos pre – clínicos para poder establecer definitivamente si podría llegar a convertirse en un fármaco.

Con respecto a la actividad inhibitoria de *TcTIM* los parámetros PSA, TPSA y MLP (potencial de lipofilidad molecular) son necesarios tenerlos en cuenta. La enzima *TcTIM* posee una región hidrofóbica en su interfase [35], por lo tanto aquellos compuestos que poseen cierto carácter hidrofóbico, podrían interactuar con esta región, y promover la disrupción de la interfase, pero también se ha descrito que compuestos con grupos polares, como el ácido sulfónico, puede presentar algún tipo de interacción. Por lo tanto, la lipofilia debería presentar una relación con esta actividad biológica. Así es que se estudia la relación entre la lipofilia de estos compuestos (LogP, tabla 4.7.1) y su capacidad para inhibir *TcTIM*. La familia de bis – tiazoles muestra un comportamiento cuadrático (figura 4.7.1). Lo mismo ocurre cuando se analiza la relación entre la propiedad TPSA y la capacidad en inhibir *TcTIM*

(figura 4.7.2), un comportamiento cuadrático. Estos comportamientos cuadráticos, entre ambas propiedades fisicoquímicas y la capacidad de inhibir la enzima, son típicos de las interacciones fármacos-biomoléculas que muestran la necesidad de una lipofilia óptima o una superficie expuesta a disolvente óptima.

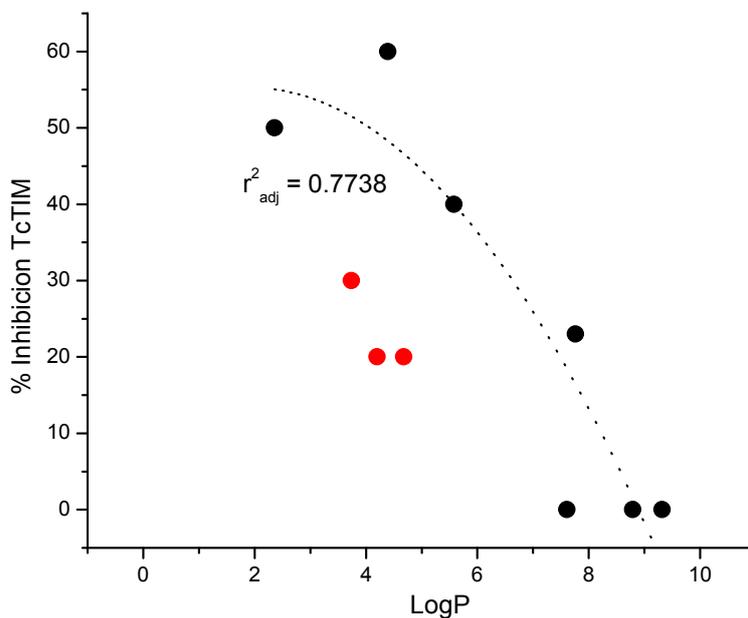
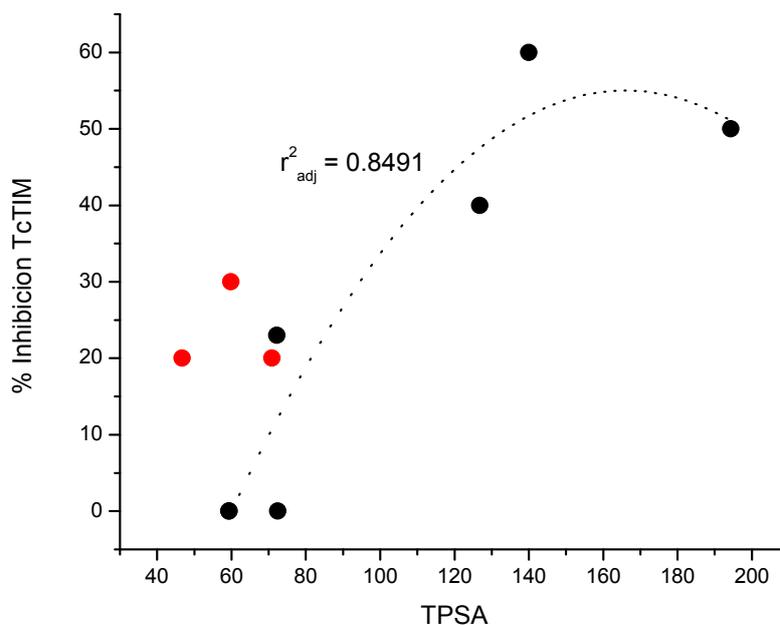


Figura 4.7.1. Gráfico LogP vs. % de inhibición de TcTIM a 25 μ M. En negro se muestran los bis-tiazoles estudiados y en rojo los intermedios de reacción. La correlación no incluye a los intermedios de reacción.

Figura 4.7.2. Gráfico TPSA vs. % de inhibición de TcTIM a 25 μ M. En negro se muestran los bis-tiazoles estudiados y en rojo los intermedios de reacción. La correlación no incluye a los intermedios de reacción.



Dado que se encontró una buena correlación entre lipofilia y actividad inhibitoria de TcTIM en el presente trabajo se analiza el parámetro MLP de los candidatos a disruptores de la interfase de TcTIM. En primera instancia, se analiza el MLP del compuesto **176**; el cual, como ya se explicó anteriormente, por estudios de *docking* el mismo se posiciona en el sitio catalítico de TcTIM. Entonces su MLP indicará las características de lipofilia de la contraparte en la enzima. En la figura 4.7.3 se observa el MLP del compuesto **176**; como se puede ver presenta una gran parte de su superficie con característica hidrofílica.

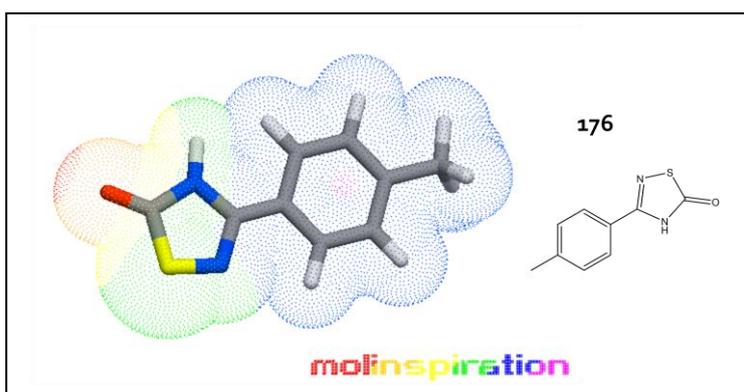


Figura 4.7.3. Estructura 3D obtenida para el compuesto **176**. Referencias: violeta/azul mayor lipofilia – rojo/naranja menor lipofilia, pasando por amarillo/verde lipofilia intermedia.

El otro compuesto que fue analizado mediante esta herramienta, fue **JM09** (figura 4.7.4). Se puede observar que este compuesto posee una mayor superficie lipofílica que el compuesto **176**, entonces podría ser un buen candidato para intervenir en la interfase de la proteína blanco más que en el sitio donde interactúa el compuesto **176**. Sin embargo, los datos experimentales indican que este compuesto no posee capacidad inhibitoria de TcTIM en las condiciones ensayadas, lo que estaría indicando que su lipofilia es demasiado elevada para presentar actividad inhibitoria.

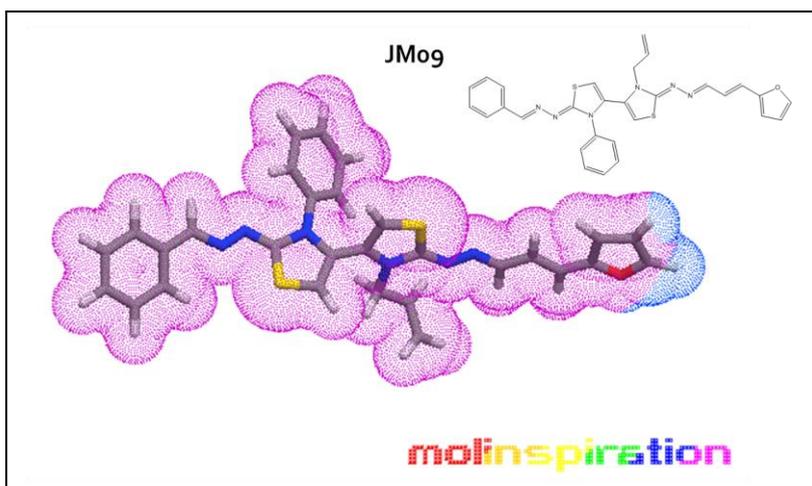


Figura 4.7.4. Estructura 3D obtenida para el compuesto **JM09**. Referencias: violeta/azul mayor lipofilia – rojo/naranja menor lipofilia, pasando por amarillo/verde lipofilia intermedia.

El compuesto **JM12** también fue analizado mediante este estudio (figura 4.7.5), ya que el mismo presentó la mayor actividad frente *TcTIM* dentro de los compuestos desarrollados en este trabajo. Claramente se observa un mapa de lipofilia completamente diferente al mapa del derivado inactivo **JM09** y diferente al del inhibidor **176** que no actúa a nivel de la interfase de la enzima. Se observa que una parte de su estructura es hidrofóbica, por lo tanto sería capaz de intervenir en el bolsillo hidrofóbico presente en la interfase de *TcTIM*. Pero, además, posee un claro fragmento hidrofílico proveniente del grupo sulfónico que podrá promover otras interacciones favorables dentro de la interfase.

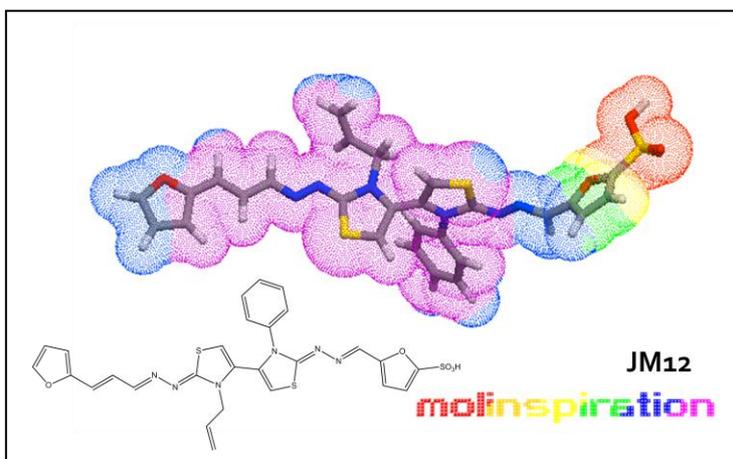


Figura 4.7.5. Estructura 3D obtenida para el compuesto **JM12**. Referencias: violeta/azul mayor lipofilia – rojo/naranja menor lipofilia, pasando por amarillo/verde lipofilia intermedia.

5. Conclusiones y perspectivas

5.1. Conclusiones

Se sintetizaron y caracterizaron siete nuevos productos bis – tiazólicos finales. Se tomó como compuesto de referencia el primer producto bis – tiazólico sintetizado, el compuesto **JM02**; para realizar modificaciones en los sustituyentes y poder analizar los cambios en la actividad anti – *T. cruzi*.

El derivado bis – tiazólico **JM09** (figura 5.1.1) resultó ser un excelente inhibidor del crecimiento de *T. cruzi*, presentando un IC₅₀ de 11 µM. También se obtuvieron cinco productos intermedios, tres de los cuales (**JM03**, **JM04** y **JM06**, figura 5.1.1) presentaron actividad tripanosomicida.

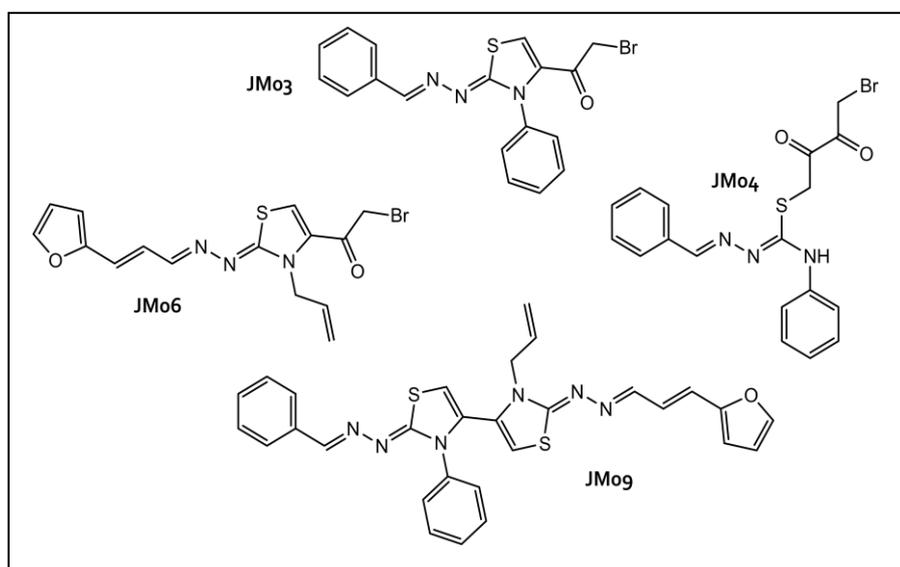


Figura 5.1.1. Estructuras de los compuestos activos frente a la forma epimastigote de *T. cruzi*.

Además se realizaron ensayos de citotoxicidad en la línea celular de macrófagos murinos J774 con aquellos compuestos que resultaron ser activos en *T. cruzi*. De esta manera, se pudo obtener un índice de selectividad de cada compuesto; resultando los compuestos **JM04** (índice de selectividad 13,2) y **JM09** (índice de selectividad 18,2) ser los más selectivos. En lo que respecta al compuesto de mayor interés, el **JM09**, mostró ser casi veinte veces más selectivo frente a *T. cruzi* que a macrófagos murinos.

Se trabajó sobre la posibilidad de desarrollar una técnica alternativa, a la evaluación de inhibición de la actividad catalítica, para evaluar compuestos disruptores de la interfase del dímero de TcTIM. Intentando poner a punto una técnica que aplica espectroscopía de fluorescencia; sin embargo a partir de estos resultados se pudo observar que la técnica no permite discriminar entre compuestos disruptores y no disruptores de la interfase de TcTIM.

Otra de las técnicas analizada en el presente trabajo, implica *cross – linking* y electroforesis SDS – PAGE, pero los resultados obtenidos, no fueron alentadores ni reproducibles. Esta técnica tampoco es conveniente para discriminar nuevos disruptores de la interfase del dímero de TcTIM.

Como método de evaluación de los compuestos frente a TcTIM se realizó el ensayo convencional de inhibición de catálisis enzimática; ya que no se logró desarrollar una técnica conveniente para discriminar entre compuestos disruptores y no disruptores del dímero.

El mejor resultado se obtuvo con un compuesto bis – tiazólico, que presenta en su estructura el grupo funcional ácido sulfónico; característico de compuestos previamente identificados como disruptores de la interfase de TcTIM. Por lo tanto, este es un agrupamiento a tener en consideración en el futuro diseño de moléculas candidatas para producir este efecto en la proteína blanco.

Un resultado interesante, es que este compuesto, **JM12**, presentó baja actividad frente a *T. cruzi*, lo cual podría deberse a problemas de solubilidad del mismo; ya que en su gran mayoría estos compuestos resultaron ser insolubles a altas concentraciones.

El compuesto **JM09**, no presentó actividad frente a TcTIM; sin embargo fue el compuesto que presentó mayor actividad tripamosomicida. Este último efecto de inhibición del crecimiento de los parásitos por parte de este compuesto, estará ocurriendo mediante otro mecanismo de acción con diferente blanco dentro del parásito.

Los estudios de relación estructura – actividad fueron útiles para estudiar las posibilidades, de los compuestos sintetizados, para convertirse en candidatos a fármacos. Particularmente, los resultados obtenidos con el compuesto **JM09** son alentadores, de manera que es necesario seguir investigando sobre sus propiedades bioquímicas; y estudiar posibles modificaciones químicas, de modo de mejorar su actividad anti – *T. cruzi*.

5.2 Perspectivas

Como perspectivas principales que derivan del presente trabajo de tesina se plantean los siguientes puntos:

- continuar con el trabajo sintético de otros derivados bis – tiazólicos, realizando modificaciones en los sustituyentes de modo de generar compuestos más compatibles a los modelos de fármacos. Una de las propiedades más importante a tener en cuenta, es la solubilidad de los mismos; ya que se requiere que la misma sea adecuada para una buena absorción del compuesto.
- evaluar la mutagenicidad de los compuestos que hayan resultado ser inhibidores del crecimiento de *T. cruzi*; aplicando el test de AMES, técnica que es desarrollada por parte del grupo de Química Medicinal.
- evaluar los compuestos activos y no tóxicos en un modelo murino *in vivo* agudo de la enfermedad de Chagas.

6. Bibliografía

6. Bibliografía

- [1] Dias J.P.C., Silveira A.C., Schofield C.J. The impact of chagas disease control in Latin America – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, 97:603 – 612.
- [2] Salvatella R.A. Achievements in Controlling Chagas Disease in Latin America. *WHO, Geneva* **2007**.
- [3] Moncayo A., Silveira A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, 104:17 – 30.
- [4] Moncayo A., Ortiz Y.M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2006**, 100:663 – 677.
- [5] Schofield C.J., Jannin J., Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* **2006**, 22:583 – 588.
- [6] <http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>
- [7] Salvatella R., González, J. Reservorios animales de *T. cruzi* en Uruguay. *Rev. Med. Uruguay* **1986**, 2:101 – 105.
- [8] Neghme A. Hipótesis acerca de la evolución de la tripanosomiasis americana. *Parasitología al Día* **1982**, 6:23 – 25.
- [9] Usinger R., Wygodzinsky P., Ryckrnan R. The biosystematics of Triatoinine. *Ann. Rev. Entomol.* **1966**, 2:309 – 330.
- [10] Rassi A. Jr, Rassi A., Marin-Neto J.A. Chagas disease. *The Lancet* **2010**, 375:1388 – 1402.
- [11] Rassi A., Rassi A. Jr, Rassi S.G. Doença de Chagas. En: Lopes AC, ed. *Tratado de clínica médica*, 2nd edn. Sao Paulo: Editora Roca **2009**: 4123 – 4134.
- [12] Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1971**, 13:171 – 78.
- [13] Tyler K.M., Engman D.M. The life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. En: Tyler KM, Miles MA, eds. American trypanosomiasis. *World class parasites: Boston, MA: Kluwer Academic Publishers* **2003**, 7:1 – 11.
- [14] Bock M., Gonert R., Haberkorn A. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol. Chil. Parasitol.* **1969**, 24:13 – 19.

- [15] Hall B. S., Bot C., Wilkinson S. R. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J. Boil. Chem.* **2011**, 286:13088 – 13095.
- [16] Boiani M., Piacenza L., Hernández P., Boiani L., Cerecetto H., González M., Denicola A. Mode of action of Nifurtimox and *N*-oxide – containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79:1736 – 1745.
- [17] Polak A., Richle R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1978**, 72: 228 – 232.
- [18] Diaz de Toranzo E.G., Castro J.A., Franke de Cazzulo B.M., Cazzulo J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* **1988**, 44:880 – 881.
- [19] Rodríguez Coura J., de Castro S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, 1:3 – 21.
- [20] Teixeira A.R., Cordoba J.C., Souto Maior I.C., Solorzano E. Chagas disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1990**, 43:146 – 158.
- [21] Teixeira A.R., Calixto M.A., Teixeira M.L. Chagas disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mutat. Res.* **1994**, 305:189 – 196.
- [22] Cabrera M., Lavaggi M.L., Hernández P., Merlino A., Gerpe A., Porcal W., Boiani M., Ferreira A., Monge A., López de Cerain A., González M., Cerecetto H. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti – *T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicol. Lett.* **2009**, 190:140 – 9.
- [23] González M., Cerecetto H. Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective. *Expert Opin. Ther Pat.* **2011**, 5:699 – 715.
- [24] Verlinde C.L.M.J., Hannaert V., Blonski C., Willson M., Périé J.J, Fothergill-Gilmore L.A, Opperdoes F.R, Gelb M.H, Hol W.G.J, Michels P.A.M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Updates* **2001**, 4:1 – 14.
- [25] Tellez-Valencia A., Avila-Rios S., Perez-Montfort R., Rodriguez-Romero A., Tuena de Gomez-Puyou M., Lopez-Calahorra F., and Gomez-Puyou A. Highly specific

inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 295:958 – 963.

[26] Tellez-Valencia A., Olivares-Illana V., Hernandez-Santoyo A., Perez-Montfort R., Costas M., Rodriguez-Romero A., Lopez- Calahorra F., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez-Puyou A. Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* **2004**, 341:1355 – 1365.

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

[28] Velanker S.S., Ray S.S., Gokhale R.S., Balaram H., Balaram P., Murthy M.R.N. Triosephosphate isomerase from *plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **1997**, 5:751 – 761.

[29] Cortés Figueroa A.A., Pérez Torres A., Salaiza N., Cabrera N., Escalona Montaña A., Rondán A., Aguirre-García M., Gómez Puyou A., Pérez-Montfort R., Becker I. A monoclonal antibody that inhibits *T. cruzi* growth “in vitro” and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Parasitol. Res.* **2008**, 102:635 – 643.

[30] Knowles J.R. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **1991**, 350:121 – 124.

[31] Walden H., Bell G.S., Russell R.J., Siebers B., Hensel R., Taylor G.L. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **2001**, 306:745 – 757.

[32] Walden H., Taylor G.L., Lorentzen E., Pohl E., Lilie H., Schramm A., Knura T., Stubbe K., Tjaden B., Hensel R. Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* **2004**, 342:861 – 875.

[33] Gayathri P., Banerjee M., Vijayalakshmi A., Azeez S., Balaram H., Balaram P., Murthy M.R.N. Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystal. D Biol. Crystal.* **2007**, 63: 206 – 220.

[34] Maldonado E., Soriano-García M., Moreno A., Cabrera N., Garza-Ramos G., de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Perez-Montfort R. Differences in the intersubunit

contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **1998**, 283:193 – 203.

[35] Gong Gao X., Maldonado E., Pérez-Montfort R., Garza-Ramos G., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Rodríguez-Romero A. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96:10062 – 10067.

[36] Waley S.G. Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* **1973**, 135:165 – 172.

[37] Zabori S., Rudolph R., Jaenicke R. Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Naturforsch* **1980**, 35:999 – 1004.

[38] Borchert T.V., Abagyan R., Kishan K.V., Zeelen J.P., Wierenga R.K. The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, mono – TIM: the correct modelling of an eight – residue loop. *Structure* **1993**, 1:205 – 213.

[39] Borchert T.V., Abagyan R., Jaenicke R., Wierenga R.K. Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91:1515 – 1518.

[40] Schliebs W., Thanki N., Eritja R., Wierenga R.K. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* **1996**, 5:229 – 239.

[41] Zomosa-Signoret V., Aguirre-López B., Hernández-Alcántara G., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. Crosstalk Between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, 67:75 – 83.

[42] Gayosso-De-Lucio J., Torres-Valencia M., Rojo-Domínguez A., Nájera-Peña H., Aguirre-López B., Salas-Pacheco J., Avitia-Domínguez C., Téllez-Valencia A. Selective inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives isolated from *Geranium bellum* Rose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19:5936 – 5939.

[43] Olivares-Illana V., Pérez-Montfort R., López-Calahorra F., Costas M, Rodríguez-Romero A., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez Puyou A. Structural differences in

triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochem.* **2006**, *45*:2556 – 2560.

[44] Hu Z., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2000**, *39*:331 – 342.

[45] Grishin N.V., Phillips M.A. The subunit interfaces of oligomeric enzymes are conserved to a similar extent to the overall protein sequence. *Protein Sci.* **1994**, *3*:2455 – 2458.

[46] Olivares-Illana V., Rodríguez-Romero A., Becker I., Berzunza M., García J., Pérez-Montfort R., Cabrera N., López-Calahorra F., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2007**, *1*: 1 – 8.

[47] Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*:457 – 470.

[48] Merlino A., González M., Cerecetto H. Targets for anti – *T. cruzi* drugs in the post-genomic era. *Curr. Enz. Inhib.* **2010**, *6*:195 – 210.

[49] Doolittle R.F. Redundancy in protein sequences. En: Fastman GD, ed. *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, Plenum Press NY **1989**: 599 – 623.

[50] Vázquez-Contreras E., Guadalupe Sánchez-Rebollar B, Chánez-Cárdenas M.E. The equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *T. cruzi* in guanidinium hydrochloride is a four state process. Intrinsic fluorescence studies. *Rev. Soc. Quím.* **2004**, *48*:296 – 299.

[51] Gokhale R.S, Ray S.S, Balaram H., Balaram P. Unfolding of *plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: Evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross – linked mutant. *Biochem.* **1999**, *38*:423 – 431.

[52] Espinoza-Fonseca L.M., Trujillo-Ferrara J.G. Structural considerations for the rational design of selective anti – trypanosomal agents: The role of the aromatic clusters at the interface of triosephosphate isomerase dimer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2005**, *328*:922 – 928.

- [53] Fernández Velazco D.A., Sepulveda Becerra M., Galina A., Darszon A., Tuena Sangri M., Gómez Puyou A. Water requirements in monomer folding and dimerization of triosephosphate isomerase in reverse micelles. Intrinsic fluorescence of conformers related to reactivation. *Biochem.* **1995**, *34*:361 – 369.
- [54] Álvarez G., Aguirre-López B., Varela J., Cabrera M., Merlino A., López G.V, Lavaggi M.L, Porcal W., Di Maio R., González M., Cerecetto H., Cabrera N., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer – interface – irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*:5767 – 5772.
- [55] Álvarez G., Aguirre-López B., Cabrera N., Marins E.B., Tinoco L., Batthyany C.I, Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez Puyou A., Pérez-Montfort R., Cerecetto H., González M. 1,2,4-thiadiazol-5(4H)-ones: a new class of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase. Study of the mechanism of inhibition. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2012**, en prensa, doi:10.3109/14756366.2012.700928.
- [56] Álvarez G. Investigación y desarrollo de agentes anti – *Trypanosoma cruzi* con moderados efectos tóxicos y dirigidos a múltiples dianas. *Tesis de Doctorado en Química*. Universidad de la República.
- [57] Chung K.T., Murdock C.A., Zhou Y., Stevens S.E. Jr., Li Y.S., Wei C.I., Fernando S.Y., Chou M.W. Effects of the nitro-group on the mutagenicity and toxicity of some benzamines. *Environ. Mol. Mutagen.* **1996**, *27*:67 – 74.
- [58] Perrin D.D., Armarego W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth-Heinemann: Oxford **1996**.
- [59] Perry, R.H.; Green, D.W. *Perry's. Chemical Engineers Handbook*. 7th Edition, editorial McGraw-Hill, New York, USA **1997**.
- [60] Garza-Ramos G., Cabrera N., Saavedra-Lira E., Tuena de Gómez-Puyou M., Ostoa-Saloma P., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou A. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity – triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*:684 – 691.

- [61] Ostoa-Saloma P., Garza-Ramos G., Ramírez J., Becker I., Berzunza M., Landa A., Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Puyou M., Pérez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*:700 – 705.
- [62] Ancizu S., Moreno E., Torres E., Burguete A., Pérez-Silanes S., Benítez D., Villar R., Solano B., Marín A., Aldana I., Cerecetto H., González M., Monge A. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-*N*-oxide quinoxalin-2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. *Molecules* **2009**, *14*:2256 – 2272.
- [63] Rubbo H., Denicola A., Radi R. Peroxynitrite inactivates thiol – containing enzymes of *T. cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *308*:96 – 102.
- [64] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/logS.html>
- [65] <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>
- [66] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness.html>
- [67] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>
- [68] Ertl P., Rohde B., Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*:3714 – 3717.
- [69] Gaillard P., Carrupt P.A., Testa B., Boudon A. Molecular Lipophilicity Potential, a tool in 3D QSAR: Method and applications. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1994**, *8*:83 – 96.
- [70] Palm K., Stenberg P., Luthman K., Artursson P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* **1997**, *14*:568 – 571.
- [71] Helal A., Lee S.H, Kimb S.H, Kima H.S. Dual – signaling fluorescent chemosensor based on bisthiazole derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*:3531 – 3535.
- [72] Hesse M., Meier H., Zeeh B. *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*. 5ta edición revisada, Síntesis **1995**. Capítulo 3.
- [73] Mixcoha-Hernández E., Moreno-Vargas L.M, Rojo-Dominguez A., Benítez-Cardoza C.G. Thermal – unfolding reaction of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein J.* **2007**, *26*:491–498.
- [74] Cháñez-Cárdenas M.E., Pérez-Hernández G., Sánchez-Rebollar B.G., Costas M., Vázquez-Contreras E. Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase

from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochem.* **2005**, *44*:10883–10892.

[75] Benítez-Cardoza C.G., Rojo-Domínguez A., Hernández-Arana A. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochem.* **2001**, *40*:9049 – 9058.

[76] Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3^{ra} edición, volumen 1. Springer **2006**, 1 – 19.

[77] Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Scientific Pierce Crosslinking *Technical Handbook*, **2009**, 1 – 2, www.thermo.com/pierce

[78] Banerjee S., Nandyala A., Podili R., Katoch V.M., Hasnain S.E. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenases (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation. *BMC Biochem.* **2005**, *6*:1 – 14.

[79] Freifelder D. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté S.A. **1981**.

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

[81] Santoro G.S., Cardoso M.G., Guimarães L.G., Freire G.F., Soares M.J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol.* **2007**, *134*:1649 – 1665.

[82] Feducci Canosa E. *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Edición Médica Panamericana, **2010**. Capítulo 1.

[83] Valencia L., Muñoz D.L., Robledo S.M., Echeverri F., Arango G.J., Vélez I.D., Triana O. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica* **2011**, *31*:552-559.

[84] Varela Ubillos J. Fraccionamiento bioguiado del extracto hidro – etanólico de *Aristeguitia glutinosa* Lam. y elucidación estructural de los principios activos anti – *Trypanosoma cruzi*. *Tesina de grado en Bioquímica*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, **2011**.

- [85] Gerpe A. Agentes anti – protozoarios con un mecanismo de acción dual: generación de fármacos híbridos por combinación de moléculas de actividad reconocida y farmacóforos presentes en inhibidores de la biosíntesis de esteroides de membrana. *Tesis de doctorado en Química*. Facultad de Química, Universidad de la República, **2008**.
- [86] Kerns E.H., Di L. *Drug – like properties: Concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*. Editorial Elsevier, Oxford, UK, **2008**.
- [87] Lin. J., Sahakian D.C., de Morais S.M., Xu J.J., Polzer R.J., Winter S.M. The role of absorption, distribution, metabolism and toxicity in drug discovery. *Curr. Topics Med. Chem.* **2003**, 3:1125 – 1154.
- [88] Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46:3 – 26.
- [89] Lipinski C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule of five revolution. *Drug Dis. Today: Technol.* **2004**, 1:337 – 341.
- [90] Talevi A. Screening virtual basado en topología molecular: una nueva metodología en el descubrimiento de agentes anticonvulsivos. *Tesis Doctoral* **2007**, capítulo 7.