



Tesis de grado para la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas.

Título:
Exploración de aspectos estructurales claves en la actividad leishmanicida de derivados de isoquina, imiquimod y quinolin-3-*N*-acilhidrazonas

Bach. Francisco Jourdan Güell.

Tutor: Dr. Angel H. Romero

Grupo de Química Orgánica Medicinal,
Instituto de Química Biológica,
Facultad de Ciencias, Udelar.

Montevideo, Uruguay. (2025)

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Conceptos básicos de la leishmaniasis

2.2. Situación actual de la leishmaniasis en el mundo, las Américas y el Uruguay

2.3. Tratamientos clásicos de la leishmaniasis

2.4. Recientes avances quimioterapéuticos en fase preclínica

2.5. Potencial de imidazolquinolinas como agente leishmanicida

2.6.4-Aminoquinolinas como plataforma privilegiada para el diseño de agentes leishmanicidas

2.7. Sistemas de isoquina y antecedentes como agente leishmanicida

2.8. *N*-acilhidrazones como farmacóforo potencial en el diseño de agentes leishmanicidas

2.9. Importancia de la basicidad y lipofilicidad en el diseño de agentes leishmanicidas

2.10. Propuesta y justificación de la tesina

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

3.2. Objetivos específicos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Parte Química

4.1.1 Generalidades

4.1.2 Procedimientos de síntesis

4.1.2.1. Síntesis de derivados pre-análogos de imiquimod **2-4**

4.1.2.1.1. Síntesis de los intermedios de 4-hidroxi-3-nitro-quinolina II y 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina III a partir de nitración de 4-hidroxiquinolina I

4.1.2.1.2. Síntesis de los intermedios de *N*-(4-flúorbencil)-3-nitro-quinolin-4-amina 2 y *N*-(4-flúorbencil)-3,6-dinitroquinolin-4-amina 4

4.1.2.1.3. Síntesis de 1-(4-flúorbencil)-1H-imidazo[4,5-*c*]quinolina 3

4.1.2.2. Síntesis de derivados deshidroxilados de isoquina **5-13**

4.1.2.2.1. Síntesis de derivados deshidroxilados de isoquina **5-10**

4.1.2.2.2. Síntesis de derivados deshidroxilados de isoquina **11-13**

4.2 Parte Biológica

4.2.1. Cultivo de parásitos, promastigotes de *Leishmania infantum*

- 4.2.2. Evaluación *in vitro* frente a *L. infantum* en la forma promastigote
- 4.2.3. Cultivo de parásitos, línea bioluminiscente de *Leishmania infantum*
- 4.2.4. Cultivo de la línea celular monocítica
- 4.2.5. Conteo de células
- 4.2.6. Preparación de fármacos y compuestos
- 4.2.7. Ensayo de cribado
- 4.2.8. Lectura de viabilidad parasitaria por bioluminiscencia
- 4.2.9. Lectura por microscopía para evaluar densidad celular y confirmación de compuestos activos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parte química

- 5.1.1. Síntesis de derivados del grupo I
- 5.1.2. Síntesis de derivados del grupo II

5.2. Parte biológica

- 5.2.1. Filosofía de los ensayos *in vitro*
- 5.2.2. Resultados *in vitro* contra promastigote de *Leishmania infantum*
 - 5.2.2.1. Actividad antipromastigote de los derivados de grupo I
 - 5.2.2.2. Actividad antipromastigote de los derivados de grupo II
 - 5.2.2.3. Actividad antipromastigote de los derivados de grupo III
- 5.2.3. Actividad *in vitro* antiamastigote de los derivados más promisorios de los grupos I, II y III

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7. FINANCIAMIENTO

8. BIBLIOGRAFÍA

9. APÉNDICE

- 9.1. Cultivo de parásitos, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- 9.2. Evaluación *in vitro* contra epimastigote de *T. cruzi*
- 9.3. Resultado de actividad antiepimastigote de compuestos 1-54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AP-1 – Proteína Activadora 1 (factor de transcripción)

ARN – Ácido Ribonucleico

bc₁ – Complejo citocromo bc₁

Bcl2 – B-cell lymphoma 2 (proteína antiapoptótica)

BHI – Brain Heart Infusion (medio de cultivo cerebro-corazón)

BMDM – Macrófagos derivados de precursores de médula ósea murina

CD4⁺ – Linfocito T cooperador tipo 4

CD8⁺ – Linfocito T citotóxico tipo 8

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CE₅₀ – Concentración efectiva media (50 %)

CPSF3 – Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor subunit 3 (Endonucleasa de poliadenilación)

CTLA-4 – Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative

FBS – Fetal Bovine Serum (suero fetal bovino)

FDA – Food and Drug Administration

IFN-γ – Interferón gamma

IgG – Inmunoglobulina G

IL – Interleuquina

IS – Índice de selectividad

LC – Leishmaniasis cutánea

LMC – Leishmaniasis mucocutánea

LV – Leishmaniasis visceral

LVC – Leishmaniasis visceral canina

L. braziliensis – Leishmania braziliensis

L. donovani – Leishmania donovani

L. infantum – Leishmania infantum

MTT – Ensayo de viabilidad celular con bromuro de tetrazolio

NF- κ B – Factor nuclear kappa B

OMS – Organización Mundial de la Salud

OPS – Organización Panamericana de la Salud

PAHO – Pan American Health Organization

PBS – Phosphate Buffered Saline (solución salina de buffer fosfatada)

pKa – Constante de disociación ácida

RNS – Especies reactivas de nitrógeno

ROS – Especies reactivas de oxígeno

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

THP-1 – Línea celular humana de leucemia monocítica

Th1 – Linfocito T helper tipo 1

TLC – Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)

TLR – Receptor tipo Toll (Toll-Like Receptor)

TLR7/8 – Receptores tipo Toll 7 y 8

TNF- α – Factor de necrosis tumoral alfa

WHO – World Health Organization

¹H-RMN – Resonancia magnética nuclear de protón

¹³C-RMN – Resonancia magnética nuclear de carbono 13

^{19}F -RMN – Resonancia magnética nuclear de flúor 19

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Angel por haberme abierto las puertas del laboratorio, haberme guiado y ayudado muchísimo en este camino.

Agradezco a Elena por haberme guiado en la parte de evaluación biológica.

Sin duda alguna, aprendí muchísimo de ustedes. Estoy enormemente agradecido.

A Diego por los ensayos en el Institut Pasteur.

A todos los compas del lab.

A mi familia y especialmente a mi abuela Nora

A todos aquellos quienes de alguna u otra forma supieron confiar y apoyar.

A la Universidad de la República.

¡Gracias!

1. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida que afecta a millones de personas en el mundo. No existen vacunas para humanos contra ninguna de las formas clínicas de la enfermedad y los tratamientos actuales son basados en quimioterapia, los cuales presentan una variedad de limitaciones destacando alta toxicidad, baja eficiencia terapéutica, desarrollo de resistencia parasitaria, altos costos y regímenes de administración complejos. Esto obliga al desarrollo de nuevas plataformas leishmanicidas potentes y selectivas, las cuales no solo deben seguir los conceptos básicos de la química medicinal, sino que su diseño debe considerar los aspectos claves de la supervivencia del parásito y su relación con el macrófago. En ese sentido, la quinolina, en particular aquellas funcionalizadas con cadenas *N*-alquiladas, representa una plataforma conveniente para el desarrollo de agentes leishmanicidas debido a su capacidad de inducir efectos específicos en el parásito y además estar envueltas en aspectos relacionados con la relación parásito-macrófago tales como acumulación en fagolisosoma del macrófago infectado (organelo donde se aloja el parásito) así como su potencial capacidad para inducir activación inmunológica en macrófagos. Inspirados en el sistema quinolina y en el potencial de una serie de derivados deshidroxilados de isoquina previamente explorado por el grupo, en la presente investigación se planteó la evaluación leishmanicida *in vitro* de una serie de 54 compuestos (algunos de ellos preparados en el marco de esta tesis de grado) basados en tres plataformas quinolínicas: i) una familia de pre-análogos de imiquimod (un tipo de imidazolquinolina) **1-4 (4 derivados)** incluyendo el imiquimod) que busca identificar la relevancia en la actividad leishmanicida de las funcionalidades de 2-amino, *N*-isobutilo y la unidad de imidazol que están presentes en la estructura de imiquimod; ii) una familia de derivados deshidroxilados de isoquina **5-22 (18 derivados)** incluyendo la cloroquina) que busca responder la relevancia de la funcionalidad de dialquilamino así como la identificación de farmacóforos claves en esta plataforma y, iii) una familia de quinolin-3-*N*-acilhidrazonas **23-54 (32 derivados)** que buscan identificar el potencial del núcleo de quinolina al conectar con este el farmacóforo reconocido de *N*-acilhidrazonas. La actividad leishmanicida fue evaluada frente a un modelo *in vitro* de promastigote de *Leishmania infantum* así como contra un modelo de macrófagos humanos (THP-1) infectados con *Leishmania infantum*. Citotoxicidad y solubilidad fueron estimadas cualitativamente por microscopía para los compuestos más activos.

De los pre-análogos de imiquimod **1-4**, sólo el compuesto **3** mostró una moderada respuesta contra promastigote ($CE_{50} = 23.9 \mu M$), la cual fue superior a aquella observada para

imiquimod **1** ($CE_{50} = 37.1 \mu M$). Aunque ninguno de estos dos mostró una actividad contra amastigote intracelulares a $20 \mu M$. Otros análogos quinolínicos carentes de la unidad de imidazol fusionada a la quinolina no fueron activos contra promastigotes, pero si mostraron actividad moderada ($CE_{50} \sim 20 \mu M$) contra amastigotes intracelulares. Aunque mayores experimentos son necesarios para confirmar el rol de la funcionalidad química en potencial la actividad leishmanicida de estas imidazol-quinolinas, se puede ver que la presencia del grupo 2-amino es prescindible contra el parásito (aunque debe ser clave para conservar la actividad inmunoestimulante), la unidad de imidazol fusionado por la cara *c* de la quinolina es esencial para la actividad, mientras que el grupo inédito de *N*-bencilo puede representar una cadena a considerar para futuros diseños, siendo inclusive superior a la cadena de isobutilo típica del imiquimod.

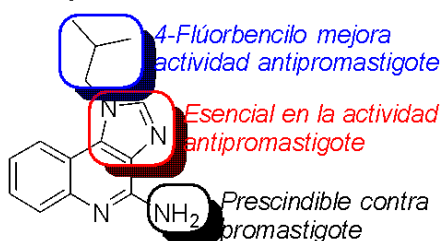
Del grupo de isoquinas deshidroxiladas **5-22**, los derivados **5**, **6** (**IIa**), **12**, **11** (**IIb**), **14**, **17**, **19**, **20** y **21** (**IIc**), en ese orden fueron reconocidos como agentes promisorios por presentar valores de CE_{50} en rangos submicromolares contra amastigotes de *Leishmania infantum*, así como una moderada actividad contra la forma promastigote del parásito para los compuestos **5**, **6**, **12**, **17**, pero discordancia con los demás que son inactivos en dicho estadio. De esta familia fue identificado que los sustituyentes bencílicos (X): H (**5** y **6**), *N*4-metilpiperacinil (**14**), *N*4-(2-pirimidinil)piperacinil (**17**), dietil-amino (**19**), terbutilamino (**20**) e *N*-imidazoil (**21**) ofrecen compuestos activos con perfiles de bioactividad que pueden compararse con los derivados morfolinil (**FD1**) y piperidinil (**FD3**) ya identificados en el trabajo precedente, representan los farmacóforos preferentes en la optimización de isoquinas deshidroxiladas por su mejor relación actividad/toxicidad. Por su parte, el derivado deshidroxilado metilado **5** fue tan activo como aquel derivado líder de piperidinil, siendo reconocido como un potencial *hit* para futuros ensayos. La ausencia de grupo dialquilamino en combinación con incremento de la lipofilia (ver derivados **11** y **12**) ofrece mejoras en el perfil de actividad y selectividad en la isoquina deshidroxilada como agente leishmanicida.

Finalmente, dentro del grupo de las quinolin-3-*N*-acilhidrazonas **23-53**, dos compuestos **31** y **44** presentaron una significativa respuesta contra promastigote ($CE_{50} = 5.99 \mu M$) y ($CE_{50} = 0.79 \mu M$), respectivamente, aunque estos no fueron activos contra amastigote intracelulares a $20 \mu M$. Dentro de esta familia, el 5-nitro-furilo como *N*-acil sustituyente representa un potencial farmacóforo, aunque mayor optimización es necesaria para incrementar la actividad en el modelo de amastigote intracelulares. Otras funciones en las posiciones R_2 (metoxi > F) y R_1 (Cl > CH_3 > H) del anillo de quinolina ofrecieron ligeras mejoras en la actividad.

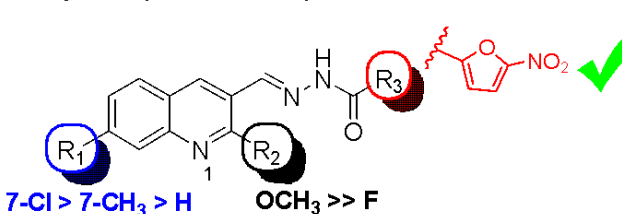
En resumen, la presente investigación representa un punto de partida para el diseño de nuevas estructuras leishmanicidas basadas en análogos de imiquimod y quinolin-3-*N*-acilhidrazonas, así como un avance a la optimización final de la isoquina deshidroxilada como plataforma líder para el diseño de agentes leishmanicidas.

Palabras clave: *Leishmania*, leishmanicida, 4-aminoquinolinas, promastigote, amastigote, imiquimod, quinolin-3-*N*-acilhidrazonas, imidazolquinolina.

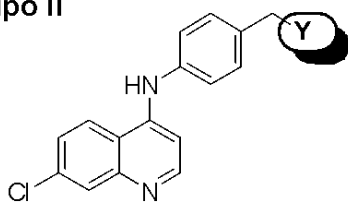
Grupo I



Grupo III (promastigote)

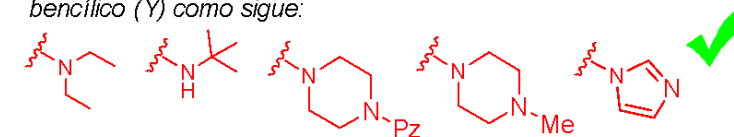


Grupo II



- Discreta/moderada actividad antipromastigote

- Remarcable actividad anti-amastigote como función del grupo bencílico (Y) como sigue:



2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales desatendidas son un conjunto de enfermedades infecciosas que afectan principalmente a las poblaciones vulnerables en regiones tropicales y subtropicales. Se estima que más de mil millones de personas tienen al menos alguna de estas enfermedades, y cerca de 1.500 millones requieren medidas preventivas o terapéuticas (OMS, 2023). Estas enfermedades incluyen patologías provocadas por virus, bacterias, protozoarios, helmintos y hongos, y se caracterizan por su impacto devastador que tienen en la salud, la economía y en la calidad de vida de las comunidades afectadas (OMS, 2023).

La palabra “desatendidas” es debida a la poca visibilidad que tienen en las agendas de salud global, la limitada inversión en investigación y desarrollo, y la falta de diagnóstico y agentes terapéuticos efectivos. Su persistencia no solo está asociada a factores biológicos, sino que también sociales, económicos y ambientales, incluyendo el cambio climático, la falta de acceso a agua potable, saneamiento y servicios de salud de calidad (World Health Organization, 2021).

Dentro del conjunto de estas enfermedades, la leishmaniasis se destaca por estar presente en diversas regiones del mundo, por el impacto que tiene en la salud pública y por las distintas formas en que puede manifestarse. Esta enfermedad parasitaria es endémica en más de 90 países y representa un desafío epidemiológico grande, en parte por la expansión de sus vectores y reservorios hacia nuevas regiones del mundo (OMS, 2023; Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2020).

2.1. Conceptos básicos de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Leishmania*, que principalmente son transmitidos al ser humano a través de la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo) o *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) (Hide, 2007). Más de 20 especies de *Leishmania* han sido identificadas como agentes etiológicos en humanos, y cerca de 90 especies de flebótomos tienen capacidad vectorial comprobada (Torres-Guerrero et al., 2017). Por tanto, el ciclo de vida del parásito de *Leishmania* se divide en dos etapas principales, una de ellas en el insecto y otra en el mamífero huésped (**ver Figura 1**). En el insecto vector, el parásito vive como promastigote que representa uno de los estadios del parásito, el cual se caracteriza por tener una forma alargada y con flagelo. Esta forma se multiplica en el intestino medio del insecto hasta transformarse en el promastigote metacíclico, el cual es capaz de infectar al ser humano

(Torres-Guerrero et al., 2017). La transmisión al humano ocurre cuando la hembra del flebótomo se alimenta de sangre durante la noche, transfiriendo estos promastigotes metacíclicos a la piel. En esta fase, el sistema inmunitario interviene y las células del sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos fagocitan rápidamente a los parásitos y son infectadas. Dentro del macrófago, el fagosoma que contiene el promastigote metacíclico se fusiona con el lisosoma generando el fagolisosoma. Dentro del fagolisosoma, los promastigotes se transforman en la forma amastigote, que es una variante más pequeña carente de flagelo y es la forma capaz de producir la infección dentro del macrófago. Esta forma del parásito no sólo logra resistir las condiciones adversas del fagolisosoma (*pH* 4–5 y una alta actividad enzimática) (Coimbra et al., 2016), sino que logra eludir el mecanismo inmunológico de la célula huésped promoviendo el cambio de polarización en el macrófago, los cuales son aspectos claves en la supervivencia del parásito (Silva Almeida et al., 2023). Una vez instalados allí, los amastigotes se multiplican asexualmente, destruyen la célula que los contiene y se liberan al medio extracelular para infectar a nuevos macrófagos (Torres-Guerrero et al., 2017; Mann et al., 2021). Posteriormente, para continuar el ciclo, cuando un flebótomo sano se alimenta de un hospedador que ya porta amastigotes en sus macrófagos, estos son ingeridos junto con la sangre y, en el intestino del insecto, se transforman nuevamente en promastigotes, completando el ciclo (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2023).

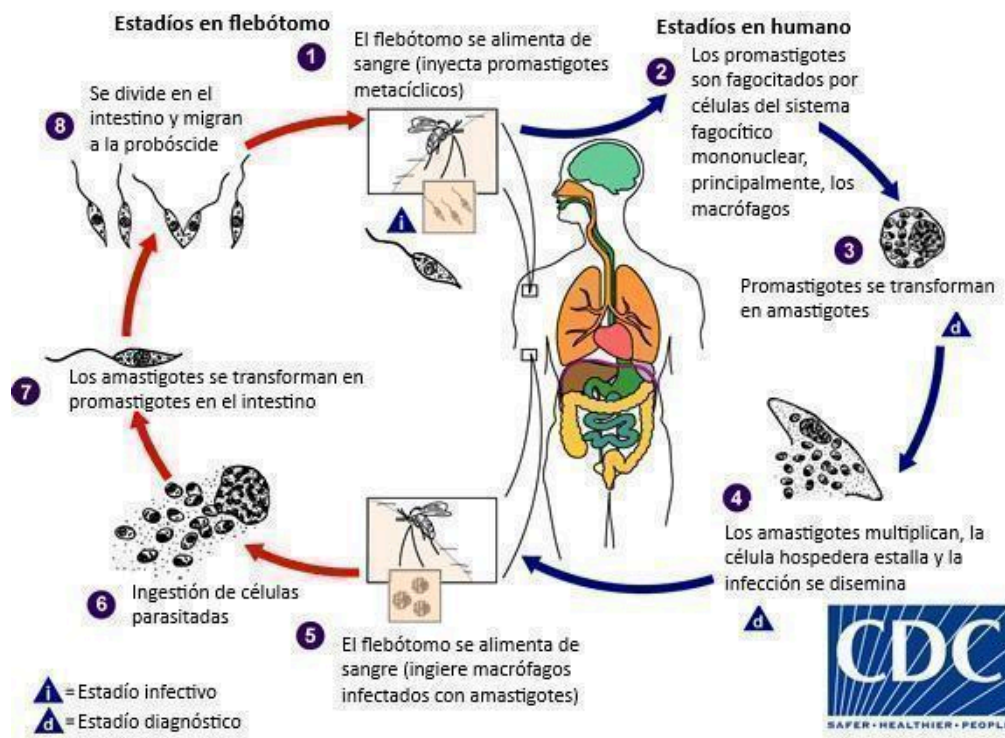


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Leishmania*. Modificado y traducido al idioma español. (<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>)

Respecto a las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, se reconocen tres tipos principales: (i) la leishmaniasis cutánea (LC), la más común que se caracteriza por la aparición de úlceras en la piel que varían en número y gravedad; (ii) la leishmaniasis mucocutánea (LMC), que da lugar a lesiones destructivas en nariz, boca y garganta y que suele desarrollarse como una complicación tardía de una infección cutánea previa y; (iii) la leishmaniasis visceral (LV), la forma más grave que afecta órganos internos como el hígado, el bazo y la médula ósea, y que se manifiesta con fiebre prolongada, pérdida de peso, anemia y un marcado agrandamiento del hígado y el bazo (Murray et al., 2005; Torres-Guerrero et al., 2017). Esta variabilidad es una consecuencia de la variedad de especies de *Leishmania* capaces de causar enfermedad en humanos y dependen ampliamente de la región tropical del mundo.

Desde el punto de vista etiológico y epidemiológico, la enfermedad se divide en dos grandes formas geográficas: la del Viejo Mundo y la del Nuevo Mundo. En el Viejo Mundo, la LC es causada por especies de *Leishmania* de *L. major* (*principal*), *L. tropica* y *L. aethiopica* (Elmahallawy et al., 2014). Estas especies se distribuyen principalmente en África del Norte, Medio Oriente, Asia Central y Etiopía, y presentan distintos modos de transmisión, desde formas zoonóticas rurales causadas, por ejemplo, por *L. major* (con roedores como reservorios), hasta formas más urbanas y antroponóticas como aquellas causadas por *L. tropica* (Du et al., 2016; Lemma et al., 2009; Reithinger et al., 2007). En las Américas, la principal especie responsable de LC es la *L. braziliensis*, aunque otras como *L. panamensis* y *L. guyanensis* también pueden inducir afecciones mucocutáneas, especialmente en América Central y del Sur (Llanes et al., 2015).

Respecto a la LV, en Asia y África Oriental, la principal especie responsable es *Leishmania donovani*, cuya transmisión es antroponótica (Ready, 2014). Por su parte, en América Latina y en regiones del Mediterráneo, la LV es causada por *Leishmania infantum*, donde se comporta como una zoonosis, siendo el perro el principal reservorio natural (Scarpini et al., 2022).

2.2. Situación actual de la leishmaniasis en el mundo, las Américas y el Uruguay

La leishmaniasis es endémica en 98 países, concentrándose en regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, Latino-América y la región Mediterránea (**Figura 2a**). De

acuerdo a la OMS, un total de 1.3 millón de nuevos casos de leishmaniasis y de 65.000 defunciones se registran anualmente. La mayoría de los nuevos casos corresponden a la LC (entre 600.000 y 1 millón de nuevos casos), mientras las LV registran un promedio de 50.000 a 90.000 nuevos casos anuales (WHO, 2023). Aunque es importante mencionar que la LV es la forma más mortal siendo responsable de más de 90% de muertes por leishmaniasis y fatal en un 95% de los casos no tratados. Por su parte, la LMC presenta la menor incidencia global.

Desde el punto de vista demográfico mundial, el 95% de los casos de LC se concentran en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central, mientras el 90% de los casos de LV se concentran en Brasil, la India y el este de África. La LMC está fundamentalmente presente en un 90% en Brasil, Bolivia, Perú y Etiopía (WHO, 2023).

Analizando la realidad dentro del continente americano, la leishmaniasis es endémica en al menos 18 países. La LC es la forma más común, con un promedio anual de 58.000 casos registrados y una letalidad media del 7% (Pan American Health Organization [PAHO], 2020). Según Maia-Elkhoury et al. (2021), los países con mayor incidencia de LC incluyen Brasil, Colombia, Perú, Bolivia y Venezuela, donde los casos están fuertemente influenciados por factores ambientales y socioeconómicos, como la deforestación, la urbanización no planificada y la pobreza.

Por otro lado, la LV, aunque es menos frecuente, es más grave y con una transmisión activa en Brasil, Paraguay, Venezuela y algunas áreas de Argentina y Colombia (PAHO, 2020). En la región, la tasa de mortalidad por LV oscila entre el 5% y el 10%, dependiendo del acceso al diagnóstico y al tratamiento oportuno (WHO, 2023). Brasil concentra aproximadamente el 95% de los casos de LV en el continente, reflejando la importancia epidemiológica de esta enfermedad en la región (Alegretti, 2022).

Para analizar la situación local, Uruguay ha sido históricamente un país con baja incidencia de leishmaniasis; sin embargo, entre 2017 y 2021 se han reportaron un total de 10 casos confirmados de LV en humanos, con una distribución predominante en el interior del país y una mortalidad acumulada del 20% (2 fallecidos en el período) (Alegretti, 2022). En cuanto a la leishmaniasis cutánea, solo se registró un caso importado desde Argentina en 2019 (Alegretti, 2022). Sin embargo, hay una serie de factores, entre los que incluyen: i) la persistencia del parásito en reservorios animales que ha mostrado un creciente número de casos autóctonos de LV canina (LVC) en ciertas zonas de la región litoral-norte desde 2015, ii) la presencia del vector de la LV, la *Lutzomyia longipalpis*, en los departamentos de Salto y Artigas, iii) la cercanía geográfica con el Brasil, que acumula un 95% de los casos de leishmaniasis en América (Satragno et al., 2017) y iv) los aumentos de casos de LV en

humanos desde 2017, los cuales indican que la LV puede convertirse en una enfermedad persistente, siendo necesarias tomar no solo las precauciones correspondientes desde el punto de vista preventivo sino que estimular el desarrollo de investigaciones en búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad.

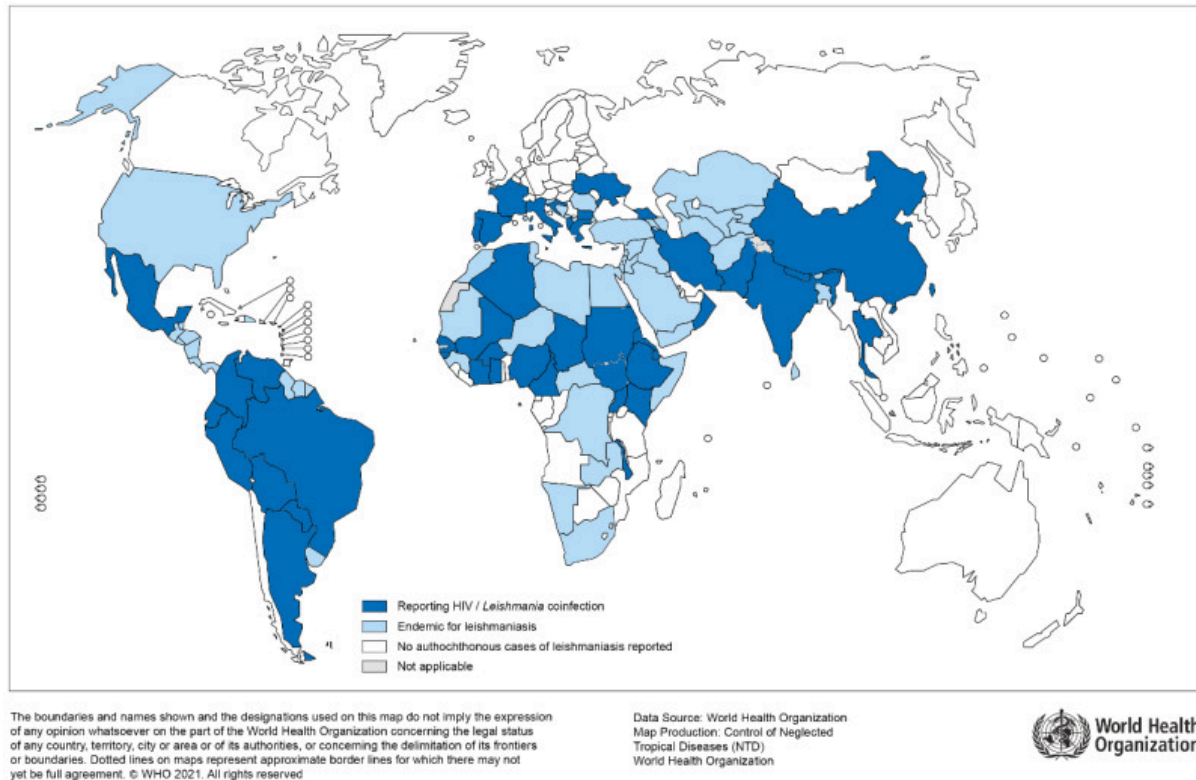


Figura 2. Mapa de la distribución mundial de la leishmaniasis (Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581526/figure/ch3.fig1/>).

2.3. Tratamiento clásico de la leishmaniasis

En la actualidad no existen vacunas para humanos ni un tratamiento quimioterapéutico efectivo contra ninguna de las tres formas de la leishmaniasis. En el campo de desarrollo de vacunas, sólo se han encontrado avances en modelos animales. En 2020, fue desarrollada una vacuna basada en la tecnología **CRISPR-Cas9** que logró la cura parcial de ratones infectados con cepas de *Leishmania major* atenuados (Zhang et al., 2020). En 2022, otra vacuna creada a partir de una cepa de *Leishmania mexicana* 2022 mostró cura de lesiones cutáneas en modelo animal (Volpedo et al., 2022). En perros, una vacuna conocida como **LeishTech** fue desarrollada para perros (Moafi et al., 2019). A pesar de los avances en modelos animales, hasta el momento no existen vacunas en humanos, siendo la quimioterapia la opción para el tratamiento de esta enfermedad en sus diferentes

manifestaciones. En este sentido, el tratamiento se basa principalmente en Anfotericina B, Miltefosina, Paromomicina y agentes antimoniales como Glucantime y Pentostam (**Figura 3**).

La anfotericina B es un antibiótico poliénico aislado en 1956 del *Streptomyces nodosus* y se utiliza como tratamiento de elección en casos de resistencia a antimoniales, especialmente en India (Sangshetti et al., 2015). Su mecanismo de acción se basa en la afinidad por el ergosterol de la membrana de *Leishmania*, formando poros que alteran su permeabilidad y provocan la muerte celular (Ramos et al., 1996). Las formulaciones más comunes son la anfotericina B desoxicolato (Fungizone®) y las liposomales como AmBisome®, diseñadas para mejorar su distribución y reducir la toxicidad. Estas últimas se acumulan eficazmente en el hígado, principal órgano afectado en la leishmaniasis visceral (VL), y han mostrado tasas de curación de hasta un 95% con efectos adversos mínimos tras una sola infusión (Sangshetti et al., 2015). A pesar de su eficacia, este tratamiento presenta limitaciones importantes, como lo son el alto costo, la necesidad de administración intravenosa, condiciones de conservación restrictivas y efectos adversos como fiebre, escalofríos, dolor óseo, hipotensión y, en algunos casos, nefrotoxicidad e hipokalemia. Aunque no se han reportado resistencias clínicas todavía, sí hay evidencia de resistencias en cepas creadas en el laboratorio.

Por su parte, la miltefosina que también es conocido por su nombre químico como hexadecilfosfolina, fue desarrollada primero como un fármaco antitumoral de uso tópico, pero desde mediados de los años 80 comenzó a estudiarse su potencial para el tratamiento para la leishmaniasis. Es el primer medicamento eficaz por vía oral aprobado para esta enfermedad, lo que lo pone en ventaja frente a otros tratamientos inyectables más difíciles de administrar, sobre todo en zonas rurales o en niños (Croft & Engel, 2006). Durante ensayos clínicos en India, se observó una tasa de curación del 94 % en pacientes con leishmaniasis visceral, incluso en aquellos que no respondían bien a los tratamientos con antimoniales. A partir de esos resultados, fue aprobado en India en 2002 y más tarde en Alemania y Colombia y se encuentra aprobado por la *Food and Drug Administration (FDA)* (Aronson, 2017). Sin embargo, cabe destacar que su eficacia varía según el tipo de especie del parásito, por ejemplo, en Colombia mostró un 91 % de curación frente a *L. panamensis*, pero en Guatemala, con *L. braziliensis* y *L. mexicana*, sólo alcanzó un 53 % (Soto et al., 2004). En cuanto al mecanismo de acción, el mismo no se conoce del todo. Se cree que actúa interfiriendo en la membrana celular del parásito, afectando la señalización intracelular o induciendo mecanismos similares a la apoptosis (Verma et al., 2004). A pesar de sus ventajas,

la miltefosina tiene limitaciones, ya que puede provocar efectos adversos tales como trastornos gastrointestinales, hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, y está contraindicada en el embarazo por su potencial teratogénico. También se han observado tasas de recaída más altas en algunos estudios y casos de resistencia en laboratorio.

Entre otros fármacos destaca la paromomicina que es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que ha mostrado ser útil en el tratamiento de la leishmaniasis, ya sea tanto visceral como cutánea, aunque su eficacia es mayor frente a esta última (Pokharel et al., 2021). Este fármaco fue originalmente producido por fermentación a partir de *Streptomyces rimosus* var. *paromomycin*, y está aprobado por la OMS. Este fármaco está disponible como inyección intramuscular para infecciones sistémicas y como pomada para lesiones cutáneas, aunque requiere de una dosis diaria de 16 o 20 mg/kg/día durante 21 días por vía intramuscular (Jha & Sundar, 2012; Jha et al., 1998). Respecto a su modo de acción, aunque no está completamente aclarado, se conoce que este fármaco afecta la síntesis proteica del parásito al interferir con la asociación de las subunidades ribosomales, tanto en el citoplasma como en la mitocondria. También se ha propuesto que altera la fluidez de membrana y el metabolismo lipídico (Chawla & Sundar, 2011). Entre los efectos adversos se han reportado ototoxicidad (daño al oído interno), aumento de enzimas hepáticas, molestias gastrointestinales y dolor en el sitio de la inyección. En estudios de laboratorio, también se ha visto la aparición de resistencia en cepas de *L. donovani* (Sundar et al., 2007).

Finalmente, tenemos a los agentes antimoniales de antimonio de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®). Ellos han sido la principal herramienta terapéutica contra la leishmaniasis durante más de medio siglo. Ambos se administran por vía intramuscular o intravenosa durante 20 días lo cual puede ser una carga significativa para el paciente, sobre todo considerando la necesidad de supervisión médica, los costos y el malestar asociado a la administración parenteral diaria. Además, pueden provocar efectos adversos frecuentes, como dolor en el sitio de inyección, fiebre, náuseas, mialgias y, en algunos casos, toxicidad hepática o renal, y se consideran equivalentes en términos de eficacia clínica, aunque presentan algunas diferencias en toxicidad local y efectos bioquímicos sobre el parásito (Henao et al., 2004). Aunque es un fármaco recomendado por la OMS para administración en diversas regiones, este no ha sido aprobado por la FDA (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2024; World Health Organization [WHO], 2022).

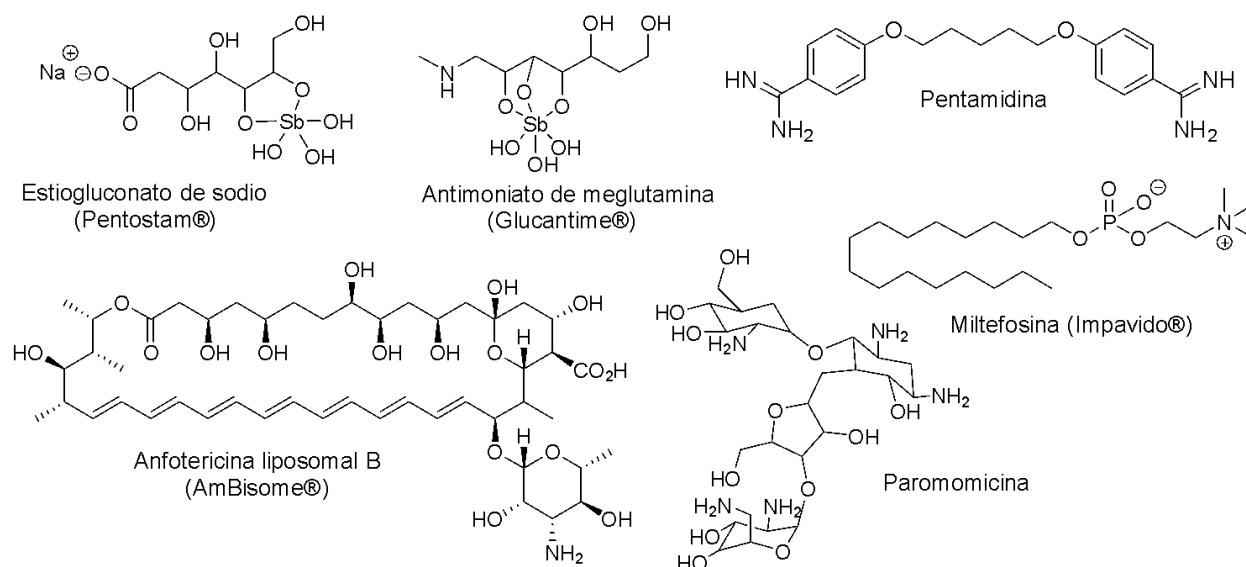


Figura 3. Fármacos de referencia para el tratamiento de la leishmaniasis.

Si bien estos fármacos son comúnmente utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis, los mismos presentan una toxicidad considerable, tienen que ser administrados por vía intravenosa o intramuscular durante varias semanas, y en muchas zonas ya se observan casos de resistencia a los mismos (Zulfiqar et al., 2017; Alves et al., 2018; Aronson et al., 2017), lo cual obliga al diseño de nuevos agentes leishmanicidas potentes, selectivos, seguros y de bajo costo de producción.

2.4. Recientes avances quimioterapéuticos en fase preclínica

Entre los avances recientes desde la quimioterapia destaca el compuesto DNDI-6174 (estructura en **Figura 4**), que tiene como blanco terapéutico al complejo citocromo *bc1*. Este compuesto tiene una potente actividad *in vitro* y una buena reducción de la carga parasitaria en modelos animales, acompañado de un buen perfil de seguridad (Braillard et al., 2023). Otro candidato relevante es el DNDI-6148 (estructura en **Figura 4**), el cual es un benzoxaborole que inhibe la enzima CPSF3 y ha mostrado más del 98 % de reducción parasitaria en modelos animales, con la ventaja que su administración es oral (Mowbray et al., 2021). Para la leishmaniasis cutánea, uno de los compuestos más reciente y prometedor es el LXE408, el cual ha mostrado una alta potencia frente a distintas especies de *Leishmania* y también contra *Trypanosoma cruzi*. Su mecanismo de acción se basa en la interacción selectiva con las subunidades altamente conservadas b4 y b5 del proteasoma 20S de los kinetoplastos, sin afectar al proteasoma 20S humano. Esta especificidad sugiere que

LXE408 podría ser un tratamiento seguro y eficaz. Actualmente se encuentra en fase II de ensayos clínicos en India y Etiopía, donde se evalúa su eficacia frente a diferentes especies de *Leishmania* en comparación con la miltefosina, que es utilizada como control (Drugs for Neglected Diseases initiative [DNDi], 2025). Sin embargo, a pesar de los avances, es fundamental diseñar nuevas estrategias, las cuales más allá de considerar los conceptos básicos de la química medicinal, deben ir dirigidas a atacar los aspectos claves en la supervivencia del parásito en el macrófago y su relación con este.

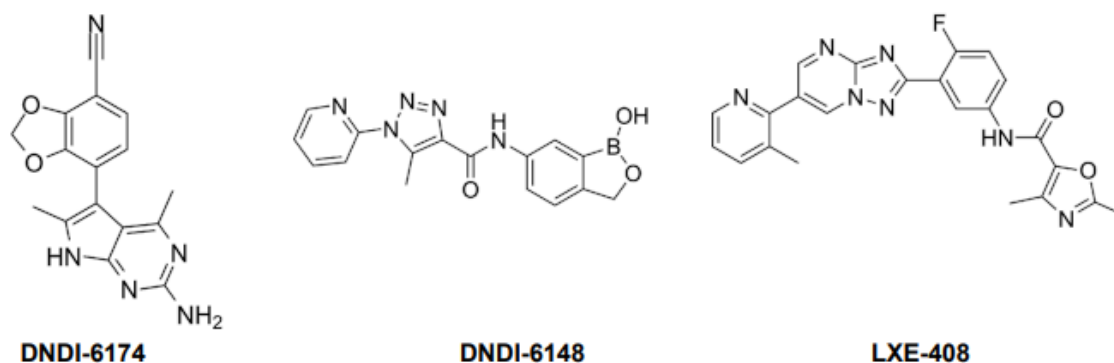


Figura 4. Estructuras químicas de los compuestos en desarrollo preclínico y clínico para el tratamiento de la leishmaniasis.

En ese sentido, la quinolina, en particular la 4-aminoquinolina, representa una plataforma muy atractiva debido a que este tipo de estructura está envuelta en una serie de aspectos claves en la supervivencia del parásito y su relación con el macrófago tales como su habilidad de favorecer acumulación en el fagolisosoma, de inducir inmunoestimulación como agonista/antagonista de receptores tipo Toll [Toll like receptor (TLR) en inglés] 7 y 8 Talukdar et al., 2021) y su habilidad de afectar la función mitocondrial parasitaria (Romero & Delgado, 2025). Además, es una estructura altamente versátil desde el punto de vista sintético, ya que existen una variedad de métodos de síntesis para la funcionalización química diversa en cualquiera de las posiciones del anillo quinolínico, siendo estas metodologías adaptables al diseño estructural requerido (Delgado et al., 2025).

La presente investigación estudió aspectos estructurales de tres sistemas quinolínicos como plataformas: i) el imiquimod (un tipo de imidazol-quinolina), (ii) la isoquina deshidroxilada (como un tipo de 4-aminoquinolina) y (iii) quinolin-3-*N*-acilhidrazona, buscando la identificación de farmacóforos claves para la optimización como leishmanicida de cada sistema quinolínico.

2.5. Potencial de imidazolquinolinas como agente leishmanicidas

La limitada tasa de éxito en el descubrimiento de nuevos agentes leishmanicidas ha puesto en evidencia la necesidad de implementar estrategias más innovadoras y más eficaces para abordar la complejidad de esta enfermedad (Zulfiqar et al., 2017). En este sentido, resulta fundamental considerar la interacción íntima del parásito con el macrófago, ya que constituye el nicho principal de supervivencia y de replicación de la *Leishmania* (Moradin & Descoteaux, 2012). Diversos estudios han demostrado que el parásito tiene una notable capacidad para evadir la respuesta inmunitaria innata mediante la reprogramación del fenotipo del macrófago. La *Leishmania* favorece la polarización hacia el perfil M2, asociado a bajos niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) y a una elevada producción de IL-10 y TGF- β , lo que conlleva a una disminución de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) necesarias para eliminar al parásito (Tomiotto-Pellissier et al., 2017). Además, se han descrito mecanismos más sofisticados de inmunomodulación por parte del parásito tales como la inducción de apoptosis linfocitaria por *L. major* a través de la sobreexpresión de p53 y la regulación negativa de Bcl-2 (Tomiotto-Pellissier et al., 2018), o la participación de CTLA-4 en infecciones por *L. donovani*, cuya inhibición farmacológica favorece la producción de IFN- γ e IL-4 y reduce la carga parasitaria (Tomiotto-Pellissier et al., 2017). En este contexto, la inmunoestimulación dirigida emerge como una estrategia prometedora para restablecer la capacidad microbicida del macrófago y potenciar la respuesta adaptativa, lo cual posiciona a los inmunoestimulantes como una plataforma atractiva para el diseño de agentes leishmanicidas.

Entre los agentes inmunoestimulantes estudiados contra modelos de leishmaniasis destacan principalmente el imiquimod, el resiquimod (R848) (Buates & Matlashewski, 1999). Estos compuestos representan un sistema de imidazolquinolina, donde el anillo de imidazol se encuentra fusionado con la quinolina por la cara “c” de esta. En particular, el imiquimod y resiquimod han sido identificados como agonistas de los TLR7/8. Estos receptores, que se encuentran localizados en los compartimentos endosomales, actúan como sensores de ARN monocatenario de origen viral o parasitario (Sun, 2022) y cumplen un rol central en la defensa frente a patógenos intracelulares. Por lo tanto, ellos tienen un papel clave en la modulación de la inmunidad innata y en la orientación de la respuesta adaptativa hacia perfiles más bien protectores. Su activación desencadena la producción de un amplio espectro de mediadores inmunitarios, incluyendo interferón- α , TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, lo que promueve la activación de monocitos, macrófagos y células dendríticas así como favorecer la

diferenciación de linfocitos T hacia un perfil Th1 que es esencial en el control de la infección (Faria et al., 2012).

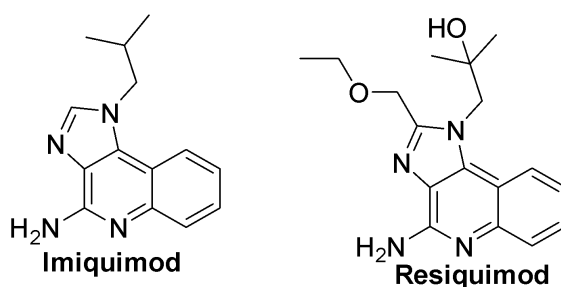


Figura 5. Estructuras de inmunoestimulantes, agonistas de receptores TLR 7 y TLR 8.

La mayoría de investigaciones del potencial del imiquimod y sus análogos como agentes leishmanicidas están aplicadas contra modelos *in vitro* de LC (El Hajj et al., 2018). Un ejemplo resaltante mostró que en modelos animales deficientes en el TLR7 e infectados *L. amazonensis*, donde la infección mostró ser superior a un animal normal con una mayor proliferación parasitaria en neutrófilos (Regli et al., 2020), el tratamiento con resiquimod en macrófagos infectados es capaz de estimular la activación de factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B que son cruciales para la producción de citocinas proinflamatorias dependientes de TLR7 (Buates & Matlashewski, 1999; Kaushik et al., 2021; He et al., 2013). Estos hallazgos posicionan a TLR7/8 no solo como sensores innatos, sino también como blancos terapéuticos estratégicos en la búsqueda de compuestos bioactivos capaces de transformar el microambiente inmunológico en uno menos favorable para el parásito y más propicio para la eliminación efectiva de la infección (Faria et al., 2012).

Contra modelos *in vitro* de LV, las investigaciones basadas en imiquimod y sus análogos contra especies viscerotrópicas son bastante escasas, encontrando sólo un reporte de 1999 (Buates & Matlashewski, 1999). Este reporte mostró que tanto el imiquimod como el resiquimod presentan una significativa actividad leishmanicida contra un modelo de infección *in vitro* de BMDM con *L. donovani*, obteniendo valores de CE_{50} en rangos sub-micro y nano-molar, respectivamente. De manera interesante, tanto el imiquimod como el resiquimod mostraron un nulo efecto contra formas axénicas del parásito tales como promastigote como amastigote axénicos a 20 μ M. Adicionalmente, la actividad leishmanicida en macrófagos infectados fue consistentemente correlacionada con un incremento de óxido nítrico y la expresión del factor de transcripción AP-1.

Estos resultados demuestran el potencial de estas imidazoquinolinas como una alternativa terapéutica contra modelos de LV; sin embargo, mayores investigaciones son necesarias de

carácter químico-estructural con el objetivo de generar derivados de imiquimod que sean capaces de promover una actividad leishmanicida propiamente independiente de la respuesta inmunoestimulante. La inducción de una actividad leishmanicida en análogos de imiquimod puede ser fundamental para generar compuestos con actividad dual, leishmanicida e inmunoestimulante, lo cual resulta toda una novedad en el campo. Para promover una actividad leishmanicida propiamente, primeramente, es importante estudiar si modificaciones químicas en torno a alguna de las funciones claves en la estructura de imiquimod (ejemplo 2-amino, unidad de imidazol o *N*-sustituyente) pueden generar compuestos activos contra modelos axénicos de *Leishmania* así como conservar o mejorar su efecto contra los modelos de infección.

2.6. 4-Aminoquinolinas como una plataforma privilegiada para el diseño de agentes leishmanicidas

Las quinolinas, en particular las 4-aminoquinolinas, representan una plataforma privilegiada para el diseño de agentes leishmanicidas. En la **Figura 6** se muestran una compilación de los derivados de quinolinas más promisorios con perfiles preclínicos interesantes para mayores ensayos (Romero & Delgado, 2025; Avanzo et al., 2025; Del Carpio et al., 2025; Romero, 2025a). Como se puede notar, la mayoría de ellos consisten de 4-aminoquinolinas (estructuras **1-6**). Los derivados mostraron respuestas significativas contra la forma de amastigote intracelulares, moderada a baja citotoxicidad y altos índices de selectividades que algunos casos superan el factor de 100 (ejemplo compuestos **1, 2, 3, 4, 5** y **7**). De un análisis estructura-actividad se puede extraer que la presencia de grupos lipofílicos (marcados en rojo) y grupos básicos (marcados en verde) parecen ser claves para garantizar un efecto leishmanicida y modular convenientemente la selectividad. Estos aspectos justamente son claves para garantizar la acumulación en el fagolisosoma (Romero & Delgado, 2025; Romero, 2025a). Más allá de aspectos estructurales, el uso de vehículos tipo nanopartículas, liposomas, hidrogeles, entre otros, han permitido incrementar el potencial de algunos agentes quinolínicos en modelos de infección *in vitro* e *in vivo* (Romero et al., 2025c).

Desde el punto de vista del mecanismo de acción, es bien documentado que los derivados de 4-aminoquinolinas promueven cambios en morfologías del parásito (derivado de experimentos ejecutado contra promastigotes) con subsecuente muerte vía apoptosis, lo cual es causada por el estrés oxidativo en el parásito, cambios en la función mitocondrial (en específico cambios de polaridad de la membrana mitocondrial) (Romero & Delgado, 2025).

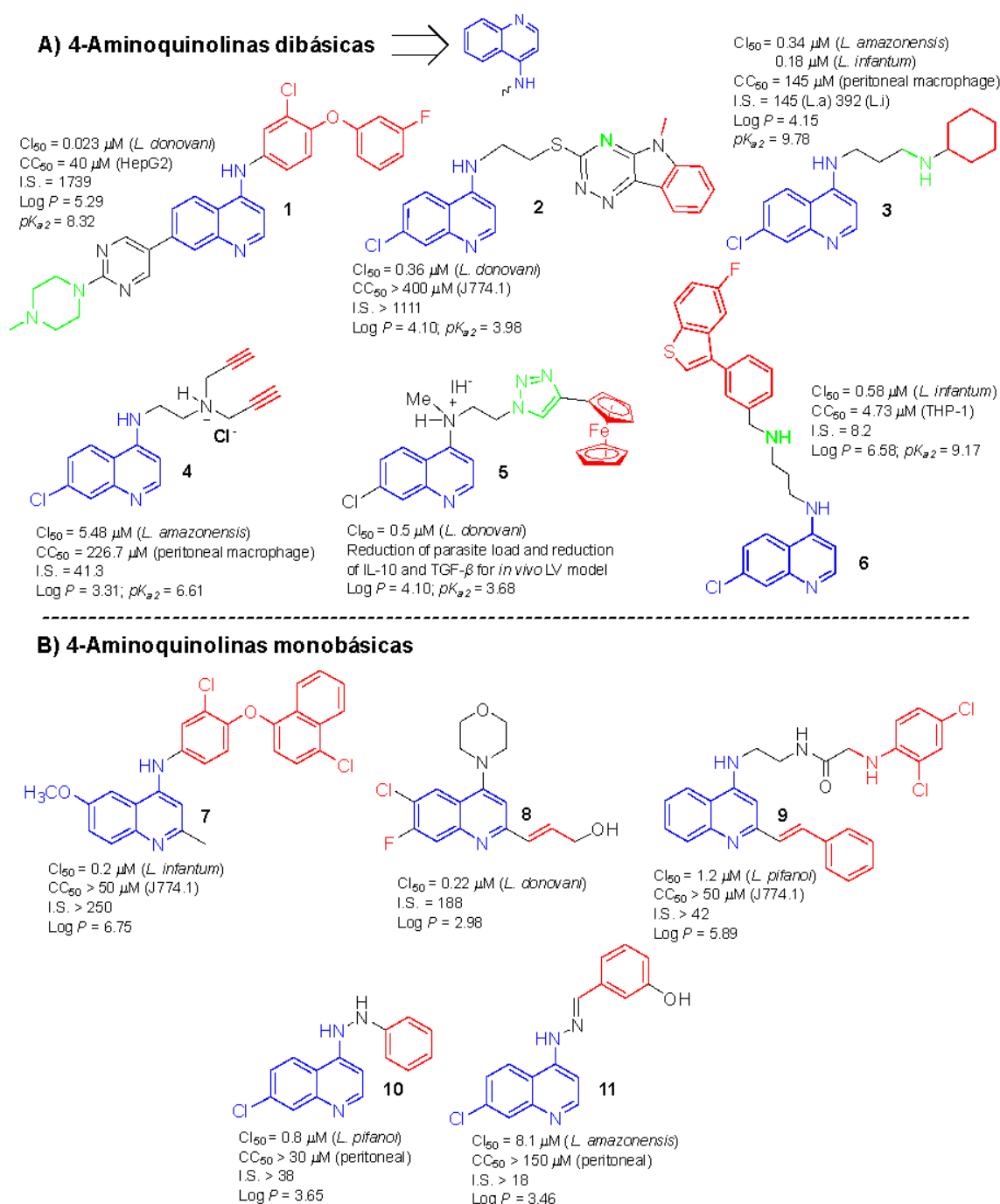


Figura 6. Derivados de quinolinas como candidatos promisorios para estudios preclínicos [ver detalles y otros ejemplos en revisión Romero, 2025a]. Cl_{50} , concentración inhibitoria 50 (definida contra estadio amastigote); CC_{50} , concentración citotóxica 50 (definida contra célula hospedera mamífera) e I.S., Índice de Selectividad = CC_{50}/Cl_{50} . Este esquema fue tomado de Romero, 2025.

Desde el punto de vista inmunológico, más allá de la conocida actividad antiparasitaria de derivados de quinolinas, es bien documentado que este tipo de estructuras también pueden

interactuar con los *TLRs*, especialmente con los *TLR7* y *TLR8*, que cumplen un papel clave en la activación de la inmunidad innata y en la polarización de la respuesta adaptativa hacia un perfil protector (Romero & Delgado, 2025; Talukdar, et al. 2021). Se ha encontrado que ciertas modificaciones en la estructura de las 4-aminoquinolinas permiten cambiar su comportamiento frente a los *TLRs*, generando antagonistas o agonistas de estos receptores, capaces de inducir una respuesta inmunoestimulante. Esto significa que es posible diseñar derivados que no solo ataquen directamente al parásito, sino que al mismo tiempo promuevan la liberación de citocinas proinflamatorias (como IL-12, TNF- α e interferones tipo I), reforzando así la capacidad del macrófago de controlar la infección (Talukdar et al. 2021).

La isoquina es un derivado de 7-cloro-4-aminoquinolinas funcionalizada en la posición 4 con un fragmento de (*N,N*-dialquilamino)metil-3-hidroxianilino (**Figura 7**). En estas moléculas, el grupo hidroxilo y el dialquilamino cambian de posición entre las posiciones 3 y 4 del fragmento anílico en comparación con la amodiaquina, lo que explica el prefijo “iso” en su nombre (**Figura 7**). Estos compuestos fueron desarrollados en sus inicios por el grupo de Paul O’Neill en la década de 1980 y mostraron una buena actividad antimalárica tanto *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* como en la forma *in vivo*, con una reducción significativa de carga parasitaria y una buena tasa de supervivencia de los animales tratados (O’Neill et al., 2003). Sin embargo, el desarrollo clínico de la isoquina se detuvo en fase preclínica II debido a efectos adversos y la baja acumulación plasmática, probablemente asociados a la presencia del grupo hidroxilo (O’Neill et al., 2009). Con el objetivo de mejorar el perfil de estas moléculas, Romero y colaboradores desarrollaron versiones deshdroxiladas de isoquina (**Figura 7**), las cuales mostraron excelente actividad antimalárica contra modelos *in vivo* de infección con *Plasmodium berghei* en combinación con una inhibición efectiva de la polimerización de β -hematina en un experimento *in vitro* (Valverde et al., 2018).

Figura 7. Estructura base de amodiaquine, isoquina y sistemas deshidroxilados de isoquina.

En el contexto de la leishmaniasis, nuestro grupo estudió el potencial de los derivados deshidroxilados de isoquina y otros derivados de isotebuquina (trece derivados) contra modelos de LC y LV. Respecto a los modelos de LC, los trece derivados fueron evaluados contra modelos *in vitro* de *L. braziliensis* y *L. mexicana*, identificando tres compuestos activos, los compuestos **I**, **II** y **III**, con valores de I.S. entre 11 y 52. Estudios *in vitro* contra amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* mostraron que el compuesto **III** ($CE_{50} = 13.9 \mu M$; I.S.=14.3) presentó mayor actividad leishmanicida y selectividad que los compuestos **I** ($CE_{50} = 22.6 \mu M$; I.S.=6.1) y **II** ($CE_{50} = 19.3 \mu M$; I.S.=5.2) (**Figura 8**). El compuesto **I** mostró una actividad leishmanicida ligeramente superior a aquella derivada del fármaco de referencia de glucantime ($CE_{50} \sim 15.1 \mu M$) (Romero, 2019). Adicionalmente, el compuesto **III** mostró un efecto leishmanicida contra líneas resistentes de *L. braziliensis* ($CE_{50} = 25.2 \mu M$; I.S.= 7.8) que fue superior a aquella respuesta derivada de amastigotes tratados con el glucantime ($CE_{50} > 50 \mu M$). Adicionalmente, se observó un aumento en la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados, lo cual sugiere un posible efecto inmunoestimulador, que ya había sido reportado en otros derivados de 4-aminoquinolinas funcionalizadas (Coimbra et al., 2016). Recientemente, nuestro grupo realizó una mayor profundización sobre el potencial de estos derivados de isoquina e isotebuquinas para extender a un modelo *in vivo* de LC infectado con *L. braziliensis*. Compuesto **II** y **III** fueron seleccionados para mayores estudios, encontrando para ellos, por ejemplo, una baja hematotoxicidad, no mutagenicidad, alta estabilidad metabólica bajo fracciones citosólicas y microsomales y una moderada a discreta solubilidad en agua con valores de solubilidad de 0.5 y 4 mg/mL para los compuestos **III** y **II**, respectivamente (Romero et al., 2025b, por enviar). En animales infectados y bajo un tratamiento intralesional, el compuesto **III** mostró una alta capacidad de reducir el tamaño y peso de la lesión, la cual fue superior a aquella derivada de los ratones tratados con glucantime. Adicionalmente, el compuesto **III** promovió una significativa reducción de la carga parasitaria (60%), la cual fue ligeramente superior a aquella promovida por el glucantime, sin efectos adversos apreciables. Adicionalmente, de este reporte quedó claro que la naturaleza del grupo fenilo extra típico de los sistemas de isotebuquina puede ser clave para modular la actividad y selectividad, lo cual fue clave para futuros diseños en nuestras investigaciones.

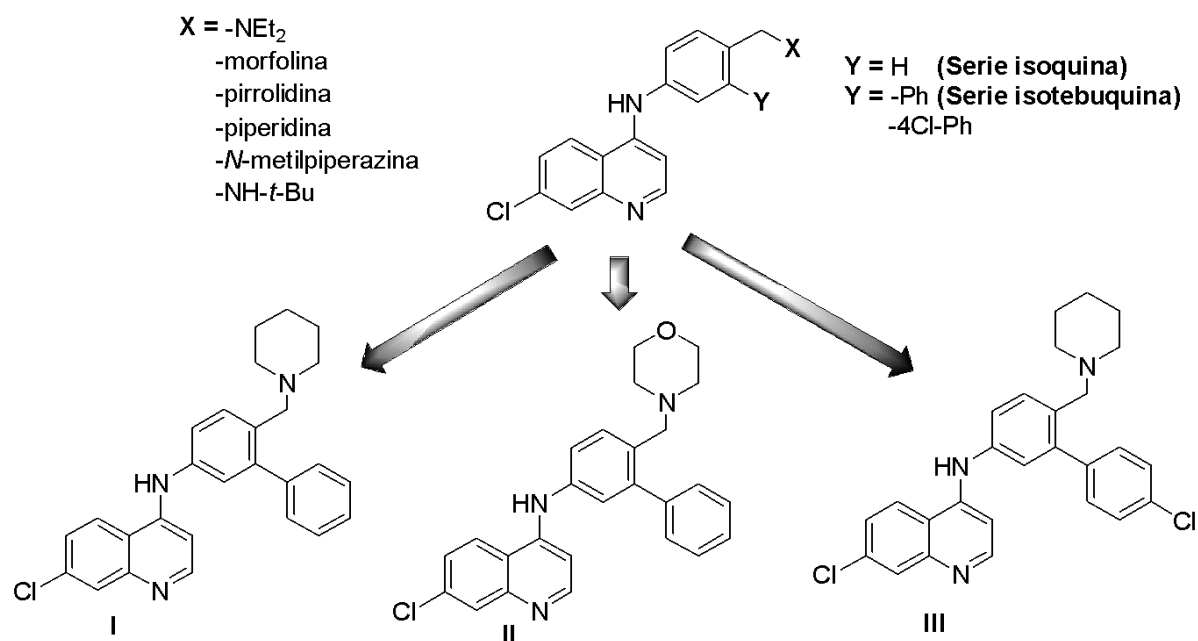


Figura 8. Estructura de derivados de isoquina e isotebuquina **I**, **II** y **III**, reportados por Romero, 2019.

Por su parte, contra un modelo *in vitro* de LV basado en macrófagos (THP-1) infectados con *L. infantum*, estos trece derivados y otros nuevos derivados fueron evaluados (Delgado, 2025). Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Institut Pasteur de Montevideo y aún se encuentra en fase de investigación avanzada. Aunque forma parte de una investigación en curso, podemos mencionar algunas características estructurales importantes (**Figura 9**). Por ejemplo, se encontró que el grupo morfolinil generó los compuestos menos tóxicos, aunque en un detrimento ligero de la actividad leishmanicida contra amastigote tanto en derivados de isoquina como de isotebuquinas. Por su parte, el grupo pirrolidinil generó compuestos muy potentes pero tóxicos con una baja selectividad en general, mientras el sustituyente piperidinil generó compuestos activos de toxicidad discreta y buenas selectividades. Por su parte, respecto al rol de sustituciones que modulan la lipofilia, encontramos que los derivados de isotebuquinas, aunque mostraron una buena potencia, presentaron una menor toxicidad que los derivados de isoquina, lo cual nos llevó a evaluar el efecto de sustituyentes menos lipofílicos que los fenilos tal como los halógenos para funcionalizar la posición 3 del fragmento anilínico. Con ello, encontramos una mejor modulación de la selectividad, muy especialmente con el sustituyente de bromo, los cuales mostraron respuestas muy superiores en comparación a aquellas encontradas en los análogos clorados o fluorados. Aunque las conclusiones son claras, es necesario hacer un mayor estudio sobre el rol de este sustituyente en la actividad leishmanicida de los derivados de

isoquinas que resultaron más selectivos, siendo necesario expandir a otros sustituyentes tales como dietilamino, terbutilamino o sustituyentes de piperacilil *N*-sustituidas. También resulta interesante evaluar la importancia real de este sustituyente de dialquilamino, que aunque se presume sea clave para la acumulación en el fagolisosoma, ya se ha documentado derivados de 4-aminoquinolinas altamente activos y selectivos carentes de esta funcionalidad (ejemplo moléculas **5**, **6** y **7** en **Figura 6**). Estos dos aspectos son necesarios abordar para dar cierre al rol de esta funcionalidad en los derivados de isoquinas como agentes leishmanicidas contra modelos de LV.

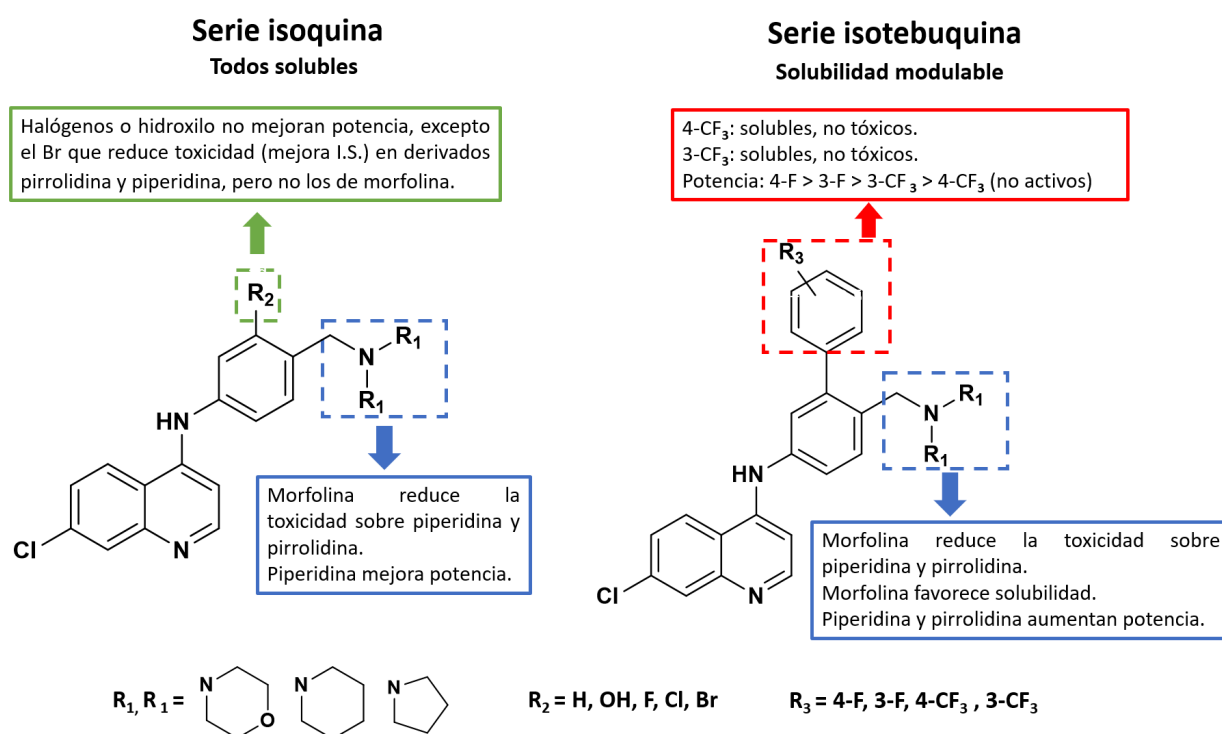


Figura 9. Identificación del sistema deshidroxilado de isoquina e isotebuquina como plataformas potenciales para el diseño de agentes leishmanicidas y su respectivo análisis de la relación estructura-actividad derivada de estudios preliminares en el modelo de infección de macrófagos humanos con *L. infantum*. Imagen tomada de la Tesis Francisco Delgado (Delgado, 2025).

2.8. *N*-acilhidrazonas como farmacóforo potencial en el diseño de agentes leishmanicidas

El fragmento de *N*-acilhidrazona, que consiste de un grupo hidrazona ($-\text{C}=\text{N}-\text{NR}-$) conectado al nitrógeno terminal a un grupo acilo para dar el siguiente tipo de función química: $\text{R}_1-\text{C}=\text{N}-\text{NR}_2-\text{C}(\text{O})-\text{R}_3$ (**Figura 10**), el cual ha sido reconocido como un farmacóforo interesante en el diseño de agentes leishmanicidas con una constante evolución a

lo largo del tiempo hasta llegar a la formulación de estructuras altamente activas y selectivas contra modelos de leishmaniasis.

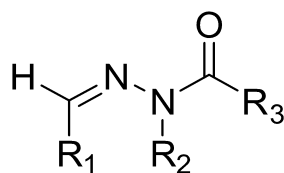


Figura 10. Estructura general de una *N*-acilhidrazona del tipo: $\text{R}_1\text{-C=N-NR}_2\text{-C(O)-R}_3$.

Comenzando con una reseña cronológica, en 2005 Bernardino y colaboradores (Bernardino et al., 2006) reportaron la actividad leishmanicida de *N*-acilhidrazonas caracterizadas por un grupo acilo (R_3) del tipo *N*³-fenilpirazol y como sustituyente R_1 el grupo 4-nitrofenilo, generando compuestos con una actividad leishmanicida muy discreta (CE_{50} entre 50 y 80 μM) (ver **Figura 11A**) contra amastigote de *L. amazonensis*.

Posteriormente, Cerecetto y Gonzalez (Hernández et al., 2013) reportaron en 2013 la actividad de una serie de *N*-acilhidrazonas que consistían de un grupo *N*-acilo (R_3) de fenilos sustituidos y furoxano así como benzofuroxanos, furoxanos y fenilos sustituidos como sustituyente R_1 . Esta conectividad dió con la identificación de dos compuestos muy potentes y selectivos con valores de CE_{50} en rangos sub-micromolares así como I.S. superiores a 100 contra amastigote de *L. amazonensis* (ver **Figura 11B**). De esta investigación se extrae que los furoxanos, benzofuroxanos y fenilos oxigenados representan farmacóforos potenciales, siendo requerido al menos un grupo furoxano o benzofuroxano entre las funcionalidades R_3 o R_1 para generar compuestos altamente activos y selectivos.

Acomplejamiento de *N*-acilhidrazonas con oxo-vanadio (IV) (Benítez et al., 2013) generó compuestos con respuesta leishmanicida discreta contra amastigote de *L. major* (ver **Figura 11C**), siendo necesario mayores investigaciones para evaluar el real potencial del acomplejamiento con especies de vanadio en orden de mejorar la respuesta leishmanicida y selectividad, al menos en este tipo de *N*-acilhidrazonas.

Otro tipo de combinaciones entre los sustituyentes R_3 y R_1 , por ejemplo, grupo cinamoilo y fenilo sustituidos, respectivamente, genera compuestos de actividad moderada con valores de CE_{50} entre 3 y 10 μM contra *L. donovani* para sus derivados más activos y selectivos (ver **Figura 11D**) (Carvalho et al., 2014).

Otros ejemplos enmarcado en el uso de furoxano y benzofuroxano como sustituyente de acilo R_3 (Dutra et al., 2014) ha permitido a acceder a compuestos con actividades

leishmanicida en rangos sub-micromolares de CE_{50} e índices de selectividades mayores a 15 contra amastigote de *L. amazonensis* (ver Figura 11E).

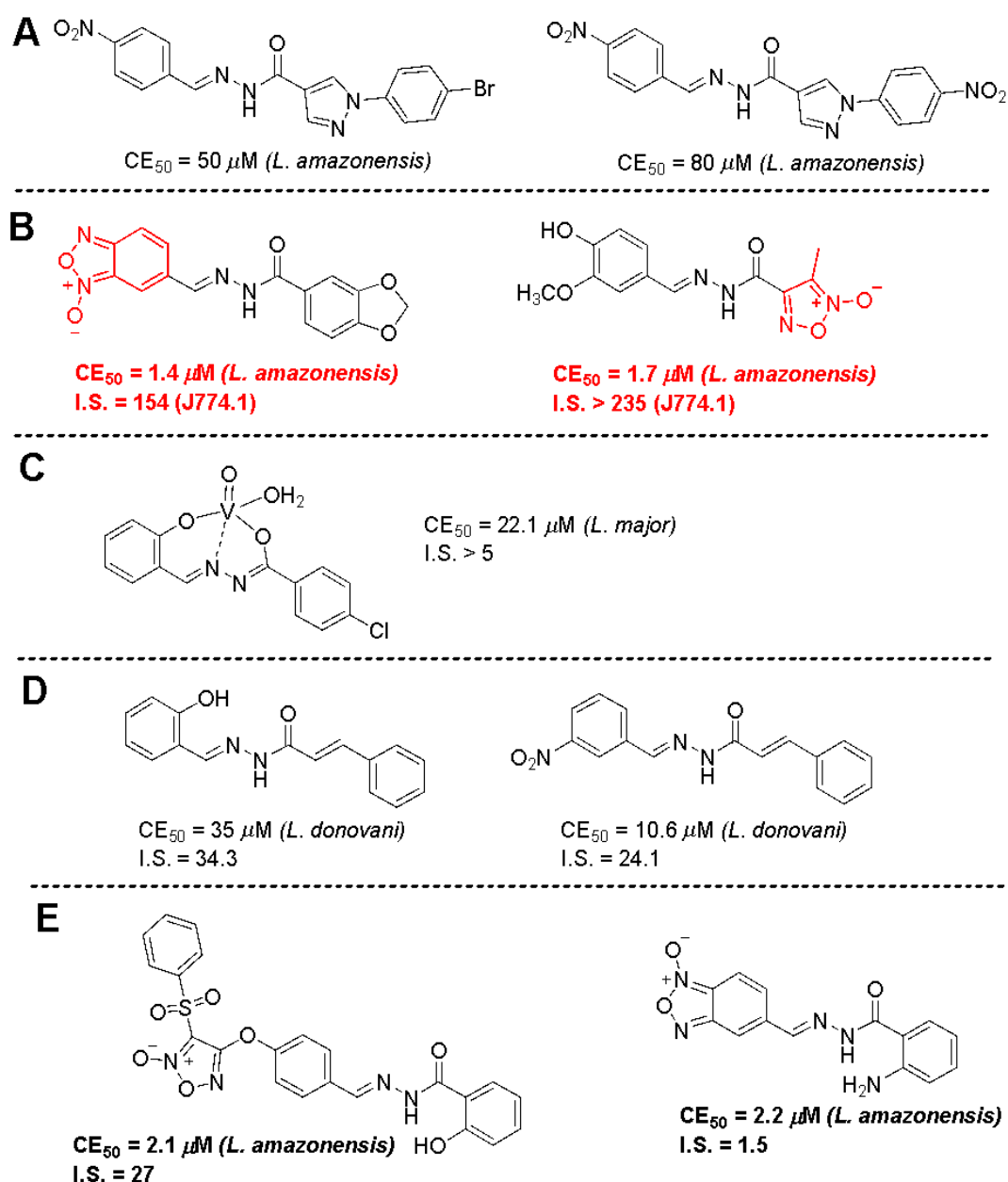


Figura 11. Estructura de tres tipos de *N*-acilhidrazonas (A), (B), (C), (D) y (E) como agentes leishmanicidas. Actividad focalizada en estudios *in vitro* contra amastigote intracelulares.

Más allá de la relevancia de los grupos de furoxano y benzofuroxano, sustituyentes heterocíclicos han sido identificados como potenciales farmacóforos como sustituyente *N*-acilo R_3 . Por ejemplo, el pirazol conectado a piracina-1,2 por la cara “e” como sustituyente *N*-acilo R_3 genera un derivado con una buena actividad leishmanicida ($CE_{50} = 3.8 \mu M$ contra *L. amazonensis*) e índice de selectividad de 60 (ver Figura 12A) (Jacomini et al., 2018). Por

otra parte, el uso de pirazol dimetil carbono-sustituídos genera compuestos de actividad leishmanicida moderada contra amastigote de *L. amazonensis* (CE_{50} entre 10 y 42 μM) para los derivados más activos de la serie (**ver Figura 12B**) (Monteiro et al., 2025; Socea et al., 2022). Finalmente, la introducción de benzimidazol mediante el carbono C2 al grupo *N*-acilo en combinación con 5-nitrofurilo como sustituyente R_1 generó compuestos con una actividad *in vitro* contra amastigote de *L. amazonensis*, pero en rangos sub-micromolares contra el modelo de infección de un parásito análogo como *T. cruzi* (**ver Figura 12C**) (Ramos et al., 2024).

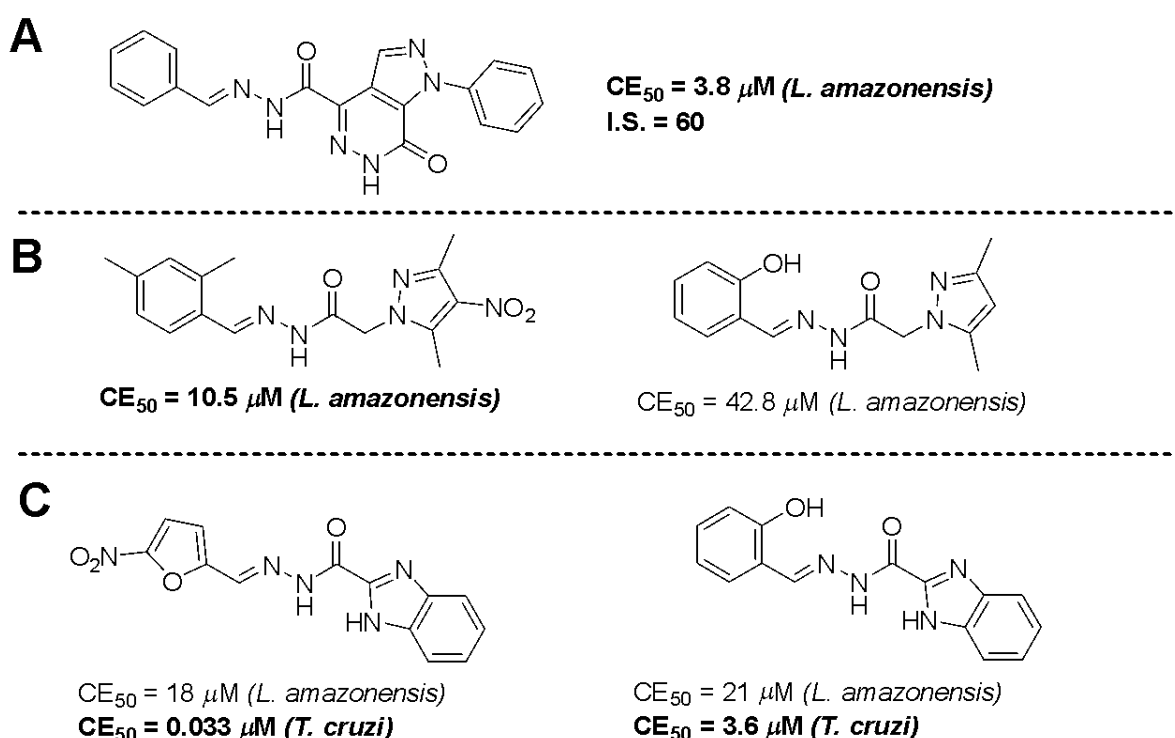


Figura 12. Estructura de diversas de *N*-acilhidrazonas (A), (B) y (C) como agentes leishmanicidas. Actividad focalizada en estudios *in vitro* contra amastigote intracelulares.

Desde el punto de vista del mecanismo de acción, se han propuesto la inducción de estrés oxidativo (para los nitroheteroarenos) y la inhibición de la tripaniotoma reductasa (TR). Esta última enzima está implicada en la homeostasis redox del parásito, siendo así enzimas vitales para *Leishmania*.

Más allá de las *N*-acilhidrazonas, sus análogas *N*-heteroarilhidrazonas, que se diferencian de sus antecesoras por el reemplazo del grupo acilo R_3 por un heteroareno (1,3-piracina, piridina, ftalacina, quinazolina, etc) generalmente, también muestran un gran potencial, siendo esencial la incorporación del nitroheteroarenos como sustituyente R_1 . En la **Figura 13** se muestran algunos ejemplos resaltantes. Por ejemplo, Coimbra y colaboradores (Coimbra et

al., 2019) mostraron que la combinación de 1,3-piracinas como *N*-heteroareno y 5-nitrofurilo como sustituyente R_1 generó compuestos altamente activos, dando valores de CE_{50} en rangos nanomolares contra amastigote de *L. amazonensis*, en contraposición de su moderada respuesta contra promastigote (CE_{50} = 10.8 μ M) (**ver Figura 13A**). Por su parte, nuestro grupo de investigación ha venido explorando el potencial de *N*-acilhidrazonas como agente leishmanicida (Romero et al., 2017; Romero et al., 2017c; Romero et al., 2019; Romero et al., 2023) y contra un parásito análogos tal como el *T. cruzi* en modelos *in vitro* (Romero et al., 2017b; Romero et al., 2023). Por ejemplo, el reemplazo de 1,3-piracina por el heteroareno de 1,4-ftalacina, también funcionalizado con el grupo 5-nitrofurilo como sustituyente R_1 , permitió generar un compuesto activo con una respuesta a niveles sub-micromolar (CE_{50} = 0.5 μ M) contra amastigote de *L. braziliensis* en un modelo de infección bastante robusto como el de BMDM (**ver Figura 13B**) (Romero et al., 2017). Aprovechando a la 1,4-ftalacina, una doble *N*-arilhidrazona mediante las posiciones 1 y 4 en combinación con 4-fluorfenilo como sustituyente R_1 permitió acceder a un derivado con una buena actividad leishmanicida contra amastigote de *L. braziliensis* y de muy baja citotoxicidad contra modelos de infección de BMDM (**ver Figura 13C**) (Romero et al., 2019). Finalmente, la introducción de un *N*-heteroareno como quinazolina mediante la posición 4 en combinación con 5-nitrofurilo como sustituyente R_1 ha permitido acceder a compuestos altamente activos en modelos axénicos de *L. infantum* con valores de CE_{50} en rangos sub-micromolares (**ver Figura 13D**) (Romero et al., 2023). En particular, el derivado 4-flúorsustituido (**Figura 3D**, izquierda) fue no mutágeno, mientras su análogo 3-clorosustituido (**Figura 3D**, derecha) resultó altamente mutágeno. La mayoría de estas *N*-arilhidrazonas funcionalizados por el sustituyente 5-nitrofurilo actúan en parte a mediante un mecanismo de estrés oxidativo, sugerido a partir de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante mediciones fluorométricas.

Como se puede notar, la *N*-acilhidrazona representa una plataforma altamente versátil y atractiva para el desarrollo y diseño racional de agentes leishmanicidas, con una alta plasticidad que permite introducir sustituyentes que son capaces de modificar la lipofilia, la reactividad y el perfil electrónico del compuesto. En general, de la compilación se puede notar que el uso de *N*-heteroareno en el fragmento de *N*-acilo así como nitro heteroarilo como sustituyente R_1 parece ser esenciales al momento de diseñar compuestos altamente potentes contra modelos *in vitro* de *Leishmania*. Por tanto, combinar un núcleo de probada actividad leishmanicida como la quinolina como sustituyente R_1 con diferentes arilos y heteroarilos

incluyendo el 5-nitrofurilo como *N*-acilo sustituyente pueden ser muy interesante para el diseño de nuevas estructuras de *N*-acilhidrazonas.

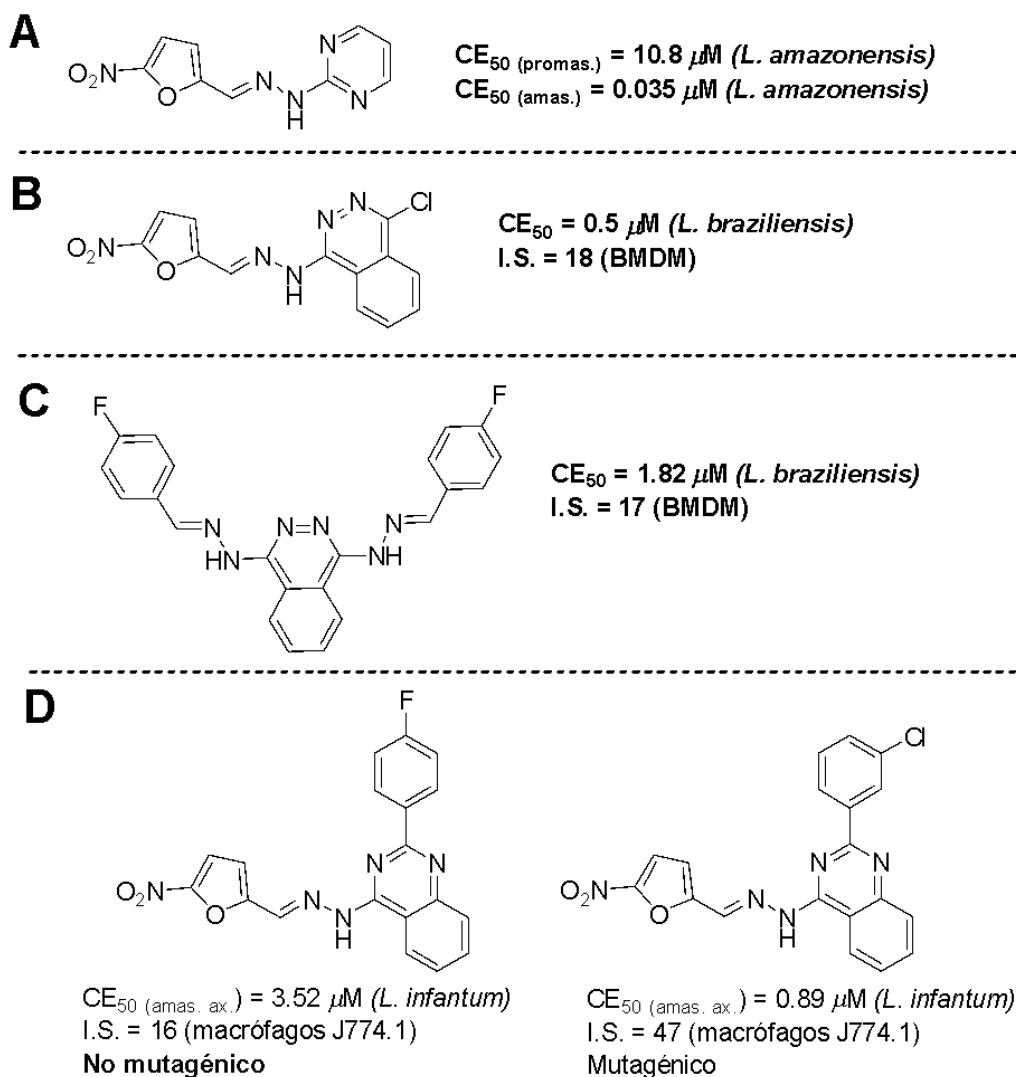


Figura 13. Estructura de diversas *N*-arilhidrazonas (**A-D**) como agentes leishmanicidas. Actividad focalizada en estudios *in vitro* contra amastigote intracelulares.

2.9. Importancia de la basicidad y lipofilicidad en el diseño de agentes leishmanicidas

El diseño racional de fármacos contra la *Leishmania* no debe centrarse únicamente en la potencia propia de las moléculas sobre los blancos del parásito, sino que también en su capacidad de llegar al sitio donde este se encuentra dentro de la célula. Durante la infección, los amastigotes se localizan en el interior de los fagolisosomas de macrófagos, lo cual suma un grado más a la dificultad al diseño de agentes leishmanicidas potentes y selectivos contra modelos infectivos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniasis, siendo una etapa donde muchos compuestos suelen ser descartados en ensayos preclínicos. Sin embargo, algunas

características propias del organelo tales como una membrana altamente lipofílica y un interior ácido ofrece una oportunidad para el desarrollo de agentes leishmanicidas dirigidos selectivamente al fagolisosoma modulando dos propiedades de los compuestos tales como la lipofilicidad y la basicidad en términos de la constante de ionización (Coimbra et al., 2016; Konstantinović et al., 2018).

En términos generales, desde el punto de vista fisicoquímico es posible modular la capacidad de la quinolinas y cualquier otro agentes quimioterapéutico para acumularse en el fagolisosoma y otros organelos análogos (ej. lisosoma, acidocalcisomas, vacuola, etc). S. Trapp y colaboradores (Trapp et al. 2008) mostraron que fármacos (especialmente quinolinas antimaláricas) con grupos básicos débiles poseen una alta capacidad para acumularse en el lisosoma celular, en un porcentaje superior a otros sitios celulares como citosol o mitocondria. Del estudio, una alta y selectiva acumulación fue encontrada para bases mono- y di-valentes que tengan valores de alto a intermedia de $\text{Log } P$ entre 4 y 10. Para bases monovalentes, el parámetro óptimo estuvo entre 6 y 10 para el pK_a y entre 0 y 3 para el $\text{Log } P$. Para bases bivalentes, el valor óptimo de pK_{a2} (dialquilamina) fue entre 8 y 10 y entre 4 y 8 para el pK_{a1} , mientras el valor óptimo para el $\text{Log } P$ fue entre 3 y 6. Para mostrar la relevancia de la presencia de grupos básicos, un compuesto neutro carente de este tipo de grupos, ejemplo la artemesinina, mostró una inapreciable acumulación en el lisosoma. Autores propone que la acumulación efectiva y selectiva del compuesto es derivada de un mecanismo de “*ion-trapping*” (**Figura 14**), donde la protonación parcial en el entorno ácido ($\text{pH } 4\text{-}5$) favorece la ionización y posterior acumulación con baja tasa de intercambio hacia el exterior.

Por su parte, la lipofilia es esencial para asegurar su penetración a través de la membrana. En esta dirección, Marceau y colaboradores identificaron una efectiva correlación entre la lipofilicidad en términos de $\text{Log } P$ y su óptima acumulación en el lisosoma (Marceau et al., 2012). Basado en estudio en una serie de derivados incluyendo trietanolamina, procainamida, trietilamina, lidocaína, imatinib, cloroquina, astenizol, quinacrina, dronedarona y amiodarona que presentaron valores de pK_a óptimos en el rango entre 8 y 10, los autores encontraron que la acumulación fue óptima para compuestos con valores de $\text{Log } P$ entre 1 y 4, mientras una menor acumulación fue apreciada para compuestos con valores de $\text{Log } P$ menores a 4.

Por lo tanto, la combinación de estas dos propiedades pueden ser claves para garantizar su acumulación en el fagolisosoma. La introducción de grupos lipofílicos que provean un $\text{Log } P$ entre 1-4 busca facilitar la penetración de la quinolina a través de la membrana lipofílica, mientras los grupos básicos buscan asegurar su acumulación con baja tasa de difusión al

exterior como consecuencia de su protonación mediante el mecanismo de “ion trapping” tal como se muestra en la **Figura 14**.

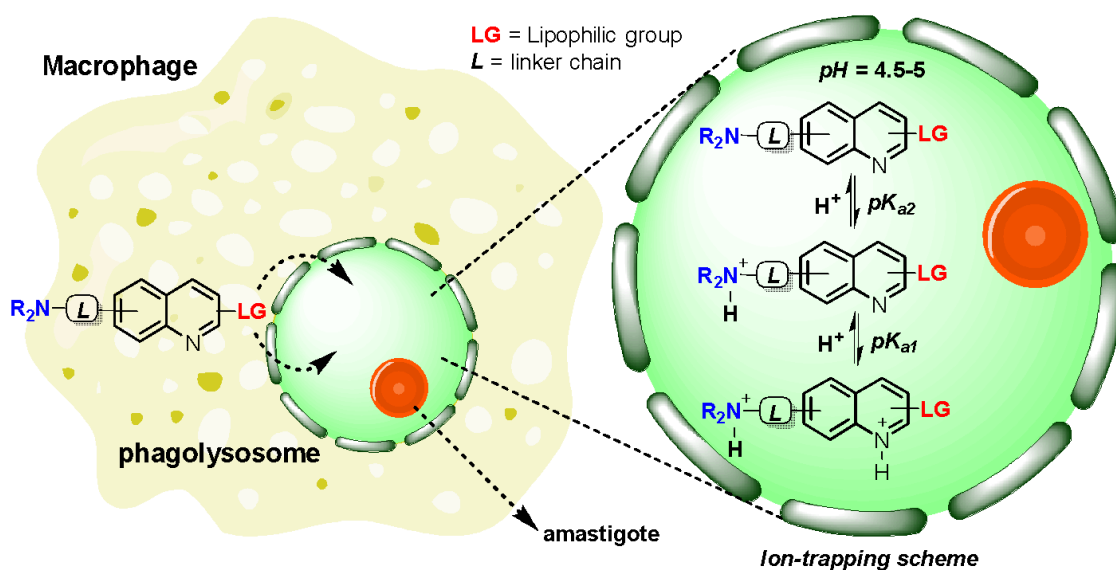


Figura 14. Mecanismo tentativo de acumulación de la quinolina dentro del fagolisosoma a través de la penetración lipofílica y subsecuente mecanismo de atrapamiento iónico mediante protonación de grupos básicos en un ambiente ácido. Este esquema fue tomado de Romero, 2025a.

Aunque no existe un reporte claro, Romero, 2025a mostró a partir de un grupo selecto de quinolinas y basado en su actividad leishmanicida contra amastigote intracelulares, mostró cierta correlación con estas propiedades, encontrando que los derivados más potentes y selectivos presentan constante de ionización (pK_{a2}) entre 6 y 9, mientras la lipofilia en términos de $\log P$ y se ubica entre 4 y 6 (ver datos de actividad leishmanicida, pK_{a2} y $\log P$ en **Figura 6**). Este dato es importante ya que para el diseño de agentes leishmanicidas es necesario una lipofilia superior a la recomendada por Marceau, que fue determinado como una perspectiva más general. Por lo tanto, la evidencia apunta a que la basicidad y la lipofilia son parámetros clave para la optimización y diseño de agentes leishmanicidas. Ajustar el pK_a y el $\log P$ en derivados quinolínicos no solo garantiza su acumulación selectiva en compartimentos ácidos del hospedero y del parásito, sino que también potencia su eficacia y su selectividad biológica (Romero, 2025a; Romero & Delgado, 2025). Más allá del fagolisosoma, otras estructuras ácidas del parásito, como los ácidocalcisomas, también pueden ser blanco de compuestos con propiedades lisosomotrópicas. Estos organelos cumplen un rol clave en la homeostasis del calcio y el metabolismo energético de la *Leishmania* (Carvalho et al., 2011). Algunos fármacos, como la sitamaquina, han demostrado

acumularse rápidamente en estas estructuras, induciendo desequilibrios celulares que favorecen la muerte del parásito (López-Martín et al., 2008; Coimbra et al., 2010).

2.10. Propuesta y justificación de la tesina

En vista de la importancia de las quinolinas para el diseño de agentes leishmanicidas, en particular, las 4-aminoquinolinas por su potencial de actuar como inmunoestimulador, su habilidad de acumular en el fagolisosoma con un control adecuado de la constante de ionización y la lipofilicidad y su alta versatilidad estructural para introducir funcionalidades claves, en la presente tesis de grado se planeó la síntesis (en algunos casos) y evaluación leishmanicida contra modelos *in vitro* de LV de una serie de tres tipos de sistemas quinolínicos: (i) derivados pre-análogos de imiquimod (**1-4, 3 derivados + imiquimod, grupo I, Figura 15**); (ii) derivados deshidroxilados de isoquina funcionalizados (**14-22, 17 derivados, grupo II, Figura 15**) con diversos grupos de dialquilamino así como otros carentes de esta funcionalidad y, (iii) derivado de quinolin-3-*N*-acilhidrazonas (**23-53, 30 derivados, grupo III, Figura 15**).

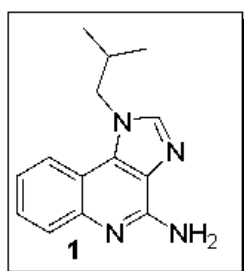
La idea del primer sistema químico es verificar la actividad leishmanicida de una serie de pre-análogos de imiquimod y verificar la relevancia del grupo 2-amino y el fragmento de imidazol (que son típicos en la estructura del imiquimod) en la actividad leishmanicida de este tipo de estructuras. Además, demostrar si el reemplazo de la cadena de *N*-isobutilo por la incorporación de un fragmento de *N*-bencilo mejora la actividad leishmanicida.

Por su parte, el segundo grupo busca verificar el rol de la funcionalidad dialquilamino en la actividad leishmanicida de derivados deshidroxilados isoquina. Para ello, primeramente, se estudió el efecto de la supresión de este farmacóforo en la actividad leishmanicida, lo que llevo al diseño de los derivados **5-10 (6 derivados)**. En una segunda parte, se estudió el efecto de la supresión de este grupo dialquilamino en combinación con un incremento de la lipofilia mediante la incorporación de sustituyentes lipofílicos carentes de grupos básicos como alternativa al sustituyente de dialquilamino (**3 derivados**). Finalmente, en un tercer renglón, se estudió el efecto de otras funcionalidades de dialquilamino incluyendo dietilamino, terbutilamino, piperacínil *N*-sustituidas y imidazol (**8 derivados**), en orden de identificar un farmacóforo más allá de los reconocidos morfolinil y piperidinil (Delgado, 2025).

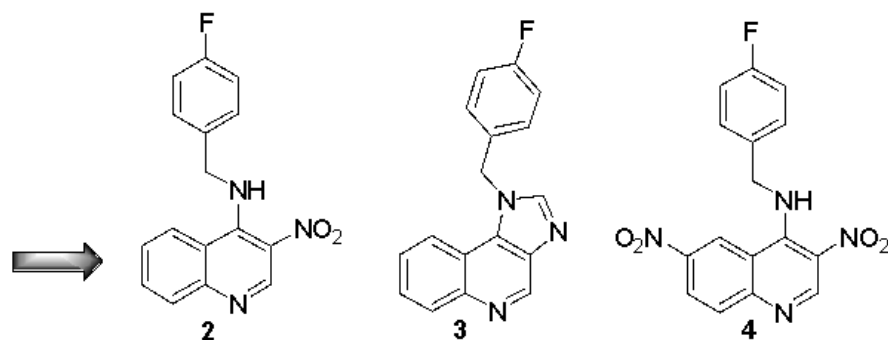
Finalmente, del **grupo III** (quinolin-3-*N*-acilhidrazonas) se busca verificar si el uso de quinolinas como sustituyente del grupo *N*-acilo en combinación con una variedad de

sustituyentes R1 puede generar compuestos altamente activos contra modelos *in vitro* de *Leishmania*. Diversos grupos arilo incluyendo el 5-nitrofurilo, un farmacóforo leishmanicida identificado en otras plataformas de *N*-acilhidrazonas, forman parte de las estructuras a estudiar.

GRUPO I



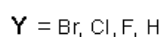
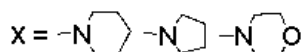
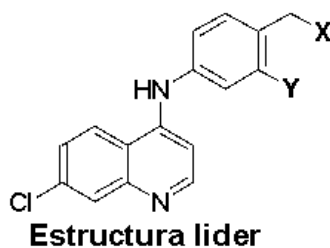
Imiquimod líder
como agonista de TLR7(8)



3 derivados

GRUPO II

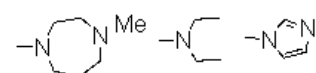
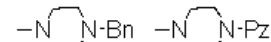
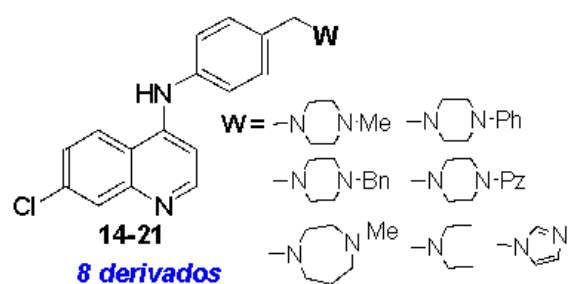
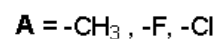
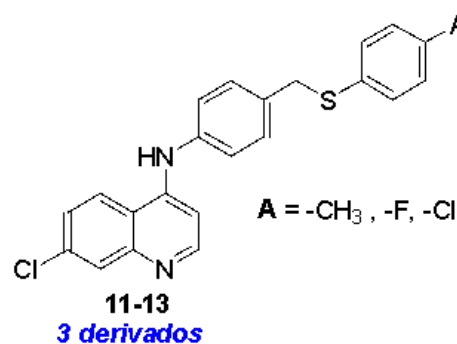
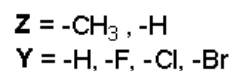
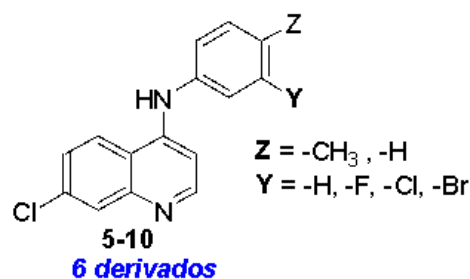
*Derivados deshidroxilados
de isoquina
Delgado, Tesina 2025*



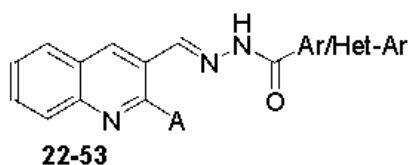
Explorar la relevancia del
grupo dialquilamino

Explorar incremento de
la lipofilia en ausencia
del grupo dialquilamino

Identificar otro potencial
grupo dialquilamino



GRUPO III



30 derivados

Figura 15. Estructuras de compuestos a evaluar distribuidos por familia: grupo I, grupo II y grupo III.

En resumen, la presente investigación busca la optimización de tres sistemas quinolínicos para generar nuevas plataformas para el desarrollo de nuevos compuestos con buena potencia leishmanicida y selectivos.

Concretamente esta investigación busca responder las siguientes preguntas:

¿Es posible mejorar la selectividad de los derivados de isoquina con la modulación del grupo dialquilamino?

¿Es posible mejorar la selectividad de los derivados de isoquina con la supresión del grupo dialquilamino?

¿Es posible reconocer compuestos activos análogos de imiquimod carentes del grupo imidazol y 2-amino en la estructura base de imidazolquinolina?

¿Es posible reconocer compuestos activos de *N*-acilhidrazonas activos basados en quinolinas?

¿Es posible reconocer un potencial *hit* para avanzar en los estudios preclínicos?

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo general*

Identificar aspectos estructurales claves en análogos de imiquimod, isoquina deshidroxiladas y quinolin-3-*N*-acilhidrazonas como agentes leishmanicidas en modelos *in vitro* de *L. infantum*

3.2. *Objetivos específicos*

1. Síntesis y caracterización de pre-análogos de derivados de imiquimod **2-4**
2. Síntesis y caracterización de algunos análogos deshidroxilados de isoquina **5-10**
3. Evaluación *in vitro* de actividad leishmanicida contra promastigote de *L. infantum* de derivados del grupo I, grupo II y grupo III
4. Evaluación *in vitro* de actividad leishmanicida contra amastigote de *L. infantum* de un selecto grupo provenientes de los grupos I, II y III.
5. Identificar el rol de diferentes funcionalidades químicas en la actividad leishmanicida de los pre-análogos de imiquimod **2-4**, análogos deshidroxilados de isoquina **5-21** y derivados de quinolina-3-hidrazonas **23-54**

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Parte Química

4.1.1 Generalidades

Para llevar a cabo la síntesis y caracterización de alguno de los compuestos orgánicos presentados en este trabajo, se dispuso de los siguientes materiales y equipos:

- Material de vidrio presente en el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Evaporación de solventes a presión reducida (puntos de ebullición bajos y medios). La destilación de solventes tales como CH_2Cl_2 , CHCl_3 , *n*-hexano y acetato de etilo fueron realizados en un rotaevaporador marca BUCHI, modelo R-114, conectado a un baño de calentamiento marca BUCHI, modelo B-180, y a una bomba de vacío de marca Welch.
- Puntos de fusión: los puntos de fusión fueron medidos en un fusiómetro marca Fisher-John con un termómetro de 300 °C (± 1), y no están corregidos.
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN): los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{19}F -RMN, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC y $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC fueron realizados en un espectrómetro marca BRUKER Avance DPX-400 (400 MHz para los experimentos de ^1H -RMN; 100 MHz para ^{13}C -RMN), tomados en solventes deuterados como CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$.
- Un equipo de análisis elemental marca Perkin Elmer 2400 CHN analyser para la caracterización de productos finales ($< 0.4\%$).
- El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se controlaron por cromatografía en capa fina con fase estacionaria sílica-gel (Kieselgel 60 F254) de la firma MERCK® y disolventes adecuados como fase móvil. Los métodos empleados para revelar las placas de TLC fueron: exposición a luz ultravioleta y exposición a vapores de yodo.
- Todos los espectros correspondientes a los intermedios y derivados finales se pueden encontrar en un documento digital llamado ANEXO.

Los siguientes reactivos como función de casa comercial fueron empleados sin previo tratamiento:

Sigma-Aldrich Co: 4,7-dicloroquinolina (99%), etanol absoluto (100%), estaño (99%), 4-fluorobencilamina, 2-fluor-4-nitrotolueno, anilina, 4-hidroxiacetanilida, *N*-3,5-piracnil-piperacina, *N*-metilpiperacina, *N*-fenilpiperacina, *N*-bencilpiperacina,

dietilamina, imidazol, *N*-metilhomopiperacina, miltefosina y sal de cloroquina didosfato.

Cayman: 4-Hidroxiquinolina.

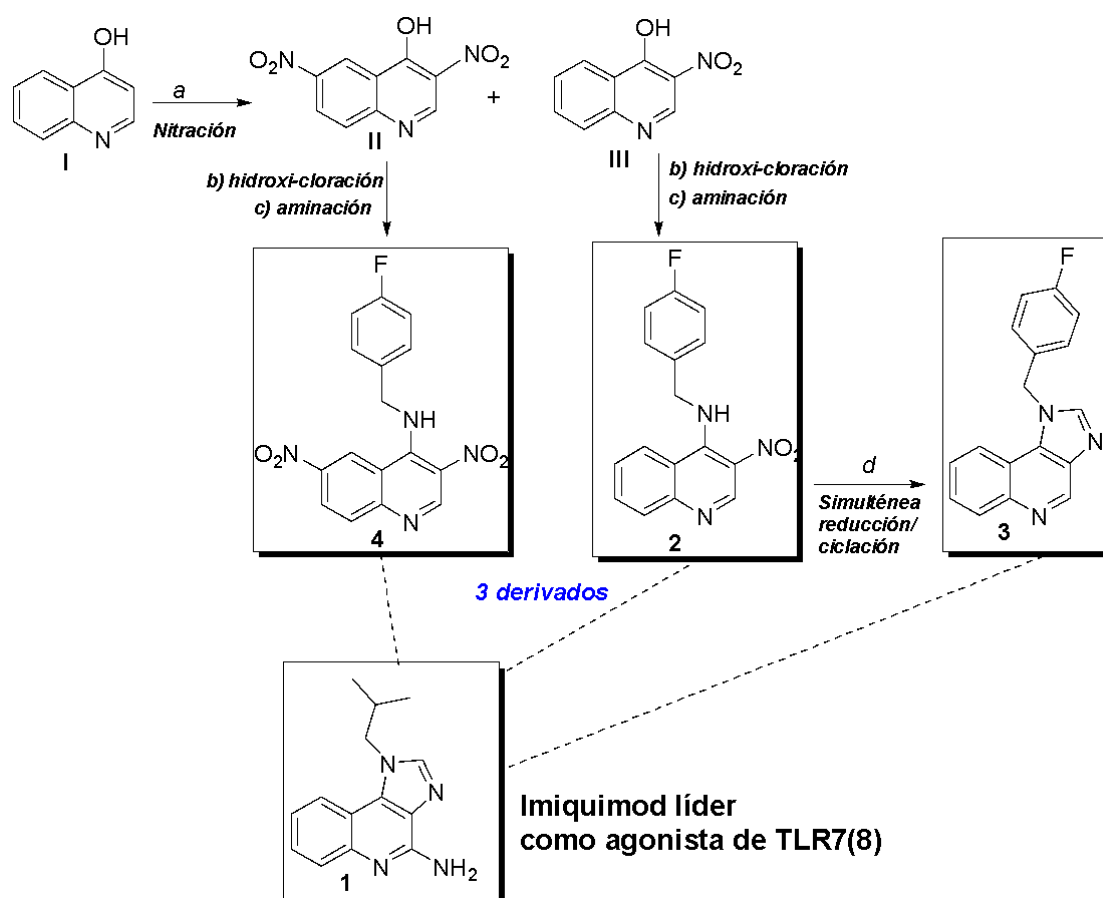
MERCK®: trietilamina (99%), 4-metil-3-cloroanilina, Fe (99.9%), *p*-toluidina (99%), CuI (99%) y H₂SO₄ (98%).

Dorwil: HCl (37%).

Disolventes tales como diclorometano, acetato de etilo, *n*-hexano fueron adquiridos bajo forma técnica y posteriormente fueron purificados siguiendo el tratamiento correspondiente y posterior destilación de acuerdo a técnica descrita (Vogel, 2003). Otros disolventes como acetonitrilo (MERCK®), tolueno (MERCK®), cloroformo (MERCK®), diclorometano (Sigma-Aldrich Co), etanol anhidro (Sigma-Aldrich Co) fueron utilizados sin previa purificación.

4.1.2 Procedimientos de síntesis

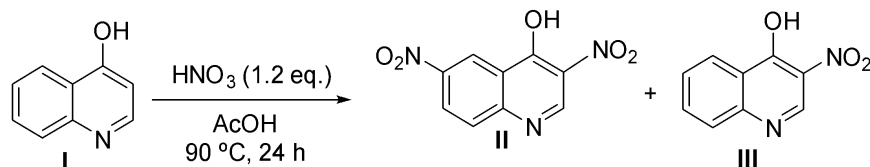
4.1.2.1. Síntesis de derivados pre-análogos de imiquimod 2-4



Esquema 1. Ruta general para la síntesis de derivados pre-análogos de imiquimod 2-4. Condiciones de reacción: (a) I (1 eq.), HNO₃ (1.2 eq.), AcOH, 90 °C, 24 h. (b) II ó III (1 eq.),

POCl₃ (7 eq.), 80 °C, 2 h y luego, (c) 4-flúorbencilamina (1.1 eq.), acetonitrilo, 80 °C, 24 h. (d) **2** (1.0 eq.), Fe (10 eq.), HCOOH (10 eq.), NH₄Cl (5 eq.), isopropanol, 80 °C, 2 h.

4.1.2.1.1. Síntesis de los intermedios de 4-hidroxi-3-nitro-quinolina **II y 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina **III** a partir de nitración de 4-hidroxiquinolina **I****



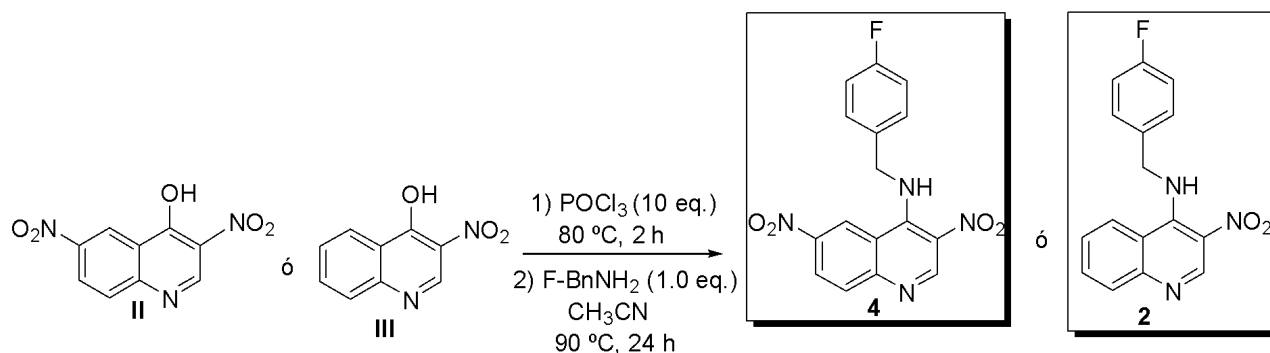
Esta reacción fue realizada de acuerdo a un protocolo con pequeñas modificaciones (Buckle et al., 1975). En un balón de fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se agregó 4-hidroxiquinolina **I** (200 mg, 1 eq.) y se disolvió en ácido acético (5 mL). Seguidamente, se añadió a la mezcla ácido nítrico (1.2. eq.) y se llevó a calentamiento a 90 °C bajo agitación por 24 horas. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano: acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Al culminar la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el precipitado resultante fue filtrado y posteriormente, se purificó por una cromatografía rápida para obtener el 4-hidroxi-3-nitroquinolina **II** (*R_f*=0.3 en *n*-hexano/AcOEt). Por su parte, de la solución resultante de la filtración se realizó una extracción con acetato de etilo. Se evaporó el disolvente al vacío y se aplicó una cromatografía en columna utilizando la fase móvil *n*-hexano/AcOEt (9:1), logrando separar el 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina **III** (*R_f*=0.6 en *n*-hexano/AcOEt) y la 4-hidroxi-3,5,6,7,8-pentanitroquinolina (*R_f*=0.8 en *n*-hexano/AcOEt). Estos intermedios fueron caracterizados por ¹H-RMN y algún caso por ¹³C-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

4-Hidroxi-3-nitroquinolina (**II**): sólido amarillo pálido, 40 mg (rendimiento 20%), *R_f*=0.3 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ¹H-RMN (400 MHz, acetone-d₆): δ 8.17 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H). ¹³C-RMN (100 MHz, acetone-d₆): 156.2, 143.1, 139.5, 135.4, 134.4, 129.4, 126.5, 123.4, 117.5.

4-Hidroxi-3,6-dinitroquinolina (**III**): sólido amarillo intenso, 80 mg (40%), *R_f*=0.6 en *n*-hexano/AcOEt (8:2). ¹H-NMR (400 MHz, acetone-d₆): δ 8.42 (s, 1H), 8.1 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H).

4.1.2.1.2. Síntesis de los intermedios de *N*-(4-flúorbencil)-3-nitro-quinolin-4-amina **2 y *N*-(4-flúorbencil)-3,6-dinitroquinolin-4-amina **4****



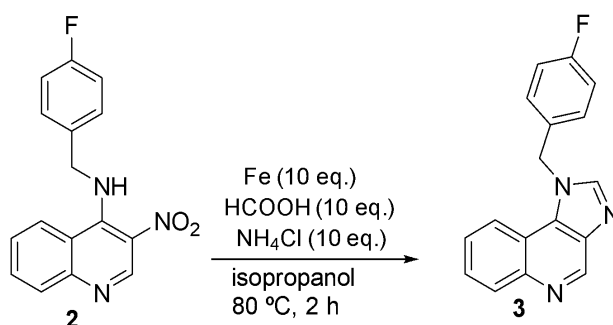
Esta reacción fue realizada de acuerdo a un protocolo con pequeñas modificaciones (Romero et al., 2015; Valverde et al., 2018). En un balón de fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se agregó 4-hidroxi-3-nitroquinolina **III** (ó **II**) (50 mg, 1 eq.) y seguidamente POCl_3 (10 eq.). La mezcla se llevó a reflujo bajo agitación por 2 horas. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano: acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Al culminar la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el POCl_3 fue evaporado al vacío hasta obtener un aceite de color beige. Se dejó enfriar y se agregó acetonitrilo y seguidamente, 4-flúorbencilamina (1.0 eq.) y la solución resultante se llevó a reflujo por 24 horas. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano: acetato de etilo (8:2) como fase móvil. La mezcla se sejó enfriar, se evaporó el disolvente al vacío y se aplicó una cromatografía en columna utilizando la fase móvil *n*-hexano/AcOEt (9:1), logrando separar el producto deseado **2** ó **4** como sólidos amarillos pálidos. Estos productos fueron caracterizados por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

***N*-(4-fluorobencil)-3-nitroquinolin-4-amine (**2**):** sólido amarillo pálido, 23 mg (rendimiento 22%), $R_f=0.3$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.14 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.01 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.62 (s, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, acetone- d_6): 156.2, 143.1, 139.5, 135.4, 134.4, 132.2 (2C), 129.4, 127.1 (2C), 126.5, 123.4, 117.5, 115.1 (2C), 62.1. ^{19}F -RMN (500 MHz, acetone- d_6): -121.12.

***N*-(4-fluorobencil)-3,6-dinitroquinolin-4-amine (4):** sólido amarillo intenso, 28 mg (29%), $R_f=0.6$ en *n*-hexano/AcOEt (8:2). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.42 (s, 1H), 8.1 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J=8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.45(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.11 (dd, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.62 (s, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, acetone- d_6): 157.2, 144.3, 141.8, 138.4, 135.4, 132.7, 131.1, 129.4, 128.3 (2C), 126.8, 124.4, 119.5, 116.2 (2C), 69.8. $^{19}\text{F-RMN}$ (500 MHz, acetone- d_6): -118.87.

4.1.2.1.3. Síntesis de 1-(4-flúorbencil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina 3

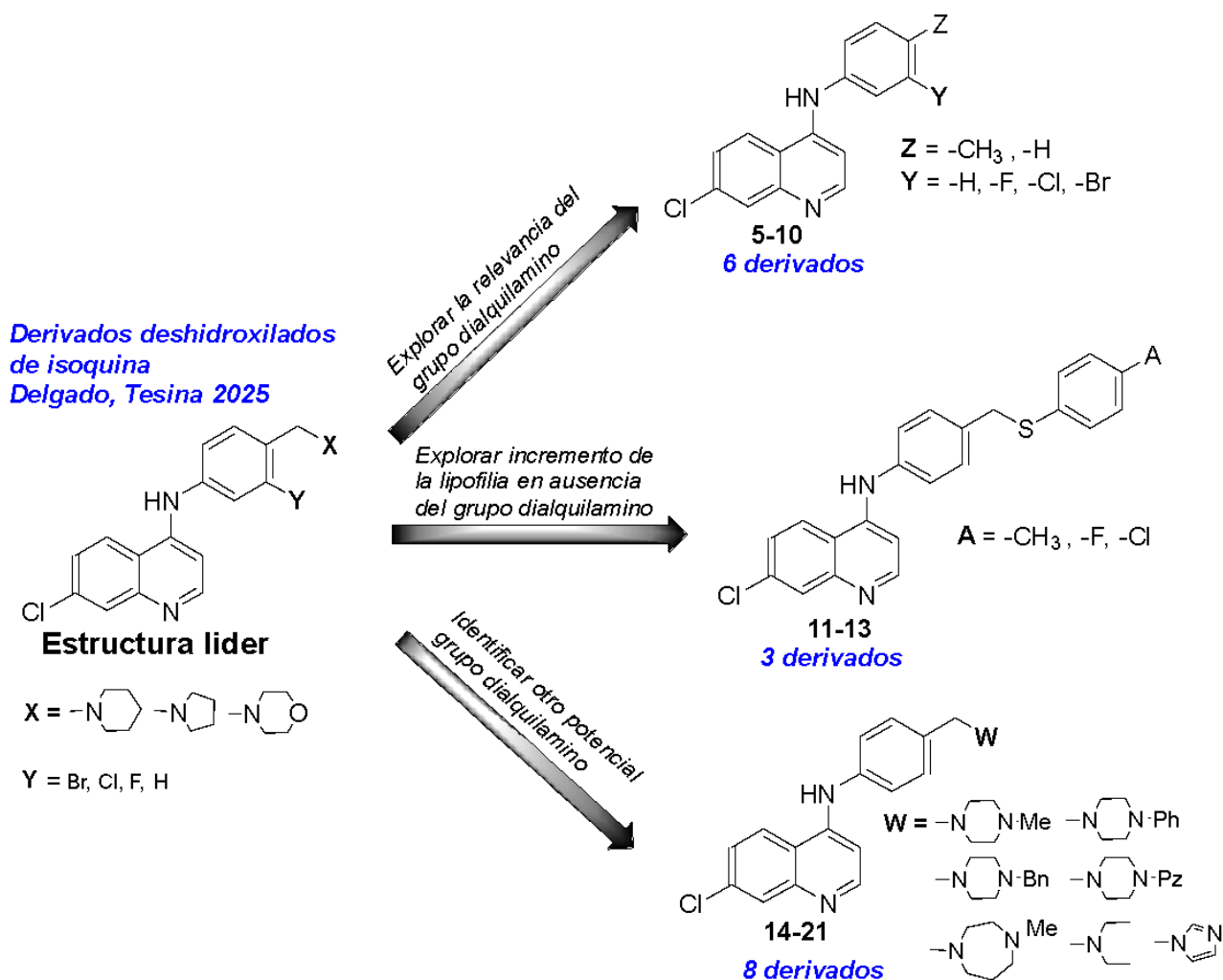


Esta reacción fue realizada de acuerdo a un protocolo con pequeñas modificaciones (Hanan et al., 2010). En un balón de fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se agregó *N*-(4-fluorobencil)-3-nitroquinolin-4-amine (**2**) (20 mg, 1 eq.), Fe (10 eq.), ácido fórmico (10 eq.), cloruro de amonio (10 eq.), isopropanol (5 ml). La mezcla se llevó a reflujo bajo agitación por 2 horas. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano: acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Al culminar la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el isopropanol y el ácido fórmico fueron evaporados al vacío hasta obtener un aceite de color beige. La solución resultante se neutralizó hasta pH 7, se extrajo con acetato de etilo y el producto final se purificó mediante una cromatografía *Flash* utilizando silica gel como fase estacionaria y una mezcla *n*-hexano: acetato de etilo (8:2) como fase móvil, logrando separar el producto deseado **3** como un sólido amarillos pálido. Este producto fue caracterizado por $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

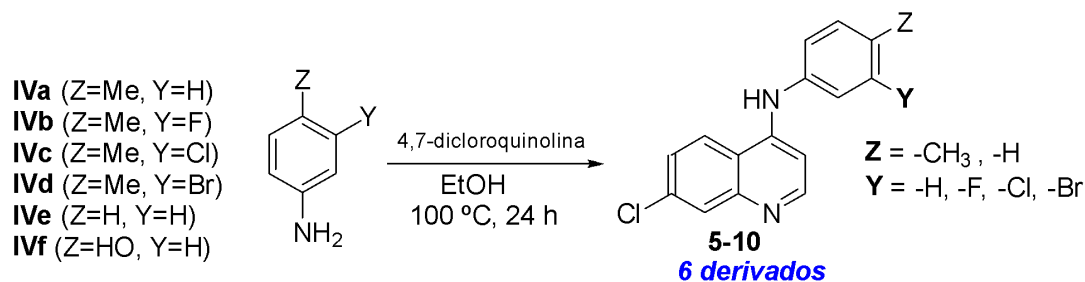
1-(4-Flúorbencil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina (3): sólido amarillo pálido, 19 mg (rendimiento 17%), $R_f=0.3$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.3 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.71 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J=8.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J=8.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.62 (s, 2H). $^{19}\text{F-RMN}$ (500 MHz, acetone- d_6): -112.45.

4.1.2.2. Síntesis de derivados de isoquina 5-21



Esquema 2. Dibujo general para la preparación de derivados deshidroxilados de isoquinas 5-21.

4.1.2.2.1. Síntesis de derivados de isoquina deshidroxilados 5-10



Esta reacción fue realizada de acuerdo a un protocolo con pequeñas modificaciones (Romero et al., 2015; Valverde et al., 2018). En un balón de 10 mL provisto de un

condensador, se colocó 4,7-dicloroquinolina (1 eq) disuelta en etanol y dos gotas de HCl concentrado, seguida de la adición de la correspondiente anilina **IVa-f** (1.1 eq) disuelta en etanol. Luego, esta mezcla se calienta a reflujo por 24 horas bajo agitación constante y se sigue por *TLC*, empleando una mezcla *n*-hexano/AcOEt (1:1). Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja a temperatura ambiente y el sólido resultante se filtra al vacío obteniendo el correspondiente derivado de isoquina **5-10**. Estos nuevos productos finales de isoquinas deshidroxiladas fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y algunos casos ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

7-Cloro-*N*-(4-metilfenil)quinolin-4-amina (5): sólido amarillo pálido, 34 mg (87%), $R_f=0.4$ (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.59 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.92 (d,d $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.51 (sa, 1H), 2.92 (s, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6): 148.2, 144.5, 139.1, 137.3, 135.4, 133.6, 130.3, 129.7, 128.7, 122.2 (2C), 119.2 (2C), 118.2, 114.2, 43.2.

7-Cloro-*N*-(3-flúor-4-metilfenil)quinolin-4-amina (6): sólido amarillo pálido, 42 mg (82%), $R_f=0.4$ (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.57 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.95 (d,d $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H), 6.79 (dd, $J = 12.0, 8.0$ Hz, 1H), 6.72 (dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H), 6.51 (sa, 1H), 2.94 (s, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6): 148.4, 143.9, 139.4, 137.5, 136.1, 133.9, 132.5, 129.9, 129.0, 128.7, 122.2, 120.5, 118.9, 118.6, 114.2, 43.2. ^{19}F -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): -119.76.

7-Cloro-*N*-(3-cloro-4-metilfenil)quinolin-4-amina (7): sólido amarillo pálido, 52 mg (89%), $R_f=0.4$ (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.59 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.99 (d,d $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.72 (dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H), 6.51 (sa, 1H), 2.98 (s, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6): 148.6, 141.4, 140.2, 138.2, 136.8, 134.8, 133.4, 131.2, 129.4, 129.0, 125.7, 121.7, 119.9, 118.7, 115.2, 44.7.

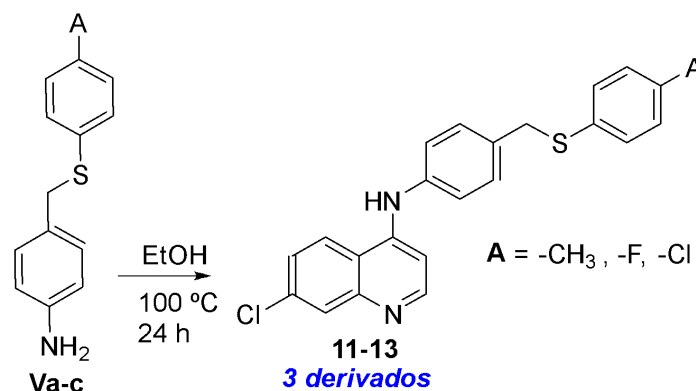
7-Cloro-*N*-(3-bromo-4-metilfenil)quinolin-4-amina (8): sólido amarillo pálido, 49 mg (88%), $R_f=0.4$ (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.65 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.97 (d,d $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.77 (dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz,

1H), 6.52 (sa, 1H), 2.97 (s, 2H). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): 148.6, 141.4, 140.2, 138.2, 136.8, 134.8, 133.4, 131.2, 129.4, 129.0, 125.7, 121.7, 119.9, 118.7, 115.2, 44.7.

7-Cloro-*N*-(fenil)quinolin-4-amina (9): sólido amarillo pálido, 41 mg (91%), *R_f* = 0.5 (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.65 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.97 (d,d *J* = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.81 (m, 2H), 6.72 (m, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 6.52 (sa, 1H). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): 147.2, 142.1, 139.2, 138.4, 136.1, 133.2, 132.9, 130.4, 130.0, 125.7, 120.9, 116.9, 115.7.

7-Cloro-*N*-(4-hidroxi-fenil)quinolin-4-amina (10): sólido amarillo pálido, 29 mg (78%), *R_f* = 0.1 (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.52 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.88 (d,d *J* = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.51 (sa, 1H). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): 148.2, 144.5, 139.1, 137.3, 135.4, 133.6, 130.3, 129.7, 128.7, 122.2 (2C), 119.2 (2C), 118.2, 114.2, 43.2.

4.1.2.2.2. Síntesis de los derivados de isoquina deshidroxilados 11-13



Esta reacción fue realizada de acuerdo a un protocolo con pequeñas modificaciones (Romero et al., 2015; Valverde et al., 2018). En un balón de 10 mL provisto de un condensador, se colocó 4,7-dicloroquinolina (1 eq.) disuelta en etanol y dos gotas de HCl concentrado, seguida de la adición de la correspondiente anilina **Va-c** (1.1 eq) disuelta en etanol. Luego, esta mezcla se calienta a reflujo por 24 horas bajo agitación constante y se sigue por *TLC*, empleando una mezcla *n*-hexano/AcOEt (1:1). Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja a temperatura ambiente y el sólido resultante se filtra al vacío obteniendo el correspondiente derivado de isoquina **11-13**. Estos nuevos productos finales de isoquinas deshidroxiladas fueron debidamente caracterizados por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y algunos casos ¹⁹F-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

7-Cloro-*N*-[(4-fluortiofenoxi)metilfenil]quinolin-4-amina (11): sólido amarillo pálido, 39 mg (81%), $R_f=0.6$ (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.57 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J=3.1$ Hz, 1H), 7.93 (d,d $J=8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J=12.0, 8.0$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.73 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.51 (sa, 1H), 3.32 (s, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6): 148.7, 143.9, 139.9, 138.2, 136.7, 133.6, 131.0, 129.7, 128.7, 127.9, 127.1, 125.2, 123.9, 122.8, 119.9, 119.2, 116.2, 49.3. ^{19}F -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): -116.56.

7-Cloro-*N*-[(4-clorotiofenoxi)metilfenil]quinolin-4-amina (12): sólido amarillo pálido, 34 mg (85%), $R_f=0.6$ (*n*-hexano/AcOEt 1:1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.59 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J=3.1$ Hz, 1H), 7.90 (d,d $J=8.0, 3.0$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.49 (sa, 1H), 3.39 (s, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6): 148.9, 144.3, 139.8, 138.6, 137.1, 134.6, 133.0, 131.7, 129.9, 128.3, 127.9, 125.4, 124.5, 124.1, 121.2, 119.9, 116.9, 49.9.

4.2. Parte biológica

La parte biológica comprende la evaluación *in vitro* de los compuestos contra las formas promastigote y amastigote de *L. infantum*. El ensayo de promastigote se realizó durante cinco días y se analizó por turbidimetría. Por su parte, el ensayo *in vitro* contra la forma amastigote se llevó a cabo en el Institut Pasteur de Montevideo, cuyo equipo tuvo un alto protagonismo en la ejecución de los ensayos *in vitro* del modelo de infección en sus diferentes facetas. Este último ensayo se efectuó durante cuatro días y se cuantificó mediante mediciones de bioluminiscencia, ya que se empleó una cepa transgénica bioluminiscente de *L. infantum*.

Adicionalmente, del ensayo contra amastigote intracelulares, se indicó un dato cualitativo de citotoxicidad y la solubilidad a 20 μM de los compuestos más activos mediante la observación por microscopía de levantamiento de células (o no) así como la verificación formación de cristales en el pocillo testado, respectivamente. A partir de estos ensayos se realizó el análisis de la relación estructura-actividad con el fin de establecer aquellas modificaciones estructurales asociadas a la respuesta biológica observada.

Adicionalmente, de forma alternativa se determinó el efecto *in vitro* de todos los compuestos contra epimastigote de *T. cruzi*. Datos obtenidos se encuentra listados en el Tablas A1-3 del Apéndice (sección 8). El procedimiento para el ensayo anti-epimastigote es

muy similar al descrito arriba para promastigote de *Leishmania* y se encuentra detallado en el **Apéndice**.

4.2.1 Cultivo de parásitos, promastigotes de *Leishmania infantum*

Los promastigotes de *Leishmania (V) infantum* (MHOM MA67I7MAP263) fueron provistos por el Dr. M. Comini (Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay). Los parásitos se mantuvieron en medio BHI (*brain-heart infusion*, Oxoid) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Capricorn), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 mg/mL). Los cultivos se incubaron a 28 °C y los promastigotes se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial. Para los tratamientos, las células en crecimiento exponencial se recolectaron, contaron, resuspendieron en medio fresco.

4.2.2. Evaluación *in vitro* contra promastigote de *L. infantum*

El efecto de todos los compuestos del grupo I (**1-4**), grupo II (**5-22**) y del grupo III (**23-54**) sobre la viabilidad de los promastigotes de *L. infantum* (MHOM MA67I7MAP263) se determinó mediante una técnica turbidimétrica. Para ello, se prepararon soluciones madre de los compuestos en DMSO a una concentración de 3000 mM. El cribado se llevó a cabo en placas de 24 pocillos, con un máximo de 1 % de DMSO por pocillo, mantenidas a 25 °C, utilizando cultivos de *L. infantum* en medio con base BHI (Romero et al., 2023) ajustados a una densidad inicial de 3×10^6 parásitos/mL, determinada por conteo en cámara de Neubauer a partir de una dilución 1/10 en medio de cultivo para facilitar el recuento. Inicialmente, se probó una concentración estándar de 25 µM y para derivados de una inhibición de la proliferación celular por encima del 50% fueron realizados experimentos adicionales exponiendo a los cultivos de parásitos a una serie de concentraciones crecientes (4 concentraciones entre 3.125; 6.25; 12.5 y 25 µM para la mayoría de los casos, algún caso excepcional como compuesto **44** se requirieron nueve concentraciones entre 0.05 y 25 µM). La exposición de los compuestos en el medio de cultivo de parásito fue por 120 h (5 días) continuos. Como controles se incluyeron medio con 1 % de DMSO (control negativo) y miltefosina como fármaco de referencia (control positivo). El efecto biológico de los compuestos se evaluó mediante mediciones de absorbancia a 595 nm en un Varioskan ThermoFischer al quinto día del ensayo. Los parásitos sin tratar se utilizaron para calcular el porcentaje de inhibición (P.I.).

El P.I. a cada concentración se determinó según la siguiente fórmula: $(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c}) - 100$, donde:

$A_p = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo que contiene el compuesto al día 5

$A_{0p} = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo que contiene el compuesto al día 0

$A_c = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo en la ausencia del compuesto (control) al día 5

$A_{0c} = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo en la ausencia del compuesto (control) al día 0

Los cálculos de CE_{50} fueron obtenidos a partir de la construcción de curvas dosis/respuesta (P.I. vs. Log Concentración de compuesto) y a partir de un cálculo aplicando aproximación de Boltzmann se determinó el valor de CE_{50} (concentración efectiva del 50 % del crecimiento) mediante procesamiento matemático en el programa Origin 2021 (Origin, 2021) incluyendo sus respectivos valores de DE (desviación estándar).

4.2.3. Cultivo de parásitos, línea bioluminiscente de *Leishmania infantum*.

Se utilizó una línea bioluminiscente de *L. infantum* que expresa de forma constitutiva una enzima luciferasa de *Photinus pyralis* (PpyRE9H o RE9HLUC) que se mantiene en estado infectivo por ciclos de infección de ratones Balb/c [protocolo del Comité y Uso de Animales (CEUA), Institut Pasteur de Montevideo número 013-2023] y aislamiento de parásitos de bazo de animales infectados. La forma promastigote de *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP263) utilizados para promover la infección de macrófagos se cultivó en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) con GlutaMAX™ (Invitrogen), complementado con 25 mM de sal sódica de HEPES (MERCK®) a pH 7,4, 10% v/v de suero fetal bovino inactivado (SFBi, Gibco®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) y 15 µg/mL higromicina B de Streptomyces hygroscopicus (Gibco®), en botella de cultivo con tapa de cierre hermético de 25 cm² (Corning®), en incubador a 28 °C.

4.2.4. Cultivo de la línea celular monocítica

Las células de la línea monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202™) se cultivaron en una botella de cultivo de 175 cm² con tapa ventilada (Corning®) en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/ 95% aire a 37 °C, en medio RPMI complementado con 10% v/v de SFBi, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (medio completo RPMI para THP-1).

4.2.5. Conteo de células

La concentración de macrófagos viables se cuenta luego de teñir la muestra con azul de tripán (MERCK®) 0.2% p/v. La concentración de parásitos viables fue determinada luego de realizar una dilución en PBS–glucosa 1% p/v, contando parásitos móviles. Se utiliza un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) y una cámara de Neubauer (Precicolor HBG).

4.2.6. Preparación de fármacos y compuestos

Se preparó una solución stock de los compuestos en DMSO (MERCK®), a partir de la cual se obtuvieron las soluciones intermedias en el mismo disolvente, para luego preparar una solución de trabajo en medio de cultivo completo RPMI para THP-1, que se coloca en la placa de 96 pocillos (Corning®), para crear la placa de compuestos.

La miltefosina (MERCK®) se disolvió al inicio a 20 mM en agua destilada, y se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 μm (MERCK®). A partir de esta se preparó una solución intermedia de 1 mM y una de trabajo de 5 μM (CE_{50}), agregando 6 μL en 1194 μL de medio completo RPMI.

La cloroquina se preparó de forma parecida, se hizo una solución madre de 20 mM en agua destilada, esterilizada con filtro de 0.22 μm , a partir de la cual se obtuvo una solución intermedia de 4 mM y una de trabajo de 20 μM (CE_{50}).

Para el cribado primario, se prepararon soluciones intermedias de 4 y 1 mM en DMSO, de las cuales se obtuvieron las soluciones de trabajo mezclando 6 μL con 1194 μL de medio RPMI completo. Estas se evaluaron a concentraciones finales de 20 y 5 μM , verificando visualmente la solubilidad antes de agregar 270 μL por pocillo (en cuadruplicado).

En los ensayos de concentración-respuesta, se realizaron diluciones seriadas (1:2 o 1:3 en DMSO) a partir de las soluciones intermedias (4 o 1 mM), de modo que el rango de concentraciones abarcara valores de viabilidad parasitaria entre 100 y 0 %, permitiendo estimar la CE_{50} , definida como la concentración capaz de reducir la viabilidad en un 50 ± 10 %.

4.2.7. Ensayo de cribado

El protocolo descrito por Benítez (Benítez et al., 2022) fue adaptado sustituyendo la célula hospedadora, el macrófago de la línea J774.A1 (ATCC® TIB67™), por macrófagos derivados de la línea monocítica humana THP-1. Esta línea se cultivó en botellas de 175 cm^2 con tapa de ventilación (Corning®) y, una vez alcanzada la densidad celular adecuada, se

transfirió a unos tubos cónicos de 50 mL, incubándose con 100 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato para inducir la diferenciación a macrófagos. Posteriormente, las células se distribuyeron con una pipeta multicanal en una placa de 96 pocillos, a razón de 200 μ L por pocillo, con una densidad de 150.000 monocitos/pocillo. Luego de 48 horas, los macrófagos se lavaron con PBS y se infectaron con promastigotes en fase estacionaria en una relación 1:4 (macrófago: parásito), durante 24 h. Antes de la infección, se asegura que no queden residuos del antibiótico de selección (higromicina) en el cultivo de parásitos, para esto, se realizan dos lavados con PBS–glucosa al 1 % (p/v) y resuspendiendo los parásitos en medio completos RPMI para THP-1. Después de la infección, se realizaron tres lavados con 200 μ L de PBS precalentado a 37 °C para eliminar promastigotes no internalizados, y se transfirieron 200 μ L desde la placa de compuestos hacia la placa de cribado. Las placas se incubaron durante cuatro días. La lectura del ensayo se realizó siguiendo el procedimiento de Benítez et al., 2022 donde se utiliza el kit de PROMEGA E4530, que incluye un buffer de lisis ($\times 5$, PROMEGA E397A) y el reactivo de bioluminiscencia (LAR, Luciferase Activity Reagent, PROMEGA E151A). Tres pocillos por condición se lisaron y se utilizaron para determinar la carga parasitaria por bioluminiscencia, mientras que uno se fijó con etanol absoluto (CARLO ERBA) y se analizó mediante microscopía de fluorescencia.

4.2.8. Lectura de viabilidad parasitaria por bioluminiscencia

En las filas B a G (**ver Figura 16**), se agregaron 30 μ L del buffer de lisis $\times 1$ por pocillo y se homogeneizó exhaustivamente para asegurar el lisado celular pipeteando de forma circular contra el borde del pocillo, de arriba hacia abajo, diez veces. Se ajustó el volumen de forma de obtener una señal para el control negativo (DMSO) en el orden de 0.5 a 1 millón de unidades relativas de luminiscencia y se transfirió dicho volumen desde la placa de cribado a una placa de lectura opaca de 384 pocillos (NUNC®) (placa de lectura). Se incubó dicha placa a 30 °C por 5 min en el luminómetro [LUMIstar OPTIMA Microplate (BMG LABTECH)]. Se descongeló el LAR a temperatura ambiente. Se agregó 30 μ L por pocillo. Se midió intensidad de BL configurando los siguientes parámetros: 30 °C de temperatura, 10 segundos de agitación, 5 segundos de adquisición por pocillo, 0.2 segundos de espera en la medida, máxima ganancia.

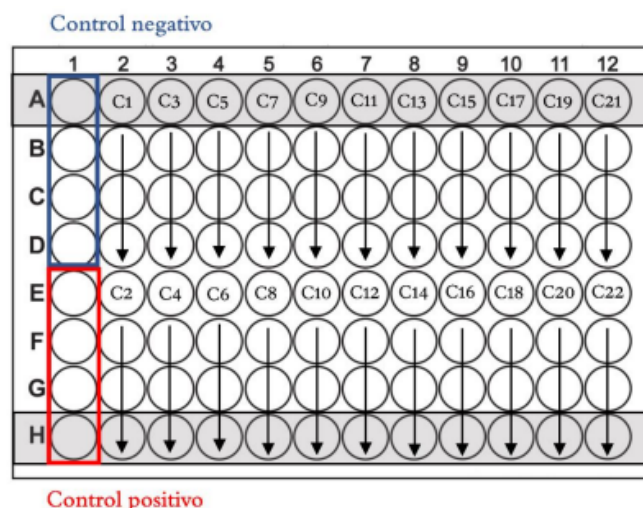


Figura 16. Esquema de plaqueo para cribado de compuestos y lectura del ensayo. Cada condición de compuesto (Cn, compuestos a determinada concentración) es evaluado por cuadruplicado, por triplicado para bioluminiscencia y monuplicado para microscopía (pocillos marcados en gris). El control negativo (rectángulo en azul) corresponden a las células tratadas con DMSO 0.5% (v/v) y el control positivo (rectángulo en rojo) a las células tratadas con miltefosina 5 μ M (CE_{50}). Este esquema fue tomado de Benítez et al., 2022.

4.2.9. Lectura por microscopía para evaluar densidad celular y confirmación de compuestos activos

Para la evaluación se utilizaron las filas A y H de la placa de cribado (ver Figura 17). En ellas se retiró el etanol de fijación y se adicionaron 100 μ L de verde de metilo al 0.0004 % (p/v) en PBS, con el fin de teñir el ADN. Se visualiza por un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX-81) con una cámara ORCA (Hamamatsu) y el software libre μ Manager, utilizando una longitud de excitación de 633 nm y una longitud de emisión de 677 nm. Para cada condición se tomaron cinco imágenes 100 x (visión panorámica del pocillo control cualitativo de toxicidad sobre la célula hospedera) y al menos 10 imágenes con aumento 400 \times cubriendo los 4 cuadrantes y el centro del pocillo. Se realizó una evaluación cualitativa de densidad de células hospederas en el pocillo y de carga parasitaria. Se consideró una condición no tóxica cuando más del 80% de las células hospederas permanecieron adheridas, y tóxica cuando más del 80% se desprendieron. Asimismo, se definió clearance como una reducción de la carga de amastigotes superior al 90 % respecto al control negativo (ver Figura 17). Las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron mediante el programa FIJI.

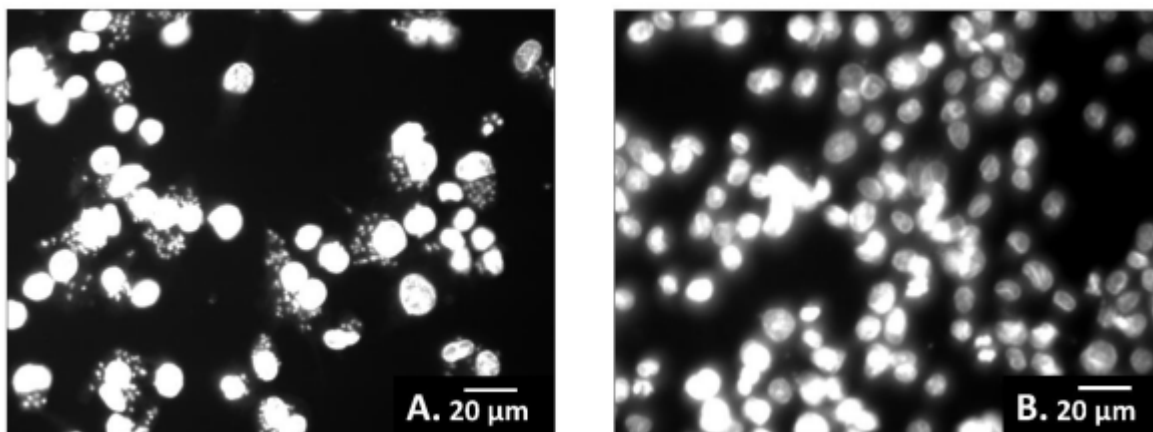


Figura 17. Imágenes de cultivos de macrófagos humanos infectados y teñidos con verde de metilo (ADN), obtenidas con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-81. (A) Control negativo tratado con vehículo (DMSO 0.5 % v/v), donde se observan macrófagos infectados. (B) Muestra tratada con un compuesto o fármaco a una concentración parasiticida, mostrando una reducción >90 % de la carga parasitaria sin afectar las células hospederas, esto es lo que se denomina “*clearance*”.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parte química

La parte química involucró la preparación de los derivados pre-análogos de imiquimod (**2-4**) del grupo I así como algunos de los derivados deshidroxiladas de isoquina **5-13** del grupo II. Derivados del **14** al **21** fueron proporcionados por el Dr. Romero, mientras los derivados del grupo III (**23-54**) fueron proporcionados por el grupo del Dr. Simón López de la Universidad de Florida (EEUU). Estos grupos de compuestos del **14** al **21** y del **23** al **54** se encuentran debidamente purificados y caracterizados.

5.1.1. Síntesis de derivados del grupo 1

Respecto a la síntesis de los derivados del grupo I, estos compuestos fueron preparados siguiendo una ruta de síntesis de tres pasos partiendo de la 4-hidroxiquinolina como se muestra en el **Esquema 1**. El primer paso envolvió una reacción nitración utilizando ácido nítrico como agente nitrante y ácido acético que actuaba como disolvente y agente activante de la deshidratación del ácido nítrico. La reacción fue ejecutada bajo agitación a 80°C por 24 horas, permitiendo obtener la 4-hidroxi-3-nitroquinolina con un rendimiento del 20%. El

producto fue obtenido mediante una filtración directa al tratar la mezcla de reacción con agua fría. Del filtrado fueron detectados diferentes sub-productos de nitración tales como 4-hidroxi-3,5,6,7,8-pentanitroquinolina, 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina y la 4-hidroxiquinolina que no reaccionó. Estos sub-productos fueron aislados mediante una cromatografía en columna tomando ventaja de sus diferentes valores de R_f de 0.9, 0.7 y 0.2 en *n*-hexano/acetato de etilo, respectivamente. La cromatografía fue ejecutada utilizando sílica como fase estacionaria y una fase móvil por gradiente comenzando con una mezcla *n*-hexano acetato de etilo (9:1).

Es importante mencionar que a temperaturas superiores a 80 °C se observó un incremento de los productos de polinitración, mientras una reducción de la misma implicó una baja conversión de la 4-hidroxiquinolina (**Tabla 1**). Una ligera mejoría en el rendimiento fue encontrado (25%) con el uso de una mezcla ácido acético e isopropanol, manteniendo la concentración de 4-hidroxiquinolina en solución (ácido acético/isopropanol 1:1). Otras condiciones empleando ácido sulfúrico como activante de la deshidratación del ácido nítrico bajo condiciones suaves de reacción (50°C, 2 h) conllevó a una conversión total de la 4-hidroxiquinolina, pero hacia el 4-hidroxi-8-nitroquinolina. Todas las condiciones de reacción probadas se detallan en la **Tabla 1**. La presente reacción representa una alternativa a la estrategia reportada en la literatura (Mariotti et al., 2005), la cual ejecuta la reacción de nitración en ácido nítrico en presencia de ácido propanoico. Aunque nuestro procedimiento ejecutado en ácido acético presenta un menor rendimiento respecto al presentado en ácido propanoico, 20% vs. 40%, es importante destacar la simplicidad operacional de la presente estrategia para obtener la 4-hidroxi-3-nitroquinolina. El producto fue debidamente caracterizado mediante espectroscopía de ^1H -RMN, dónde se distinguen cinco protones aromáticos. A diferencia de la 4-hidroxiquinolina, que presenta seis protones aromáticos, los protones en el compuesto nitrado se desplazan a un campo más bajo (mayores valores de ppm en el ^1H -RMN). Un punto distinguible se aprecia en los protones del núcleo piridínico, dónde el portón H2 se aprecia como un doblete de constante de acoplamiento ($J \sim 8$ Hz) derivado de un acoplamiento H2 con el protón lactámico (NH). En contraparte, la 4-hidroxiquinolina este protón H2 se caracteriza por aparecer como un doble-doblete ($J_1 \sim 8$, $J_2 \sim 8$ Hz) en el ^1H -RMN, mientras el protón H3, que está ausente en el 4-hidroxi-3-nitroquinolina, aparece con un doblete a campo alto (~ 6.2 ppm). Esta evidencia certifica la nitración de la 4-hidroxiquinolina en la posición 3.

Otro resultado de interés encontrado durante la presente investigación fue encontrar una dependencia del tautomerismo del sistema como función nitro-funcionalización. Un estudio

detallado fue realizado para un grupo variado de 4-hidroxiquinolinas incluyendo la 4-hidroxiquinolina, 4-hidroxi-3-nitroquinolina, 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina, 4-hidroxi-6-nitroquinolina, 4-hidroxi-8-nitroquinolina y 4-hidroxi-3,5,6,7,8-pentanitroquinolina. En general, sin entrar en mayores detalles, este tipo de quinolinas mostró una dominancia del tautómero ceto y su prevalencia fue aún más significativa e incluso rígida con la 8-nitro funcionalización. Por su parte, la polinitración en torno a la 4-hidroxi posición, por ejemplo en la 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina y la 4-hidroxi-3,5,6,7,8-pentanitroquinolina, favorece el tautomerismo enólico.

Con la 4-hidroxi-3-nitroquinolina y la 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina en mano, el siguiente paso involucra la cloración del grupo hidroxilo para dar la 4-cloro-3-nitroquinolina y 4-cloro-3,6-dinitroquinolina, respectivamente. Esta reacción fue ejecutada en condiciones anhidras con el uso del oxo-cloruro de fósforo (POCl_3) como agente clorante y disolvente bajo reflujo y agitación por 1 hora. El producto fue reconocido por TLC teniendo un R_f significativamente alto ($R_f \sim 0.95$ y 0.75 en *n*-hexano/acetato de etilo 7:3) respecto a la 4-hidroxi-3-nitroquinolina ($R_f \sim 0.3$) y la 4-hidroxi-3,6-dinitroquinolina, en la misma fase móvil, respectivamente. Ambos intermedios clorados fueron aislados y considerados lo suficientemente puro para el siguiente paso de reacción.

Con estos intermedios clorados en mano, se procedió a la preparación de los pre-análogos de imiquimod **2** y **4**. Para ello, se procedió a hacer reaccionar estos intermedios clorados en presencia de 4-flúorbencilamina en acetonitrilo como disolvente bajo reflujo por 24 horas. La reacción consiste de una sustitución nucleofílica aromática aprovechando la alta electrofilia del anillo piridínico por la presencia del grupo 3-nitro adyacente al carbono-4, el cual se encuentra conectado al cloro como grupo saliente. La reacción procedió exitosamente dando una conversión total del material de partida y los productos fueron debidamente purificados por cromatografía en columna en sílica y fase móvil de *n*-hexano y acetato de etilo con rendimientos del 22 y 29%, respectivamente. Los productos fueron debidamente caracterizados por RMN, distinguiéndose de sus respectivos materiales de partida por la aparición de señales extras en la región aromática que corresponden al anillo de bencilo. Adicionalmente, la presencia del flúor fue distinguible por el multiplete típico del protón aromático alfa (H_3) al flúor, que no solo acopla con el protón H_2 sino con el 4-flúor. Del espectro de ^1H -RMN, adicionalmente es distinguible la aparición de una nueva señal en 4,2 ppm correspondiente a los protones bencílicos. También la aparición de una señal en -77 ppm en el espectro de ^{19}F -RMN demuestra la correcta sustitución del 4-flúorbencilamina en el

núcleo de quinolina. Del espectro de ^{13}C -RMN, se distinguen 14 tipos de carbonos diferentes, lo cual confirma la sustitución del fragmento de 4-fluorbencilamina.

Cómo última parte, se planteó la preparación del compuesto **3**, un tipo de imidazolin-quinolina fusionados entre sí por la cara *c* de la quinolina. Para su preparación, se partió del compuesto **2** y se sometió a un procedimiento de reducción-ciclación intramolecular en un sólo paso de reacción en presencia de ácido fórmico. La reacción fue ejecutada en presencia de hierro metálico en medio ácido (ácido fórmico) para promover primeramente la reducción del grupo nitro al grupo amino para formar un intermedio de 1,2-diamino. Uno de estos grupos amino condensa con el ácido fórmico para un intermediario *N*-formilado, el cual en condiciones de acidez y calor pueden promover la condensación intramolecular entre el carbono del amino formilado y el *orto*-amino adyacente para dar el imidazolquinolino. La reacción fue ejecutada de acuerdo a procedimiento de la literatura (Hannan et al., 2010), en isopropanol como disolvente a 80 °C por 2 horas. El producto fue purificado por cromatografía en columna y se obtuvo un bajo rendimiento alrededor del 17%. El producto fue debidamente caracterizado por RMN, distinguiendo la aparición de una nueva señal en 8.1 ppm correspondiente al protón NHC del anillo imidazol. Adicionalmente, se aprecia ligero corrimiento de protones aromáticos y bencílico cuando se compara con el material de partida, compuesto **2**. Más verificación fue obtenida de los espectros de ^{19}F -RMN y ^{13}C -RMN. Es importante mencionar que el compuesto imidazol-quinolina (compuesto **4**) fue intentado preparar, pero la reacción resultó en una mezcla compleja, por lo cual aunado al bajo rendimiento de la reacción anterior, refleja que una mayor optimización de las condiciones de esta reacción es necesarias para mejorar los rendimientos.

5.1.2. Síntesis de derivados del grupo II

El grupo II consistió de tres sub-familias, IIA, IIB y IIC. La primera consiste de seis derivados desaminados, donde el núcleo de 7-cloroquinolina está funcionalizado en la posición 4 por un grupo anilino sustituido para completar los derivados **5-10**. La segunda sub-familia consiste de tres derivados desaminados donde el núcleo de 7-cloroquinolina está conectado en la posición 4 por 4-(metil-tiofenoxidos) para completar los derivados **11-13**. Finalmente, la sub-familia IIC consiste de varios derivados deshidroxilados de isoquinas **14-21** funcionalizados por grupos piperacinos *N*-sustituidos, dietil-amino, terbutilamino e imidazol. La incorporación de estos grupos dialquilamino buscan verificar si estas sustituciones pueden mejorar la actividad leishmanicida contra amastigote de *L. infantum* ya

encontrada previamente en derivados deshidroxilados de isoquina funcionalizados con morfolina, pirrolidina y piperidina.

Para preparar estos derivados se recurrió a una reacción de acoplamiento directo entre la 4,7-dicloroquinolina con la correspondiente anilina sustituida. Las anilinas correspondientes fueron proporcionadas por Dr. Romero. Los derivados de las sub-familias IIA (**5-10**) y IIB (**11-13**) fueron preparadas en la presente tesis, mientras los derivados de la sub-familia IIC (**14-21**) fueron proporcionados por Dr. Romero.

Los compuestos **5-13** de fueron obtenidos en un procedimiento bien optimizado por el grupo que consiste de la adición de ácido clorhídrico en forma catalítica, etanol como disolvente, la anilina (1.1 eq.) y la 4, 7-dicloroquinolina previamente disuelta. Se lleva a reflujo bajo agitación por 24 horas, resultando en un sólido amarillo al final de la reacción. Este se filtra y se purifica por cromatografía en columna de forma rápida utilizando *n*-hexano/acetato de etilo (1:1), hasta obtener el producto con rendimientos entre 78-91% (Ver datos en sección 4). Los compuestos fueron debidamente caracterizados por RMN de protones y carbono, distinguiendo las señales característica del nuevo fragmento anilínico, metil bencílico y ligero corrimiento de señales del núcleo de quinolina respecto a la 4,7-dicloroquinolina.

5.2. Parte biológica

5.2.1. Filosofía de los ensayos *in vitro*

Con los compuestos de la familia I, II y III en mano, se procedió a probar su efecto *in vitro* contra promastigote y amastigote de *L. infantum*. Adicionalmente, de forma alternativa se determinó el efecto de todos los compuestos contra epimastigote de *T. cruzi* y los resultados se encuentran detallados en la **Tabla A1** del Apéndice.

La parte biológica comprende la evaluación *in vitro* de los compuestos en las formas promastigote y amastigote de *L. infantum*. El ensayo *in vitro* sobre promastigotes se lleva a cabo durante cinco días y el análisis se realiza por turbidimetría. Este ensayo en una fase inicial busca la determinación del porcentaje de inhibición de la proliferación celular (P.I.) para una concentración fija de 25 μ M del compuesto a probar. Para los compuestos activos, aquellos que presenten una P.I. mayor a 50% fueron seleccionados para evaluar su efecto leishmanicida a menores concentraciones del compuesto en orden de determinar un CE₅₀.

Por su parte, en el ensayo *in vitro* contra los amastigote intracelulares, los compuestos fueron incubados con células infectadas por cuatro días y la lectura de la inhibición de proliferación celular se realizó mediante bioluminiscencia. Esto se facilita por el uso de una cepa transgénica bioluminiscente de *L. infantum*. Al final del experimento dependiendo del nivel de luminiscencia (mayor luminiscencia menor o baja inhibición de proliferación celular, mientras una baja luminiscencia implica una alta inhibición de la proliferación celular), se determina el porcentaje de inhibición y con ellos se determina el CE_{50} si el compuesto muestra suficiente actividad. Adicionalmente, la cuantificación por luminiscencia se confirma mediante microscopía óptica en orden de determinar si existe o no el *clearance*. Como se mencionó anteriormente, *clearance* es la capacidad que tiene el compuesto de reducir la carga de amastigotes intracelulares (>90%), dejando íntegros a los macrófagos.

Además, este ensayo nos permite hacer una evaluación cualitativa de la citotoxicidad de los compuestos más activos, así como evaluar la solubilidad cualitativa del compuesto a la concentración probada. Luego, a partir de los resultados obtenidos, se procedió a identificar a los compuestos más activos (CE_{50} menor a 20 μM) y con la información completa, se buscó realizar un análisis estructura-actividad con el propósito de identificar farmacóforos claves para cada uno de los tres sistemas quinolínicos estudiados para avanzar hacia estudios más detallados.

5.2.2. Resultados *in vitro* contra promastigote de *L. infantum*

Los resultados y su respectivo análisis se van a presentar por familia en función de la actividad leishmanicida contra promastigotes de *L. infantum*, destacando a los compuestos activos, así como un análisis estructura-actividad cualitativo por cada grupo. Posteriormente, se presentará un análisis global de los resultados derivados del experimento *in vitro* contra amastigote de *L. infantum*. Este experimento envolvió una selección basada en los compuestos más activos contra promastigote ($CE_{50} < 25 \mu M$), así como otros derivados con una actividad discreta a 25 μM con P.I. mayores al 35%.

5.2.2.1. Actividad antipromastigote de los derivados de grupo I

Dentro de los derivados del grupo I, que consisten de cuatro compuestos **1-4** incluyendo el imiquimod, se encontró que uno de los pre-análogos de imiquimod, el derivado **3**, exhibió un CE_{50} de 23.9 μM , el cual fue superior a la actividad antipromastigote del imiquimod contra promastigote de *L. infantum* (CE_{50} de 37.10 μM). Por su parte, los otros dos pre-análogos,

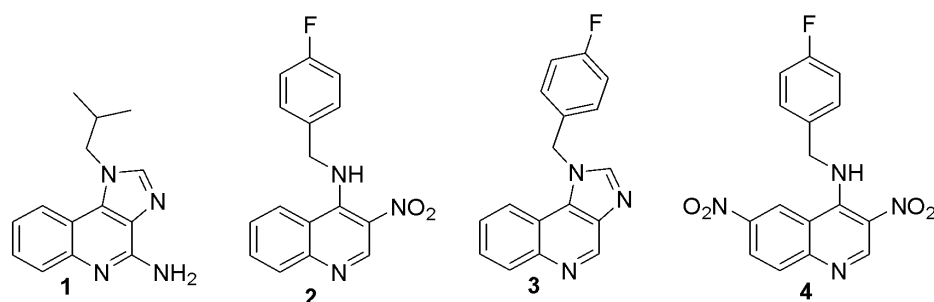
compuestos **2** y **4**, que son derivados de 3-nitro-4-aminobencil-quinolina, mostraron una actividad leishmanicida discreta contra promastigote de *L. infantum* con P.I. de 31.7 y 28 %, respectivamente, bajo una concentración de tratamiento de 25 μ M.

Desde una perspectiva estructural, podemos observar que la presencia de la unidad de imidazol fusionada a la quinolina por la cara *c* es fundamental para generar un efecto leishmanicida intrínseco, lo cual se demuestra por la actividad leishmanicida mostrada por los derivados **1** y **3**. En contraparte, los derivados no fusionados, compuestos **2** y **4**, mostraron un efecto leishmanicida discreto e inferior a los derivados fusionados, lo cual deja en evidencia relevancia esta funcionalidad imidazol-quinolina. Por otra parte, los resultados encontrados para los compuestos **1** y **3** muestran que el grupo amino no parece ser crucial en la actividad leishmanicida, ya que su ausencia no provoca una pérdida de la actividad, sino más bien se observa un ligero incremento de la misma, 23.89 vs. 37.10 μ M en compuesto **3** (no 2-aminado) y el imiquimod (2-aminado), respectivamente. Es importante mencionar que aunque la relevancia del grupo 2-amino sea cuestionada para inducir una actividad leishmanicida, si debe ser importante para promover la actividad inmunoestimulante en el modelo de infección, por lo cual, no se puede descartar de esta primera evidencia.

Adicionalmente, la comparativa entre la actividad antipromastigote del imiquimod **1** y el compuesto **3** nos deja claro que el grupo isobutilo puede ser reemplazado por el grupo 4-fluorofenil, generando un compuesto con una mejor respuesta leishmanicida. Su contribución, así como la relevancia contra amastigote intracelulares es discutida más adelante.

Comparando con la literatura, el imiquimod ha sido principalmente evaluado contra modelos de LC (Hajj et al., 2018; Buates & Matlashewski, 1999; Arevalo et al., 2007; Miranda-Verastegui et al., 2009) y solo existe un ejemplo en modelo *in vitro* de LV. Dicho ejemplo muestra un modelo *in vitro* de *L. donovani* (Buates & Matlashewski, 1999). Este ejemplo mostró que el imiquimod no presentó actividad leishmanicida contra promastigote de *L. donovani* a 20 μ M, lo cual está en consistencia con nuestro resultado contra promastigote de *L. infantum*. Sin embargo, experimentos contra modelos de infección son claves ya que este agonista actúa como un inmunoestimulante cuya actividad contra amastigote intracelulares fue demostrada y la misma no fue derivada de una actividad leishmanicida intrínseca sino de la inmunoestimulación del macrófago infectado (Buates & Matlashewski, 1999). Detalles serán discutidos más adelante en la sección de actividad leishmanicida *in vitro* contra amastigote intracelulares de *L. infantum*.

Tabla 1. Actividad leishmanicida *in vitro* de compuestos de **grupo I** contra promastigote de *L. infantum*



Compuesto	P.I. (%) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b
1	47.5 ± 3.2	37.10 ± 1.70
2	31.7 ± 1.3	----
3	72.8 ± 5.1	23.89 ± 2.12
4	28 ± 1.9	----

^aP.I: porcentaje de inhibición a 25 μM. ^bConcentración efectiva (CE₅₀) determinada a partir de 4 concentraciones de tratamiento del compuesto probado. Ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.2.2. Actividad antipromastigote de los derivados de grupo II

Respecto a la actividad antipromastigote de los derivados del grupo II, su análisis es realizado primeramente por subgrupos y luego se presentará un análisis global del grupo. Los derivados del grupo II se dividieron en tres sub-familias: (i) derivados deshidroxiladas de isoquina carentes del grupo dialquilamino **5-10** (grupo IIA) (ii) derivados deshidroxiladas de isoquina carentes del grupo dialquilamino pero de alta lipofilia **11-13** (grupo IIB) y (iii) los derivados deshidroxilados de isoquinas funcionalizados con diversos dialquilamino incluyendo diversas piperacínilo *N*4-sustituidas, dietilamino, terbutilamino, *N*4-metilhomopiperacínil (*N*-1,4-diazepanil) e imidazoil **14-21** (grupo IIC). Los primeros derivados buscan demostrar la relevancia del grupo dialquilamino en la actividad antipromastigote así como evaluar el efecto del halógeno en el anillo anilínico. Por su parte, el segundo sub-grupo busca verificar el efecto neto de la lipofilia en ausencia del grupo dialquilamino, mientras el sub-grupo IIC busca reconocer otro farmacóforo de dialquilamino

más allá de los típicos morfolinil, pirrolidinil y piperidinil que tienden a generar derivados de isoquina e isotebuquina altamente activos y selectivos (Delgado, 2025).

Comenzando el análisis con los derivados del grupo IIA, sus derivados mostraron una buena actividad antipromastigote a 25 μ M, mostraron P.I. entre 70 y 81%, exceptuando los compuestos **9** y **10** que presentaron P.I. más bajos de 38 y 51%, respectivamente. En general, el compuesto **5** presentó el valor de CE_{50} menor (9.58 μ M), seguido por los derivados *orto*-halogenados de cloro, bromo y flúor con valores de CE_{50} de 10.17, 13.71 y 22.17 μ M, respectivamente. El derivado hidroxilado **10** exhibió un CE_{50} de 25.1 μ M, mientras el derivado **9** fue el menos activo de la sub-familia (P.I. =38%, CE_{50} < 25 μ M). De los resultados de la sub-familia IIA se puede extraer que el sustituyente de 4-metilanilino sustituidos genera compuestos más activos que el sustituyente de 4-hidroxianilino y el anilino propiamente, lo cual demuestra que la ligera mayor lipofilia derivada del grupo metilo puede ser clave en la actividad leishmanicida de estos compuestos. Dentro de los derivados de 4-metilanilinos, en general, la incorporación del *orto*-halógeno (compuestos **6-8**) decrece discretamente la actividad antipromastigote en relación al derivado no halogenado (**5**).

Por otra parte, si comparamos la actividad antipromastigote de estos derivados **5-10** con los derivados de isoquinas dialquilamino sustituidos (ej. morfolinil pirrolidinil y piperidinil) podemos notar que el primer grupo generó compuestos tan o igualmente activos (CE_{50} entre 10 y 14 μ M) que los derivados preliminares [derivado de morfolinil (CE_{50} =12.5 μ M) y aquellos de piperidinil y pirrolidinil (CE_{50} > 25 μ M)] (Delgado, 2025). Por tanto, se puede inferir que el grupo dialquilamino es prescindible y no representa un farmacóforo esencial para la actividad antipromastigote en el sistema de isoquinas deshidroxiladas. Mayores detalles son discutidos en la sección dedicada al estudio contra amastigotes intracelulares.

Respeto a los compuestos del grupo IIB que se caracterizan por reemplazar el grupo dialquilamino por grupos lipofílicos de tiofenoxidos 4'-flúor-, 4'-cloro-, y 4'-metil-sustituido, se observa que el derivado clorado **12** tiene la mejor actividad biológica del sub-grupo contra promastigote con un P.I. de 97.6% a 25 μ M y un valor de CE_{50} de 12.03 μ M. El derivado fluorado **11** y metilado **13** mostraron P.I. muy discreto a 25 μ M con valores alrededor de 28%. En general, su actividad es comparable a aquellas registradas por los derivados del grupo IIA y superior a derivados deshidroxilados de piperidinil y pirrolidinil contra promastigote. Mayores detalles son discutidos en la sección dedicada al estudio contra amastigote intracelulares.

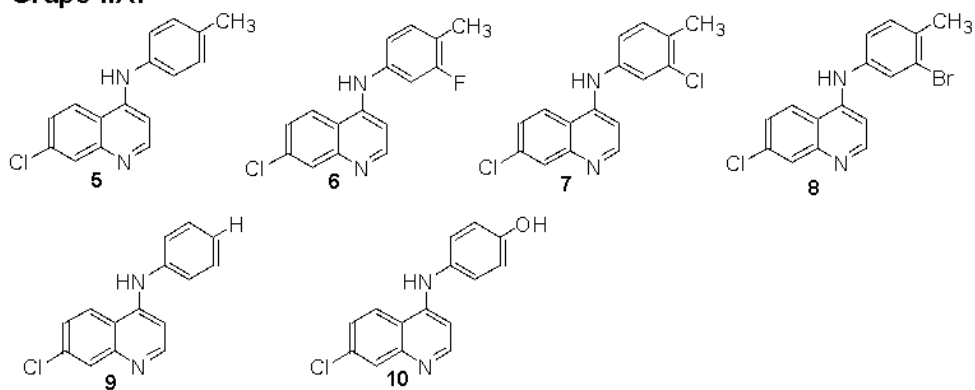
Por último, respecto a los compuestos del grupo IIC (9 derivados incluyendo la cloroquina), se puede observar que los derivados **16**, **17** y **21** presentaron la mejor

actividad antipromastigote con P.I. de 99.6, 69.1 y 56.8%, respectivamente, a 25 μ M de tratamiento. En contraste, los otros compuestos con sustituyentes más lipofílicos mostraron una disminución marcada de la actividad. Los derivados **15** y **14** alcanzaron inhibiciones moderadas (41.2 % y 40.8 %, respectivamente), mientras que los compuestos **19** y el **20** que se encuentran funcionalizados con grupos dietilamino y terbutilamino, respectivamente, presentaron P.I. cercanas al 40 %. El caso más extremo fue el compuesto **18**, que posee un sustituyente de *N4*-metilhomopiperacinil, cuya actividad fue casi nula (1 % de inhibición). Cloroquina como referencia mostró un P.I. del 51%. En general, los derivados **16**, **17** y **21** fueron los compuestos más activos del sub-grupo IIC, mostraron valores de CE_{50} de 12.7, <25 y 25 μ M, respectivamente. De los resultados, se identificaron al grupo piperacin-*N*-bencil (**16**) y *N4*-(2-pirimidinil)piperacinil (**17**) y el imidazoil (**21**) como sustituyentes bencílico convenientes para generar compuestos con actividad antipromastigote intrínseca, mientras terbutilamino (**20**), dietilamino (**19**), *N4*-metilhomopiperacinil (**18**) y *N4*-fenilpiperacinil (**15**) no mejora la actividad antipromastigote.

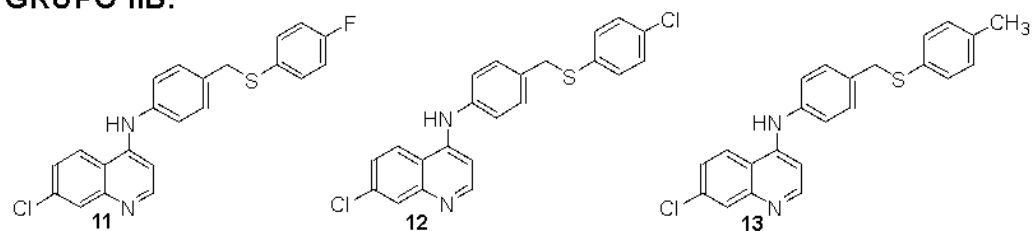
En términos generales y comparando con derivados plataforma de morfolinil, pirrolidinil y piperidinil, se puede notar que la incorporación del grupo piperacin-*N*-bencil favorece significativamente la actividad antipromastigote, ya que estos derivados (ver **FD2** y **FD3** en **Tabla 2**) mostraron una baja inhibición de crecimiento de promastigotes a 25 μ M, exceptuando el derivado de morfolinil (**FD1**). Por tanto, el grupo piperacin-*N*-bencil puede representar un farmacóforo interesante para generar una actividad leishmanicida intrínseca. Además, este tipo de sustitución favorece la lipofilia, lo que favorece probablemente la penetración a través de membranas del parásito y facilita el acceso a blancos moleculares.

Tabla 2. Actividad leishmanicida *in vitro* de compuestos del **grupo II** contra promastigote de *L. infantum*

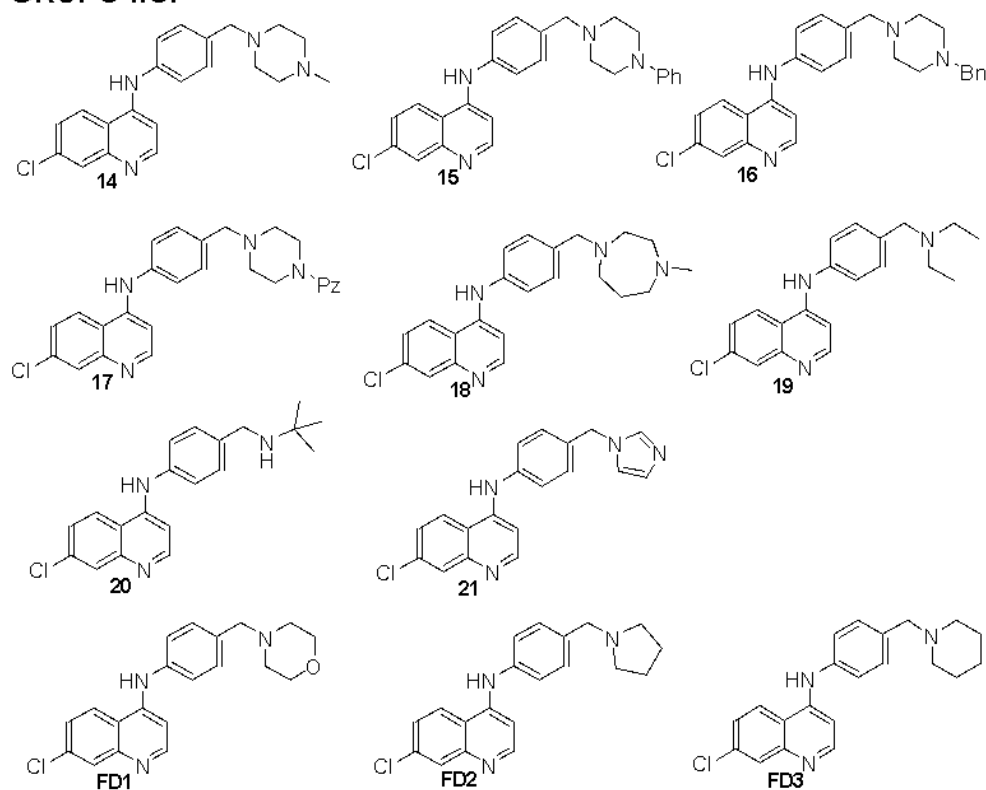
Grupo IIA:



GRUPO IIB:



GRUPO IIC:



Compuesto	P.I. (%) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b
5	81.1 ± 6.7	9.58 ± 0.6
6	72.8 ± 5.9	22.17 ± 1.9

7	77.5 ± 7.2	10.17 ± 0.9
8	70.6 ± 6.1	13.71 ± 1.2
9	38.0 ± 2.1	
10	51.1 ± 4.7	25.3 ± 2.1
11	28.6 ± 1.9	
12	97.6 ± 8.4	12.02 ± 1.1
13	28.9 ± 1.9	
14	40.8 ± 3.2	
15	41.2 ± 4.1	
16^c	99.6 ± 8.9	12.70 ± 1.2
17^d	69.1 ± 5.9	< 25.0
18	1.0 ± 0.6	
19	42.3 ± 3.2	
20	38.7 ± 3.2	
21	56.8 ± 4.7	~ 25.0
22 (Cloroquina)	51.0 ± 4.2	~ 25.0
Referencia FD1	71.2 ± 6.1	12.34 ± 1.12
Referencia FD2	42.2 ± 3.7	> 25.0
Referencia FD3	33.9 ± 2.9	> 25.0

^aP.I: porcentaje de inhibición a 25 μ M. ^bConcentración efectiva (CE₅₀) determinada a partir de 5 concentraciones de tratamiento del compuesto probado. Ensayos se realizaron por triplicado. ^cBn: bencilo. ^dPz: *N*-(2-pirimidinil)piperacín.

Una comparación global nos permite identificar a ocho potenciales candidatos, **5, 6, 7, 8, 12, 16, 17** y **21** de los 17 derivados, con valores de CE₅₀ entre 9.58 y 25 μ M. Esta actividad es ligeramente inferior a la actividad antipromastigote observada por el fármaco de referencia de miltefosina (CE₅₀= 5.2 μ M) y superior a aquella encontrada por la cloroquina (CE₅₀ ~ 25 μ M). Desde el punto estructural es destacable, primeramente, que es posible acceder a compuestos activos con la remoción del grupo dialquilamino, mientras la incorporación de piperacinos *N*-sustituídos (fénil, metil, bencil o pirimidinil) puede representar una sustitución alternativa a los grupos de morfolinil y piperidinil. Sin embargo, ensayos contra amastigote intracelulares son claves para dilucidar la relevancia de cada sustitución.

5.2.2.3. Actividad antipromastigote de los derivados de grupo III

Dentro del grupo III de compuestos de quinolin-3-*N*-acilhidrazonas, el análisis fue primeramente realizado en sub-grupos y posteriormente, se realizó un análisis global del sistema. El primer subgrupo consiste de los compuestos del **23** al **31** que son quinolinas sustituidas con un grupo metoxi en la posición 2 y carentes de sustituyente en el anillo bencénico, así como una variedad de sustituyentes de arilo/hetero-arilo incorporado al carbono del grupo *N*-acilo. En general, los compuestos mostraron una actividad de baja con valores de P.I. entre 12.8 y 26.5 para la mayoría de los casos. Otros casos aún más extremos tales como aquel de los compuestos **26** y **28** presentaron valores de P.I. de 4.1 y 2.3, respectivamente. De este sub-grupo, sólo destaca el compuesto **31** que exhibió un alto P.I. (83.1%) a 25 μ M y un CE_{50} de 5.99 μ M. Por tanto, entre los sustituyentes de *N*-acilo probados se encontró que solamente el 5-nitrofurilo generó un compuesto significativamente activo, mientras grupos de arilos sustituidos (3-cloro, 4-cloro, 4-fluor, 3-flúor, 4-nitro y 4-triifluorometil) no mejoraron la actividad leishmanicida. Esto deja claro que el grupo 5-nitrofurilo es un farmacóforo potencial en este tipo de derivados.

Respecto al segundo subgrupo de compuestos (**32** al **39**), este se caracteriza por el grupo metoxi en posición 2, un grupo metilo en la posición 7 del anillo quinolínico así como una variedad de sustituyentes de arilo/hetero-arilo incorporado al carbono del grupo *N*-acilo. *N*-Heteroarilo tal como 5-nitrofurilo no fue probado. En general, los compuestos **32**, **34** y **39** exhibieron la mejor actividad leishmanicida con P.I. de 59.6, 48.1 y 40.2%, respectivamente, mientras el resto de los derivados **33**, **35**, **36**, **37** y **38** mostraron una modesta inhibición con P.I. de 24.3, 11.1, 0.0, 12.5 y 9.9%, respectivamente, a una concentración de tratamiento de 25 μ M. Estos resultados muestran que la incorporación del grupo metilo en posición 7 favorece la actividad antipromastigote en relación a derivados carentes de benzo-sustitución (**23-30**). Adicionalmente, se puede notar que los 3-clorofenilo, 3-metoxifenilo e inclusive 4-trifluorometilfenil generan compuestos más activos que el resto de sustituciones arílicas.

Del tercer subgrupo de compuestos (**40** al **45**), que se diferencian de los derivados previos por la introducción del átomo de cloro como sustituyente en la posición 7 del anillo quinolínico, presentaron los mejores valores de P.I. respecto a los dos subgrupos anteriores. Los compuestos **40**, **41**, **42**, **43** y **44** exhibieron P.I. de 42.1, 44.2, 69.9, 53.1 y 88.7, respectivamente, bajo una concentración de tratamiento de 25 μ M. En particular, los derivados **42**, **43** y **44** presentaron CE_{50} entre > 25 y 0.79 μ M. Como se observó en el

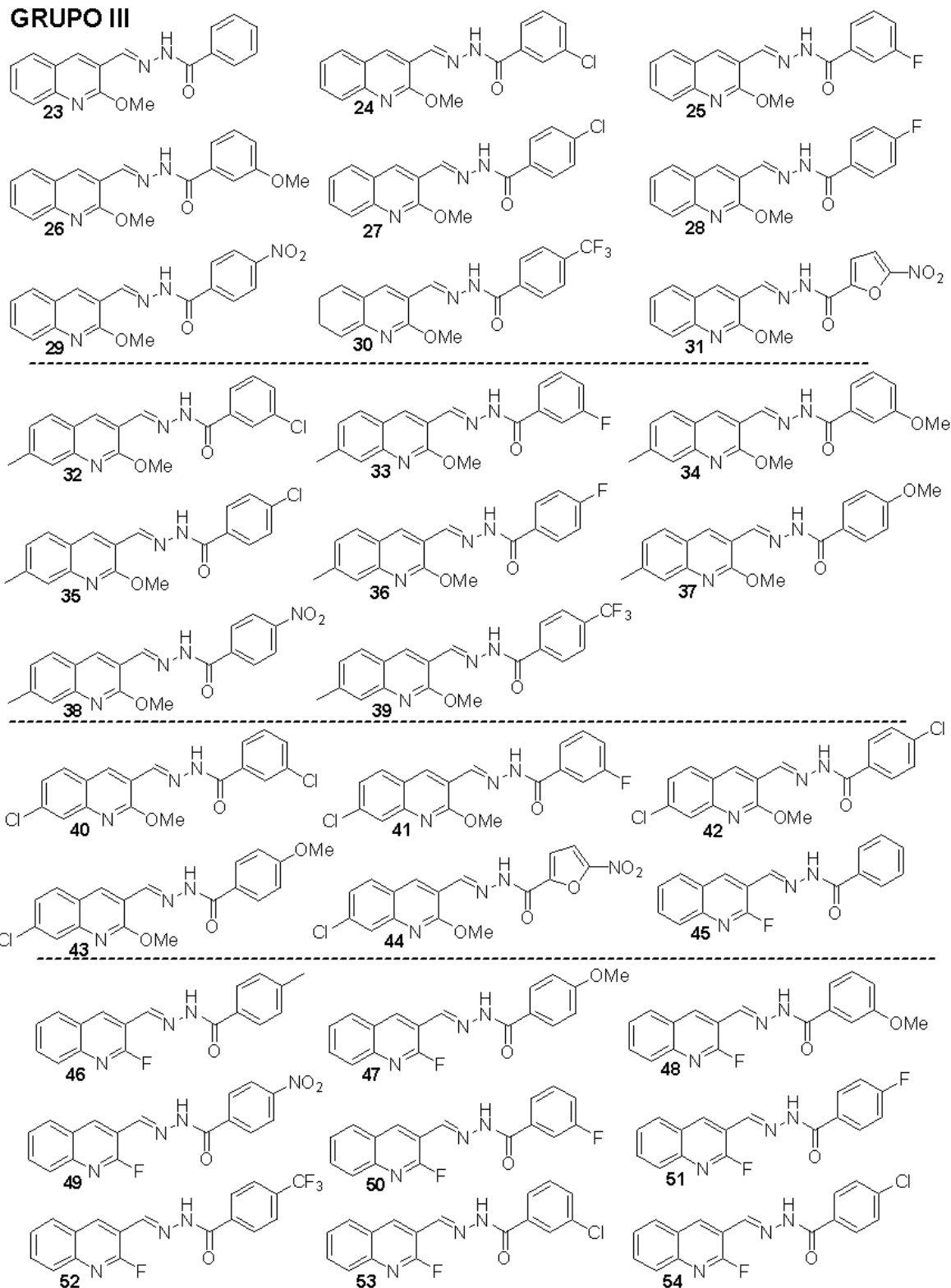
sub-grupo IIIA, la presencia del 5-nitrofurilo es esencial para generar compuestos altamente activos, siendo un farmacóforo potencial. Otro aspecto relevante a discutir es que la funcionalización con 7-cloro, incrementó la actividad en relación a los compuestos 7-metil-sustituídos y no benzo-sustituídos.

El último subgrupo de compuestos (**46** al **54**), que son caracterizados por presentar un átomo de flúor como sustituyente en la posición 2, mostró una nula actividad antipromastigote con P.I. alrededor de cero para la mayoría de los casos, exceptuando el compuesto **53** que exhibió un P.I. de 21%, bajo una concentración de tratamiento de 25 μM . Desde el punto de vista estructural, este resultado demuestra que el reemplazo del grupo metoxi por el átomo de flúor compromete la actividad leishmanicida de la isoquina deshidroxilada.

En términos generales, la identificación de compuestos activos demuestra que la funcionalización de *N*-acilhidrazona con quinolinas genera compuestos no muy potentes contra la forma promastigote. Para ello, es necesaria la incorporación del farmacóforo de 5-nitrofurilo como *N*-acil-sustituyente. Si lo comparamos con nuestros antecesores basados en ftalacinas y quinazolinas basados en 5-nitrofurilo, podemos notar que la quinolina es un farmacóforo interesante comparable con los heterociclos de 4-cloroftalacina (Romero et al., 2017; Romero et al., 2019) y 2-(4-fluorfenil)quinazolina (Romero et al., 2023). Otros aspectos estructurales de estas nuevas quinolin-3-*N*-acilhidrazonas indican que la selección de la funcionalización en la posición 2 es fundamental, siendo preferible el grupo metoxi sobre el flúor. Por su parte, respecto a la sustitución en el anillo bencénico, la incorporación del 7-cloro mejora la actividad sobre el 7-metil y aún más para anillo bencénico no funcionalizado. Finalmente, respecto a la naturaleza del grupo *N*-acilo, el 5-nitrofurilo generó remarcablemente los compuestos más activos, dando CE_{50} en rangos submicromolares y nanomolares, mientras 4-clorofenilo y 3-clorofenilo generó compuestos con actividades discretas entre 20 y 25 μM . La combinación de estas funcionalidades generó el compuesto más activo, el compuesto **44**. Este compuesto mostró una actividad antipromastigote superior a la miltefosina ($\text{CE}_{50} = 5.2 \mu\text{M}$) y aún más sobre cloroquina ($\text{CE}_{50} \sim 25 \mu\text{M}$).

Tabla 3. Actividad leishmanicida *in vitro* de compuestos de **grupo III** contra promastigote de *L. infantum*

GRUPO III



Compuesto	P.I. (%) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b
23	12.8 ± 0.9	
24	26.5 ± 1.9	

25	14.1 ± 0.8	
26	4.1 ± 0.2	
27	31.9 ± 2.3	
28	2.3 ± 0.1	
29	13.8 ± 1.0	
30	24.8 ± 1.8	
31	83.1 ± 7.1	5.99 ± 0.4
32	59.6 ± 4.3	~ 25.0
33	24.3 ± 1.8	
34	48.1 ± 3.2	~ 25.0
35	11.1 ± 1.1	
36	0.0	
37	12.5 ± 0.8	
38	9.9 ± 0.8	
39	40.2 ± 3.4	
40	42.1 ± 3.5	
41	44.2 ± 4.1	
42	69.9 ± 5.4	> 25
43	53.0 ± 4.7	~ 25.0
44	88.7 ± 7.9	$0.79 \pm 0.08^{\circ}$
45	0	
46	0	
47	1.1 ± 0.4	
48	0	
49	0	
50	0	
51	0	
52	0	

53

21.0 \pm 1.2

54

0

^aP.I: porcentaje de inhibición a 25 μ M. ^bConcentración efectiva (CE₅₀) determinada a partir de 6 concentraciones de tratamiento del compuesto probado. ^cDeterminación de CE₅₀ requirió de 10 concentraciones de 0.1 a 25 μ M. Ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.2.3. Actividad antiamastigote de los derivados más promisorios de los grupos I, II y III

En este ensayo fueron seleccionados los compuestos que se consideran promisorios en base a la actividad que se obtuvieron contra la forma promastigote. Esta selección incluyó a todos los derivados que presentaron un P.I. superior al 50% así como también algunos compuestos con un P.I. inferior pero que cumplan una característica estructural a analizar. En total se evaluaron 22 compuestos, los cuales incluyen a derivados de las tres familias químicas. Del grupo I fueron seleccionados todos los derivados: el imiquimod **1** (referencia) (CE₅₀ promastigote = 37.1 μ M), **2** (CE₅₀ promastigote = 23.9 μ M), **3** y **4** (CE₅₀ promastigote > 25 μ M). La selección de este último derivado busca verificar y confirmar la relevancia de la funcionalización imidazol sobre la actividad antiamastigote.

Por su parte, dentro del grupo II fueron seleccionados todos los derivados de los sub-grupos IIA y IIB (**5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12** y **13**), algunos del sub-grupo IIC (**19** y **20**) y la cloroquina (como referencia). Los derivados **9**, **10**, **11** y **13** fueron seleccionados a pesar de su baja actividad, en orden de analizar el efecto de las funcionalidades químicas en el modelo amastigote. Del sub-grupo IIC, algunos derivados activos contra promastigote tales como **16**, **17** y **21** no fueron probados por su falta de disponibilidad al momento de montar el ensayo antiamastigote que se realiza en unos momentos muy puntuales del año. Este grupo de tres compuestos se estiman evaluar en las próximas semanas en orden de complementar la data generada y extraer el rol definitivo de la funcionalidad de dialquilamino.

Finalmente, del grupo III, solamente fueron seleccionados los derivados **31** y **44** por su significativa actividad contra promastigote. Otros derivados tales como **32**, **34**, **42** y **43** se estiman incluir en el próximo ensayo para verificar su potencial. No entran en la discusión de la presente tesis de grado. Miltefosina fue seleccionada como fármaco de referencia.

Para la evaluación fueron usadas dosis seriadas de entre 20 μ M y 60 μ M para la mayoría de casos y concentraciones entre 1 y 20 μ M para derivados que resultaron muy activos contra el modelo de amastigotes intracelulares. Este ensayo es crítico ya que emplea la forma amastigote del parásito, la cual es la clínicamente relevante, y nos permite distinguir entre los compuestos que realmente tienen un efecto leishmanicida dentro de la célula y aquellos que

aunque muestran buena actividad en la forma promastigote, no necesariamente mantienen esa actividad en la infección intracelular. Por lo tanto, estos resultados nos ayudan a identificar cuáles compuestos tienen el potencial de convertirse en hits e identificar el rol de funcionalidad química para dirigir o redirigir futuros diseños.

Del primer grupo se encontró que tanto el imiquimod **1** como el derivado **3** no presentaron actividad anti-amastigote exhibiendo P.I. de 31 y 25%, respectivamente, mientras los derivados **2** y **4** que están carentes del grupo imidazol mostraron actividad anti-amastigote ($CE_{50} \sim 20 \mu M$) con evidente *clearance* del compuesto **2** a **40 μM** . Estos resultados muestran que la estructura de imidazol-quinolina en sí no parece suficiente para inducir una actividad anti-amastigote. Esto entra en contraposición, en parte, con los resultados de Buates & Matlashewski, 1999 dónde en modelos de infección de BMDM con *L. donovani* se observó una respuesta leishmanicida (*clearance* completo a $4 \mu M$). Las variables como tipo de macrófagos y especie de *Leishmania*, en nuestro caso utilizamos células THP-1 y *L. infantum*, puede estar influyendo en las discrepancias en la actividad leishmanicida. Con estos dos ejemplos y experimentos realizados no es posible responder acerca de la relevancia de las funcionalidades en estos imidazol-quinolinas en la actividad anti-amastigote. Otros experimentos relacionados con la inmunoestimulación (producción de citoquinas claves, liberación de óxido nítrico o expresión de proteínas de superficie del macrófago infectado tal como el complejo MCII) puede ayudar a analizar el rol de la inmunoestimulación en la actividad anti-amastigote así como el efecto de la funcionalidad química (imidazol, 2-amino o *N*-sustituyente). También un mayor número de compuestos con diversas funciones químicas puede ser de utilidad para extraer una conclusión estructural sólida. Por el momento, sólo la actividad antipromastigote nos indica que tanto la presencia de unidad de imidazol y la presencia del *N*-(4-fluorobencilo) pueden ser relevantes al momento de diseñar agentes leishmanicidas intrínseca. Para futuros diseños, para conservar la actividad inmunoestimulante, es mandatorio conservar las funcionalidades de imidazol y 2-amino, y buscar otros cambios sustanciales, probablemente a nivel del *N*-imidazol. En este último caso, grupos bencilos emergen como una potencial sustitución.

Por otra parte, los derivados **2** y **4**, quienes fueron considerados inactivos a $25 \mu M$ contra promastigote, mostraron una actividad leishmanicida contra los amastigote intracelulares, dando CE_{50} de aproximadamente $20 \mu M$. Esta actividad, no implica que la ausencia de la unidad de imidazol incrementa la actividad leishmanicida, sino más bien que esta respuesta

puede estar asociada a un efecto propio del grupo 3-nitro, que es muy común en agentes tripanosomicida (Zuma et al., 2022).

Respecto al segundo grupo II, se probaron once compuestos. Del sub-grupo IIA, el compuesto **5** mostró una actividad leishmanicida significativa ($CE_{50} \sim 1.25 \mu M$) con un claro *clearance*, el compuesto **6** exhibió una moderada actividad ($CE_{50} \sim 1.25 \mu M$) con *clearance*, mientras los compuestos **7**, **8** y **9** presentaron un CE_{50} alrededor de $20 \mu M$ pero sin un notable *clearance*. El compuesto **10** no mostró una actividad apreciable a $20 \mu M$ ($CE_{50} > 20 \mu M$). De este grupo se puede extraer, similarmente, como fue apreciado contra promastigote (ver **Tabla 1**), que la ausencia del grupo dialquilamino sigue generando compuestos activos; sin embargo, situaciones extremas como una disminución de la lipofilia por incorporación de grupo hidrofílico (hidroxilo en **10**) o una remoción de grupo metilo (**9**) así como un mayor incremento de la misma por la incorporación de halógeno lipofílicos (ej. cloro en **7** y bromo en **8**) comprometen la actividad leishmanicida de esta sub-familia de compuestos, siendo por tanto los compuestos **5** y **6** los más promisorios de esta sub-familia. Esto último compromete el potencial del sistema y si lo comparamos con los derivados previos de morfolinil ($CE_{50} 5 \mu M$, no tóxico a $20 \mu M$) y piperidinil ($CE_{50} 0.625 \mu M$, tóxico a $20 \mu M$) que fueron altamente activos y no tóxicos a $20 \mu M$, estos sustituyentes de dialquilamino funcionan como un modulador de la toxicidad, siendo un farmacóforo clave en el diseño de agentes leishmanicidas.

Del sub-grupo IIB, los compuestos **11** y **12** fueron activos a potencia submicro-molar con un claro *clearance* a $20 \mu M$ y CE_{50} de ~ 5 y 1.25 , respectivamente, con solubilidad y no toxicidad a $20 \mu M$, mientras el compuesto **13** no mostró actividad. Interesantemente, el compuesto **11** que fue inactivo contra promastigote presentó actividad antiamastigote, mientras el compuesto **13** fue consistente con su inactividad contra ambos estadios del parásito. En resumen de este grupo IIB, este reemplazo del grupo dialquilamino por un grupo lipofílico como el tiofenoxi-metilo, que tenemos en los derivados **11** y **12**, generaron compuestos tan activos como las referencias **FD1** (morfolinil) y **FD3** (piperidinil).

Respecto al sub-grupo IIC, los compuestos **17**, **19**, **20** y **21**, mostraron una apreciable actividad antiamastigote ($CE_{50} \sim 5 \mu M$), mientras el compuesto **16**, que mostró la mejor actividad antipromastigote, exhibió una actividad antiamastigote discreta ($CE_{50} \sim 5 \mu M$). En particular, el compuesto **20** sí mostró lisis de macrófagos, mientras el resto de compuestos probados del sub-grupo IIC no mostraron lisis de macrófagos. Al comparar la actividad de estos derivados con aquella de los derivados previos de morfolinil ($CE_{50} \sim 5 \mu M$ y no tóxico a $20 \mu M$) y piperidinil ($CE_{50} \sim 0.625 \mu M$ y tóxico a $20 \mu M$), los sustituyentes de dietilamino

(19), *N*4-(2-pirimidinil)piperacínil (17) , *N*-metilpiperacínil (14), terbutilamino (20) y *N*-imidazol (21), a pesar de generar compuestos activos, no representan una significativa mejora y el grupo piperidinil sigue siendo un sustituyente de dialquilamino esencial en el diseño de isoquinas deshidroxiladas potentes.

En el caso del grupo III, fueron evaluados los compuestos 31 y 44, y si bien los mismos mostraron una potencia que fue notable en el modelo promastigote con valores de CE_{50} de 5.99 μ M y 0.80 μ M, respectivamente, su actividad frente a la forma amastigote fue significativamente menor, es decir, ambos presentaron valores de inhibición cercanos a los 20 μ M. Aun así, es importante destacar que ninguno mostró citotoxicidad en la línea THP-1, lo que indica que la pérdida de potencia no estaría asociada a efectos tóxicos sobre la célula hospedera.

En general, la presente investigación logró el objetivo de identificar funcionalidades esenciales en cada uno de los tres sistemas quinolínicos estudiados, siendo un aspecto clave para futuros diseños. Del grupo I y II se identificaron funcionalidades claves, así como funciones inocuas, lo cual nos permite generar una perspectiva general para futuros diseños. Por su parte, dentro del grupo II, las preguntas formuladas antes de la tesina fueron respondidas, encontrando que el grupo dialquilamino es importante para modular la potencia de los compuestos y actúa como un modulador de la citotoxicidad, siendo el morfolinil y en especial, el piperidinil, farmacóforos claves de elección en el diseño de isoquinas deshidroxiladas. La carencia de esta funcionalidad genera compuestos más potentes y selectivos. Ver detalles de un análisis estructura-actividad comprimido de los tres sistemas quinolínicos en el **Esquema 3**.

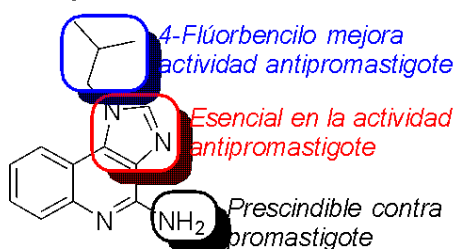
Tabla 4. Actividad antiamastigote, solubilidad y citotoxicidad cualitativa en la línea celular THP-1 de los compuestos más promisorios de los grupos I, II y III.

Compuesto	Grupo	CE_{50} (μ M) [P.I. (%)] ^a	<i>Clearance</i> ^b	Solubilidad ^c	Citotoxicidad ^d
1	I	> 20.0 [31%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
2		~ 20.0 [50%]	<i>Clearance a 40</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 62.5 μ M
3		> 20.0 [25%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
4		~ 20.0 [50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
5	IIa	~1.25 [~50%]	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
6		~1.25 [<50%]	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
7		~ 20.0 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
8		~ 20.0 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
9		~ 20 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
10		> 20 [15%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
11	IIb	~ 5 [~50%]	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M

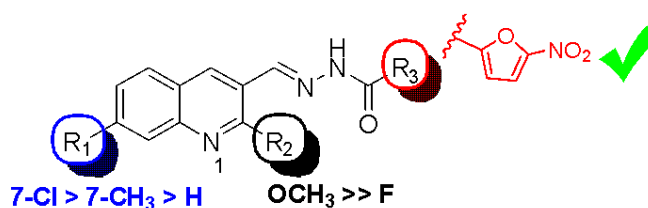
12	IIc	~ 1.25 [~50%]	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
13		> 20 [10%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
14		~ 5.0 [~50%]	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
16		~ 20.0 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
17		~ 5.0 [~50%]	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
19		~ 5.0 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
20		~ 5.0 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	Tóxico a 20 μ M
21		~ 5.0 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
22	Cloroquina	~ 25 [~50%]	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
31	III	> 20.0	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
44		> 20.0	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
FD1 ^e	IIc-Referencia	~ 5.0	<i>Clearance</i>	Soluble a 20 μ M	No tóxico a 20 μ M
FD2 ^e	IIc-Referencia	> 20.0	<i>No clearance</i>	Soluble a 20 μ M	Tóxico a 20 μ M
FD3 ^e	IIc-Referencia	~ 0.625	<i>Clearance a 2.5</i>	Soluble a 20 μ M	Tóxico a 20 μ M

^aCE₅₀ and P.I. (porcentaje de inhibición a 20 μ M) entre paréntesis. ^b*Clearance* a la concentración de prueba (20 μ M en general). ^cSolubilidad cualitativa en medio de cultivo (medio acuoso) apreciada por precipitación o no de cristales del compuesto probado. ^dCitotoxicidad cualitativa en THP-1 apreciada por lisis o no de las células bajo el tratamiento del compuesto probado. ^eEstructuras de compuestos de código FD1, FD2 y FD3 ver en **Tabla 2**.

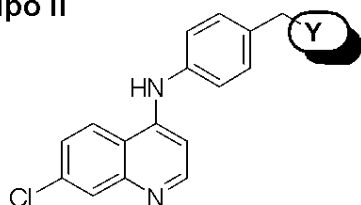
Grupo I



Grupo III (promastigote)

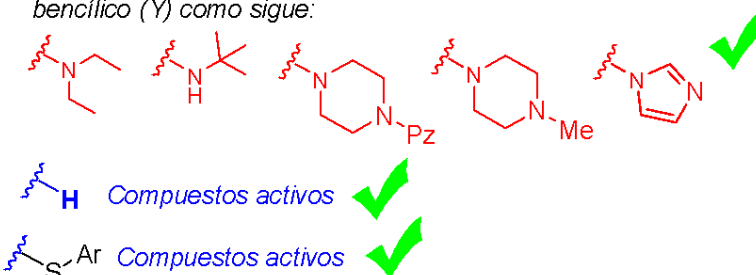


Grupo II



- Discreta/moderada actividad antipromastigote

- Remarcable actividad antiamestigote como función del grupo bencílico (Y) como sigue:



Esquema 3. Análisis estructura-actividad cualitativo global para los compuestos estudiados: (Grupo I) pre-análogos de imiquimod **1-4**; (Grupo II) derivados deshidroxilados de isoquina **5-21** y (Grupo III) derivados de quinolin-3-*N*-acilhidrazonas **23-54**.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudiaron tres familias de derivados de quinolinas con el objetivo de identificar farmacóforos claves que determinen la actividad leishmanicida y además seleccionar aquellos compuestos con el potencial para avanzar hacia más ensayos preclínicos.

En los preanálogos de imiquimod (grupo I) se confirmó que el grupo amino no es indispensable para la actividad antipromastigote, mientras que la estructura base de imidazol-quinolina es esencial y el grupo *N*-(flúor)bencilo representa un potencial farmacóforo. Sin embargo, mayores investigaciones son necesarias, incluyendo la preparación de un grupo más amplio de compuestos con diversas funcionalidades así como estudios inmunológicos, en orden de buscar una respuesta dual leishmanicida/inmunoestimulantes.

El grupo II (derivados deshidroxilados de isoquina) fue la familia más prometedora. Se observó que los grupos dialquilamino producen compuestos activos, aunque con diferencias en la citotoxicidad. De manera destacada, los derivados desaminados conservaron e incluso mejoraron la actividad, siendo los compuestos **5**, **6** y **12** los más relevantes de las tres familias químicas, con un CE₅₀ del orden de submicromolar en ambas formas del parásito. Estos derivados representan potenciales *hits* para futuros ensayos y optimización de la isoquina deshidroxilada como estructura líder. Por su parte, los sustituyentes de dietilamino y terbutilamino generaron compuestos activos; sin embargo, su moderada respuesta y toxicidad en algunos casos, confirmó que el grupo morfolinil y en especial el piperidinil son los farmacóforos de elección para el diseño de isoquinas deshidroxiladas potentes y selectivas contra modelos de infección, al menos *in vitro* de *L. infantum*. El derivado de piperidinil emerge como un potencial candidato para extender nuestro estudio a ensayos preclínicos avanzados.

Respecto a las 3-quinolin-hidrazonas (grupo III), se identificaron compuestos altamente activos en promastigote (como el **31** y **44**), pero con pérdida de la actividad en amastigote, evidenciando así limitaciones relacionadas a la penetración de la membrana celular. El análisis de estructura-actividad permitió establecer que el 5-nitrofurilo es un farmacóforo ya que genera compuestos altamente activos, mientras que la introducción las sustituciones en las posiciones 7 y 2 actúan como un amplificador de la potencia leishmanicida, siendo preferido el cloro y metoxi en la posición 7 y 2, respectivamente. Por su parte, la pérdida de la actividad observada en amastigote para estos compuestos **31** y **44** invita a que es fundamental realizar cambios estructurales que faciliten el acceso del compuesto al

amastigote. Probablemente, estos deben ir dirigidos a la incorporación de grupo básicos y un ligero incremento de la lipofilia, manejando dichas variables en simultáneo o en forma separada en los sistemas químicos modificados.

En resumen, la presente tesis de grado logró el objetivo planteado de investigar las funcionalidades claves en la actividad leishmanicida en nuevos sistemas pre-análogos de imiquimod y quinolin-3-*N*-acilhidrazonas así como alcanzar una mayor optimización de la plataforma de isoquina deshidroxiladas. Esta información ha permitido abrir nuevas puertas para afinar el diseño de los sistemas quinolínicos del grupo I y II, así como continuar el desarrollo de las isoquinas deshidroxiladas como plataforma líder.

7. FINANCIAMIENTO

La presente Tesis de Grado fue soportada por fondos extraordinarios de PEDECIBA-QUÍMICA y por fondos de proyecto PEDECIBA bajo el programa de DESPEGUE CIENTÍFICO 2023, ambos bajo la responsabilidad del Dr. Angel H. Romero. Los estudios en amastigotas intracelulares fueron financiados por el proyecto Fondo Vaz Ferreira, FVF_2023_441, Dirección Nacional de Innovación, Ciencia y Tecnología Ministerio de Educación y Cultura, Fondo Vaz Ferreira, FVF_2023_441, bajo la responsabilidad del Dr. Diego Benítez.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abadías-Granado, I.**, Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 112(9), 822–832. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2021.05.011>
- Alegretti, M.** (2022). Ministerio de Salud Pública, Dirección General de la Salud División Epidemiología. Document 12/001/3/3754/2022. https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2022-08/Respueta%20y%20resoluci%C3%B3n%20Julio%20Medina_removed%20%281%29.pdf.
- Alvar, J.**, et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE*, 7, e35671. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671
- Alves, F.**, Bilbe, G., Blesson, S., Goyal, V., Monnerat, S., Mowbray, C. Chatelain, E. (2018). Recent development of visceral leishmaniasis treatments: Successes, pitfalls, and perspectives. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00048-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00048-18>
- Antinarelli, L. M.**, Souza, I. O., Glanzmann, N., Almeida, A. D., Porcino, G. N., Vasconcelos, E. G., da Silva, A. D., & Coimbra, E. S. (2016). Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinyldrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, 171, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.009>
- Arevalo, I.**, Tulliano, G., Quispe, A., Spaeth, G., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., Pollack, H. (2017) Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Disease*, 44, 1549-1554. doi: 10.1086/518172.
- Aronson, N.**, Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P. Magill, A. (2017). Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Avanzo, R. E.**, Garcia-Linares, G., Rodriguez, N., & Romero. (2025). A comprehensive revision on the use of quinoline antimalarial drugs as leishmanicidal agents. *Froniers in Chemitry*, 13: 1608340 (DOI: 10.3389/fchem.2025.1608340).
- Benítez, D.**, Medeiros, A., Quiroga, C., & Comini, M. A. (2022). A Simple Bioluminescent Assay for the Screening of Cytotoxic Molecules Against the Intracellular Form of *Leishmania infantum*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2524, 127–147. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2453-1>.

Benítez, J., Cavalcanti de Queiroz, A.; Correia, I., Amaral-Alves, M., Alexandre-Moreira, M.S., Barreiro, E.J., Moreira-Lima, L., Varela, J., González, M., Cerecetto, H., Moreno, V., Costa-Pessoa, J., Gambino, D. (2013). New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.036>

Bernardino, A.M.R., Gomes, A.O., Charret, K.S., Freitas, A.C.C., Machado, G.M.C., Canto-Cavalheiro, M.M., Leon, L.L., & Amaral, V.F. (2006). Synthesis and leishmanicidal activities of 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(1):80–87. doi: 10.1016/j.ejmech.2005.10.007.

Braillard, S., Keenan, M., Breese, K.J., Heppell, J., Abbott, M., Islam, R., Shackelford, D.M., Katneni, K., Crichton, E., Chen, G., Patil, R., Lee, G., White, K.L., Carvalho, S., Wall, R.J., Chemi, G., Zuccotto, F., González, S., Marco, M., Chatelain, E. (2023). Discovery of DNDI-6174, a preclinical candidate for visceral leishmaniasis targeting the cytochrome bc1 complex. *Science Translational Medicine*, 15(726), eadh9902. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adh9902>

Buckle, D.R., Cantello, B.C.C., Smith, H., & Spicer, B.A. (1975). 4-Hydroxy-3-nitro-2-quinolones and Related Compounds as Inhibitors of Allergic Reactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18(7), 727. doi: 10.1021/jm00241a017.

Buates, S., & Matlashewski, G. (1999). Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: Efficacy and mode of action. *Journal of Infectious Diseases*, 179(6), 1485–1494. <https://doi.org/10.1086/314782>

Carvalho, L., Luque-Ortega, J.R., López-Martín, C., Castanys, S., Rivas, L., & Gamarro, F. (2011). The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), 4204–4210. <https://doi.org/10.1128/AAC.00520-11>

Carvalho, S.A., Kaiser, M., Brun, R., da Silva, E. F., & Manssour Fraga, C. A. (2014). Antiprotozoal Activity of (E)-Cinnamic N-Acylhydrazone Derivatives. *Molecules*, 19(12), 20374–20381. <https://doi.org/10.3390/molecules191220374>

Centers for Disease Control and Prevention. (s.f.). DPDx – Leishmaniasis. Accedido el 8 de julio de 2025, de <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.htm>

Centers for Disease Control and Prevention. (2024). Leishmaniasis: Clinical care. U.S. Department of Health & Human Services. Retrieved October 4, 2025, from <https://www.cdc.gov/leishmaniasis/hcp/clinical-care/index.html>

Chawla, B., Anupam, J., Sanexa, S., Barrett, M.P., Madhubala, R. (2011). Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular Biochemical Parasitology* 164 (2): 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.007>

Coimbra, E. S., Antinarelli, L. M., Silva, N. P., Souza, I. O., Meinel, R. S., Rocha, M. N., Soares, R. P., & da Silva, A. D. (2016). Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chemico-Biological Interactions*, 260, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.017>

Coimbra, E. S., Libong, D., Cojean, S., Saint-Pierre-Chazalet, M., Solgadi, A., Le Moyec, L., Duenas-Romero, A. M., Chaminade, P., & Loiseau, P. M. (2010). Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2548–2555. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq371>

Croft, S. L., & Engel, J. (2006). Miltefosine — discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Drugs for Neglected Diseases Initiative*. <https://dndi.org/scientific-articles/2006/miltefosine-discovery-of-the-antileishmanial-activity-of-phospholipid-derivatives>

Del Carpio, E., Hernández, L., Lubes, V., Jourdan, F., Cerecetto, H., Scalese, G., Gambino, D., & Romero, A.H. (2025). Metal Complexes based on Quinoline for development of Leishmanicidal Agents: Structure and Mechanism of Action. *Frontiers in Chemistry*, 13:1586044 (DOI: 10.3389/fchem.2025.1586044).

Delgado, F., Benítez, A., Gotopo, L., & Romero, A.H. (2025). 4-Aminoquinoline: A Comprehensive Review about Synthetic Strategies. *Frontiers in Chemistry*, 13:1553975 (DOI: 10.3389/fchem.2025.1553975).

Delgado, F. Síntesis y evaluación leishmanicida *in vitro* de nuevos derivados de isoquinas e isotebuquinas. Tesis de grado. Montevideo: Udelar. FC. 2025. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/48868>

Drugs for Neglected Diseases initiative. (2025, February 7). LXE408 Novartis for cutaneous leishmaniasis. <https://dndi.org/research-development/portfolio/lxe408-novartis-for-cutaneous-leishmaniasis/>

Du, R., Hotez, P. J., Al-Salem, W. S., & Acosta-Serrano, A. (2016). Old World cutaneous leishmaniasis and refugee crises in the Middle East and North Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(5), e0004545.

Dutra, L. A., de Almeida, L., Passalacqua, T.G., Reis, J. S., Torres, F.A.E., Martinez, I., Peccinini, R.G., Chin, C.M., Chegaev, K., Guglielmo, S., Fruttero, R., Graminha, M.A.S., & dos Santos, J.L. (2014) Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 4837–4847. doi:10.1128/AAC.00052-14.

El Hajj, R., Bou Youness, H., Lachaud, L., Bastien, P., Masquefa, C., Bonnet, P.A., Khalifeh, I. (2018). EAPB0503: An Imiquimod analog with potent in vitro activity against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(11), e0006854. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006854>

Elmahallawy, E.K., Alkhaldi, A.M., Saleh, A.A., Al-Mekhlafi, A.M., & Mohamed, E.S. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Infection and Public Health*, 7(6), 466–471. <https://doi.org/10.3855/jidc.4310>

Faria, M. S., Reis, F. C. G., & Lima, A.P.C.A. (2012). Toll-like receptors in *Leishmania* infections: Guardians or promoters? *Journal of Parasitology Research*, 2012, 930257. <https://doi.org/10.1155/2012/930257>

Hanan, E.J., Chan, B.K., Estrada, A.A., Shore, D.G., & Lyssikatos, J.P. (2010). Mild and General One-Pot Reduction and Cyclization of Aromatic and Heteroaromatic 2-Nitroamines to Bicyclic 2H-Imidazoles. *Synlett* No. 18, 2759–2764. DOI: 10.1055/s-0030-1259007.

He, X., Jia, H., Jing, Z., Liu, D. (2013). Recognition of pathogen-associated nucleic acids by endosomal nucleic acid-sensing toll-like receptors. *Acta Biochemical Biophysical Sin (Shanghai)* 45, 241-58. doi: 10.1093/abbs/gms122.

Henao, H.H., Osorio, Y., Saravia, N. G., Gómez, A., & Travi, B. (2004). Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomédica*, 24(4), 393–402. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i4.1296>

Hernández, P., Rojas, R., Gilman, R.H., Sauvain, M., Lima, L.M., Barreiro, E.J., González, M., & Cerecetto, H. (2013). Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 64–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.047.

Hide, M. (2007). Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. *Encyclopedia of Infectious Diseases*, Chapter 6, 87–123. DOI:10.1002/9780470114209.ch6.

Jacomini, A.P., Silva, M., Poletto, J., & Rosa, F.A. (2018). Potential Antileishmanial Activity of 4-N-Acylhydrazone Pyrazolo[3,4-d]pyridazin-7-ones: Synthesis, in vitro Biological Evaluations and Computational Studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(12). Doi: 10.21577/0103-5053.20180134

Jha, T.K., & Sundar, S. (2012). Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(4), 489–492. <https://doi.org/10.1586/eri.12.23>

Jha, T.K., Oliario, P., Thakur, C.P., Kanyok, T.P., Singhanian, B.L., Singh, I.J., et al. (1998). Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ*, 316(7139), 1200–1205. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7139.1200>

Kaushik, D., Granato, J.T., Macedo, G.C., Dib, P.R.B., Piplani, S., Fung, J., da Silva, A.D., Coimbra, E.S., Petrovsky, N., Salunke, D.B. (2021). Toll-like receptor-7/8 agonist kill

Leishmania amazonensis by acting as pro-oxidant and pro-inflammatory agent. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 2021, 73, 1180-1190. doi: 10.1093/jpp/rgab063.

Konstantinović, J., Videnović, M., Orsini, S., Bogojević, K., D'Alessandro, S., Scaccabarozzi, D., Terzić Jovanović, N., Gradoni, L., Basilico, N., & Šolaja, B.A. (2018). Novel aminoquinoline derivatives significantly reduce parasite load in *Leishmania infantum*-infected mice. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(7), 629–634. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00053>

Lindoso, J.A.L., Costa, J.M.L., Queiroz, I.T., & Goto, H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 3, 69–77. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S24764>

Llanes, A., Restrepo, C.M., Del Vecchio, G., Anguizola, F.J., & Lleonart, R. (2015). The genome of *Leishmania panamensis*: insights into the origin of New World *Leishmania* species. *Scientific Reports* 5 (8550). <https://www.nature.com/articles/srep08550.pdf>

Lemma W, Tekola F, Sileshi M, Erenso G, Mekonnen Y, Hailu A. (2009). A zoonotic focus of cutaneous leishmaniasis in Addis Ababa, Ethiopia. *Parasites Vectors*. 2009, 2: 60. doi: 10.1186/1756-3305-2-60

López-Martín, C., Pérez-Victoria, J.M., Carvalho, L., Castanys, S., & Gamarro, F. (2008). Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4030–4036. <https://doi.org/10.1128/AAC.00964-08>

Maia-Elkhoury, A.N., Magalhães Lima, D., Salomón, O.D., Puppim Buzanovsky, L., Saboyá-Díaz, M.I., Valadas, S.Y.O.B., & Sanchez-Vazquez, M.J. (2021). Interacción entre los determinantes medioambientales y socioeconómicos para el riesgo de leishmaniasis cutánea en América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 45, e49. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2021.49>

Mahboudi, F., et al. (2002). Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Journal of Infectious Diseases*, 34(756). DOI: 10.1080/0036554021000026930.

Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A.F., Newman, S., Ramanan, P., & Suarez, J.A. (2021). A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. *Current Tropical Medical Report* 8(2):121-132. doi: 10.1007/s40475-021-00232-7.

Marceau, F., Bawolak, M.T., Lodge, R., Bouthillier, J., Gagné-Henley, A., Gaudreault, R.C., & Morissette, G. (2012). Cation trapping by cellular acidic compartments: Beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.004>

Mariotti, E., Allegrini, P., Castaldi, G., Minoja, F., & Bianchetti Bracco, M. (2005). A process for the preparation of Imiquimod and intermediates thereof. *European Patent Application*, EP 1529781 A1.

Miranda-Verastegui, C., Tulliano, G., Gyorkos, T.W., Calderon, W., Rahme, E., Ward, B., Cruz, M., Llanos-Cuentas, A., Matlashewski, G. (2009). First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. *PLoS Neglected Tropical Disease* 3, e491. doi: 10.1371/journal.pntd.0000491.

Moafi, M., Rezvan, H., Sherkat, R., & Taleban, R. (2019). Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *International Journal of Preventive Medicine*, 10, 95. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18.

Monteiro, C.E.O., Mafra, J.C.M., Boechat, N., & da Silva, E.R. (2025) Design, Synthesis, and Biological Evaluation of N-Acylhydrazones and Their Activity Against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. *Microorganisms* 13(7), 1563. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071563>

Moradin, N., & Descoteaux, A. (2012). *Leishmania* promastigotes: Building a safe niche within macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 121. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00121>

Mowbray, C.E., Braillard, S., Glossop, P.A., Whitlock, G.A., Jacobs, R.T., Speake, J., Pandi, B., Nare, B., Maes, L., Yardley, V., Freund, Y., Wall, R.J., Carvalho, S., Bello, D., Van den Kerkhof, M., Caljon, G., Gilbert, I.H., Corpas-Lopez, V., Lukac, I., Wyllie, S. (2021). DNDI-6148: A novel benzoxaborole preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(20), 15021–15035. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01304>

Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). *Advances in leishmaniasis*. *The Lancet*, 366(9496), 1561–1577. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)

O'Neill, P.M., Mukhtar, A., Stocks, P.A., Randle, L.E., Hindley, S., Ward, S.A., & Park, B. K. (2003). Isoquine and related amodiaquine analogues: a new generation of improved 4-aminoquinoline antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4933–4945. <https://doi.org/10.1021/jm030796n>

O'Neill, P.M., Park, B.K., Shone, A.E., Maggs, J.L., Roberts, P., Stocks, P.A., Ward, S.A. (2009). Candidate selection and preclinical evaluation of N-tert-butyl isoquine (GSK369796), an affordable and effective 4-aminoquinoline antimalarial for the 21st century. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(5), 1408–1415. <https://doi.org/10.1021/jm8012618>

Organización Mundial de la Salud. (2023, 12 de enero). Leishmaniasis. Accedido el 17 de abril de 2025, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores. Accedido 11 de abril de 2025, de OPS/OMS sitio web: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-desatendidas-tropicales-transmitidas-por-vector-es>

Pan American Health Organization (PAHO). (2020). *Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas*. Number 9, December 2020. Washington, D.C.: PAHO. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>

Pokharel, P., Singh, R., Shrestha, B., & Adhikari, R. (2021). Efficacy and safety of paromomycin for visceral leishmaniasis: A systematic review. *Journal of Tropical Medicine*, 2021, Article ID 8629039. <https://doi.org/10.1155/2021/8629039>

Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., & Cohen, B.E. (1996). Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *Journal of Membrane Biology*, 152(1), 65–75. <https://doi.org/10.1007/s002329900086>

Ramos, L.G., de Souza, K.R., Barbosa, J.M.C., & Carvalho, S.A. Synthesis and activity of benzimidazole N-Acylhydrazones against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2024, 110, 129876. DOI: 10.1016/j.bmcl.2024.129876

Ready, P.D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 147–154. <https://scispace.com/pdf/epidemiology-of-visceral-leishmaniasis-1hxz5re16b.pdf>

Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596. DOI: [10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)

Regli, I. B., Passelli, K., Martínez-Salazar, B., Amore, J., Hurrell, B. P., Müller, A. J., Tacchini-Cottier, F., & Scott, P. (2020). TLR7 sensing by neutrophils is critical for the control of cutaneous leishmaniasis. *Cell Reports*, 31(10), 107746. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107746>

Rocha, V.P.C., Nonato, F. R., Guimarães, E. T., Rodrigues de Freitas, L. A., & Soares, M. B. P. (2013). Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt 7), 1001–1010. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058115-0>

Romero, A.H. (2019). Role of Trifluoromethyl Substitution in Design of Antimalarial Quinolones: a Comprehensive Review. *Topics in Current Chemistry (Cham)*, 377(2), 9. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0234-7>

Romero, A.H. (2025a). Are Basic and Lipophilic Chain Groups Highly Required in Leishmanicidal Quinolines via Phagolysosome Accumulation?. *Frontiers in Chemistry*, 13:1655979 (doi: 10.3389/fchem.2025.1655979).

Romero, A.H., Acosta, M.E., Gamboa, N., Charris, J.E., Salazar, J., & López, S.E. (2015). Synthesis, β -hematin inhibition studies and antimalarial evaluation of dehydroxy isotebuquine derivatives against *Plasmodium berghei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15), 4755–4762. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.040>

Romero, A.H., Aguilera, E., Gotopo, L., Cabrera, G., Dávila, B., & Cerecetto, H. (2023). Optimization of the 2-arylquinazoline-4(3H)one scaffold for a selective and potent antitrypanosomal agent: modulation of the mechanism of action through chemical functionalization. *RSC Medicinal Chemistry* 14, 1992–2006. (DOI: 10.1039/D3MD00243H).

Romero, A.H., & Delgado, F. (2025). 4-Aminoquinoline as a privileged scaffold for the design of leishmanicidal agents: Structure–property relationships and key biological targets. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1527946. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1527946>

Romero, A.H., Rodríguez, N., López, S.E., & Oviedo, H. (2019). Identification of dehydroxy isoquine and isotebuquine as promising antileishmanial agents. *Archiv der Pharmazie*, 352(5), e1800281. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800281>

Romero, A.H., Rodríguez, N., López, S.E., & Oviedo, H. (2019b). Antileishmanial activity, mechanism of action study and molecular docking of 1,4-bis(substituted benzalhydrazino)phthalazines. *Archiv der Pharmazie* 352(6), 1800299 (DOI: 10.1002/ardp.201800299).

Romero, A.H., Medina, R., Alcalá, A.M., García-Marchan, Y., Nuñez-Duran, J., Leañez, J., Mihoba, A., Ciangherotti, C., Serrano-Martín, X., Lopez, S.E. (2017). Design, Synthesis, Structure-Activity relationship and Mechanism Studies of a Series of 4-chloro-1-phthalazinyl hydrazones as potent agent against *Leishmania braziliensis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 127, 606–620. (DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.01.022).

Romero, A.H., Rodriguez, J., García-Marchan, Y., Leañez, J., Serrano-Martín, X., & Lopez, S.E. (2017). Aryl- or heteroaryl-based hydrazinylphthalazine derivatives as new potential antitrypanosomal agents. *Bioorganic Chemistry*, 72, 51–56. (DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.03.008).

Romero, A.H., Lopez, S.E. (2017). In silico molecular docking of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected *T. cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. *Journal Molecular Graphics Modelling*, 76, 313–329. (DOI: 10.1016/j.jmgm.2017.07.013).

Romero, A. H., Gonzalez, K.N., Sabino, M.A. (2025b). Application of Nano and Microformulations to Improve the Leishmanicidal Response of Quinoline Compounds: A Brief Review. *Frontiers in Chemistry* 13:1622566 (DOI: 10.3389/fchem.2025.1622566).

Romero, A.H., Serna, E., Aguilera, E., Dávila, B., Delgado, F., Scalesse, G., Pérez-Díaz, L., Yaluff, G., Rodríguez, N., Cerecetto, H. (2026). *In vitro* and *In vivo* Studies of Dehydroxylated-isoquinines and -Isotebuquinines Against Trypanosomatids: A Preclinical Drug Candidate for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis (bajo revisión).

- Sangshetti, J. N.**, Kalam Khan, F. A., Kulkarni, A. A., Arote, R., & Patil, R. H. (2015). Antileishmanial drug discovery: Comprehensive review of the last 10 years. *RSC Advances*, 5, 32376–32415. <https://doi.org/10.1039/C5RA02669E>
- Satragno, D.**, Faral-Tello, P., Canneva, B., Verger, L., Lozano, A., Vitale, E., Greif, G., Soto, C., Robello, C., Basmadjian, Y. (2017). Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 23(536). DOI: 10.3201/eid2303.160377.
- Scarpini, S.**, Dondi, A., Totaro, C., Biagi, C., Melchionda, F., Zama, D., Pierantoni, L., Gennari, M., Campagna, C., Prete, A., & Lanari, M. (2022). Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms*, 10(10), 2025. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102025>
- Schröder, J.**, Noack, S., Marhöfer, R.J., Mottram, J.C., Coombs, G.H., & Selzer, P.M. (2013). Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *PLOS ONE*, 8(7), e68810. doi: 10.1371/journal.pone.0077460.
- Schwartz, E.** (2008). Leishmaniasis. En: Keystone, J. S., Kozarsky, P.E., Freedman, D.O., Nothdurft, H. D., & Connor, B.A. (Eds.), *The Travel and Tropical Medicine Manual* (4th ed., pp. 532–542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3305-0.50039-9>
- Silva Almeida, F. S.**, Ramos Vanderley, S. E., Comberlang, F. C., Andrade, A. G., Cavalcante-Silva, L. H. A., Silva, E. S. Palmeira, P. H. de S. (2023). Leishmaniasis: Immune cells crosstalk in macrophage polarization. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(5), 276. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050276>
- Socea, L.I.**, Barbuceanu, S.F., Pahontu, E. M., Dumitru, A.C., Nitulescu, G.M., Sfetea, R.C., & Apostol, T.V. (2022). Acylhydrazones and Their Biological Activity: A Review. *Molecules*, 27, 8719. doi: 10.3390/molecules27248719.
- Soto, J.**, Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Díaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J., & Junge, K. (2004). Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266–1272. <https://doi.org/10.1086/383321>
- Sun, H.** (2022). Targeting toll-like receptor 7/8 for immunotherapy: Recent advances. *Biomarker Research*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00436-7>
- Sundar, S.**, Chakravarty, J., & Jha, T. (2007). Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India: A randomized, controlled, open-label trial. *The New England Journal of Medicine*, 356(25), 2571–2581. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066536>

Talukdar, A., Ganguly, D., Roy, S., Das, N., & Sarkar, D. (2021). Structural Evolution and Translational Potential for Agonists and Antagonists of Endosomal Toll-like Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(12), 8010–8041. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00300>

Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B.S, Assolini, J.P., Gonçalves, M.D., Carloto, A.C.M., Miranda-Sapla, M.M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., Pavanelli, W.R. (2018) Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers Immunology* 9:2529. doi: 10.3389/fimmu.2018.02529

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1

Trapp, S., Rosania, G. R., Horobin, R. W., & Kornhuber, J. (2008). Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug design. *European Biophysics Journal*, 37(8), 1317–1328. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0338-4>

Valverde, E. A., Romero, A. H., Acosta, M. E., Gamboa, N., Henriques, G., Rodrigues, J. R., & López, S. E. (2018). Synthesis, β -hematin inhibition studies and antimalarial evaluation of new dehydroxy isoquine derivatives against *Plasmodium berghei*: A promising antimalarial agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.051>

Verma, N. K., Saxena, A. K., & Singh, S. (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 3010–3015. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015>

Vogel, A. I., & Furniss, B. S. (2003). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. <http://182.160.97.198:8080/xmlui/handle/123456789/386>

Volpedo, G., Pacheco-Fernandez, T., Holcomb, E. A., Zhang, W. W., Lypaczewski, P., Cox, B., et al. (March 2022). "Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New World cutaneous leishmaniasis". *npj Vaccines*, 7(1), 32. doi:10.1038/s41541-022-00449-1

WHO. (2022). *Guideline for the treatment of Leishmaniasis in the Americas* (2.^a ed.). Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud.

WHO. (2023). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Accedido 9 marzo.

World Health Organization. (2021). *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>

World Health Organization (WHO). (2023). Leishmaniasis Fact Sheet. Accessed December 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

Zhang, W. W., Karmakar, S., Gannavaram, S., Dey, R., Lypaczewski, P., Ismail, N., et al. (July 2020). "A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing". *Nature Communications*, 11(1), 3461. doi:10.1038/s41467-020-17154-z.

Zulfiqar, B., Jones, A. J., Sykes, M. L., Shelper, T. B., Davis, R. A., & Avery, V. M. (2017). Screening a natural product-based library against kinetoplastid parasites. *Drug Discovery Today*, 22(10), 1516–1523. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>

Zulfiqar, B., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2017). Leishmaniasis drug discovery: Recent progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*, 22(10), 1516–1531. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>

Zuma, N. H., Aucamp, J., Viljoen, M., & N'Da, D. D. (2022). Synthesis, in vitro antileishmanial efficacy and hit/lead identification of nitrofurantoin-triazole hybrids. *ChemMedChem*, 17(10), e202200023. doi: 10.1002/cmdc.202200023

9. APÉNDICE

9.1. Cultivo de parásitos, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 (clon CL Brener) fueron provistos por el Dr. H. Cerecetto (Laboratorio de Química orgánica Medicinal, Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Los parásitos se mantuvieron en medio BHI (*brain-heart infusion*, Oxoid) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Capricorn), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 mg/mL). Los cultivos se incubaron a 28 °C y los epimastigotes se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial. Para la diferenciación y el mantenimiento de los promastigotes también se empleó el medio LIT, compuesto por triptosa (15 g/L), extracto de levadura (5 g/L), extracto de hígado (2 g/L), hemina disuelta en NaOH (0,02 g/L), glucosa (4 g/L), NaCl (9 g/L), KCl (0,4 g/L) y Na₂HPO₄ (7,5 g/L), ajustado a pH 7,4. Dicho medio se suplementó con 10 % de SFB y los cultivos se mantuvieron a 29 °C. Para los tratamientos, las células en crecimiento exponencial se recolectaron, contaron, resuspendieron en medio fresco.

9.2. Evaluación *in vitro* contra epimastigote de *T. cruzi*

El efecto de todos los compuestos del grupo 1 (1-4), grupo 2 (5-22) y del grupo 3 (23-54) sobre la viabilidad de los epimastigotes de *T. cruzi* (Tulahuen, clon CL Brener) se determinó mediante una técnica turbidimétrica. Para ello, se prepararon soluciones madre de los compuestos en DMSO a una concentración de 3000 mM. El cribado se llevó a cabo en placas de 24 pocillos, con un máximo de 1 % de DMSO por pocillo, mantenidas a 25 °C, utilizando cultivos de *T. cruzi* ajustados a una densidad inicial de 3×10⁶ parásitos/mL, determinada por conteo en cámara de Neubauer a partir de una dilución 1/10 en medio de cultivo para facilitar el recuento. Inicialmente, se probó una concentración estándar de 25 µM y para derivados de una inhibición de la proliferación celular por encima del 50% fueron realizados experimentos adicionales exponiendo a los cultivos de parásitos a una serie de concentraciones crecientes (5 concentraciones entre 3.125; 6.25; 12.5 y 25 µM para la mayoría de los casos, algún caso excepcional como compuesto 44 se requirieron nueve concentraciones entre 0.05 y 25 µM). La exposición de los compuestos en el medio de cultivo de parásito fue por 120 h (5 días) continuos. Como controles se incluyeron medio con 1 % de DMSO (control negativo) y

miltefosina como fármaco de referencia (control positivo). El efecto biológico de los compuestos se evaluó mediante mediciones de absorbancia a 595 nm en un Varioskan ThermoFischer al quinto día del ensayo. Los parásitos sin tratar se utilizaron para calcular el porcentaje de inhibición (P.I.).

El P.I. a cada concentración se determinó según la siguiente fórmula: $(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c}) - 100$, donde:

$A_p = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo que contiene el compuesto al día 5

$A_{0p} = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo que contiene el compuesto al día 0

$A_c = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo en la ausencia del compuesto (control) al día 5

$A_{0c} = A_{595}$ es la absorbancia del pocillo en la ausencia del compuesto (control) al día 0

Los cálculos de CE_{50} fueron obtenidos a partir de la construcción de curvas dosis/respuesta (P.I. vs. Concentración de compuesto) hasta obtener las correspondientes curvas con tendencia logarítmica y a partir de un cálculo aplicando aproximación de Boltzmann se determinó el valor de CE_{50} (concentración efectiva del 50 % del crecimiento) mediante procesamiento matemático en el programa Origin 2021 (Origin, 2021) incluyendo sus respectivos valores de DE (desviación estándar).

9.3. Resultado de actividad antiepipimastigote de compuestos 1-54

Tabla A1. Actividad tripanosomicida *in vitro* de compuestos de **grupo I** contra epimastigote de *T. cruzi*

Compuesto	P.I. (%) ^a	CE_{50} (μ M) ^b
1	64.3	28.1 \pm 2.1
2	37.1	
3	55.1	22.3
4	30.2	

^aP.I: porcentaje de inhibición a 25 μ M. ^bConcentración efectiva (CE_{50}) determinada a partir de 5 concentraciones de tratamiento del compuesto probado. Ensayos se realizaron por triplicado. Desviación estándar (DE) se encuentran por debajo del 10% para todos los compuestos probados.

Tabla A2. Actividad tripanosomicida *in vitro* de compuestos del **grupo II** contra epimastigote de *T. cruzi*

Compuesto	P.I. (%)	CE ₅₀ (μM)
5	11.6	8.2
6	52.1	
7	56.5	11.9
8	61.9	15.4
9	28.3	14.6
10		
11		
12	79.9	8.8
13	29.9	
14	28.7	
15	39.7	
16	95.7	14.9
17	37.0	
18	0	
19	35.6	
20	39.2	
21	26.6	
22	34.1	

^aP.I: porcentaje de inhibición a 25 μM. ^bConcentración efectiva (CE₅₀) determinada a partir de 5 concentraciones de tratamiento del compuesto probado. Ensayos se realizaron por triplicado. Desviación estándar (DE) se encuentran por debajo del 10% para todos los compuestos probados.

Tabla A3. Actividad tripanosomicida *in vitro* de compuestos de **grupo III** contra epimastigote de *T. cruzi*.

Compuesto	P.I. (%) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b
23	3.4	
24	15.2	
25	13.5	
26	34.1	
27	28.8	
28	18.2	
29	13.1	
30	31.0	
31	81.8	6.2
32	100	
33	100	
34	100	
35	0	
36	8.9	
37	30.8	
38	14.3	
39	31.4	
40	66.3	
41	44.4	
42	52.1	
43	53.6	
44	77.9	1.3

45	1.3	
46	0	
47	0.1	
48	13.8	
49	1.2	
50	2.0	
51	0	
52	10.0	
53	6.5	
54	4.8	

^aP.I: porcentaje de inhibición a 25 μ M. ^bConcentración efectiva (CE₅₀) determinada a partir de 5 concentraciones de tratamiento del compuesto probado. Ensayos se realizaron por triplicado. Desviación estándar (DE) se encuentran por debajo del 10% para todos los compuestos probados.