UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de chagas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Rosa Fonseca Berzal

Directores

Alicia Gómez Barrio
Vicente Jesús Arán Redó
José Antonio Escario García-Trevijano

Madrid, 2017

© Cristina Rosa Fonseca Berzal, 2016

BÚSQUEDA Y OPTIMIZACIÓN DE POTENCIALES ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

TESIS DOCTORAL

Cristina Rosa Fonseca Berzal

Directores:
Dra. Dña. Alicia Gómez Barrio
Dr. D. Vicente Jesús Arán Redó
Dr. D. José Antonio Escario García-Trevijano

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

BÚSQUEDA Y OPTIMIZACIÓN DE POTENCIALES ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por:

Cristina Rosa Fonseca Berzal

Directores:

Dra. Dña. Alicia Gómez Barrio
Dr. D. Vicente Jesús Arán Redó
Dr. D. José Antonio Escario García-Trevijano

Madrid, 2016

Dña. Alicia Gómez Barrio, Doctora en Farmacia, Profesora Titular y Directora del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, **D. Vicente Jesús Arán Redó**, Doctor en Ciencias (Químicas) e Investigador Científico del Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y **D. José Antonio Escario García-Trevijano**, Doctor en Farmacia y Catedrático de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada **"Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas"** presentada por la licenciada en Farmacia **Dña. Cristina Rosa Fonseca Berzal**, ha sido realizada en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Como directores de la presente Tesis Doctoral y de acuerdo con la normativa vigente, se firma el presente certificado autorizando su defensa.

En Madrid, a 24 de mayo de 2016.

Dra. Alicia Gómez Barrio	Dr. Vicente J. Arán	Dr. José A. Escario
Fdo.:	Fdo.:	Fdo.:

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de las siguientes ayudas:

- Ayuda de la Fundación Rafael Folch.
- Beca-Contrato Predoctoral del Programa PICATA del Campus de Excelencia Internacional Campus Moncloa (UCM-UPM y CSIC).
- Ayuda de Movilidad Internacional del CEI Campus Moncloa dentro de la Convocatoria de ayudas para estancias breves en España y en el extranjero para los beneficiarios del Programa PICATA, concedida para la realización de la estancia predoctoral en el laboratorio dirigido por la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro (Laboratorio de Biología Celular/Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) durante los meses de agosto – noviembre de 2014.

además, ha contado con financiación por parte de los siguientes Proyectos:

- *"Desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos para enfermedades olvidadas y cáncer: síntesis, estudio biológico y optimización de compuestos cabezas de serie"*. Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2009-10399 (subprograma MED).
- *"Selección racional, obtención y evaluación de nuevos compuestos tricomonicidas y antimaláricos".* AECID: Ayudas para Programas de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (A/030156/10).
- *"Acción integral para el desarrollo virtual y experimental de moléculas con actividad antiparasitaria: resistencia, diseño, modificación estructural y corroboración experimental".* AECID: Ayudas para Programas de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (AP/036539/11).
- *"Fortalecimiento institucional en la investigación de nuevos agentes antiparasitarios contra enfermedades parasitarias olvidadas y de alto impacto social".* UCM: IX Convocatoria de Cooperación al Desarrollo de la Universidad Complutense de Madrid (2012).
- Grupo de Investigación UCM-CEI Moncloa, Clúster de Medicina Innovadora: *"Terapia Antiparasitaria"* (911120).

A mí família,
con todo mí caríño

Agradecimientos

Durante todos estos años, son muchos los momentos en los que inevitablemente se piensa en el día en que la memoria de Tesis Doctoral estará finalmente redactada, a falta sólo de escribir estas últimas líneas que se dejan para el final, no siendo por ello las más fáciles. Hoy ha llegado ese día, en el que echo la vista atrás para recordar el camino recorrido y agradecer a todas aquellas personas que durante este tiempo han estado a mi lado, y que indudablemente, constituyen una parte fundamental de este proyecto.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis por su cercanía, su confianza plena y el apoyo constante que me han brindado durante todos estos años. A mi directora, la ***Dra. Alicia Gómez Barrio****, con quien empecé a trabajar el día en que llegué al Departamento de Parasitología para comenzar con una beca de colaboración que me permitiría dar los primeros pasos en este mundo de la Investigación. Han pasado ya unos cuantos años desde entonces y hoy, me veo alcanzando un sueño que empezó a forjarse en mi último año de Licenciatura en Farmacia. Muchas gracias por confiar en mí desde aquel primer día, por tu enorme paciencia, tus buenos consejos y estar siempre pendiente de todo. A mi director, el* ***Dr. Vicente J. Arán****, por refrescarme algunas de las nociones de química que estudié durante mis años de Licenciatura, pero sobre todo, muchas gracias por derrochar siempre tanta simpatía y por permanecer en todo momento tan cercano a la Facultad. A mi director, el* ***Dr. José Antonio Escario****, por tu entusiasmo y el buen humor del día a día, porque formar parte del Grupo de Investigación que diriges se convirtió en una oportunidad maravillosa, y estaré siempre muy agradecida por pertenecer a este equipo. Gracias, muchas gracias a los tres por todo lo que he aprendido junto a vosotros en esta etapa. Sin duda alguna, he tenido la gran suerte de teneros como "jefes".*

A las ***Dras. Sandra*** *y* ***Yanetsy****, mis dos hermanas científicas. Compañeras en el laboratorio, pero sobre todo grandes amigas. He tenido la enorme fortuna de crecer con vosotras, compartiendo los mejores momentos y también los difíciles, nuestras alegrías, triunfos y tropiezos. Muchas gracias por estar siempre a mi lado todos estos años, porque sin vosotras el camino habría sido más difícil.*

A todos mis compañeros del ***Departamento de Parasitología de la UCM****. A* ***Vega****,* ***Virginia*** *y* ***Bea****, por transmitirme siempre tanta alegría y optimismo. A* ***Juan****, por tu simpatía y tus mensajes de "a tope" desde el laboratorio vecino. Al* ***Dr. Pablo****, por tu sonrisa y tu buen humor. A* ***Laura*** *y* ***Patricia****, que también formáis parte de este grupo tan importante. A* ***Rory****,* ***Berta*** *y* ***Mamen****, con quienes compartí los primeros años en el laboratorio. No me olvido del* ***Dr. Raúl****, y de sus visitas a "Para"; ni tampoco de la* ***Dra. Inés*** *del Isciii, a quien conocí en los cursos de Doctorado. A todos, gracias por vuestra amistad, vuestro apoyo y por compartir tantos y tantos momentos inolvidables durante estos años.*

*A la **Dra. Mercedes Martínez**, porque tus clases fueron en gran parte responsables de mi pasión por la Parasitología, gracias por tu alegría y tus buenos consejos, y por habernos endulzado los días con "chuches" todos estos años. Al **Dr. Francisco Ponce**, compañero de cafés y rojiblanco, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme ante cualquier problema informático que se cruzase en mi camino. Al resto de profesores y compañeros del **Departamento de Parasitología de la UCM**, que sin duda ha sido mi segunda casa durante todos estos años: **Dres. Francisco Bolás**, **Juan José García**, **Juan José Nogal**, **Catalina Castaño**, **Marta Rodero**, **Carmen Cuéllar**, **Carmen Cuesta**, **Ángel Sánchez-Covisa**, **José Luis Guillén**, **D. Antonio R. Martínez**, **María Isabel Jiménez** y **María Auxiliadora Dea**, con los que he compartido mis días y de los que he aprendido muchas cosas. Gracias a todos por vuestro apoyo, amabilidad y simpatía a lo largo de estos años.*

*A **Javier, Judit, Inés, Piedad y Manoli**, personas fundamentales en el **Departamento de Parasitología de la UCM** y con quienes también he pasado ratos estupendos en el día a día, de risas, celebraciones, comentando alguna película o incluso el partido de fútbol del día anterior. Gracias por vuestra ayuda siempre que la he necesitado y por compartir tantos momentos buenos.*

*A las **Dras. Celeste Vega** y **Miriam Rolón**, por guiarme al inicio de esta etapa en mis primeros pasos del trabajo experimental con Trypanosoma cruzi. Que conste que tampoco me olvido de aquellos alfajores de chocolate y dulce de leche.*

*Al **Dr. Alfredo Meneses**, de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas en Cuba, por enseñarme a trabajar "in silico" y por todo tu apoyo. A **Maricel**, por tu gran ayuda y colaboración. Al **Dr. Yovani Marrero**, por el software empleado en este trabajo para el desarrollo de los modelos QSAR.*

*Al **Dr. Santiago Torrado** y a todo su equipo del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM, por el trabajo conjunto que hemos desarrollado en la búsqueda de nuevas formulaciones de compuestos antichagásicos.*

*Al **Dr. Jorge Pérez**, por ofrecernos siempre la posibilidad de realizar los estudios de microscopía en la Universidad de Alcalá de Henares, por los buenos momentos que pasamos en las visitas a Alcalá y en los Congresos que hemos coincidido durante estos años.*

*A todos los grupos de investigación que con sus moléculas de síntesis han contribuido a que este trabajo fuera posible. Al **Dr. Vladimir V. Kouznetsov** de la Universidad Industrial de Santander en Colombia, al **Dr. Juan A. Páez** del Instituto de Química Médica del CSIC, al **Dr. Oluyomi S. Adeyemi** de la Universidad de Landmark en Nigeria, a la **Dra. Nadine Jagerovic** del Instituto de Química Médica del CSIC y al **Dr. Faustino Mollinedo** del CSIC-Universidad de Salamanca.*

*Al **Laboratório Farmacêutico de Pernambuco** (LAFEPE, Brasil), por facilitarnos el benznidazol utilizado como fármaco de referencia en los ensayos de actividad tripanocida.*

*A minha orientadora no Brasil, a **Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro**, pela maravilhosa experiência que foi fazer o meu estágio no **Laboratório de Biologia Celular (LBC/IOC/Fiocruz)**. Eu não tenho palavras suficientes para lhe agradecer pela grande oportunidade e por tudo o aprendizado. Nunca esquecerei daqueles meses no Rio de Janeiro. Pois é, eu sou meio carioca!. Obrigada, muito obrigada.*

*A **Dra. Cristiane**, pela sua amizade e a paciência que mostrou comigo e com os meus experimentos, pois ninguém caminha sozinho. Ao **Marcos**, pelo grande apoio oferecido a toda hora, do principio ao fim do meu estágio (só faltou o cafe com gelo!). A **Patrícia**, pelo tempo que dedicou comigo, a sua enorme paciência e tudo o que aprendi com você. A **Magna**, por me ajudar ainda antes de que eu chegasse no Rio e me ensinar os primeiros passos para me mover pela cidade. A **Dra. Denise**, pela simpatia e por me descobrir aquela trilha até o pé do Pão de Açúcar. Muito obrigada a vocês por toda sua ajuda e ser pessoas fundamentais no meu estágio, dentro e fora do laboratório. A **Mariane**, **Julianna**, **Bia**, **Marianne**, **Aline**, **Manu**, **Thabata** e **Ana**, pelos momentos compartilhados nesses quatro meses, e também a **Kelly**, **Dra. Alice**, **Dr. Gabriel**, **Dr. Rubem** e **Dra. Solange L. de Castro**. Muito obrigada a todo o **LBC** e por favor, me desculpem se esqueci de alguém. Certamente, todos vocês fizeram me sentir em casa ficando tão longe da minha casa. Saudades!!.*

*No puedo dejar de recordar a mis compañeros de **Farmacia**, con los que pasé cinco años de mi vida y quienes vieron despertar en mí las ganas de estudiar Parasitología. A mis amigos **Raquel**, **Rocío**, **Gonzalo** y **Agus**, por estar siempre pendientes preguntándome sobre la Tesis, aunque a día de hoy cada uno nos dediquemos a cosas distintas. Y a mi amiga la **Dra. María** (Illa!!), por sacar siempre un hueco en tus visitas exprés a Madrid y por las conversaciones Rio-Rotterdam que tuvimos durante nuestras respectivas estancias. Gracias farmacéuticos por seguir manteniendo esta gran amistad con el paso de los años.*

*A todos mis amigos del **cole**, quienes sin estar muy familiarizados con el tema de la Tesis habéis estado siempre ahí, apoyándome y pendientes en cada momento. A **Laura** (Dra.!!), **María** y **Tamara** por el tesoro de vuestra amistad y estar siempre a mi lado desde hace más de veinte años (qué mayores nos hacemos…). A **Alejandro**, quien con el paso de los años sigues demostrándome tu gran amistad und mit wem kann ich Deutsch oder Portugiesisch auch sprechen!!. A todos los del "deuxe", quienes durante estos años me habéis preguntado por los protozoos: **Laura**, **Juan**, **Elvira**, **Jose** (eres el próximo!), **Álvaro**, **Ángel**, **Celia**, **Álex**, **Quique**, **Paula**, **Belén**, **Diego**, **Eva**, **Pedro** y **Miguel**, gracias por tantos años de amistad y por seguir regalándome recuerdos imborrables… y los que nos quedan todavía!.*

*A mis amigos de **Guada**, donde he pasado cada verano de mi vida (salvo estos dos últimos años) y de los que guardo recuerdos maravillosos, en gran parte por haber compartido año tras año con todos vosotros: **Caye**, **Pi**, **Fer**, **Bárbara**, **Yune**, **María**, **Coke**, **Raquel**, **Laura**, **Ana** y **Marina**.*

*Por supuesto, todo este trabajo no habría sido posible sin todo el amor y el apoyo incondicional de mi **familia**. Muchas gracias **papá**, por estar siempre a mi lado y haberme animado desde el primer momento a cumplir mi sueño de ser Doctora y de querer dedicarme a la Investigación. A mis hermanos **Silvia** y **Carlos** (muchas gracias por poner tu granito de arena regalándome una portada tan chula) y mis cuñados **Fravi** y **Celia**, por vuestro enorme cariño, porque sé que siempre puedo contar con vosotros y por darme cuatro sobrinos maravillosos que son lo más bonito del mundo: **Mara**, **Elena**, **Violeta** y **Carlitos**, gracias mis peques por ser personitas enormes. A **mi abuela**, porque eres todo un ejemplo de mujer fuerte, cargando con más de un siglo a tus espaldas. Y a ti **mamá**, que eres mi ángel y mi estrella, el motor que me da la fuerza para seguir adelante luchando por alcanzar mis metas. Espero que, allí donde estés, puedas sentirte orgullosa de tu niña pequeña.*

GRACIAS, MUCHAS GRACIAS A TODOS DE CORAZÓN

Abreviaturas

%AA	Porcentaje de actividad en amastigotes intracelulares
%AE	Porcentaje de actividad en epimastigotes
%AUPC	Porcentaje de reducción del área bajo la curva de parasitemia
%C	Porcentaje de citotoxicidad inespecífica
%IE	Porcentaje de inhibición del índice endocítico
%S	Porcentaje de supervivencia
6PGDH	6-Fosfogluconato deshidrogenasa
A	Promedio
ACP	Análisis de componentes principales
ADL	Análisis discriminante lineal
ADME	Absorción, distribución, metabolismo, excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
ALP	Alquil-lisofosfolípidos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BD	Base de datos
BZ	Benznidazol
C	Coeficiente de correlación de Matthews
C	Carga
CAT	Catalasa
CBDC	*Consenso Brasileiro em Doença de Chagas*
CC	Células cardíacas
CECAL	*Centro de Criação de Animais de Laboratório*
CI_{50}	Concentración inhibitoria 50
CI_{90}	Concentración inhibitoria 90
CL_{50}	Concentración inhibitoria del crecimiento celular al 50%
CL-B5 *lacZ*	*T. cruzi* cepa CL Brener clon B5 transfectada con el gen de la β-galactosidasa de *Escherichia coli*
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CoMFA	*Comparative molecular field analysis*
CoML	Lisis mediada por el complemento
CoMSIA	*Comparative molecular similarity indices analysis*
CP	Componente principal
CPRG	Rojo de clorofenol β-D-galactopiranósido
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c.s.p.	Cantidad suficiente para
CV	Cribado virtual
CYP51	C14α-desmetilasa
DA	Dosis acumulativa
DAp	Dominio de aplicación
DASDE	*Diversity Analysis, Selection and Discovery of best Ensemble from bases models*
dhAsc	Ácido dehidroascórbico
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DM	Descriptor molecular
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DNDi	*Drug for Neglected Diseases iniciative*
d.p.i.	Día post-infección
dS	Doble estocástico
DS	Dispersión sólida

DTU	*Discrete typing unit*
E	Especificidad
E	Electronegatividad
ECG	Electrocardiograma
ELISA	*Enzime linked immunosorbent assay*
Fig.	Figura
Fiocruz	Fundación Oswaldo Cruz
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
FPPS	Farnesil pirofosfato sintasa
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GluR	Glutatión reductasa
GPI	Glucofosfatidil inositol
GSH	Glutatión
H	Dureza
HAI	Hemaglutinación indirecta
HCA	*High-content analysis*
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
HK	Hexoquinasa
HPC	Hidroxipropilcelulosa
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HTS	*High throughput screening*
IBE	Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol
IE	Índice endocítico
IL	Índice lineal
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
IS	Índice de selectividad
i.v.	Intravenoso
LAFEPE	*Laboratório Farmacêutico de Pernambuco*
LBC/IOC	Laboratorio de Biología Celular/Instituto Oswaldo Cruz
LIT	*Liver Infusion Tryptose*
LogP	Coeficiente de reparto octanol/agua
M	Mediana
MA	Masa atómica
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEM	*Minimal Essential Medium*
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MF	Mezcla física
MTD	*Máximum tolerated dose*
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N	Mínimo
NaDC	Desoxicolato de sodio
NAD(P)$^+$/NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
NO	Óxido nítrico
NOAEL	*No observed adverse effect level*
NS	No estocástico
NTR	Nitro-reductasas
NTR-I	Nitro-reductasas de tipo I
NTR-II	Nitro-reductasas de tipo II
NX	Nifurtimox
OECD	*Organization for Economic Cooperation and Development*
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P	Polarizabilidad
PBS	*Phosphate-buffer saline*
PCD	Muerte celular programada

PCR	*Polimerase chain reaction*
PEG	Polietilenglicol
p.i.	Post-infección
PI3k	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
PM	Probabilidad mutua
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
p.o.	*Per os* (por vía oral)
POS	Posaconazol
PPi	Pirofosfato inorgánico
PR_{BZ}	Potencia relativa a benznidazol
PR_{NX}	Potencia relativa a nifurtimox
Prec	Precisión
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
PSA	Área de superficie polar
PVP	Polivinilpirrolidona
Q	Exactitud total
QSAR	*Quantitative structure-activity relationship*
R	Refractividad
RD	Real Decreto
RFA	Razón de falsa alarma
R-NHOH	Derivado hidroxilamina
R-NO	Derivado nitroso
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR	PCR en tiempo real
S	Sensibilidad
S	Blandura
SAR	*Structure-activity relationship*
SBF	Suero bovino fetal
SD	Desviación estándar
SE	Serie de entrenamiento
SEM	Error medio estándar
SMC	Sistema multiclasificador
SMILE	*Simplified molecular-input line-entry system*
SOD	Superóxido dismutasa
SP	Serie de predicción
SS	Estocástico
TDC	Tripomastigotes derivados de cultivo celular
TLR	*Toll-like receptors*
TMRE	Tetrametilrodamina etil éster
TOMOCOMD-CARDD	*TOpological MOlecular COMputer Design – Computer Aided "Rational" Drug Design*
TryR	Tripanotión reductasa
TryS	Tripanotión sintetasa
TS	Tripomastigote sanguíneo
$T(SH)_2$	Tripanotión
Tulahuen *lacZ*	*T. cruzi* cepa Tulahuen clon C4 transfectada con el gen de la β-galactosidasa de *Escherichia coli*
TXN	Triparredoxina
UCM	Universidad Complutense de Madrid
V	Voto mayoritario
VdW	Volumen de van der Waals
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo
WHO	World Health Organization
X	Máximo

Índice

SUMMARY **3**
RESUMEN **7**
RESUMO **11**

1. INTRODUCCIÓN **17**

1.1. Aspectos históricos 17
1.2. El parásito: *Trypanosoma cruzi* 20
1.2.1. Taxonomía 20
1.2.2. Nomenclatura subespecífica: DTU (*discrete typing units*) 22
1.2.3. Morfología 25
1.2.3.1. Tipos morfológicos 25
1.2.3.2. Características estructurales 27
1.3. El vector 28
1.4. Ciclo biológico 29
1.4.1. Desarrollo del ciclo en el hospedador vertebrado 31
1.4.1.1. Adhesión a la célula hospedadora 31
1.4.1.2. Reconocimiento 31
1.4.1.3. Invasión de la célula hospedadora 34
1.4.1.4. Ruptura de la vacuola parasitófora 35
1.4.1.5. Multiplicación de las formas amastigote, diferenciación a tripomastigotes y liberación al medio extracelular 36
1.4.2. Desarrollo del ciclo en el hospedador invertebrado 36
1.5. Epidemiología y control 37
1.5.1. Distribución geográfica 37
1.5.1.1. Área endémica 37
1.5.1.2. Área no endémica 39
1.5.2. Transmisión 39
1.5.2.1. Transmisión vectorial 39
1.5.2.2. Transmisión no vectorial 40
1.5.2.3. Vías de transmisión excepcionales o hipotéticas 42
1.6. Fases, manifestaciones clínicas y patogénesis 43
1.6.1. Fase aguda 43
1.6.2. Fase indeterminada 45
1.6.3. Fase crónica 45
1.6.3.1. Forma digestiva 46
1.6.3.2. Forma cardíaca 47
1.6.3.3. Forma cardíaco-digestiva 48
1.6.4. Reactivación 48
1.7. Diagnóstico 48
1.7.1. Diagnóstico parasitológico 49
1.7.2. Diagnóstico serológico 49
1.7.3. Diagnóstico molecular 50
1.7.4. Exámenes diagnósticos específicos 50
1.8. Tratamiento etiológico 51
1.8.1. Fármacos disponibles 53
1.8.1.1. Nifurtimox 54
1.8.1.2. Benznidazol 58
1.9. Alternativas terapéuticas en investigación 61
1.9.1. Principales dianas terapéuticas y candidatos al tratamiento 62
1.9.1.1. Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol 62

1.9.1.2. Inhibidores del metabolismo de fosfolípidos 67
1.9.1.3. Inhibidores de la cisteín proteasa cruzipaína 68
1.9.1.4. Inhibidores del metabolismo del pirofosfato 69
1.9.1.5. Inhibidores de la síntesis y metabolismo redox del tripanotión 70
1.9.1.6. Inhibidores de la glucólisis 73
1.9.1.7. Inhibidores de la ruta de las pentosas fosfato 74
1.9.1.8. Inhibidores de la vía de salvamento de purinas 74
1.9.1.9. Inhibidores de la síntesis de nucleótidos 76
1.9.2. Candidatos identificados mediante *drug-repurposing* 77
1.9.2.1. Fexinidazol 77
1.9.2.2. Oxaboroles 78
1.9.3. Desarrollo de nuevas formulaciones de los fármacos de referencia como recurso para mejorar la eficacia del tratamiento 79
1.9.3.1. Mejora del perfil de solubilidad 80
1.9.3.2. Mejora de la permeabilidad 83
1.10. Métodos de cribado farmacológico 85
1.10.1. Métodos *in vitro* 85
1.10.1.1. Ensayos de actividad en epimastigotes 86
1.10.1.2. Ensayos de actividad en tripomastigotes 87
1.10.1.3. Ensayos de actividad en amastigotes 88
1.10.1.4. Pruebas de citotoxicidad inespecífica 90
1.10.2. Métodos *in vivo* 92
1.10.2.1. Toxicidad aguda 93
1.10.2.2. Modelo murino de infección aguda 93
1.10.2.3. Modelo murino de infección crónica 94
1.10.2.4. Modelos no murinos 96
1.10.3. Métodos *in silico* 97
1.10.3.1. Métodos basados en la diana 97
1.10.3.2. Métodos basados en el ligando 98

2. MATERIALES Y MÉTODOS 103

2.1. Cribado farmacológico de moléculas de síntesis 103
2.1.1. Material biológico 103
2.1.1.1. El parásito: *Trypanosoma cruzi* 103
2.1.1.2. Líneas celulares 104
2.1.1.3. Cultivos primarios de células cardíacas 105
2.1.1.4. Hospedador experimental: *Mus musculus* 105
2.1.2. Medios de cultivo 106
2.1.2.1. Medio empleado para el mantenimiento de *T. cruzi* 106
2.1.2.2. Medios empleados para el mantenimiento de cultivos celulares 106
2.1.3. Soluciones, colorantes y reactivos 107
2.1.3.1. Soluciones 107
2.1.3.2. Colorantes 110
2.1.3.3. Reactivos 111
2.1.4. Reactivos empleados en microscopia electrónica 112
2.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido 112
2.1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión 113
2.1.5. Reactivos empleados en respirometría 114
2.1.6. Reactivos empleados en citometría de flujo 114
2.1.7. Series químicas de síntesis 115
2.1.7.1. Derivados de 5-nitroindazol. Serie I 115
2.1.7.2. Derivados de 5-nitroindazol. Serie II 116
2.1.7.3. Derivados de 5-nitroindazol. Serie III 117
2.1.7.4. Derivados de 5-nitroindazol. Serie IV 118
2.1.7.5. Derivados de 2,4-diaril-1,2,3,4-tetrahidroquinolina 119

2.1.7.6. Derivados de 7-cloro-4-amino(oxi)quinolina 120
2.1.7.7. 2,2-dióxidos de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina 121
2.1.7.8. Quelantes heterocíclicos 121
2.1.7.9. Cromenoazoldionas 122
2.1.7.10. Edelfosina 123
2.1.7.11. Fármacos de referencia 123
2.1.8. Métodos 124
2.1.8.1. Criopreservación y descongelación de células y parásitos 124
2.1.8.2. Mantenimiento de cultivos celulares 124
2.1.8.3. Obtención y mantenimiento de cultivos primarios de células cardíacas 124
2.1.8.4. Reproducción *in vitro* del ciclo biológico de *T. cruzi* 125
2.1.8.5. Infección experimental y obtención de tripomastigotes sanguíneos 128
2.1.8.6. Ensayos de actividad farmacológica *in vitro* 129
2.1.8.7. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro* 133
2.1.8.8. Ensayos de toxicidad *in vivo*. Determinación del NOAEL 136
2.1.8.9. Ensayos de actividad farmacológica *in vivo* 137
2.1.8.10. Microscopía electrónica de barrido. Estudio de las alteraciones morfológicas ocasionadas en el parásito 138
2.1.8.11. Microscopía electrónica de transmisión. Estudio de los daños ultraestructurales ocasionados en el parásito 139
2.1.8.12. Respirometría 141
2.1.8.13. Citometría de flujo 141
2.1.8.14. Análisis estadístico 142
2.2. Formulaciones de compuestos antichagásicos 143
2.2.1. Material biológico 143
2.2.2. Formulaciones evaluadas 144
2.2.2.1. Dispersiones sólidas de benznidazol 144
2.2.2.2. Dispersiones sólidas de derivados de 5-nitroindazol 146
2.2.3. Evaluación biológica 147
2.2.3.1. Ensayos de actividad farmacológica *in vitro* 147
2.2.3.2. Ensayos de actividad farmacológica *in vivo* 148
2.2.4. Análisis estadístico 149
2.3. Modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida 149
2.3.1. Construcción de la base de datos 149
2.3.1.1. Diseño de las series de entrenamiento y predicción 150
2.3.2. Desarrollo de los modelos QSAR de predicción de actividad 150
2.3.2.1. Cálculo de los descriptores moleculares 150
2.3.2.2. Análisis discriminante lineal 151
2.3.2.3. Validación de los modelos 152
2.3.3. Sistema multiclasificador de modelos QSAR 153
2.3.3.1. Evaluación de la diversidad 154
2.3.3.2. Ensamble 154
2.3.4. Cribado virtual de las series de síntesis 155
2.3.5. Exploración del dominio de aplicación 155
2.3.5.1. Dominio de aplicación 155
2.3.5.2. Análisis de conglomerados 156
2.3.5.3. Análisis de componentes principales 156

3. RESULTADOS 159
3.1. Cribado farmacológico de moléculas de síntesis 159
3.1.1. Evaluación biológica sobre *T. cruzi* de derivados de 5-nitroindazol, serie I 159
3.1.1.1. Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ* 159
3.1.1.2. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 160
3.1.1.3. Microscopía electrónica de barrido 162

3.1.1.4. Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares 164
3.1.1.5. Actividad *in vivo* 166
3.1.1.6. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro* 168
3.1.1.7. Microscopía electrónica de transmisión 170
3.1.1.8. Respirometría 172
3.1.1.9. Citometría de flujo 173
3.1.2. Evaluación biológica sobre *T. cruzi* de derivados de 5-nitroindazol, serie II 174
3.1.2.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 174
3.1.2.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares 176
3.1.3. Evaluación biológica sobre *T. cruzi* de derivados de 5-nitroindazol, serie III 176
3.1.3.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y amastigotes intracelulares. Pruebas de citotoxicidad inespecífica 177
3.1.3.2. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro* 181
3.1.3.3. Ensayos de toxicidad aguda *in vivo* 183
3.1.3.4. Actividad *in vivo* 186
3.1.4. Evaluación biológica sobre *T. cruzi* de derivados de 5-nitroindazol, serie IV 190
3.1.4.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 190
3.1.4.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares 190
3.1.4.3. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro* 193
3.1.4.4. Ensayos de toxicidad aguda *in vivo* 195
3.1.4.5. Actividad *in vivo* 200
3.1.4.6. Citometría de flujo 212
3.1.5. Evaluación de la potencial actividad tripanocida de dos series de 2,4-diaril-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas de síntesis 213
3.1.5.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 213
3.1.5.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares 215
3.1.6. Actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* de dos series de síntesis derivadas de 7-cloro-4-amino(oxi)quinolina 216
3.1.6.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 216
3.1.6.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares 217
3.1.7. Actividad tripanocida *in vitro* de una serie de derivados de 2,2-dióxido de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina 218
3.1.7.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 218
3.1.8. Evaluación de la actividad tripanocida *in vitro* de una serie de quelantes heterocíclicos 220
3.1.8.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 220
3.1.9. Evaluación de la potencial actividad tripanocida de una serie de cromenoazoldionas de síntesis 223
3.1.9.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 223
3.1.10. Evaluación de la actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* del alquil-lisofosfolípido edelfosina 226
3.1.10.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica 226
3.1.10.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares 227
3.2. Formulaciones de compuestos antichagásicos 228
3.2.1. Evaluación de dispersiones sólidas de benznidazol sobre *T. cruzi* 228
3.2.1.1. Ensayo de velocidad de disolución *in vitro* 228
3.2.1.2. Actividad frente a epimastigotes 230
3.2.1.3. Citotoxicidad inespecífica 231
3.2.1.4. Actividad frente a amastigotes intracelulares 231
3.2.1.5. Actividad *in vivo* 232
3.2.2. Evaluación de dispersiones sólidas de derivados de 5-nitroindazol sobre *T. cruzi* 234
3.2.2.1. Dispersiones sólidas del derivado de 5-nitroindazol VATR1: 2-bencil-1-propil-5-nitroindazolinona 234
3.2.2.2. Dispersiones sólidas del derivado de 5-nitroindazol VATR3: 2-bencil-1-butil-5-nitroindazolinona 237

3.3. Modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida 240
3.3.1. Obtención de los modelos QSAR/ADL de predicción 240
3.3.1.1. Diseño de las series de entrenamiento y predicción 240
3.3.1.2. Obtención de los modelos QSAR/ADL 241
3.3.1.3. Validación de los modelos de predicción 241
3.3.1.4. Evaluación de la diversidad de los modelos de predicción 244
3.3.2. Construcción del sistema multiclasificador 245
3.3.2.1. Sistema muticlasificador 1 245
3.3.2.2. Sistemas multiclasificadores 2 y 3 258
3.3.3. Exploración del dominio de aplicación 269
3.3.3.1. Dominio de aplicación 270
3.3.3.2. Análisis de conglomerados 270
3.3.3.3. Análisis de componentes principales 271

4. DISCUSIÓN 275
4.1. Cribado farmacológico de moléculas de síntesis 275
4.1.1. Actividad frente a *T. cruzi* de la serie I de derivados de 5-nitroindazol 275
4.1.2. Actividad frente a *T. cruzi* de la serie II de derivados de 5-nitroindazol 287
4.1.3. Actividad frente a *T. cruzi* de la serie III de derivados de 5-nitroindazol 289
4.1.4. Actividad frente a *T. cruzi* de la serie IV de derivados de 5-nitroindazol 292
4.1.5. Actividad tripanocida de dos series de 2,4-diaril-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas de síntesis 297
4.1.6. Actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* de dos series de síntesis derivadas de 7-cloro-4-amino(oxi)quinolina 299
4.1.7. Actividad tripanocida *in vitro* de una serie de derivados de 2,2-dióxido de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina 302
4.1.8. Actividad tripanocida *in vitro* de una serie de quelantes heterocíclicos 304
4.1.9. Actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* de una serie de cromenoazoldionas de síntesis 307
4.1.10. Actividad tripanocida *in vitro* del alquil-lisofosfolípido edelfosina 309
4.2. Formulaciones de compuestos antichagásicos 312
4.2.1. Evaluación de dispersiones sólidas de benznidazol sobre *T. cruzi* 312
4.2.2. Evaluación de dispersiones sólidas de derivados de 5-nitroindazol sobre *T. cruzi* 317
4.3. Modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida 320
4.3.1. Construcción de la base de datos 320
4.3.2. Desarrollo de modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida 321
4.3.3. Construcción del sistema multiclasificador 324
4.3.4. Cribado virtual de las series de síntesis 326
4.3.5. Exploración del dominio de aplicación 327

5. CONCLUSIONS 333
CONCLUSIONES 335

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 339

ANEXOS 365
Anexo 1. Publicaciones 365

ANEXOS SUPLEMENTARIOS ..... CD
Anexo suplementario 1. SMILES de los compuestos que constituyen la base de datos
Anexo suplementario 2. Clasificación de los compuestos de la base de datos por los modelos QSAR/ADL

Índice de figuras

Fig. 1. Izquierda: Carlos Chagas en su laboratorio del Instituto de Manguinhos en Rio de Janeiro. Fuente: Biblioteca virtual Carlos Chagas (www.bvschagas.coc.fiocruz.br). Derecha: Retrato de Oswaldo Cruz en 1903. Fuente: www.portalfiocruz.br 18

Fig. 2. Clasificación de los tripanosomas de mamíferos. Fuente: esquema adaptado del propuesto en *Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del Comité de Expertos de la OMS* (OMS, 2002) 21

Fig. 3. Distribución geográfica aproximada de los DTU de *T. cruzi* (TcI–TcVI) en sus ciclos de transmisión selvático y doméstico. Fuente: Zingales *et al*. (2012) 25

Fig. 4. Morfología y organización ultraestructural de *T. cruzi*: epimastigote (A), tripomastigote (B) y amastigote (C). Fuente: Atlas Didático – O Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi* (PUB_527_1.0, disponible en www.open.edu/openlearnworks/) 26

Fig. 5. Triatominos de la familia Reduviidae, potenciales vectores de la enfermedad de Chagas. De izquierda a derecha: *T. sordida, T. infestans, T. pseudomaculata, P. megistus, T. brasiliensis, T. dimidiata y R. prolixus.* Fuente: Bellini *et al*. (2012) 29

Fig. 6. Ciclo biológico de *T. cruzi*. Fuente: www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html 30

Fig. 7. Principales moléculas de superficie involucradas en el proceso de interacción de los tripomastigotes de *T. cruzi* con la célula hospedadora. Fuente: de Souza *et al*. (2010) 33

Fig. 8. Mecanismos de invasión celular por *T. cruzi.* De izquierda a derecha: dependiente de lisosomas, dependiente de actina e independiente de lisosomas. Fuente: de Souza *et al*. (2010) 34

Fig. 9. Distribución de los casos de enfermedad de Chagas reportados a la OMS a nivel mundial, 2010–2013. Fuente: *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases* (WHO, 2015) 38

Fig. 10. Progresión de la enfermedad de Chagas. Fuente: adaptación del esquema propuesto en Chatelain (2015) 44

Fig. 11. Comparación de los conceptos defendidos por la hipótesis de la autoinmunidad ("antiguo paradigma") y la de la persistencia del parásito ("nuevo paradigma") en el desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica. Fuente: creado a partir del esquema propuesto en Viotti *et al*. (2009) 52

Fig. 12. Estructura química del fármaco de referencia nifurtimox 55

Fig. 13. Mecanismo de acción del nifurtimox. NTR-I: nitro-reductasa de tipo I. NTR-II: nitro-reductasa de tipo II. Fuente: esquema creado a partir de los propuestos por Wilkinson y Kelly (2009) y Hall *et al.* (2011) 57

Fig. 14. Estructura química del fármaco de referencia benznidazol 58

Fig. 15. Mecanismo de acción del benznidazol. NTR-I: nitro-reductasa de tipo I. Fuente: creado a partir del esquema propuesto por Wilkinson *et al*. (2011) 60

Fig. 16. Biosíntesis del ergosterol y colesterol mostrando los pasos principales, enzimas involucradas e inhibidores. En rojo: diversos compuestos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) con actividad frente a *T. cruzi*. Fuente: esquema adaptado de de Souza y Rodrigues (2009) 62

Fig. 17. La biosíntesis del $T(SH)_2$ ocurre en dos pasos consecutivos mediante la incorporación de dos moléculas de GSH a una de espermidina. El proceso consume dos moléculas de ATP y es catalizado por la enzima tripanotión sintetasa (TryS). Fuente: esquema adaptado de Irigoín *et al*. (2008) 70

Fig. 18. Reacciones dependientes del $T(SH)_2$. TryR: tripanotión reductasa, TXN: triparredoxina, Asc: ascorbato, GSH: glutatión, RR: ribonucleótido reductasa, ROOH: hidroperóxidos, A: oxidante, TXNPx: triparredoxina peroxidasa, GPx-I y GPx-II: glutatión peroxidasa-*like* triparredoxina peroxidasas I y II, APx: peroxidasa dependiente de ascorbato. Fuente: esquema adaptado de Irigoín *et al*. (2008) 71

Fig. 19. Reacción catalizada por la DHFR. Fuente: esquema adaptado de Gilbert (2002) 76

Fig. 20. Reacción colorimétrica experimentada por el sustrato CPRG en presencia de parásitos pertenecientes a las cepas CL-B5 *lacZ* y Tulahuen C4 *lacZ* 104

Fig. 21. Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie I 115

Fig. 22. Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie II 116
Fig. 23. Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie III y compuestos relacionados 117
Fig. 24. Estructuras químicas de los compuestos de la serie **AR** (Fonseca-Berzal *et al*., 2013) 119
Fig. 25. Estructuras químicas de los compuestos de la serie **DM** (Fonseca-Berzal *et al*., 2013) 119
Fig. 26. Estructuras químicas de los compuestos con estructura de 4-bencilamino-7-cloroquinolina (**1**–**4**) y conjugados de 7-cloroquinolina–1,3-tiazolidin-4-ona (**5**–**16**) pertenecientes al denominado **Grupo 1** (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a) 120
Fig. 27. Estructuras químicas de los compuestos con estructura de 4-ariloxi-7-cloroquinolina pertenecientes al denominado **Grupo 2** (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a) 120
Fig. 28. Estructuras químicas de los compuestos pertenecientes a la serie **DIT** 121
Fig. 29. Estructuras químicas de los quelantes heterocíclicos evaluados 122
Fig. 30. Estructuras químicas de las quinonas pertenecientes a la serie **PM** 123
Fig. 31. Estructura química de la edelfosina 123
Fig. 32. Tinciones Giemsa de epimastigotes (A), tripomastigotes derivados de cultivo celular (B), amastigotes intracelulares en cultivos de células L929 (C) y tripomastigotes sanguíneos (D) (100×) 128
Fig. 33. Representación esquemática del modelo de cribado farmacológico secuencial de rutina 129
Fig. 34. Reacción de reducción experimentada por el sustrato resazurina en presencia de células metabólicamente activas 131
Fig. 35. Cribado farmacológico *in vitro* de rutina: pruebas de actividad en epimastigotes CL-B5 *lacZ* en presencia de CPRG (A), citotoxicidad inespecífica en células L929 en presencia de resazurina (B) y pruebas de actividad en amastigotes intracelulares CL-B5 *lacZ* en presencia de CPRG (C) 133
Fig. 36. Estructura del NaDC (izquierda) y de la L-HPC (LH-31, contenido en grupos hidroxipropoxi: 11%, derecha), utilizados como excipiente en las distintas formulaciones de BZ 144
Fig. 37. Esquema del aparato empleado en el ensayo de disolución (USP aparato 2): vaso (A), paleta (B), punto de muestreo (C) y medio de disolución (D) 145
Fig. 38. Derivados de 5-nitroindazol seleccionados para el desarrollo de nuevas DS en L-HPC: 2-bencil-1-propil- (**VATR1**) y 2-bencil-1-butil-5-nitroindazolin-3-ona (**VATR3**) 146
Fig. 39. Protocolo para la obtención del SMC a partir de los clasificadores individuales (modelos). Fuente: esquema adaptado del propuesto en Martins Alho *et al.* (2014) 155
Fig. 40. Curva de crecimiento de epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ.* Cada punto indica la media ± desviación estándar (SD) de los recuentos realizados en tres subcultivos independientes (n = 3) 159
Fig. 41. Curvas dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AE) obtenidas para los derivados **VATR1** (A), **VATR2** (B) y **VATR3** (C). Cada punto de la curva representa la media de al menos dos experimentos independientes. La SD fue inferior al 10% 162
Fig. 42. MEB realizada en cultivos de epimastigotes cepa CL-B5 *lacZ* tras 72 h de tratamiento: (A–B) los parásitos sin tratar muestran la morfología típica de epimastigotes, (C–D) el tratamiento con BZ y NX produjo retracción en el cuerpo celular de los epimastigotes, (E–F) **VATR1** y (G–H) **VATR3** dieron lugar a alteraciones a nivel de la superficie, más evidentes en el caso del derivado **VATR1** (F) 163
Fig. 43. Absorbancias medias registradas para los controles de infección, crecimiento y medio en las pruebas de amastigotes realizadas en placas de 48 pocillos mediante infección 1:6 (L929:TDC) 164
Fig. 44. Curvas dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AA) obtenidas para los derivados de 5-nitroindazol más activos de la serie I: **VATR1** (A), **VATR2** (B) y **VATR3** (C). Cada punto de la curva representa la media ± SD (n = 3) 165
Fig. 45. Tratamiento con **VATR1** y **VATR3**, 100 mg/kg/día vía oral por 5 días consecutivos (5–9º d.p.i): niveles de parasitemia en ratones NMRI infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). * Indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA 167
Fig. 46. Tratamiento con **VATR1** y **VATR3**, vía oral: supervivencia durante la fase aguda 167
Fig. 47. Análisis mediante microscopía óptica de cultivos de CC infectados durante 24 h con *T. cruzi* cepa Y (A) y posteriormente tratados 48 h con 6,25 μM (B), 12,50 μM (C) y 25 μM (D) del derivado **VATR3**. Las flechas negras señalan algunas de las CC infectadas con amastigotes 170

Fig. 48. Alteraciones ultraestructurales producidas en TS de *T. cruzi* cepa Y tras 2 h de tratamiento: (A) los parásitos no tratados mostraron la morfología típica de TS, (B–C) los TS tratados con BZ presentaron una intensa vacuolización (estrella blanca), (D) el tratamiento de los TS con **VATR1** provocó la separación de la membrana plasmática (flechas negras) y la aparición de vesículas intracelulares, (E–F) el tratamiento con **VATR3** mostró perfiles dilatados de ER y una desorganización del aparato de Golgi (estrellas negras) además de la separación de la membrana plasmática (flecha negra) y de la envoltura nuclear (flecha blanca). M: mitocondria, N: núcleo, ER: retículo endoplasmático, K: kinetoplasto, F: flagelo, G: aparato de Golgi. Barras = 0,5 µm 171

Fig. 49. Alteraciones ultraestructurales producidas en TS de *T. cruzi* cepa Y tras 24 h de tratamiento: (A–B) los TS tratados con **VATR1** presentaron una separación de la membrana plasmática (flechas negras), (C–E) los TS tratados con **VATR3** mostraron afectación a nivel de la mitocondria (doble flecha blanca) y perfiles de ER rodeando la mitocondria y el núcleo (doble flecha negra). M: mitocondria, N: núcleo, ER: retículo endoplasmático, K: kinetoplasto, F: flagelo, G: aparato de Golgi. Barras = 0,5 µm 172

Fig. 50. Inhibición en el consumo de O_2 de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y tratados durante un periodo de 2 h con concentraciones crecientes de **VATR1** y **VATR3**. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control, test U de Mann-Whitney 173

Fig. 51. Resultados del análisis de citometría de flujo realizado con el marcador TMRE en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y. De izquierda a derecha: control (sin tratamiento), control positivo (choque térmico, 2 h 56 ºC) y tratados con la CI_{50}/24 h de **VATR1** y **VATR3** durante 2 (arriba) y 24 h (abajo) a 37 ºC 174

Fig. 52. Análisis mediante microscopía óptica de cultivos de CC infectados durante 24 h con *T. cruzi* Y (A) y posteriormente tratados 48 h con 0,19 µM (B), 0,39 µM (C) y 0,78 µM (D) del derivado **VATR75**. Las flechas negras señalan algunas de las CC infectadas con amastigotes 182

Fig. 53. Variación en el peso de ratones hembra Swiss de 23–25 g tratados p.o. e i.p. con la DA de **VATR75** (25 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2). * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis 184

Fig. 54. Relación entre el peso de los órganos extraídos (mg) y el peso del animal (g) a las 48 h de administrar p.o. e i.p. la DA de **VATR75** (25 mg/kg). Los resultados son la media ± SD de dos experimentos (n = 2). * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis 184

Fig. 55. Tratamiento con **VATR75** administrado p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva expresa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 186

Fig. 56. Tratamiento con **VATR75** p.o**.** el 5º y 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 187

Fig. 57. Tratamiento con **VATR75** p.o. en el 5º y 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 187

Fig. 58. Tratamiento con **VATR75** administrado vía i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 188

Fig. 59. Tratamiento con **VATR75** vía i.p. el 5º y 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 188

Fig. 60. Tratamiento con **VATR75** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 189

Fig. 61. Repercusión del tratamiento realizado con **VATR75** p.o. (A) e i.p. (B) sobre los niveles de parasitemia del 8º d.p.i. (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA 189

Fig. 62. Variación en el peso de ratones hembra Swiss de 23–25 g tratados p.o. e i.p. con la DA de **VATR99** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2). * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis 196

Fig. 63. Relación entre el peso de los órganos extraídos (mg) y el del animal (g) a las 48 h de administrar p.o. e i.p. la DA de **VATR99** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2). * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis 196

Fig. 64. Variación en el peso de ratones hembra Swiss de 23–25 g tratados p.o. e i.p. con la DA de **VATR100** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2). * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis 197

Fig. 65. Relación entre el peso de los órganos extraídos (mg) y el del animal (g) a las 48 h de administrar p.o. e i.p. la DA de **VATR100** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2). * Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis 197

Fig. 66. Tratamiento con **VATR99** administrado p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 200

Fig. 67. Tratamiento con **VATR99** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 200

Fig. 68. Tratamiento con **VATR99** administrado i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 201

Fig. 69. Tratamiento con **VATR99** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 201

Fig. 70. Tratamiento con **VATR99** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones. * Diferencias significativas (*P* < 0,05*)* con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (*P* < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 202

Fig. 71. Tratamiento con **VATR99** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones. * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (*P* < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 202

Fig. 72. Repercusión del tratamiento realizado con **VATR99** p.o. (A) e i.p. (B) sobre los niveles de parasitemia del 8º d.p.i. (media ± SD). * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control de infección, ANOVA 203

Fig. 73. Tratamiento con **VATR100** p.o. en el 5º y en el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva indica el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 203

Fig. 74. Tratamiento con **VATR100** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 204

Fig. 75. Tratamiento con **VATR100** i.p. en el 5º y en el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva indica el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 204

Fig. 76. Tratamiento con **VATR100** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 205

Fig. 77. Tratamiento con **VATR100** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones.* Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (*P* < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 205

Fig. 78. Tratamiento con **VATR100** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones. * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (*P* < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 206

Fig. 79. Repercusión del tratamiento realizado con **VATR100** p.o. (A) e i.p. (B) sobre los niveles de parasitemia del 8º d.p.i. (media ± SD). * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control, ANOVA 206

Fig. 80. Tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. durante 10 días consecutivos: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 207

Fig. 81. Tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. durante 10 días consecutivos: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 208

Fig. 82. Tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. durante 10 días consecutivos: variación de peso durante la fase aguda. * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (*P* < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 208

Fig. 83. Tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o. durante 10 días consecutivos: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD 209

Fig. 84. Tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o. durante 10 días consecutivos: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 209

Fig. 85. Tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o. durante 10 días consecutivos: variación de peso durante la fase aguda. * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (*P* < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 210

Fig. 86. Repercusión del tratamiento realizado durante 10 días consecutivos con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** i.p., sobre los niveles de parasitemia del 8º (A) y del 14º d.p.i. (B) (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA 210

Fig. 87. Repercusión del tratamiento realizado durante 10 días consecutivos con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o., sobre los niveles de parasitemia del 8º (A) y del 14º d.p.i. (B) (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA 211

Fig. 88. Peso de los ratones supervivientes a la fase aguda registrado el 30º día post-tratamiento (45º d.p.i.). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 211

Fig. 89. Relación entre el peso de los órganos (mg) y el del animal (g) en el 30º día post-tratamiento (45º d.p.i.). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA 212

Fig. 90. Resultados del análisis de citometría de flujo realizado con el marcador TMRE en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y. De izquierda a derecha: control (sin tratamiento), control positivo (choque térmico, 2 h 56 ºC) y tratados con la CI_{50}/24 h de **VATR81**, **VATR99** y **VATR100** durante 2 (arriba) y 24 h (abajo) a 37 ºC 213

Fig. 91. Perfil de actividad *in vitro* de los compuestos **PM199** (A), **PM52** (B), **PM401** (C), **PM154** (D), **PM357** (E), **PM402** (F) y BZ (H) sobre epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ.* Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de dos experimentos independientes (n = 2) 224

Fig. 92. Perfil de citotoxicidad inespecífica de los compuestos **PM199** (A), **PM52** (B), **PM401** (C), **PM154** (D), **PM357** (E), **PM402** (F) y BZ (H) sobre cultivos de fibroblastos L929. Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de dos experimentos independientes (n = 2) 225

Fig. 93. Perfil de actividad *in vitro* de la edelfosina frente a epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ* (A) y citotoxicidad inespecífica sobre cultivos de macrófagos J774 (B). Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes (n = 3) 227

Fig. 94. Actividad *in vitro* de la edelfosina sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cepa CL-B5 *lacZ* en macrófagos J774. Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes (n = 3) 228

Fig. 95. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: BZ materia prima (BZ), BZ recristalizado (R-BZ), MF-1:3 y MF-1:10 en NaDC (A). DS-1:0,8, DS-1:1,5, DS-1:3, DS-1:6 y DS-1:10 en NaDC (B). Cada punto representa la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 229

Fig. 96. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: BZ materia prima (BZ), BZ recristalizado (R-BZ), MF-1:3 y DS-1:3 en L-HPC. Cada punto muestra la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 230

Fig. 97. DS de BZ: curvas de parasitemia en hembras NMRI de 25 ± 2 g de peso infectadas con *T. cruzi* cepa Y, tratadas durante 5 días consecutivos con 25 mg/kg/día p.o. de las distintas formulaciones de BZ. Animales con parasitemia positiva el 5º d.p.i.: n = 10 en los grupos tratados con DS-1:3 (NaDC y L-HPC) y DS-1:6, n = 9 en los grupos control de infección y BZ materia prima. Cada punto de la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SEM. * Diferencias significativas con respecto al grupo control de infección ($P < 0,05$), ANOVA. $^{\#}$ Diferencias significativas entre la DS-1:3 (BZ:NaDC) y su homólogo con L-HPC ($P < 0,05$), ANOVA 232

Fig. 98. DS de BZ: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 233

Fig. 99. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: materia prima, **VATR1** recristalizado (R-**VATR1**), DS-1:2,5 y DS-1:10 en L-HPC. Cada punto indica la media ± SD de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 234

Fig. 100. DS de **VATR1**: curvas de parasitemia en machos NMRI de 33 ± 2 g de peso infectados con *T. cruzi* cepa Y, tratados por 5 días consecutivos con 12,5 mg/kg/día p.o. de las DS de **VATR1** en L-HPC. N = 9 en los grupos control de infección, BZ y **VATR1** materia prima; n = 10 en los tratados con las DS. Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SEM. * Diferencias significativas *($P < 0,05$)* con respecto al grupo control de infección y $^{\#}$ *($P < 0,05$)* entre **VATR1** y las DS, ANOVA 235

Fig. 101. DS de **VATR1**: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 236

Fig. 102. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: materia prima, **VATR3** recristalizado (R-**VATR3**), DS-1:5, DS-1:10 y DS-1:20 en L-HPC. Cada punto representa la media ± SD de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 237

Fig. 103. DS de **VATR3**: curvas de parasitemia en machos NMRI de 33 ± 2 g de peso infectados con *T. cruzi* cepa Y, tratados por 5 días consecutivos con 12,5 mg/kg/día p.o. de las DS de **VATR3** en L-HPC. N = 10 para todos los grupos. Cada punto muestra la media de la parasitemia ± SEM. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección y $^{\#}$ ($P < 0,05$) entre **VATR3** y las DS, ANOVA 238

Fig. 104. DS de **VATR3**: supervivencia de los ratones durante la fase aguda 239

Fig. 105. SE y SP diseñadas mediante análisis de conglomerados (*k*-medias). Fuente: esquema adaptado a los resultados obtenidos a partir del propuesto por Montero-Torres *et al.* (2005) 240

Fig. 106. Mejor combinación de modelos (ensamble) obtenida de acuerdo con las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M), en base a los valores de Q y RFA obtenidos para la SE 246

Fig. 107. *Validación cruzada* del modelo **10** (**ILNS-S**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la Q (A) y la RFA (B) 248

Fig. 108. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **10** (**ILNS-S**) 248

Fig. 109. *Validación cruzada* del modelo **22** (**ILSS-Gral**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la Q (A) y la RFA (B) 249

Fig. 110. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **22** (**ILSS-Gral**) 249

Fig. 111. *Validación cruzada* del modelo **29** (**ILdS-H**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la Q (A) y la RFA (B) 250

Fig. 112. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **29** (**ILdS-H**) 250

Fig. 113. Mejor combinación de modelos (ensamble) obtenida de acuerdo con las reglas de voto (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M), en base a los valores de Q y RFA obtenidos para la SE 259

Fig. 114. *Validación cruzada* del modelo **21** (**ILSS-S**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la Q (A) y la RFA (B) 261

Fig. 115. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **21** (**ILSS-S**) 261

Fig. 116. *Validación cruzada* del modelo **45** (**IL-Gral**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la Q (A) y la RFA (B) 262

Fig. 117. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **45** (**IL-Gral**) 262

Fig. 118. Análisis de componentes principales para el **SMC1**: *score plot* CP1–CP2 271

Fig. 119. Análisis de componentes principales para el **SMC1**: *score plot* CP1–CP3 272

Fig. 120. Compuestos cabeza de serie: 1-bencil-2-metil- (**3s**) y 2-bencil-1-metil-5-nitroindazolin-3-ona (**4s**). Fuente: Montero-Torres *et al*. (2005) 276

Fig. 121. Representación esquemática de la cadena de transporte electrónico en *T. cruzi*. EIM: espacio intermembrana, MMI: membrana mitocondrial interna. En rojo: inhibidores de la respiración mitocondrial. Fuente: adaptación de la figura propuesta por Paes *et al*. (2011) 284

Fig. 122. Perfil de riesgo potencial inducido por las tetrahidroquinolinas de las series **AR** y **DM**. Mut.: mutagénico, Tum.: tumorigénico, Irr.: irritante, Rep. Eff.: efectos sobre la reproducción. Predicción realizada mediante el software OSIRIS. Fuente: Fonseca-Berzal *et al*. (2013) 299

Fig. 123. Riesgo potencial inducido por los derivados de cloroquina **1**–**22**. Predicción realizada con el software OSIRIS. Fuente: Fonseca-Berzal *et al*. (2014a) 301

Fig. 124. Mecanismo general de acción de los agentes quelantes sobre la célula eucariota microbiana. Fuente: adaptación de la figura propuesta en Santos *et al*. (2012) 305

Fig. 125. Ciclo redox experimentado por las quinonas y generación de metabolitos tóxicos. SOD: superóxidodismutasa, CAT: catalasa. Fuente: adaptación del esquema propuesto por Pinto y de Castro (2009) 308

Fig. 126. MEB de las formulaciones de BZ en NaDC: (a) MF-1:3, (b) DS-1:3, (c) DS-1:1,5, y (d) DS-1:6. Fuente: Palmeiro-Roldán *et al.* (2014) 314

Fig. 127. MEB de las formulaciones de BZ: (a) materia prima, (b) R-BZ, (c) MF-1:3 BZ:L-HPC y (d) DS-1:3 BZ:L-HPC. Fuente: Palmeiro-Roldán *et al*. (2014) 315

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas representativas de *T. cruzi* y DTU al que pertenecen (Zingales *et al*., 2009) 22

Tabla 2. Resumen de las principales características asociadas a cada DTU (Zingales *et al*., 2012) 24

Tabla 3. Pruebas a realizar en la monitorización de los pacientes en tratamiento (Gomes *et al*., 2009) 50

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los modelos *in vivo* (Chatelain y Konar, 2015) 92

Tabla 5. Parámetros estadísticos empleados en la evaluación de los modelos 152

Tabla 6. Actividad de 5-nitroindazolinonas (**VATR1**–**VATR16**) e indazolinona (**VATR33**) 1,2-disustituídas en epimastigotes (cepa CL-B5 *lacZ*), expresada como porcentaje de inhibición (%AE), y citotoxicidad en macrófagos J774 ($\%C_{J774}$) a las tres concentraciones inicialmente ensayadas 160

Tabla 7. Actividad de 5-nitroindazoles 2,3- (**VATR17**–**29** y **VATR34**–**35**) y 1,3-disustituídos (**VATR30**–**32**) en epimastigotes (cepa CL-B5 *lacZ*), expresada como porcentaje de inhibición (%AE), y citotoxicidad en macrófagos J774 ($\%C_{J774}$) a las tres concentraciones inicialmente ensayadas 160

Tabla 8. Actividad tripanocida frente a amastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ*, expresada como la media del porcentaje de inhibición (%AA) ± SD (n = 3) obtenido para cada concentración 165

Tabla 9. Actividad frente a epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ* y citotoxicidad inespecífica en macrófagos J774 expresadas como CI_{50} y CL_{50}, respectivamente 166

Tabla 10. Citotoxicidad (%C) de **VATR1** y **VATR3** en CC y L929, expresada como porcentaje a la mayor concentración ensayada (100 μM) y CL_{50} (μM). Los resultados son la media ± SD (n = 2 para CC y n = 3 para L929) 168

Tabla 11. Actividad de **VATR1** y **VATR3** frente a amastigotes intracelulares (cepas Tulahuen C4 *lacZ* e Y) y tripomastigotes sanguíneos (cepa Y), expresada como la media de CI_{50} (μM) y la media de CI_{90} (μM) ± SD (n = 3) 169

Tabla 12. Porcentaje de la población de tripomastigotes sanguíneos que experimentó despolarización de la membrana mitocondrial. Los resultados se expresan como la media ± SD (n = 3) 173

Tabla 13. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) de los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie II, expresados como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada (256 μM), CI_{50} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3) 175

Tabla 14. Actividad frente a amastigotes de los derivados de 5-nitroindazol (serie II) seleccionados en el cribado primario, expresada como CI_{50} (μM) y CI_{90} (μM). Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3). Los índices de selectividad (IS) y potencias relativas (PR_{BZ}) también fueron calculados 176

Tabla 15. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) de los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie III, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada (256 μM), CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3) 178

Tabla 16. Actividad frente a amastigotes de los derivados de 5-nitroindazol (serie III) seleccionados en el cribado primario, expresada como CI_{50} (μM) y CI_{90} (μM). Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3). Los índices de selectividad (IS) y potencias relativas (PR_{BZ}) también fueron calculados 180

Tabla 17. Citotoxicidad (%C) de **VATR75** en CC y L929, expresada como porcentaje a la mayor concentración ensayada (100 μM) y CL_{50} (μM). Los resultados son la media ± SD (n = 2 para CC y n = 3 para L929) 181

Tabla 18. Actividad de **VATR75** en amastigotes intracelulares (cepas Tulahuen C4 *lacZ* e Y) y tripomastigotes sanguíneos (cepa Y), expresada como la media de CI_{50} (μM) y la media de CI_{90} (μM) ± SD (n = 3) 182

Tabla 19. Toxicidad aguda – Dosis crecientes de **VATR75** (comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar 200 mg/kg) administradas vía oral (p.o.) e i.p. (0,1 mL/dosis) 183

Tabla 20. Toxicidad aguda – Hemograma realizado a las 48 h de administrar **VATR75** (CECAL/Fiocruz) (n = 1, debido a una hemólisis de las muestras) 185

Tabla 21. Toxicidad aguda – Análisis bioquímico realizado a las 48 h de administrar **VATR75** (CECAL/Fiocruz) 185

Tabla 22. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) de los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie IV, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada (256 μM), CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3) 191

Tabla 23. Actividad frente a amastigotes de los derivados de 5-nitroindazol (serie IV) seleccionados en el cribado primario, expresada como CI_{50} (μM) y CI_{90} (μM). Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3). Los índices de selectividad (IS) y potencias relativas (PR_{BZ}) también fueron calculados 192

Tabla 24. Citotoxicidad (%C) en CC y L929 de **VATR81**, **VATR99**, **VATR100 y VATR102**, expresada como porcentaje a la mayor concentración ensayada (100 μM) y CL_{50} (μM). Los resultados son la media ± SD (n = 2 para CC y n = 3 para L929) 193

Tabla 25. Actividad de **VATR81**, **VATR99**, **VATR100 y VATR102** en amastigotes (cepas Tulahuen C4 *lacZ* e Y) y tripomastigotes sanguíneos (Y), expresada como la media de CI_{50} y la media de CI_{90} (μM) ± SD (n = 3) 194

Tabla 26. Toxicidad aguda – Dosis crecientes de **VATR99** (comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar 200 mg/kg) administradas p.o. e i.p. (0,1 mL/dosis) 195

Tabla 27. Toxicidad aguda – Dosis crecientes de **VATR100** (comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar 200 mg/kg) administradas p.o. e i.p. (0,1 mL/dosis) 195

Tabla 28. Toxicidad aguda – Hemograma realizado a las 48 h de administrar **VATR99** (CECAL/Fiocruz) (n = 1, debido a una hemólisis de las muestras) 198

Tabla 29. Toxicidad aguda – Análisis bioquímico realizado a las 48 h de administrar **VATR99** (CECAL/Fiocruz) 198

Tabla 30. Toxicidad aguda – Hemograma realizado a las 48 h de administrar **VATR100** (CECAL/Fiocruz) (ND debido a una hemólisis de las muestras) 199

Tabla 31. Toxicidad aguda – Análisis bioquímico realizado a las 48 h de administrar **VATR100** (CECAL/Fiocruz) 199

Tabla 32. Porcentaje de la población de tripomastigotes sanguíneos que experimentó despolarización de la membrana mitocondrial. Los resultados se expresan como la media ± SD (n = 3) 212

Tabla 33. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) de la serie **AR**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente 214

Tabla 34. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) de la serie **DM**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente 215

Tabla 35. Actividad frente a amastigotes de los compuestos seleccionados en el cribado primario, expresada como porcentaje de inhibición (%AA) y CI_{50} (μM) 215

Tabla 36. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) del **Grupo 1**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente 216

Tabla 37. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 ($\%C_{L929}$) del **Grupo 2**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente 217

Tabla 38. Actividad frente a amastigotes de los compuestos seleccionados en el cribado primario, expresada como porcentaje de inhibición (%AA) y CI_{50} (μM) 218

Tabla 39. Perfil de actividad tripanocida frente a epimastigotes, expresado como la media del porcentaje de inhibición (%AE) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada 219

Tabla 40. Perfil de citotoxicidad en fibroblastos L929, expresado como la media del porcentaje de citotoxicidad (%C) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada 219

Tabla 41. Resultados de actividad en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica (CL_{50}) e índices de selectividad (IS) obtenidos por la serie **DIT** 220

Tabla 42. Perfil de actividad tripanocida frente a epimastigotes, expresado como la media del porcentaje de inhibición (%AE) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada 221

Tabla 43. Perfil de citotoxicidad en fibroblastos L929, expresado como la media del porcentaje de citotoxicidad (%C) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada 221

Tabla 44. Resultados de actividad en epimastigotes (IC_{50}), citotoxicidad inespecífica (CL_{50}) e índices de selectividad (IS) obtenidos por los quelantes heterocíclicos 222

Tabla 45. Resultados de actividad en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica (CL_{50}) e índices de selectividad (IS) obtenidos por las cromenoazoldionas 226

Tabla 46. Actividad de la edelfosina en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica en J774 (CL_{50}) e índice de selectividad (IS). Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n = 3) 227

Tabla 47. Actividad de la edelfosina en amastigotes intracelulares (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica en J774 (CL_{50}) e índice de selectividad (IS). Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n = 3) 228

Tabla 48. Actividad de las DS de BZ sobre epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ.* Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 230

Tabla 49. Citotoxicidad de las DS de BZ sobre fibroblastos L929. Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 231

Tabla 50. Actividad de las DS de BZ sobre amastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ.* Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3) 231

Tabla 51. Distribución de las moléculas activas e inactivas que constituyen la base de datos confeccionada en las correspondientes SE y SP 240

Tabla 52. Parámetros estadísticos obtenidos para cada uno de los 45 modelos de clasificación QSAR/ADL basados en relaciones de átomos 242

Tabla 53. Modelos de predicción seleccionados por el programa DASDE en base a los resultados de diversidad calculados por el programa 244

Tabla 54. Valores estadísticos obtenidos para la SE en el ensamble de los modelos de predicción seleccionados por el programa DASDE, aplicando las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M) 245

Tabla 55. Parámetros estadísticos obtenidos para la SP en la validación externa del **SMC1** 247

Tabla 56. CV de los derivados de 5-nitroindazol realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 251

Tabla 57. CV de las tetrahidroquinolinas realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 253

Tabla 58. CV de los derivados de cloroquina realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 254

Tabla 59. CV de los derivados de tiadiazina realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 255

Tabla 60. CV de los quelantes heterocíclicos realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 256

Tabla 61. CV de las cromenoazoldionas realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 257

Tabla 62. Parámetros estadísticos derivados de la clasificación obtenida por los modelos individuales **10**, **22**, **29** y por su ensamble (**SMC1**) en el CV de las 148 moléculas evaluadas 257

Tabla 63. Valores estadísticos obtenidos para la SE en el ensamble de los modelos de predicción seleccionados por el programa DASDE, aplicando las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M) 258

Tabla 64. Parámetros estadísticos obtenidos para la SP en la validación externa de los **SMC2** y **SMC3** 260

Tabla 65. CV de los derivados de 5-nitroindazol realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 263

Tabla 66. CV de los derivados de tetrahidroquinolina realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 265

Tabla 67. CV de los derivados de cloroquina realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 266

Tabla 68. CV de los derivados de tiadiazina realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 267

Tabla 69. CV de los quelantes heterocíclicos realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 268

Tabla 70. CV de las cromenoazoldionas realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes 269

Tabla 71. Parámetros estadísticos derivados de la clasificación obtenida por los modelos individuales **21**, **22**, **29** y **45** así como por los SMC que integran (**SMC2** y **SMC3**) en el CV de las 148 moléculas 269

Tabla 72. Análisis de conglomerados efectuado para la SE de activas y las 148 moléculas del CV a partir de las variables que constituyen el **SMC1** 270

Tabla 73. Comparación del modelo **45** con otros modelos QSAR/ADL de la literatura empleados para el CV de compuestos potencialmente tripanocidas 323

Tabla 74. Comparación de los parámetros estadísticos obtenidos para la SE de los distintos SMC y los modelos individuales que integran cada uno 326

SUMMARY

RESUMEN

RESUMO

SUMMARY

Identification and further optimization of potential therapeutic alternatives for Chagas disease treatment

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a parasitic infection transmitted in 21 Latin American countries mainly by the contaminated feces of triatomine vectors. In the endemic area, it provokes more than 7,000 deaths annually and maintains over 25 million people at risk for the infection. The disease has been classified by the WHO as one of the 17 neglected tropical diseases, and its chronic nature mostly affects poorest people of the rural areas. However, non-vectorial routes of transmission (e.g., transfusional or congenital) and population mobility have led to its emergence in non-endemic countries such as USA, Australia or Spain, affecting more than 7 million people worldwide.

The acute phase appears one week after infection and presents low mortality (<10%), usually related to heart failure and/or meningoencephalitis. In most cases it is asymptomatic/oligosymtomatic and resolves spontaneously. After 1–2 months, immune response partially controls the infection and although it is not eradicated, about 60–70% of patients never develop clinical manifestations (indeterminate phase). The remaining 30–40% manifests the chronic disease 10–30 years after initial infection, suffering life-threatening cardiomyopathy and/or digestive problems (i.e., megaesophagous and megacolon).

Although more than a century has gone since the discovery of the disease, no suitable drug is still available. The specific treatment is based on two nitrocompounds introduced more than forty years ago: benznidazole (BZ) and nifurtimox, recommended to treat acute and early-chronic cases, but both show limited effectiveness in long-term chronic infections. Their controverted activity, high toxicity and the occurrence of naturally resistant parasite strains, hinders the success of these therapies. Therefore, according to the current scenario of Chagas disease, one of the main challenges to be faced is the identification of therapeutic alternatives potentially applicable to the treatment, which is the **main objective** of this thesis. In order to achieve it, the following three **particular objectives** were pursued:

1. Identification of potential chemotherapeutic agents among different synthetic series, by applying a sequential phenotypic screening integrated by *in vitro* and *in vivo* assays.
2. Preparation and biological evaluation of novel formulations of low water soluble drugs (i.e., BZ and prototypes) to optimize their physicochemical properties and therefore, ameliorate their activity profiles.
3. Development of new computational QSAR/LDA models and further exploration of their applicability as complementary tool for identifying trypanocidal compounds.

The **first objective** comprises the phenotypic screening of 191 molecules, including 5-nitroindazoles, 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, chloroquinoline derivatives, 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]thiadiazines, chelators, chromenoazolediones and the alkyl-lysophospholipid edelfosine. A sequential procedure was followed to identify trypanocidal agents: (i) compounds were assayed over epimastigotes of CL-B5 *lacZ* (DTU TcVI) strain and cytotoxicity simultaneously tested on mammalian cells, (ii) those displaying higher selectivity than BZ were assayed over intracellular amastigotes and (iii) the most effective compounds were moved to a mouse model of acute infection of *T. cruzi*. The **results** pointed to 5-nitroindazole derivatives as the best compounds, being 2-benzyl 5-nitroindazolinones the most capable. This motivated the evaluation of **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR81**, **VATR99**, **VATR100** and **VATR102** over amastigotes of Tulahuen *lacZ* (DTU TcVI) and Y (DTU TcII) strains, as well as on bloodstream trypomastigotes (Y). These 5-nitroindazolinones obtained similar profiles over both drug-sensitive and moderately-drug resistant intracellular forms, showing **VATR75**, **VATR99** and **VATR100** activities (IC_{50} = 0.22–0.81 μM, 0.25–0.47 μM and 0.71–1.25 μM, respectively) similar to that of BZ (IC_{50} = 0.50–1.77 μM). However, they did not result as active on bloodstream trypomastigotes, suggesting different modes of action on replicative (amastigotes and epimastigotes) and non-replicative (trypomastigotes) forms. Studies performed to elucidate the mechanisms involved in **VATR1** and **VATR3** action on trypomastigotes, pointed to autophagic processes and mitochondrial machinery. Moreover, *in vivo* assays with different treatment schemes of **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR99** and **VATR100**, revealed parasitemia reductions and survival of infected mice that varied within compounds and posology. Finally, although none of the other series was as active as 5-nitroindazoles, the promising results obtained by tetrahydroquinolines **AR39**, **AR40**, **AR41**, **AR91** and **DM15,** and cloroquinoline **7**, proposed them as templates to design potential anti-*T. cruzi* agents. Edelfosine showed trypanocidal activity to be considered for further studies.

The **second objective** proposes solid dispersions (SD) to increase the solubility of low water soluble drugs by optimizing their physicochemical properties and therefore, improve effectiveness. The **results** obtained with SD of BZ in sodium deoxycholate (NaDC), showed a correlation between NaDC and responses at physiological pH. However, high ratios of drug:carrier decreased dissolution rates in acidic locations and accordingly, BZ activity was not improved by SD-1:3 and SD-1:6 when orally administered to infected mice (%AUPC = 95.27, 91.93 and 83.14%, respectively). The SD in low-substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) achieved better results, with the fastest dissolution profile and %AUPC = 96.65%. Consequently, L-HPC was selected as carrier for 5-nitroindazolinones SD, improving both dissolution rates and effectiveness: %AUPC = 53.80, 82.85 and 81.05% (**VATR1**, SD-1:2.5 and SD-1:10) and %AUPC = 24.25, 61.12 and 85.42% (**VATR3**, SD-1:2.5 and SD-1:10).

The **third objective** deals with the creation of a database initially constituted by 1,308 compounds, as the first step to build QSAR/LDA models based on the TOMOCOMD-

CARDD molecular descriptors, then combined using DASDE in multiclassifier systems (SMC) based on diversity and statistics. The **results** of validation confirmed both robustness and predictive power of models. For the training set, the SMC obtained better accuracy and false alarm rate than their integrating models. Otherwise, the slight differences noticed in statistics of both training and test sets presumed their similar behavior in virtual screening (VS). In fact, the VS of 148 molecules disappointed with the results previously achieved *in vitro*. A negative impact triggered by their low representation in the active training set and the molecular similarity between active and inactive compounds, prompted to the feedback of the database, in order to overcome such discrepancies.

In summary, principal **conclusions** of this thesis are:

1. 5-Nitroindazoles show outstanding trypanocidal activity. Concretely, 1,2-disubstituted 5-nitroindazolinones have been identified as prototypes of antichagasic drugs.
2. The most promising 5-nitroindazolinones result from the introduction of a benzyl moiety at the N-2 position of the indazole scaffold.
3. 5-Nitroindazole derivatives display different behavior on replicative and non-replicative forms of the parasite.
4. Oxidative stress, mitochondrial affectation and autophagy are proposed as part of the mode of action of 5-nitroindazole derivatives.
5. The low water solubility of some 5-nitroindazolinones affects *in vivo* effectiveness.
6. Five tetrahydroquinolines are selective on intracellular amastigotes.
7. Chloroquinoline **7** is proposed as prototype of putative anti-*T. cruzi* agents.
8. Thiadiazines, chelators or chromenoazolediones assayed, have no notable trypanocidal activity.
9. Edelfosine assays reaffirm the potential application of alkyl-lysophospholipids as a chemotherapeutic alternative for the treatment of the disease.
10. SD in NaDC improve BZ activity at physiological pH. High concentrations of NaDC affect its cession in acidic environments and generate lower dissolution profiles impacting on BZ effectiveness *in vivo*.
11. SD in L-HPC enhance the solubility of compounds and their activity profile *in vivo*.
12. TOMOCOMD-CARDD and DASDE combination is an effective strategy to create SMC.
13. Validation methods confirm the robustness and predictive power of the models.
14. In QSAR/LDA modeling, it is essential to create a database for which structural variety has been established and defined in advance.
15. A low representation in the database of the molecules evaluated *in silico*, supposes a critical point in their final classification by models.

RESUMEN

Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi,* es una parasitosis endémica en 21 países de América Latina, donde se transmite por las heces contaminadas de triatominos, provoca más de 7.000 muertes anuales y cerca de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la infección. Clasificada por la OMS como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas, principalmente se extiende entre la población más desfavorecida de las zonas rurales. Sin embargo, vías de trasmisión alternativas como la transfusional o la congénita, y los movimientos migratorios, han hecho de ella una enfermedad emergente en países como EE.UU, Australia o España, afectando a más de 7 millones de personas en el mundo.

La fase aguda aparece una semana tras la infección y posee baja mortalidad (<10%), asociada a fallo cardíaco y/o meningoencefalitis. En la mayoría de los casos es asintomática u oligosintomática y se resuelve espontáneamente. Tras 1–2 meses, la respuesta inmune controla parcialmente la infección y aunque no la erradica, el 60–70% de los pacientes nunca la manifiesta (fase indeterminada). El 30–40% restante entra en fase crónica durante los 10–30 años posteriores, con afectación cardíaca y/o digestiva (megaesófago y megacolon).

Después de más de un siglo desde su descubrimiento, no se dispone de fármacos adecuados para su tratamiento, basado en dos nitroderivados introducidos hace más de 40 años: benznidazol (BZ) y nifurtimox, recomendados para tratar los casos agudos y crónicos recientes, pero con actividad limitada en la fase crónica avanzada. Su controvertida eficacia, elevada toxicidad y la aparición de cepas de *T. cruzi* resistentes, afecta al éxito de estas terapias. Por tanto, uno de los principales retos que plantea la enfermedad de Chagas es identificar alternativas terapéuticas con potencial aplicación para su tratamiento, **principal objetivo** de esta tesis. Para su abordaje, se han perseguido tres **objetivos concretos**:

1. Identificación de potenciales agentes quimioterapéuticos entre varias series de síntesis, mediante un protocolo de cribado secuencial integrado por ensayos *in vitro* e *in vivo*.
2. Preparación y evaluación biológica de nuevas formulaciones de BZ y otros compuestos de baja solubilidad acuosa para optimizar sus propiedades fisicoquímicas y eficacia.
3. Desarrollo de nuevos modelos QSAR/ADL y posterior exploración de su aplicabilidad como herramienta de apoyo en la identificación de compuestos tripanocidas.

El **primer objetivo** comprende el cribado fenotípico de 191 moléculas de síntesis, incluyendo derivados de 5-nitroindazol, 2,4-diaril-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, derivados de cloroquinolina, 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazinas, quelantes, cromenoazoldionas y el alquil-lisofosfolípido edelfosina. Para la identificación de compuestos activos, se siguió el

siguiente protocolo secuencial: (i) ensayos de actividad sobre epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ* (DTU TcVI) y de citotoxicidad inespecífica en células de mamífero, (ii) ensayos de actividad sobre amastigotes intracelulares de los que resultaron más selectivos que el BZ y (iii) evaluación de los más eficaces en un modelo murino de infección aguda por *T. cruzi*. Los **resultados** señalan a los derivados de 5-nitroindazol como los más activos, siendo las 2-bencil-5-nitroindazolinonas los compuestos más prometedores. Tales hallazgos motivaron la evaluación de los denominados **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR81**, **VATR99**, **VATR100** y **VATR102** sobre amastigotes de las cepas Tulahuen *lacZ* (DTU TcVI) e Y (DTU TcII), además de sobre tripomastigotes sanguíneos (cepa Y). Estas 5-nitroindazolinonas presentaron un comportamiento similar frente a parásitos intracelulares de cepas sensibles y de moderada resistencia, mostrando **VATR75**, **VATR99** y **VATR100** actividades (CI_{50} = 0,22–0,81 μM, 0,25–0,47 μM y 0,71–1,25 μM, respectivamente) similares a la del BZ (CI_{50} = 0,50–1,77 μM). Sin embargo, no fueron tan activas en tripomastigotes sanguíneos, planteando su diferente modo de acción sobre formas replicativas (amastigotes y epimastigotes) y no replicativas (tripomastigotes). Estudios orientados a elucidar los mecanismos involucrados en la acción de **VATR1** y **VATR3** sobre tripomastigotes, señalaron procesos de autofagia y alteraciones mitocondriales. Por otro lado, la evaluación *in vivo* de **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR99** y **VATR100**, desveló distintos grados de reducción en la parasitemia y de supervivencia de los animales infectados, según el compuesto y su posología. Finalmente, aunque ninguna de las otras series fue tan activa como los 5-nitroindazoles, las tetrahidroquinolinas **AR39**, **AR40**, **AR41**, **AR91** y **DM15**, y la cloroquinolina **7**, obtuvieron resultados prometedores que permiten proponerlas como candidatas para el desarrollo de potenciales agentes anti-*T. cruzi*. La edelfosina mostró un perfil de actividad para ser considerado en estudios futuros.

El **segundo objetivo** plantea el desarrollo de dispersiones sólidas (DS) para mejorar el perfil de disolución de compuestos de baja solubilidad acuosa mediante optimización de sus propiedades fisicoquímicas y en consecuencia, aumentar su eficacia. Los **resultados** obtenidos con DS de BZ en desoxicolato sódico (NaDC) mostraron una correlación entre la presencia de NaDC y su respuesta a pH fisiológico. No obstante, proporciones elevadas retardaron el perfil de disolución en medio ácido, de modo que las DS-1:3 y DS-1:6 no mejoraron la eficacia del BZ al administrarse oralmente a ratones infectados (%AUPC = 95,27, 91,93 y 83,14%, respectivamente). Mejores resultados obtuvo la DS en hidroxipropilcelulosa de bajo peso molecular (L-HPC), alcanzando un perfil de disolución más rápido y %AUPC = 96,65%. La L-HPC se seleccionó como matriz para desarrollar DS de dos 5-nitroindazolinas, mejorando tanto sus perfiles de disolución como su eficacia: %AUPC = 53,80, 82,85 y 81,05% (**VATR1**, DS-1:2,5 y DS-1:10) y %AUPC = 24,25, 61,12 y 85,42% (**VATR3**, DS-1:2,5 y DS-1:10).

El **tercer objetivo** supone la creación de una base de datos (BD), inicialmente constituida por 1.308 compuestos, como primer paso para desarrollar modelos QSAR/ADL a partir de descriptores moleculares TOMOCOMD-CARDD, combinados mediante DASDE en

sistemas multiclasificadores (SMC) en base a su diversidad y parámetros estadísticos. Los **resultados** obtenidos en la validación confirmaron la robustez y el poder predictivo de los modelos. Para la serie de entrenamiento, los SMC mostraron mejor porcentaje de buena clasificación y razón de falsa alarma que los modelos que los integran. Sin embargo, las leves diferencias en los parámetros estadísticos de las series de entrenamiento y predicción, pronosticaron un comportamiento similar de los SMC en el cribado virtual (CV). De hecho, los resultados de 148 moléculas sometidas a CV discordaron con los obtenidos previamente *in vitro*. La baja representación de estas moléculas en la serie de entrenamiento de activos y la similitud existente entre compuestos activos e inactivos impactó negativamente sobre el CV, siendo requerida una retroalimentación de la BD para dirimir tales discrepancias.

De manera resumida, las principales **conclusiones** de esta tesis son:

1. Los 5-nitroindazoles poseen actividad tripanocida destacable. Concretamente, las 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas han sido identificadas como prototipos de agentes antichagásicos.
2. Las 5-nitroindazolinonas más prometedoras resultan de la introducción de un grupo bencilo en la posición N-2 del anillo de indazol.
3. Los derivados de 5-nitroindazol exhiben un comportamiento distinto sobre las formas replicativas y no replicativas del parásito.
4. La inducción de estrés oxidativo, afectación mitocondrial y procesos de autofagia, se postulan como partícipes en el modo de acción de los derivados de 5-nitroindazol.
5. La limitada solubilidad acuosa de ciertos 5-nitroindazoles afecta a su eficacia *in vivo*.
6. Cinco tetrahidroquinolinas presentan selectividad hacia amastigotes intracelulares.
7. La cloroquinolina **7** se propone como prototipo para desarrollar agentes anti-*T. cruzi*.
8. Las tiadiazinas, quelantes y cromenoazoldionas no muestran actividad destacable.
9. Los resultados obtenidos con la edelfosina reafirman la potencial aplicación de los alquil-lisofosfolípidos como alternativa terapéutica en el tratamiento de la enfermedad.
10. Las DS en NaDC mejoran la actividad del BZ a pH fisiológico, pero concentraciones elevadas retardan su disolución en medio ácido y afectan a su eficacia *in vivo*.
11. Las DS en L-HPC potencian la solubilidad de los compuestos y su actividad *in vivo*.
12. La combinación TOMOCOMD-CARDD y DASDE resulta una estrategia eficaz para la confección de sistemas multiclasificadores.
13. La robustez y poder predictivo de los modelos se ratifica en los métodos de validación.
14. En los estudios QSAR/ADL es primordial definir de antemano los criterios que determinen la elaboración de la BD.
15. La baja representación en la BD de las moléculas evaluadas *in silico*, supone un punto crítico en su correcta clasificación por los modelos de predicción.

RESUMO

Identificação e otimização de potenciais alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma parasitose endêmica em 21 países da América Latina, onde é trasmitida pelas fezes contaminadas de vetores triatomíneos. Nas áreas endémicas, a doença de Chagas gera mais de 7.000 mortes por ano e cerca de 25 milhões de pessoas estão em risco de contrair a infecção. Classificada pela OMS como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas, atinge principalmente as populações mais desfavorecidas de zonas rurais. Porém, em decorrência do fluxo imigratório de portadores e da existência de vias de transmissão alternativas como a transfusional ou a congênita, a doença de Chagas tem emergido em países como os Estados Unidos, a Austrália ou a Espanha, sendo estimado que haja mais de 7 milhões de pessoas infectadas no mundo.

A fase aguda inicia-se logo após a infecção e exibe baixa mortalidade (<10%), normalmente associada à falência cardíaca e/ou meningoencefalite. Na maioria dos casos é assintomática/oligosintomática e se resolve espontáneamente. Após 1–2 meses, a resposta imune controla a infecção, mas não a erradica. Assim, 60–70% dos portadores nunca a manifesta (fase indeterminada). No entanto, após 10–30 anos, 30–40% restante desenvolve a fase crónica com alterações cardíacas e/ou digestivas (megaesofago e megacôlon).

Mais de um século depois da sua descoberta, a doença não dispõe de fármacos satisfatórios para o tratamento, que é baseado em dois nitroderivados introduzidos há mais de 40 anos: benznidazol (BZ) e nifurtimox, recomendados nos casos agudos e crónicos recentes, mas que apresentam limitações na fase crônica tardia. A controvertida eficácia, alta toxicidade e ocorrência de cepas do *T. cruzi* resistentes, afeta o sucesso destas terapias. Assim, um dos principais desafios a serem enfrentados na pesquisa da doença de Chagas é a identificação de alternativas terapêuticas com potencial aplicação no tratamento, **objetivo principal** desta tese. Para sua abordagem, se perseguiram três **objetivos específicos**:

1. Identificação de potenciais agentes quimioterápicos dentre várias séries de síntese, através de um protocolo sequencial de triagem integrado por ensaios *in vitro* e *in vivo.*
2. Preparação e avaliação biológica de novas formulações de BZ e outros compostos de baixa solubilidade aquosa para otimizar suas propriedades físico-químicas e eficácia.
3. Desenvolvimento de novos modelos QSAR/ADL e posterior análise da sua aplicabilidade como ferramenta de apoio à identificação de compostos tripanocidas.

O **primeiro objetivo** consiste na avaliação através de ensaios fenotípicos da atividade de 191 moléculas, tais como derivados de 5-nitroindazol, 2,4-diaril-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, derivados de cloroquinolina, 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazinas,

quelantes, cromenoazoldionas e alquil-lisofosfolípido edelfosina. Para a identificação de compostos ativos, se seguiu o seguinte protocolo de triagem: (i) ensaios em epimastigotas da cepa CL-B5 *lacZ* (DTU TcVI) e de citotoxicidade em células de mamífero, (ii) ensaios em amastigotas intracelulares daqueles que foram mais seletivos do que BZ e (iii) análise dos mais eficazes sobre um modelo murino de infecção aguda pelo *T. cruzi*. Os **resultados** indicam os derivados de 5-nitroindazol como os compostos mais ativos, tendo sido as 2-bencil-5-nitroindazolinonas os mais promissores. Estes achados levaram à avaliação de **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR81**, **VATR99**, **VATR100** e **VATR102** sobre amastigotas das cepas Tulahuen *lacZ* (DTU TcVI) e Y (DTU TcII), além de sobre tripomastigotas sanguíneas (cepa Y). O comportamento destas 5-nitroindazolinonas contra parasitas intracelulares de cepas sensíveis e de moderada resistência foi semelhante, atingindo **VATR75**, **VATR99** e **VATR100** atividades (CI_{50} = 0,22–0,81 μM, 0,25–0,47 μM e 0,71–1,25 μM, respectivamente) similares à do BZ (CI_{50} = 0,50–1,77 μM). Porém, estas moléculas não foram tão ativas contra tripomastigotas, possivelmente frente a um distinto modo de ação nas formas proliferativas (amastigotas e epimastigotas) e não proliferativas (tripomastigotas). Análise orientadas à elucidação dos mecanismos relacionados à ação de **VATR1** e **VATR3** em tripomastigotas, apontaram processos de autofagia e alterações mitocôndriais. Por outro lado, ensaios *in vivo* com vários esquemas terapêuticos de **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR99** e **VATR100**, revelaram diferenças quanto à redução da parasitemia e sobrevida dos animais infectados, a depender do derivado e posologia. Finalmente, mesmo que nenhuma das outras séries fosse tão ativa como os 5-nitroindazóis, os promissorios resultados obtidos com as tetrahidroquinolinas **AR39**, **AR40**, **AR41**, **AR91** e **DM15**, e com a cloroquinolina **7**, permitem propoê-las como candidatas a serem otimizadas para desenvolvimento de potenciais agentes anti-*T. cruzi.* A edelfosina mostrou uma atividade para se considerar em estudos futuros.

O **segundo objetivo** aborda o desenvolvimento de dispersões sólidas (DS) visando promover o perfil de dissolução de compostos de baixa solubilidade aquosa mediante optimização das propriedades físico-químicas e consequentemente, aumentar a eficacia. Os resultados das DS de BZ em desoxicolato sódico (NaDC) mostraram uma correlação entre presença de NaDC e resposta em pH fisiológico. Contudo, proporções elevadas diminuiram o perfil de dissolução em ambientes ácidos e portanto, as DS-1:3 e DS-1:6 não aumentaram a eficácia do BZ na administração oral em camundongos infetados (%AUPC = 95,27, 91,93 e 83,14%, respectivamente). Melhores resultados obteve a DS em hidroxipropilcelulose de baixo peso molecular (L-HPC), atingindo um perfil de dissolução mais rápido e %AUPC = 96,65%. Alías, a L-HPC foi selecionada para desenvolver DS de dois 5-nitroindazolinonas, resultando incremento nos perfís de dissolução e eficácia: %AUPC = 53,80, 82,85 e 81,05% (**VATR1**, DS-1:2,5 e DS-1:10) e %AUPC = 24,25, 61,12 y 85,42% (**VATR3**, DS-1:2,5 e DS-1:10).

O **terceiro objetivo** conta com a elaboração de uma base de dados (BD), constituida inicialmente por 1.308 compostos, como primeiro passo para construção de modelos

QSAR/ADL a partir dos descritores moleculares TOMOCOMD-CARDD, combinados através do DASDE em sistemas multiclassificadores (SMC) baseados na diversidade e estadística. Os **resultados** da validação confirmaram a robustez e poder preditivo dos modelos. Quanto à série de treinamento, os SMC mostraram melhor percentagem de classificação e razão de alarme falso do que os modelos que os compõem. No entanto, as discretas diferenças nos parámetros estadísticos das séries de treinamento e predição, previram um comportamento semelhante dos SMC na triagem virtual (TV). De fato, os resultados do TV de 148 moléculas discordaram com aqueles obtidos previamente *in vitro*. A baixa representação na série de treinamento de ativos e a semelhança estrutural entre compostos ativos e inativos influíram negativamente no TV, requerendo a retro-alimentação da BD para dirimir tais discrepâncias.

De forma resumida, as principais **conclusões** desta tese são:

1. Os 5-nitroindazóis apresentam notável atividade tripanocida. Dentre estes, as 5-nitroindazolinonas 1,2-disubstituidas foram identificadas como protótipos de agentes antichagásicos.
2. As 5-nitroindazolinonas mais promissoras surgem da introdução do grupo benzila na posição N-2 do anel do indazol.
3. Os derivados de 5-nitroindazol mostram um comportamento diferente sobre as formas proliferativas e não proliferativas do parasita.
4. Estresse oxidativo, afetação mitocondrial e processos de autofagia, são propostos como participantes do modo de ação dos 5-nitroindazóis.
5. A limitada solubilidade aquosa de vários 5-nitroindazóis afeta sua eficacia *in vivo*.
6. Cinco tetrahidroquinolinas apresentam seletividade sobre amastigotas intracelulares.
7. A cloroquinolina **7** se propõe como protótipo para desenvolver agentes anti-*T. cruzi*.
8. As tiadiazinas, quelantes ou cromenoazoldionas não têm atividade notável no *T. cruzi.*
9. Os resultados da edelfosina reafirmam a potencial aplicação dos alquil-lisofosfolípidos como alternativa terapêutica para o tratamento da doença.
10. As DS em NaDC favorecem a atividade do BZ a pH fisiológico, mas concentrações elevadas reduzem a sua dissolução em meio ácido e afetam sua eficácia *in vivo*.
11. As DS em L-HPC melhoram a solubilidade dos compostos e a sua atividade *in vivo*.
12. A combinação dos softwares TOMOCOMD-CARDD e DASDE é uma estratégia eficaz na construção de sistemas multiclassificadores.
13. A robustez e poder preditivo dos modelos é ratificada nos exercícios de validação.
14. Nos estudos QSAR/ADL é primordial estabelecer previamente os criterios que definam a elaboração da BD.
15. A baixa representação na BD das moléculas avaliadas *in silico*, supõe um ponto crítico na sua correta classificação pelos modelos de predição.

INTRODUCCIÓN

"Não vai demorar
que passemos adiante uma grande e bela ciência,
que faz arte em defesa da vida"

- Carlos Chagas -

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

La hipótesis clásica sobre el origen de la enfermedad de Chagas, propone que ésta surgió entre las poblaciones prehistóricas que habitaban los Andes hace aproximadamente 6.000 años, al tiempo que comenzaron a domesticar animales, mudaron sus hábitos sedentarios y se iniciaron en las labores de agricultura (Ferreira *et al*., 2011).

Sin embargo, estudios de paleoparasitología basados en datos de biología molecular, han mostrado que *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas ya se encontraban presentes entre las poblaciones prehistóricas de América del Sur y Norte América mucho antes del mencionado periodo, defendiendo que la irrupción del hombre en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, originariamente zoonótico, probablemente ocurrió paralelamente a su establecimiento en el Continente Americano (Ferreira *et al*., 2011). De hecho, la primera evidencia de infección por *T. cruzi* en humanos fue hallada en momias de hasta 9.000 años de antigüedad procedentes de la cultura Chinchorro, a partir de las que se detectó ADNk mediante técnicas de PCR (Aufderheide *et al*., 2004).

Desde el s. XVI en adelante son varios los informes de médicos y viajeros que describen la presencia de una enfermedad en América Latina, cuyos síntomas recuerdan a los de la enfermedad de Chagas, afectando tanto a las poblaciones indígenas como a los colonizadores (Steverding, 2014).

Asimismo, existen diversos informes sobre triatominos anteriores a que su papel como vector de *T. cruzi* fuese descubierto (Prata *et al*., 2011), de entre los cuales destaca el redactado por Charles Darwin en el año 1835 (Steverding, 2014), donde el naturalista relata:

"[…] At night I experienced an attack (for it deserves no less a name) of the Benchuca (a species of Reduvius) the great black bug of the Pampas. It is most disgusting to feel soft wingless insects, about an inch long, crawling over one's body. Before sucking they are quite thin, but afterwards become round and bloated with blood, and in this state they are easily crushed. […]"

Charles Darwin, 1835.

Este suceso, junto con los problemas de salud que sufre durante más de 40 años y cuya sintomatología, descrita por el propio Darwin en sus cartas, se asemeja a la de la enfermedad de Chagas, ha permitido especular acerca de que una infección por *T. cruzi* fuera la causa de su muerte (Bernstein, 1984), la cual a día de hoy no se encuentra totalmente esclarecida (Campbell y Matthews, 2015).

Sin embargo, el descubrimiento de la enfermedad causada por *T. cruzi* no ocurre hasta iniciado el s. XX de la mano del médico brasileño Carlos Chagas (1879–1934), por aquel entonces dedicado a la investigación y control epidémico de la malaria, y que en el año 1906 comienza a trabajar en el Instituto de Manguinhos (Rio de Janeiro, Brasil) bajo la dirección de Oswaldo Cruz (Bestetti *et al*., 2009).

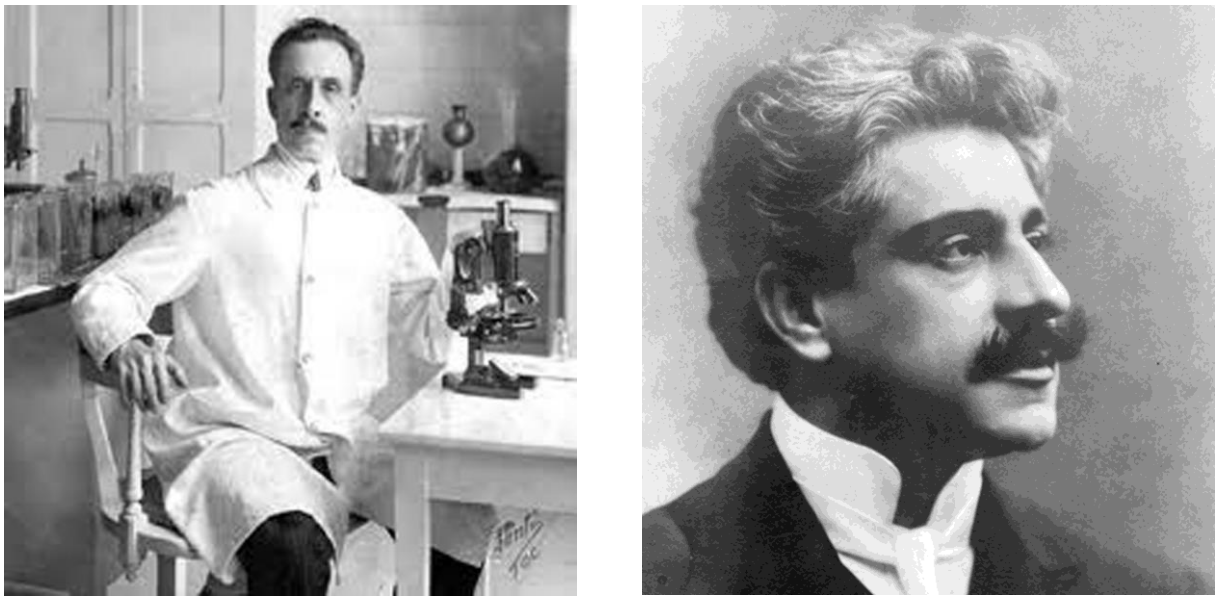


Fig. 1. Izquierda: Carlos Chagas en su laboratorio del Instituto de Manguinhos en Rio de Janeiro. Fuente: Biblioteca virtual Carlos Chagas (www.bvschagas.coc.fiocruz.br). Derecha: Retrato de Oswaldo Cruz en 1903. Fuente: www.portalfiocruz.br.

En el año 1907, enviado por Oswaldo Cruz con el propósito de combatir una epidemia de malaria surgida entre los trabajadores del ferrocarril, Carlos Chagas acude a Lassance (Minas Gerais, Brasil), donde rápidamente diagnostica diversos desórdenes neurológicos y anomalías cardíacas entre la población más joven (Bestetti *et al*., 2009).

Alertado por la presencia en las viviendas rurales de insectos hematófagos popularmente conocidos con el nombre de *barbeiro*, y motivado por su posible papel como vectores de una enfermedad humana, Carlos Chagas lleva a cabo la disección de varios de estos ejemplares encontrando en la parte posterior de su intestino numerosos flagelados con aspecto de crithidias (Chagas, 1909). Con anterioridad a este hallazgo y a partir de la sangre de un primate *(Callithrix penicillata)*, describe un protozoo no patógeno para el hospedador, *Trypanosoma minasense*. Este hecho hace que el investigador envíe algunos *barbeiros* al Instituto de Manguinhos para corroborar la hipótesis de que las crithidias correspondían a formas evolutivas de *T. minasense* que posteriormente eran transmitidas al animal. Una vez probada la transmisión del parásito a primates sanos similares a los de Lassance, Oswaldo Cruz reclama la presencia de Carlos Chagas en Rio de Janeiro, quien

mediante observación directa del protozoo en una muestra de sangre asume que se trata de *T. minasense* (Chagas, 1922). Sin embargo, el exhaustivo análisis morfológico del parásito finalmente revela características nunca antes vistas en otro tripanosoma, descubriéndose de esta manera una nueva especie a finales del año 1908:

"To the new species of trypanosome I gave the name of Trypanosoma cruzi, in honour of my unforgettable leader to whom I owe everything in my scientific career and who in these studies was to me the most broad-minded of counsellers: to the impersonation of scientific capability and kindness, always ready to let me partake of the benefits of his knowledge and to harbor me in the warmth of his friendship."

Carlos Chagas, 1922.

Meses después en Lassance, acude a la consulta médica de Carlos Chagas una niña presentando un cuadro de fiebre elevada, anemia y edemas, así como *T. cruzi* en sangre periférica. El 14 de abril de 1909, Berenice, de 2 años de edad, se convierte en el primer caso verificado de enfermedad de Chagas en humanos (Chagas, 1916a). De esta manera, el médico brasileño describe las características morfológicas y el ciclo biológico de *T. cruzi* en el vector y el hospedador vertebrado, incluido el hombre (Bestetti *et al*., 2009).

Carlos Chagas identifica las fases aguda y crónica de la enfermedad, clasificando erróneamente la segunda en las formas pseudo-mixedematosa, mixedematosa, nerviosa y cardíaca (Chagas, 1911), y ya sugiere la posible intervención de una respuesta autoinmune en la patogénesis de la fase crónica (Bestetti *et al*., 2009). En 1916, señala el carácter asintomático de la infección aguda en adultos y profundiza acerca de la patología cardíaca de la nueva enfermedad (Chagas, 1916a), manifiesta la importancia de los animales domésticos como reservorio de la misma (Bestetti *et al*., 2009) e introduce el concepto de fase indeterminada para abandonar el de formas pseudo-mixedematosa y mixedematosa de la fase crónica, tras relacionar la presencia de mixedema con la infección aguda (Chagas, 1916b). Ese mismo año observa episodios de disfagia en numerosos pacientes (Chagas, 1916a) asociando el "mal de engasgo" con la infección por *T. cruzi* (Bestetti *et al*., 2009). En 1918 identifica al armadillo como hospedador y reservorio natural del parásito (Bestetti *et al*., 2009). Finalmente, en el año 1920 sugiere el bloqueo aurículo-ventricular completo y la fibrilación ventricular como mecanismos responsables de la muerte súbita en la fase crónica y aporta evidencias de que la enfermedad estaba presente en distintos países del Continente Americano (Bestetti *et al*., 2009).

Alcanzado el año 1920, Carlos Chagas había descrito el agente etiológico, vector, reservorio natural, los aspectos clínicos de ambas fases con especial atención a la patología cardíaca, la potencial intervención de la autoinmunidad en la patogénesis de la fase crónica e identificado la amplia distribución de la enfermedad en el Continente Americano. Por todo

ello, la nueva enfermedad fue reconocida internacionalmente como enfermedad de Chagas (Bestetti *et al*., 2009).

En los años posteriores al descubrimiento de la enfermedad de Chagas, diversos investigadores contribuyen con sus trabajos a sentar las bases de su conocimiento. Entre ellos, Arthur Neiva inicia en 1910 los estudios acerca de la biología de los vectores y Gaspar Vianna identifica en el año 1911 la forma intracelular de *T. cruzi*. En 1912, Brumpt describe que la infección ocasionada por *T. cruzi* ocurría de manera natural a través de las heces contaminadas del vector y desarrolla el xenodiagnóstico en 1914. Por su parte, Guerreiro y Machado ponen a punto en 1913 un test de fijación del complemento para el diagnóstico serológico de la enfermedad, mientras que un año más tarde, Mayer y Rocha-Lima aclaran diversos aspectos de la anatomía patología y de la evolución del parásito en los tejidos. Ya en los años 30, Salvador Mazza describe más de un centenar de casos de la enfermedad en Argentina, siendo además el primero en proponer la vía transfusional como posible ruta de transmisión alternativa. En esa misma década, Cecilio Romaña identifica el edema palpebral que recibe su nombre (signo de Romaña) como puerta de entrada de la infección aguda (Velasco-Castrejón y Rivas-Sánchez, 2008; Coura y Dias, 2009; Steverding, 2014).

1.2. EL PARÁSITO

1.2.1. Taxonomía

La clasificación que muestra la Fig. 2 sitúa a *T. cruzi* como protozoo flagelado perteneciente al filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora y clase Zoomastigophorea. Dentro de esta clase, la presencia de kinetoplasto coloca al parásito en el orden Kinetoplastida, formando parte de la familia Trypanosomatidae. Sin embargo, de acuerdo con Cavalier-Smith (2009), *T. cruzi* se encuadra taxonómicamente de la siguiente manera: dominio Eukaryota – reino Protozoa – subreino Eozoa – infra-reino Euglenozoa – filo Euglenozoa – clase Kinetoplastea – orden Trypanosomatida – familia Trypanosomatidae.

El género *Trypanosoma*, cuyo nombre procede del griego *trypanon* (barrena) y *soma* (cuerpo), se divide a su vez en dos secciones según su comportamiento en el hospedador invertebrado: (i) la sección Salivaria, que comprende aquellos tripanosomas cuyas formas infectivas se transmiten mediante la saliva del vector y (ii) la sección Stercoraria cuyas especies, como *T. cruzi*, completan su ciclo biológico en el intestino posterior del hospedador invertebrado, siendo las formas infectivas liberadas junto con las heces del insecto. Dentro de la sección Stercoraria, aquellos tripanosomas que se multiplican en el hospedador vertebrado mediante estadios intracelulares forman parte del subgénero *Schizotrypanum*, entre los que se encuentra el agente causal de la enfermedad de Chagas.

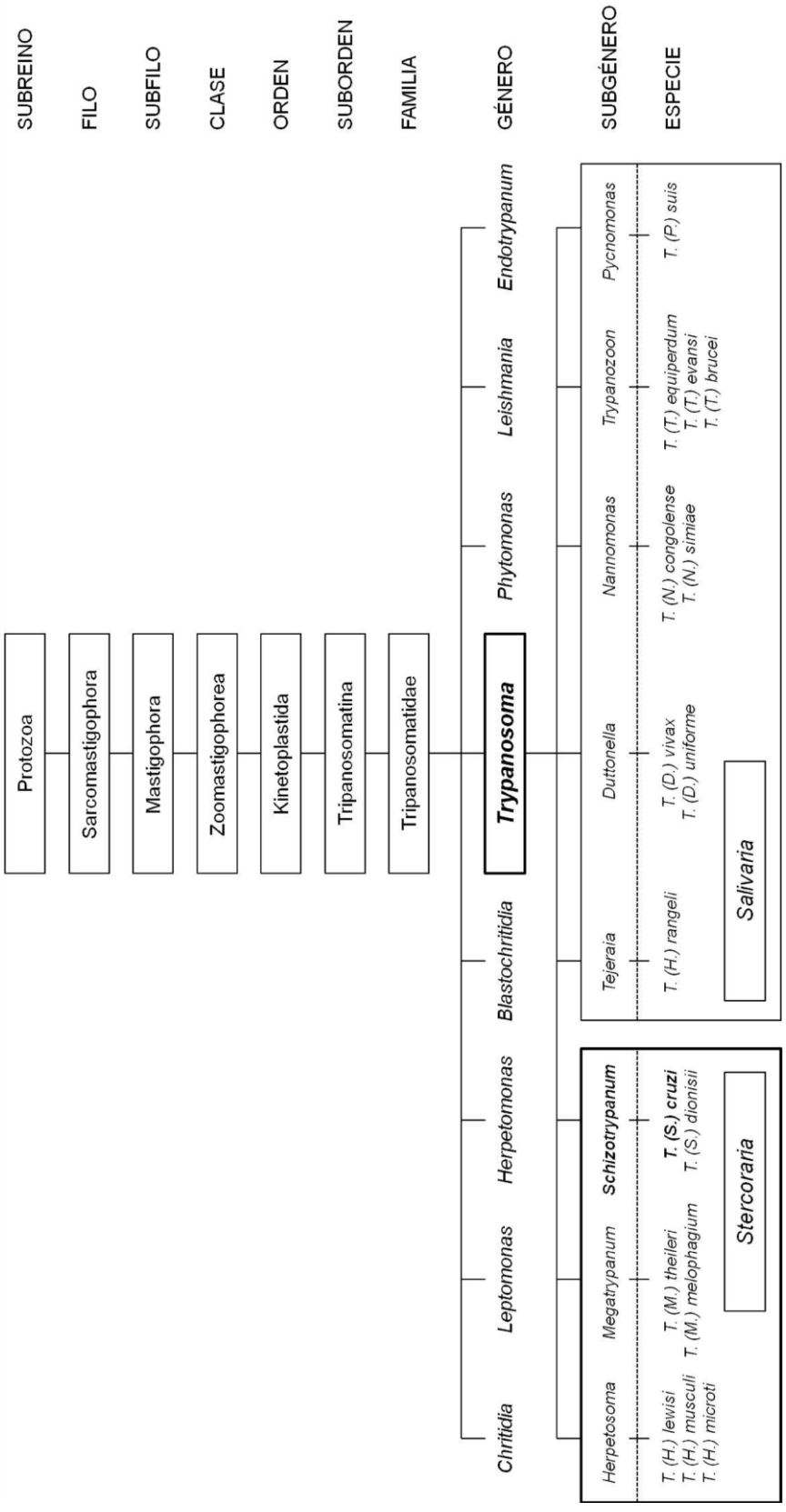


Fig. 2. Clasificación de los tripanosomas de mamíferos. Fuente: esquema adaptado del propuesto en *Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del Comité de Expertos de la OMS* (OMS, 2002).

1.2.2. Nomenclatura subespecífica: DTU *(discrete typing units)*

La gran diversidad biológica, bioquímica y genética que existe entre las distintas cepas de *T. cruzi*, junto con sus diferentes características ecoepidemiológicas, ha desembocado en numerosos esfuerzos para caracterizar su estructura poblacional, habiéndose organizado en diferentes subgrupos a lo largo de los años: zimodemas, esquizodemas, biodemas, clonets, linajes, clados y más recientemente, DTU *(discrete typing units)* (Zingales *et al*., 2009).

El término *discrete typing unit* fue propuesto por Tibayrenc en 1998 para describir un conjunto de aislados que son genéticamente más similares entre sí que a otros aislados de otros grupos, siendo además fácilmente identificables mediante marcadores moleculares comunes (Tibayrenc, 1998). En el año 2009 con el propósito de estandarizar la nomenclatura subespecífica de *T. cruzi*, se estableció un consenso por el cual se recomienda que todos los aislados y cepas conocidas sean asignadas a uno de los seis DTU (TcI–TcVI) en los que fue reagrupada. La Tabla 1 recoge algunas de estas cepas y su designación al DTU correspondiente (Zingales *et al*., 2009). Por otra parte, la Tabla 2 y la Fig. 3 muestran un resumen del ecotopo, hospedador, vector y enfermedad de Chagas asociada a cada DTU; así como la distribución geográfica de los mismos (Zingales *et al*., 2012).

Tabla 1. Cepas representativas de *T. cruzi* y DTU al que pertenecen (Zingales *et al*., 2009).

Cepa [a]	DTU	País	Hospedador / vector
12 SF	*T. cruzi* II	Bahia, Brasil	*Homo sapiens*
21 SF	*T. cruzi* II	Bahia, Brasil	*Homo sapiens*
3663	*T. cruzi* III	Amazonas, Brasil	*Panstrongylus geniculatus*
3869	*T. cruzi* III	Amazonas, Brasil	*Homo sapiens*
4167	*T. cruzi* IV	Amazonas, Brasil	*Rhodnius brethesi*
4182	*T. cruzi* III	Amazonas, Brasil	*Rhodnius brethesi*
92.80 cl2	*T. cruzi* V	Santa Cruz, Bolivia	*Homo sapiens*
92101601P cl1	*T. cruzi* I	Georgia, USA	*Didelphis marsupialis*
92122102R	*T. cruzi* IV	Georgia, USA	*Procyon lotor*
Bug2148 cl1	*T. cruzi* V	Rio Grande do Sul, Brasil	*Triatoma infestans*
Bug2149 cl10	*T. cruzi* V	Rio Grande do Sul, Brasil	*Triatoma infestans*
CA-1	*T. cruzi* I	Argentina	*Homo sapiens*
CanIII cl1	*T. cruzi* IV	Pará, Brasil	*Homo sapiens*
CL	*T. cruzi* VI	Rio Grande do Sul, Brasil	*Triatoma infestans*
CL Brener [b]	*T. cruzi* VI	Rio Grande do Sul, Brasil	*Triatoma infestans*
CM17	*T. cruzi* III	Meta, Colombia	*Dasypus sp.*
Colombiana	*T. cruzi* I	Colombia	*Homo sapiens*
Cuica cl1	*T. cruzi* I	São Paulo, Brasil	*Philander opossum*
Cutia cl1	*T. cruzi* I	Espírito Santo, Brasil	*Dasyprocta aguti*
Davis 9.90	*T. cruzi* I	Tegucigalpa, Honduras	*Triatoma dimidiata*

Tabla 1. Continuación.

Dm28c [c]	*T. cruzi* I	Carabobo, Venezuela	*Didelphis marsupialis*
Dm7	*T. cruzi* I	Casanare, Colombia	*Didelphis marsupialis*
Dog Theis [d]	*T. cruzi* IV	Oklahoma, USA	*Canis familiaris*
Esmeraldo cl3	*T. cruzi* II	Bahia, Brasil	*Homo sapiens*
G	*T. cruzi* I	Amazonas, Brasil	Opossum
Gambá cl1	*T. cruzi* I	São Paulo, Brasil	*Didelphis azarae*
IVV cl4	*T. cruzi* II	Cuncumen, Chile	*Homo sapiens*
JEM C	*T. cruzi* I	Boyacá, Colombia	*Homo sapiens*
José	*T. cruzi* I	Paraíba, Brasil	*Homo sapiens*
K-98 [e]	*T. cruzi* I	Argentina	*Homo sapiens*
M5631 cl5	*T. cruzi* III	Pará, Brasil	*Dasypus novemcinctus*
M6241 cl6	*T. cruzi* III	Pará, Brasil	*Homo sapiens*
MAS cl1	*T. cruzi* II	Minas Gerais, Brasil	*Homo sapiens*
MN cl2	*T. cruzi* V	Región IV, Chile	*Homo sapiens*
NR cl3	*T. cruzi* V	Salvador, Chile	*Homo sapiens*
P63 cl1	*T. cruzi* VI	Makthlawaiya, Paraguay	*Triatoma infestans*
PALC	*T. cruzi* I	Casanare, Colombia	*Rhodnius prolixus*
Peruana	*T. cruzi* II	Perú	*Homo sapiens*
RA	*T. cruzi* VI	Argentina	*Homo sapiens*
Sc43 cl1	*T. cruzi* V	Santa Cruz, Bolivia	*Triatoma infestans*
SO3 cl5	*T. cruzi* V	Potosi, Bolivia	*Triatoma infestans*
Sylvio [f] X10 cl1	*T. cruzi* I	Pará, Brazil	*Homo sapiens*
Td11C	*T. cruzi* I	Boyacá Colombia	*Triatoma dimidiata*
Tu18 cl1	*T. cruzi* II	Tupiza, Bolivia	*Triatoma infestans*
Tulahuen	*T. cruzi* VI	Tulahuen, Chile	*Homo sapiens*
Tulahuen cl2	*T. cruzi* VI	Tulahuen, Chile	*Homo sapiens*
X10/1 [g]	*T. cruzi* I	Pará, Brasil	*Homo sapiens*
X109/2	*T. cruzi* III	Makthlawaiya, Paraguay	*Canis familiaris*
Y	*T. cruzi* II	São Paulo, Brasil	*Homo sapiens*
YuYu	*T. cruzi* I	Minas Gerais, Brasil	*Triatoma infestans*

[a] cl indica que es un clon derivado del aislado original. [b] CL Brener es un clon derivado de la cepa CL. [c] Dm28c es un clon derivado de la cepa Dm28. [d] En ocasiones referida como DogT o DogTh. [e] Clon de la cepa CA-1. [f] Comúnmente referida como Sylvio. [g] Igual que Sylvio X10 cl1 (Sylvio).

De los seis DTU, TcI es el más abundante y el que se encuentra más ampliamente distribuido (Zingales *et al*., 2012). Todos resultan infectivos para el hombre, siendo las infecciones provocadas por TcIII y TcIV las menos frecuentes en humano (Zingales *et al*., 2012, 2014). No obstante, no se ha establecido una clara relación entre los distintos DTU y la presentación clínica de la enfermedad. Mientras que TcI, TcII, TcV y TcVI son los principales causantes de infección humana provocando cardiomiopatía, tan sólo TcII, TcV y TcVI han sido asociados con la enfermedad crónica digestiva (Zingales *et al*., 2012).

Tabla 2. Resumen de las principales características asociadas a cada DTU [a] (Zingales *et al*., 2012).

DTU	Ecotopo / nicho	Hospedador [b]	Vector [b]	Geografía [c]	Enfermedad
TcI	Primario: arbóreo, palmeras. Secundario: árido, rocoso, terrestre en la Amazonia	Primario: arbóreo, semi-arbóreo; especialmente *Didelphis* y otros didélfidos, roedores arbóreos, primates, *Tamandua.* Secundario: roedores terrestres	Primario: *Rhodnius.* Secundario: *Panstrongylus, Triatoma, Eratyrus*	Sur, Centro y Norte América	Cardiomiopatía en el Norte de la Amazonia, esporádicamente en el Cono Sur
TcII	Incompletamente conocido; raro en ciclos selváticos	Incompletamente conocido: primates de bosque Atlántico, didélfidos, *Euphractus* (Paraguay)	Incompletamente conocido: (Triatomini)	Cono Sur, más esporádico en el Norte	Cardiomiopatía y megasídromes en la zona Atlántica y Central de Brasil
TcIII	Terrestre fosorial	Armadillos, especialmente *Dasypus, Chaetophractus, Euphractus; Didelphids, Monodelphis*	*P. geniculatus*	América del Sur	Rara en humanos (también en perros domésticos). Casos agudos en la Amazonia. Presentación clínica poco conocida
TcIV	Arbóreo y algunos hospedadores terrestres en Norte América	Primates, *Nasua nasua*	*Rhodnius, Panstrongylus, Triatoma*	Norte y Sudamérica	Causa secundaria de enfermedad de Chagas en Venezuela, esporádica en otros lugares de Sudamérica
TcV	Raro en ciclos selváticos	Incompletamente conocido: *Dasypus, Euphractus, Octodon*	Incompletamente conocido	Cono Sur, Gran Chaco, extremo Sur de Brasil	Cardiomiopatía y megasíndromes en el Cono Sur
TcVI	Raro en ciclos selváticos	Incompletamente conocido	Incompletamente conocido	Cono Sur, Gran Chaco	Cardiomiopatía y megasíndromes en el Cono Sur

[a] Las asociaciones con el ecotopo, hospedador y vector no son exclusivas. [b] Se refieren al hospedador y vector selváticos. [c] Consultar distribución geográfica en la Fig. 3.

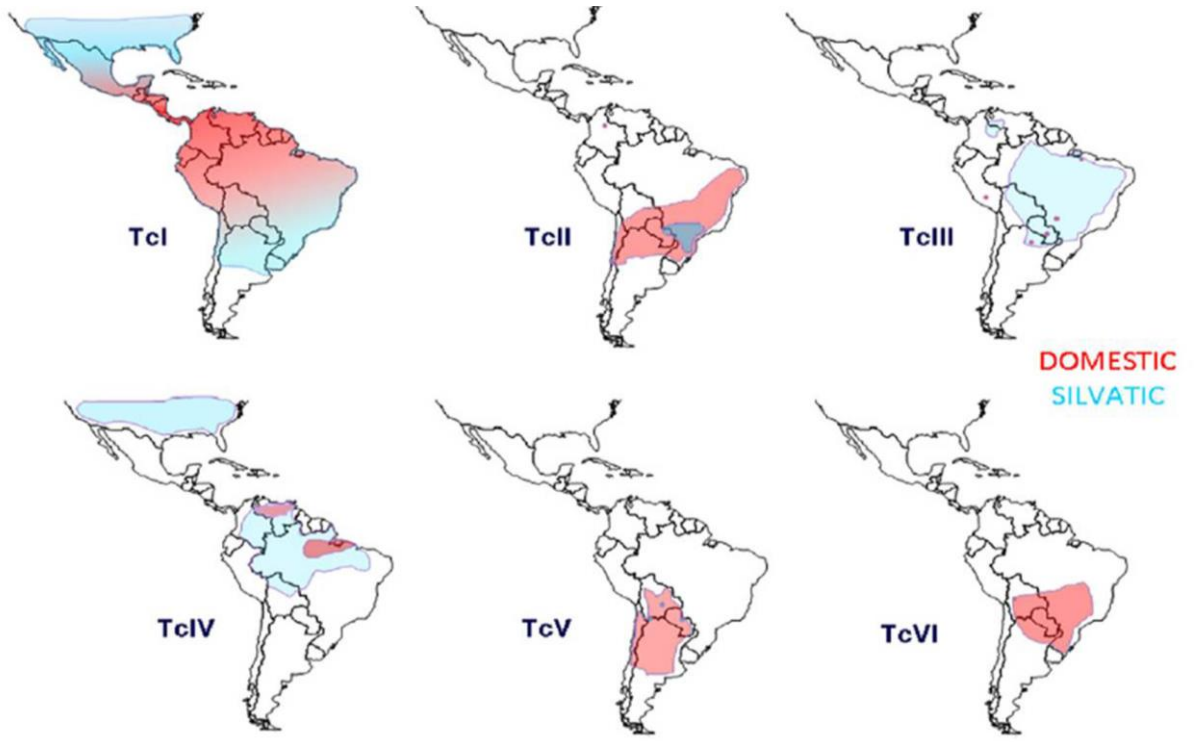


Fig. 3. Distribución geográfica aproximada de los DTU de *T. cruzi* (TcI–TcVI) en sus ciclos de transmisión selvático y doméstico. Fuente: Zingales *et al*. (2012).

Cabe mencionar la existencia de Tcbat, genotipo independiente a los anteriores y ampliamente distribuido en murciélagos (Zingales *et al*., 2012), del que recientemente se ha comunicado en Colombia el primer caso humano (Ramírez *et al*., 2014). La hipótesis *bat-seeding* sugiere como ancestro común del parásito, tripanosomas de murciélagos que invadieron animales terrestres en el Continente Americano, se adaptaron a la transmisión por triatominos y dieron origen a *T. cruzi*. El origen, relación entre los distintos DTU y la hipótesis de Tcbat como ancestro común continúa siendo discutida (Lima *et al*., 2015).

1.2.3. Morfología

1.2.3.1. Tipos morfológicos

A lo largo de su ciclo biológico, los protozoos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae presentan varios tipos morfológicos, encontrándose éstos claramente diferenciados en el caso de *T. cruzi* (Fig. 4).

Los epimastigotes (Fig. 4A), de 20–40 μm de longitud, presentan forma alargada y en ellos el kinetoplasto se localiza en posición anterior al núcleo. Esta forma extracelular de *T. cruzi* posee capacidad de división y se encuentra de manera natural en el intestino del vector, estando también presente en cultivos en fase de crecimiento exponencial (de Souza, 2002).

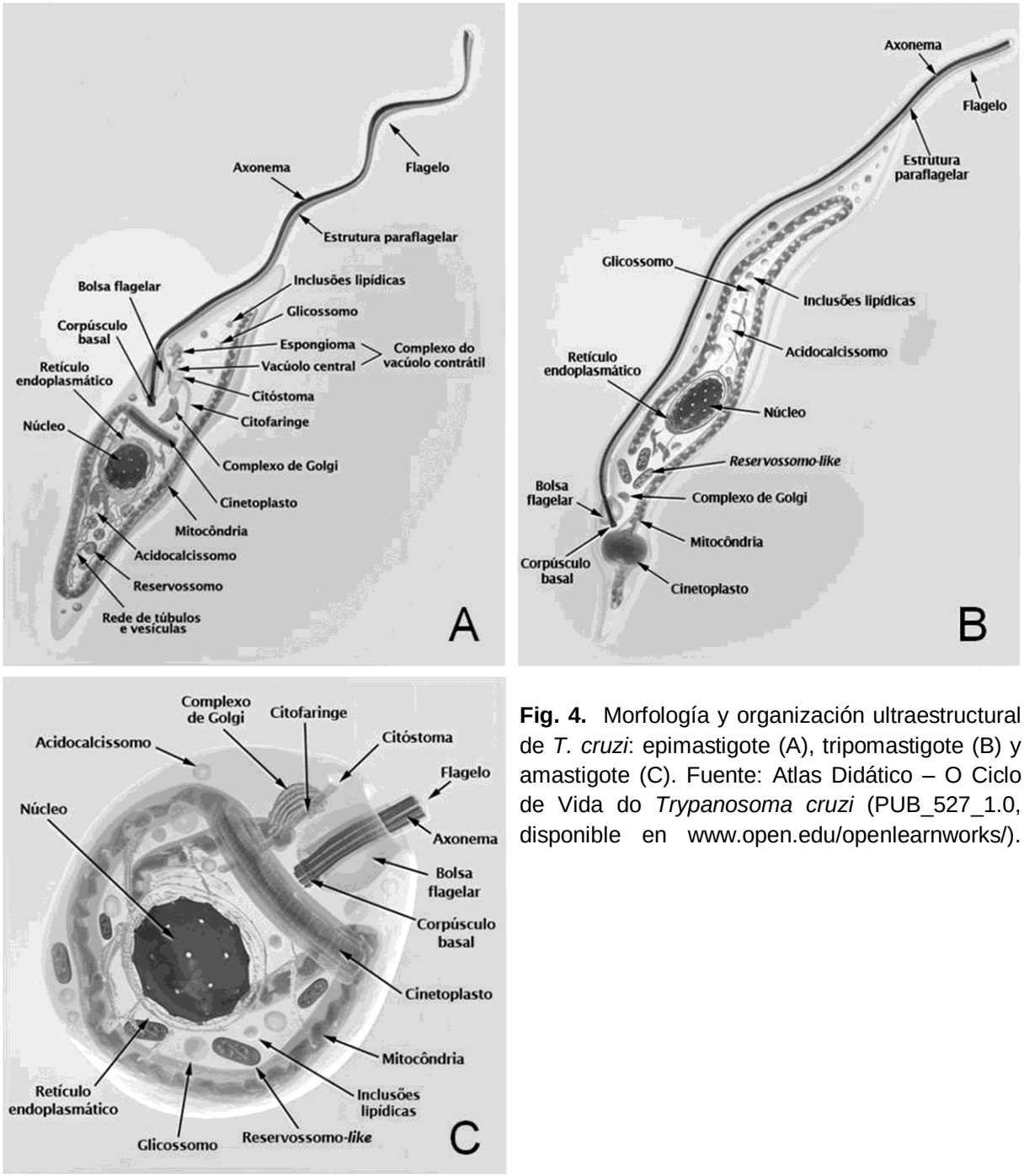


Fig. 4. Morfología y organización ultraestructural de *T. cruzi*: epimastigote (A), tripomastigote (B) y amastigote (C). Fuente: Atlas Didático – O Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi* (PUB_527_1.0, disponible en www.open.edu/openlearnworks/).

En los tripomastigotes (Fig. 4B), el kinetoplasto se sitúa en la zona posterior al núcleo. Con una longitud aproximada de 25 μm, son formas extracelulares incapaces de dividirse que se encuentran a nivel del intestino posterior, heces y orina del vector, así como en la sangre y células del hospedador vertebrado (de Souza, 2002). En la sangre del hospedador vertebrado, los tripomastigotes constituyen una población pleomórfica en la que se diferencian formas *slender* y formas *broad* (tripomastigotes delgados y gruesos, respectivamente) cuya proporción varía dependiendo de la cepa (Tyler y Engman, 2001). Los tripomastigotes también pueden observarse en cultivos de *T. cruzi* que han alcanzado la

fase estacionaria de crecimiento, así como en el sobrenadante de cultivos celulares infectados (de Souza, 2002).

Los amastigotes (Fig. 4C) son la forma redondeada e intracelular de *T. cruzi*. Presentan un diámetro aproximado de 3 a 5 μm, capacidad de división y un flagelo muy corto albergado en el interior de la bolsa flagelar (de Souza, 2002).

1.2.3.2. Características estructurales

Desde un punto de vista morfológico, la superficie celular de los tripanosomátidos está constituida por el glucocáliz y la bicapa lipídica. Asimismo, en la membrana plasmática se distinguen tres macrodominios diferenciados correspondientes al cuerpo celular, flagelo y bolsa flagelar. En ellos a su vez se aprecian diversos microdominios especializados como el collar flagelar (en la porción basal del flagelo), la zona de unión del flagelo al cuerpo celular y el citostoma. El citostoma consiste en una invaginación de la membrana plasmática continuada por microtúbulos subpeliculares, que se origina en la porción anterior de la célula y se proyecta a través de la citofaringe hacia la zona posterior, desde donde alcanza la región del núcleo. Ausente en las formas tripomastigote, participa junto con la bolsa flagelar en los procesos de endocitosis que llevan a cabo los epimastigotes (de Souza, 1999, 2009).

En flagelo se encuentra involucrado en al menos dos procesos biológicos de especial importancia: movimiento de la célula y adhesión del protozoo a la superficie (de Souza, 1999). En el cuerpo basal, parte proximal e intracitoplasmática desde la que se origina el flagelo, los microtúbulos se disponen formando nueve tripletes periféricos (Gadelha *et al*., 2006). A continuación, el flagelo se proyecta sobre la bolsa flagelar donde el axonema adquiere la típica estructura 9 + 2 (nueve pares de microtúbulos periféricos dispuestos de manera simétrica en torno a un par central). A su vez, a lo largo del flagelo y unido al axonema a través de cuatro de los nueve pares externos (dobletes 4–7) se sitúa la estructura paraflagelar (de Souza, 2002), de composición proteica y vital para la motilidad del parásito (Kohl y Bastin, 2005), ausente en las formas amastigote (Portman y Gulh, 2010). Cuando el flagelo se mueve, la onda se propaga a lo largo de toda su estructura hasta alcanzar la zona de unión al cuerpo celular, induciendo un movimiento aparente que genera la impresión de una membrana ondulante (de Souza, 2002).

El citoesqueleto está constituido por un armazón de microtúbulos subpeliculares dispuestos longitudinalmente y paralelos entre sí a una distancia constante de 44 nm, fuertemente asociados a la membrana plasmática. Los microtúbulos subpeliculares de distribuyen a lo largo de la periferia del cuerpo celular del parásito, exceptuando la región que constituye la bolsa flagelar (de Souza, 2009).

T. cruzi presenta una única mitocondria muy ramificada que se extiende ocupando la práctica totalidad del cuerpo celular. En la matriz mitocondrial se localiza el kinetoplasto,

una condensación de ADN extranuclear (ADNk) próxima al núcleo y situada bajo la base del flagelo, cuya forma varía con los distintos tipos morfológicos: en los epimastigotes (Fig. 4A) y amastigotes (Fig. 4C) adquiere forma de bastón con el ADNk más compactado, mientras que en los tripomastigotes es redondeado y con el ADNk más disperso (Fig. 4B). El ADNk supone aproximadamente el 30% del ADN celular y se encuentra constituido por una red de 20.000–30.000 minicírculos con un tamaño comprendido entre 0,2–2,5 kb y por unas pocas docenas de maxicírculos de 20–40 kb (de Souza, 1999, 2009).

El glicosoma es una estructura esférica de matriz homogénea rodeada por una membrana simple. Inicialmente fue incluido en el grupo de los peroxisomas por ser análogo a las estructuras presentes en células de mamífero que albergan catalasas. Sin embargo, dado que en los tripanosomátidos digenéticos los glicosomas no contienen catalasas, fueron finalmente considerados como un tipo especial de peroxisomas (de Souza, 2002). La principal característica de este orgánulo reside en la concentración y compartimentalización de las enzimas involucradas en la glucólisis, a diferencia de otras células donde ésta tiene lugar en el citosol (de Souza, 1999, 2009). Asimismo, existen evidencias de varias rutas metabólicas que también ocurren en el glicosoma de los tripanosomátidos, como la biosíntesis de pirimidinas o la vía de salvamento de purinas (de Souza, 2009).

Otro orgánulo a destacar es el acidocalcisoma, implicado en diversas funciones como el almacenamiento de calcio, magnesio, sodio, potasio, cinc y fósforo (en forma de pirofosfato y polifosfato); la homeostasis del pH y la osmorregulación, estando este último proceso controlado en asociación con la vacuola contráctil (de Souza, 2002, 2009).

En la región posterior de los epimastigotes se distiguen los reservosomas (Fig. 4A), estructuras esféricas con una membranana simple y cuya matriz está fundamentalmente constituida por proteínas e inclusiones lipídicas. En ellos se acumulan las macromoléculas ingeridas por el parásito en el proceso de endocitosis y desaparecen progresivamente en su transformación a tripomastigotes. Asimismo, en los epimastigotes los reservosomas acumulan cruzipaína, principal cisteín proteasa de *T. cruzi* (Cunha-e-Silva *et al*., 2006).

Otras estructuras esféricas presentes en el citoplasma de *T. cruzi* son las inclusiones lipídicas, de tamaño variable y rodeadas por una monocapa de fosfolípidos. Además de estas estructuras, en *T. cruzi* se distinguen otras típicas de eucariotas como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, ribosomas y vacuolas (de Souza, 2002).

1.3. EL VECTOR

Los triatominos representan una subfamila dentro de la familia Reduviidae, definida en base a sus hábitos hematófagos y características morfológicas. Actualmente existen más de 140 especies reconocidas, habitualmente agrupadas en 15 géneros y 5 tribus (Schofield y Galvão,

2009), en su mayoría selváticas y asociadas a una gran variedad de hospedadores vertebrados, particularmente mamíferos constructores de nidos y aves. Otros triatominos ocupan hábitats peridomésticos como gallineros y corrales, mientras que sólo unos pocos han completado el proceso de adaptación a ambientes domésticos, donde cumplen un importante papel como vectores de la enfermedad de Chagas (Schofield *et al*., 1999).

Entre las especies domiciliares, encontramos varias pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* (Fig. 5), destacando como principales vectores, debido a su importancia epidemiológica, *T. infestans*, *P. megistus* y *R. prolixus* (Rassi *et al*., 2010; Bellini *et al*., 2012).



Fig. 5. Triatominos de la familia Reduviidae, potenciales vectores de la enfermedad de Chagas. De izquierda a derecha: *T. sordida, T. infestans, T. pseudomaculata, P. megistus, T. brasiliensis, T. dimidiata y R. prolixus.* Fuente: Bellini *et al*. (2012).

Durante su desarrollo, los triatominos presentan cinco estadios ninfales además de adultos de ambos sexos, todos ellos hematófagos y potenciales transmisores de *T. cruzi* (Kollien y Schaub, 2000; Rassi *et al*., 2010). La probabilidad de que un triatomino se encuentre infectado aumenta de acuerdo con sus ingestas de sangre, siendo los estadios más desarrollados y adultos los que muestran mayor tasa de infección (Rassi *et al*., 2010).

1.4. CICLO BIOLÓGICO

T. cruzi presenta un ciclo biológico indirecto, que comienza cuando los tripomastigotes metacíclicos presentes en las heces del vector entran en contacto con lesiones en la piel y mucosas del hospedador vertebrado (Fig. 6). Estas formas son capaces de invadir una gran variedad de células nucleadas, tanto fagocíticas como no fagocíticas, mediante la formación de una vacuola parasitófora donde comienza su transformación a amastigotes, para posteriormente escapar al citoplasma, completar el proceso y multiplicarse. En el interior de las células, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes esbeltos *(slender)* a través de una forma intermedia *epimastigote-like* (Faucher *et al*., 1995; Almeida-de-Faria *et al*., 1999). A continuación, escapan de la célula tras su ruptura e invaden otras células adyacentes, o se diseminan por el torrente sanguíneo pudiendo incluso diferenciarse extracelularmente. Esta

diferenciación de los tripomastigotes esbeltos a nivel extracelular provoca un incremento de formas gruesas *(broad)* y de amastigotes extracelulares en sangre periférica (Tyler y Engman, 2001). Debido a su capacidad para infectar células, principalmente fagocíticas, estos amastigotes junto con los liberados en una ruptura prematura de la célula, contribuyen en la propagación de la infección en el hospedador vertebrado (Ley *et al*., 1998).

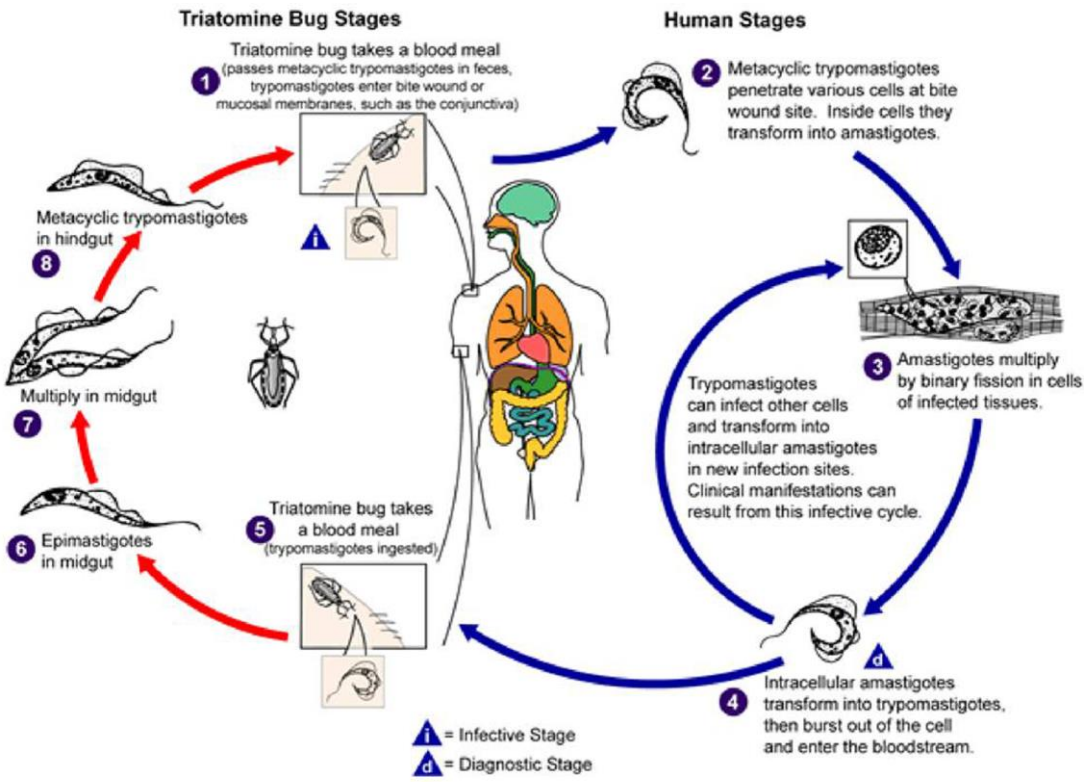


Fig. 6. Ciclo biológico de *T. cruzi*. Fuente: www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html.

Con la ingesta de sangre infectada por el hospedador invertebrado, los parásitos acceden al intestino medio donde los tripomastigotes, previa diferenciación en amastigotes y esferomastigotes, se transforman finalmente en epimastigotes, forma proliferativa del vector (Tyler y Engman, 2001). Una vez alcanzan la parte posterior del intestino, los epimastigotes se adhieren por medio del flagelo a la cutícula rectal y ocurre el proceso de metaciclogénesis en el que se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (Bonaldo *et al*., 1988). Éstos son liberados junto con las heces del vector, completándose así el ciclo biológico de *T. cruzi*.

Por tanto, las tres formas principales de *T. cruzi* (epimastigote, tripomastigote y amastigote) aparecen tanto en el hospedador vertebrado como en el invertebrado a lo largo de su ciclo biológico (Tyler y Engman, 2001). Llegado este punto hay que recordar que en el hospedador vertebrado, la primera se trata de una forma *epimastigote-like* intermedia, observada durante el ciclo intracelular (Faucher *et al*., 1995; Almeida-de-Faria *et al*., 1999).

1.4.1. Desarrollo del ciclo en el hospedador vertebrado

En contacto con el hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos generalmente infectan macrófagos, fibroblastos y otros tejidos en el lugar de la infección primaria. Asimismo, comienzan su diseminación por el torrente sanguíneo para establecer la infección en tejidos distantes al cabo de los 7–10 días posteriores a la inoculación. A pesar de que *T. cruzi* es capaz de infectar prácticamente cualquier célula nucleada, únicamente los tejidos musculares y los nervios entéricos desarrollan una patología aparente que varía en función del tropismo de la cepa (Epting *et al*., 2010).

1.4.1.1. Adhesión a la célula hospedadora

El proceso por el que *T. cruzi* se adhiere a la célula hospedadora supone el reconocimiento de moléculas de superficie, presentes tanto en el parásito como en la célula (Fig. 7). Sin embargo, que la adhesión tenga lugar no siempre conlleva una posterior internalización del parásito, encontrándose ambos procesos claramente diferenciados (de Souza *et al*., 2010).

1.4.1.2. Reconocimiento

o *Moléculas de superficie de* T. cruzi

Las moléculas que *T. cruzi* expresa en su superficie varían con las distintas cepas y formas del parásito, e intervienen en el proceso de invasión celular mediante su interacción con elementos de la célula hospedadora. A continuación se citan las moléculas presentes en la superficie de las formas tripomastigote, representadas de forma esquemática en la Fig. 7:

- Gp90, con actividad glucosidasa, desempeña su acción antifagocítica mediante la retirada de restos de glucosa presentes en la célula necesarios para la internalización del parásito. La unión de gp90 a las células de mamífero inhibe además la movilización de calcio intracelular tanto en la célula como en el parásito, necesaria para la internalización de *T. cruzi*. Por estos motivos es considerada un regulador negativo del proceso de invasión (de Souza *et al*., 2010). Sin embargo, la susceptibilidad que muestran ciertos tipos de gp90 frente a la acción de la pepsina, explica el mantenimiento de la infección en los casos de ingestión accidental de aislados de *T. cruzi* ricos en esta molécula (Yoshida, 2009).
- Las mucinas son las glucoproteínas de superficie mayoritarias en *T. cruzi* y sus residuos de galactosa interaccionan con las células de mamífero, estando muchas de ellas involucradas en el proceso de invasión (de Souza *et al*., 2010).
- Tc85 es una glucoproteína de 85 kD abundante en las formas tripomastigote, que constituye la superfamilia gp85/transialidasa junto con otras proteínas como gp82 y las transialidasas. Esta familia es capaz de unirse a receptores localizados tanto en la

superficie de la célula hospedadora (citoqueratina 18) como formando parte de la matriz extracelular (fibronectina o laminina) (de Souza *et al*., 2010).

- Las moléculas gp82 y gp35/50 también participan en el proceso de invasión celular. Ambas se expresan en la superficie de los tripomastigotes metacíclicos, estando la primera de ellas presente únicamente en dicha forma de *T. cruzi* (de Souza *et al*., 2010). Junto con la fosfolipasa C y el inositol trifosfato (IP3), gp82 interviene en el proceso de señalización celular por el que se activa una tirosina quinasa que fosforila a la proteína p175 y desencadena una movilización de calcio desde el retículo endoplasmático, necesaria para la invasión celular (Epting *et al*., 2010). En los aislados pobres en gp82, gp30 promueve la invasión mediante un mecanismo similar. Sin embargo, la afinidad de gp30 hacia la mucina gástrica es muy inferior a la que muestra gp82, siendo estos aislados menos infectivos por vía oral (Yoshida, 2009). Por su parte, gp35/50 induce una liberación de calcio desde los acidocalcisomas a través de la adenilato ciclasa y el aumento de AMPc (Epting *et al*., 2010). Aunque el proceso de invasión promovido por gp35/50 no es tan efectivo, la resistencia de esta proteína hacia la acción de proteasas gástricas confiere protección a los tripomastigotes metacíclicos frente a su destrucción en la infección por vía oral (de Souza *et al*., 2010).
- Otro grupo de moléculas presentes en los tripomastigotes son las transialidasas, enzimas exclusivas de *T. cruzi* que se encuentran ancladas a su membrana plasmática por medio de glucofosfatidilinositol (GPI) y son liberadas por el parásito al medio extracelular. En lugar de retirar ácido siálico, las transialidasas son capaces de transferirlo desde los sialilglucoconjugados de la célula hospedadora principalmente a las mucinas del parásito, incapaz de sintetizar dichos residuos. Este proceso de sialización proporciona a *T. cruzi* protección frente al complemento (de Souza *et al*., 2010).
- En todas las cepas de *T. cruzi* y expresada únicamente por las formas tripomastigote, gp83 actúa como ligando que media en su adhesión y penetración en células tanto fagocíticas como no fagocíticas (de Souza *et al*., 2010).
- De manera similar, las penetrinas, moléculas de 60 kD, muestran afinidad por ciertos elementos de la matriz extracelular como el heparán sulfato o el colágeno, a los que se une de manera selectiva promoviendo la adhesión y entrada del parásito en los fibroblastos (de Souza *et al*., 2010).
- Algunas proteasas de *T. cruzi* como la cruzipaína, la oligopeptidasa B o la Tc80 se encuentran involucradas en la infección de la célula hospedadora. Como se ha comentado anteriormente, en los epimastigotes la cruzipaína se localiza a nivel de los reservosomas. No obstante, se ha visto que también la expresan en su superficie, al igual que las formas de transición amastigote-tripomastigote. Esta cisteín proteasa también es secretada a través de la bolsa flagelar y es capaz de originar quininas a partir del quininógeno, las

cuales se unen al receptor de bradiquinina estimulando la liberación de calcio intracelular mediada por IP3. La oligopeptidasa B es una endopeptidasa citosólica secretada por los tripomastigotes que media en la movilización de calcio; mientras que Tc80 es una prolioligopeptidasa capaz de hidrolizar varios tipos de colágeno y fibronectina, participando en la entrada de *T. cruzi* en la célula (de Souza *et al.*, 2010).

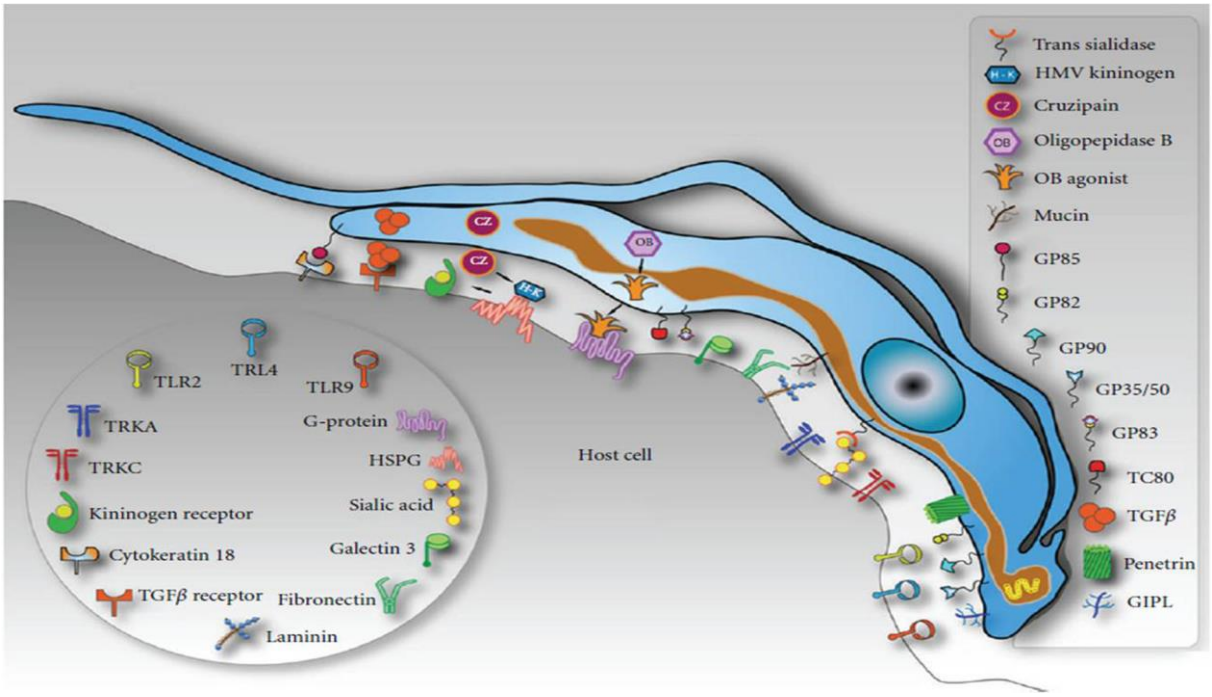


Fig. 7. Principales moléculas de superficie involucradas en el proceso de interacción de los tripomastigotes de *T. cruzi* con la célula hospedadora. Fuente: de Souza *et al*. (2010).

o *Moléculas de superficie de la célula hospedadora*

Durante el proceso de invasión llevado a cabo por *T. cruzi*, diversas moléculas presentes en la membrana de la célula hospedadora pueden actuar como potenciales receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), variando en función del tipo celular (Fig. 7). Algunas de estas moléculas, como la citoqueratina 18 o los receptores de bradiquinina, han sido comentadas en el apartado anterior. Otras como la galectina-3 o el receptor de TGF-β se han propuesto como mediadoras de la entrada de *T. cruzi* en células dendríticas y musculares, así como en células epiteliales, respectivamente. Por otra parte, los receptores TrkA y TrkC intervienen en los procesos de invasión que ocurren a nivel del sistema nervioso, habiéndose identificado TrKA como ligando de la transialidasa (de Souza *et al.*, 2010).

Dentro de los PRR, destaca el grupo de los TLR *(toll-like receptors)*, de entre los cuales, TLR-2 y TLR-4, además del intracelular TLR-9, son capaces de reconocer a *T. cruzi* en las células fagocíticas profesionales (de Souza *et al.*, 2010; Epting *et al.*, 2010; Basso, 2013).

1.4.1.3. Invasión de la célula hospedadora

Tras la adhesión y reconocimiento de *T. cruzi* por la célula, se desencadenan una serie de procesos de señalización celular bidireccionales, mediados por un incremento de los niveles de calcio intracelular que culminan con el proceso de invasión (Epting *et al.*, 2010).

o *Células fagocíticas – Fagocitosis*

La fagocitosis es el principal mecanismo de entrada en las células fagocíticas profesionales. Las células emiten pseudópodos y se produce una activación de proteínas tirosina quinasas, seguida de un reclutamiento de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3k) y filamentos de actina en el lugar de entrada del tripomastigote (de Souza *et al.*, 2010).

o *Células no fagocíticas – Endocitosis*

- Dependiente de lisosomas: las tirosina quinasas no participan en la internalización del parásito, que ocurre en un proceso en el que intervienen lisosomas y tirosina fosfatasas que median en la regulación de la activación de PI3k (de Souza *et al.*, 2010).
- Dependiente de actina: no ocurre la emisión de pseudópodos por parte de la célula hospedadora, pero existe participación de filamentos de actina (de Souza *et al.*, 2010).
- Independiente de lisosomas: mecanismo de entrada activo promovido por *T. cruzi* que conlleva un gran gasto de energía por parte de los tripomastigotes. En este proceso no hay participación de filamentos de actina y los tripomastigotes invaden la célula a través de invaginaciones en la membrana (de Souza *et al.*, 2010).

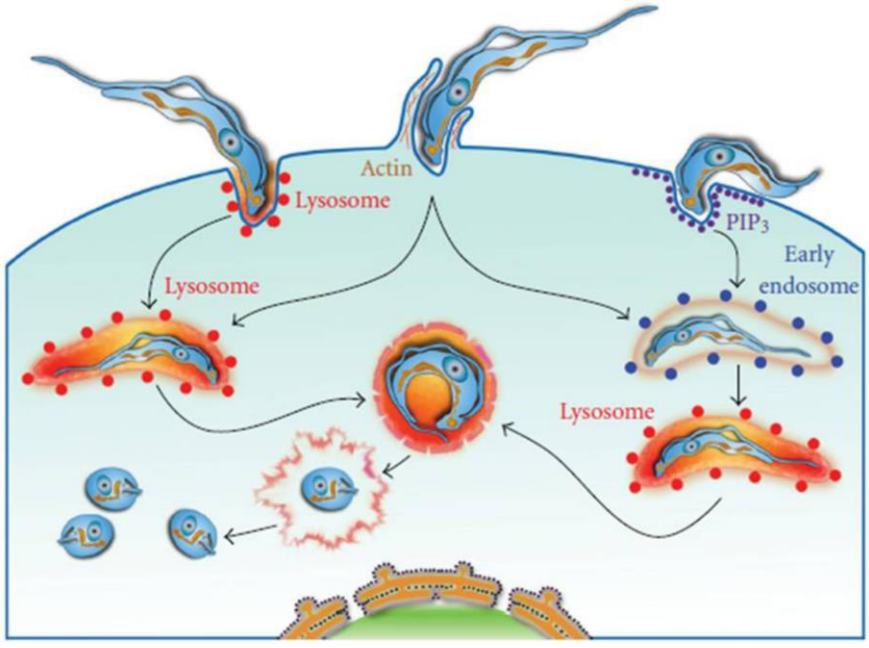


Fig. 8. Mecanismos de invasión celular por *T. cruzi.* De izquierda a derecha: dependiente de lisosomas, dependiente de actina e independiente de lisosomas. Fuente: de Souza *et al.* (2010).

En los momentos iniciales del reconocimiento entre la célula hospedadora y *T. cruzi*, ambos experimentan un incremento en los niveles de calcio intracelulares. En los fagocitos no profesionales, existe una acumulación de lisosomas en el lugar de entrada del parásito. Sin embargo, este fenómeno ocurre en aproximadamente el 20% de los parásitos, ya que éstos también pueden ser internalizados a través de una vía independiente de lisosomas, en la que *T. cruzi* penetra mediante invaginaciones en la membrana celular que acumulan fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). A los 10 min post-infección, en torno al 50% de los parásitos internalizados por esta segunda vía se acumulan en vacuolas enriquecidas con marcadores de membrana plasmática, y cerca del 20% lo hace en endosomas tempranos que tras 60 min maduran finalmente fusionándose con lisosomas (de Souza *et al*., 2010).

La formación del fagolisosoma resulta crucial en el proceso de invasión, contribuyendo en la retención y desarrollo del parásito en el interior de la célula hospedadora (de Souza *et al*., 2010). Diversos estudios han demostrado que una inhibición en la fusión con los lisosomas supone un escape del parásito al medio extracelular, señalando de esta manera su importancia en el establecimiento de una infección viable, así como la reversibilidad de ésta cuando el mecanismo de invasión celular se realiza independiente de lisosomas (Fernandes y Andrews, 2012).

Resulta importante mencionar que no sólo las formas tripomastigote, también los amastigotes de *T. cruzi* son capaces de invadir la célula hospedadora, contribuyendo a la propagación de la infección en los tejidos del hospedador vertebrado (Epting *et al*., 2010). Los amastigotes pueden ser liberados al medio extracelular con la ruptura prematura de la célula hospedadora, e invadir nuevas células mediante activación de vías de señalización en el parásito que conducen al aumento de AMPc y a la movilización de calcio desde los acidocalcisomas (Fernandes *et al*., 2006). Con relación a los epimastigotes, diversos estudios *in vitro* han mostrado su capacidad para invadir células fagocíticas (Barrias *et al*., 2010) y no fagocíticas (Florencio-Martínez *et al*., 2010), así como se ha demostrado la expresión y liberación de transialidasa una vez alcanzada la fase estacionaria (Chaves *et al*., 1993).

1.4.1.4. Ruptura de la vacuola parasitófora

Independientemente de cuál sea el mecanismo de entrada de *T. cruzi* en la célula hospedadora, tiene lugar la formación de una vacuola parasitófora cuya composición parece estar modulada por el propio parásito (de Souza *et al*., 2010).

En la vacuola parasitófora, las formas tripomastigote liberan transialidasas que retiran los restos de ácido siálico de la membrana de la vacuola, haciéndola susceptible a la acción de la Tc-Tox. Este péptido homólogo al factor C9 del complemento, secretado por el parásito y favorecido por el ambiente ácido que la vacuola adquiere en su fusión con los lisosomas, promueve la destrucción de la membrana de la vacuola (de Souza *et al*., 2010). Se

ha sugerido que la Tc-Tox también está presente en las formas amastigote, participando de manera similar en la ruptura de la vacuola parasitófora (Stecconi-Silva *et al*., 2003).

Aproximadamente 2 h después de que se produce la infección y aún dentro de la vacuola parasitófora, comienza la diferenciación de los tripomastigotes a amastigotes, ocurriendo de manera simultánea a la fragmentación de la vacuola (de Souza *et al*., 2010).

1.4.1.5. Multiplicación de las formas amastigote, diferenciación a tripomastigotes y liberación al medio extracelular

El proceso de diferenciación a amastigotes concluye en el citoplasma de la célula hospedadora, donde después de un periodo de quiescencia de 20–35 h, los amastigotes comienzan a multiplicarse y tras experimentar nueve ciclos de división binaria, cuya duración *(doubling time)* varía con la cepa de *T. cruzi*, se transforman de nuevo en tripomastigotes (Andrade y Andrews, 2005; Alves *et al*., 2007).

La población de parásitos intracelulares no se diferencia de manera sincrónica, de modo que pueden coexistir diferentes formas en una misma célula, predominando unas u otras en función de la cepa, temperatura o tiempo de infección (Alves *et al*., 2007).

Con la ruptura de la célula hospedadora los tripomastigotes son finalmente liberados al medio extracelular, pudiendo reiniciar un nuevo ciclo intracelular así como encontrarse a disposición de ser ingeridos por el vector.

1.4.2. Desarrollo del ciclo en el hospedador invertebrado

En su recorrido hacia el estómago del vector, *T. cruzi* se enfrenta a la acción de varios componentes de la saliva y de enzimas digestivas, y a fuertes cambios de temperatura, osmolaridad y nutrientes. Durante las 1–4 semanas posteriores a la infección, la densidad de parásitos es mayor en el intestino delgado que en el recto. Por el contrario, tras este periodo los epimastigotes se multiplican más rápidamente en el recto, alcanzándose un número de parásitos de 2 a 50 veces superior. Este hecho no se debe a una acción directa de las enzimas digestivas sobre *T. cruzi* a nivel del intestino delgado, sino al anclaje del parásito en el recto junto con un mayor aporte de nutrientes en esta localización. De esta manera, los epimastigotes son la forma dominante en el intestino delgado, mientras que la práctica totalidad de los tripomastigotes se localizan en el recto (Kollien y Schaub, 2000).

En el intestino delgado los epimastigotes se sitúan entre el contenido intestinal y la membrana y no sufren modificaciones en el flagelo (Kollien y Schaub, 2000). Sin embargo, cuando alcanzan el recto se adhieren al revestimento cuticular experimentando un alargamiento del flagelo y expresando de manera específica ciertos polipéptidos junto a su membrana, exclusivos del proceso de adhesión (Bonaldo *et al*., 1988).

Una vez anclados a la pared rectal tiene lugar la metaciclogénesis. Este proceso varía en función del estado nutricional del vector, cepa del parásito o especie de triatomino, y se ve influido por diversos factores como la temperatura, pH, osmolaridad, suero, componentes de la hemolinfa, extractos intestinales, estrés metabólico o AMPc (Kollien y Schaub, 2000). Se ha comprobado que la cruzipaína también interviene de forma activa en este proceso, aumentando la metaciclogénesis en aquellos parásitos con una sobreexpresión de esta enzima (Tomas *et al*., 1997).

Finalmente, los tripomastigotes metacíclicos son liberados a través de las heces del vector. La orina depositada contiene en muchas ocasiones formas infectantes que no se originan a nivel de los tubos de Malphigi, sino que se trata de formas adheridas a la pared del recto y arrastradas por la misma hacia al exterior (Kollien y Schaub, 2000).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL

1.5.1. Distribución geográfica

1.5.1.1. Área endémica

La distribución geográfica de la enfermedad de Chagas viene definida fundamentalmente por la distribución natural de triatominos a lo largo del Continente Americano, donde la transmisión vectorial ocurre entre las latitudes 40ºN y 45ºS, y por debajo de los 1.500 m de altitud (Stanaway y Roth, 2015).

En el área endémica la enfermedad se extiende principalmente entre la población más pobre y vulnerable. Los focos más importantes se encuentran en zonas rurales con condiciones de vida precarias que favorecen la instalación de los vectores en las viviendas. Sin embargo, el traslado de la población rural a los núcleos urbanos producido en los años 70 y 80, llevó consigo la enfermedad de Chagas a las ciudades, donde adquirió el carácter de infección urbana transmitida mediante transfusiones de sangre (Dubner *et al*., 2008).

De acuerdo con estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la actualidad existen aproximadamente 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* a nivel mundial, fundamentalmente en los 21 países de América Latina donde la enfermedad es endémica: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Guyana Francesa, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay y Venezuela (WHO, 2015).

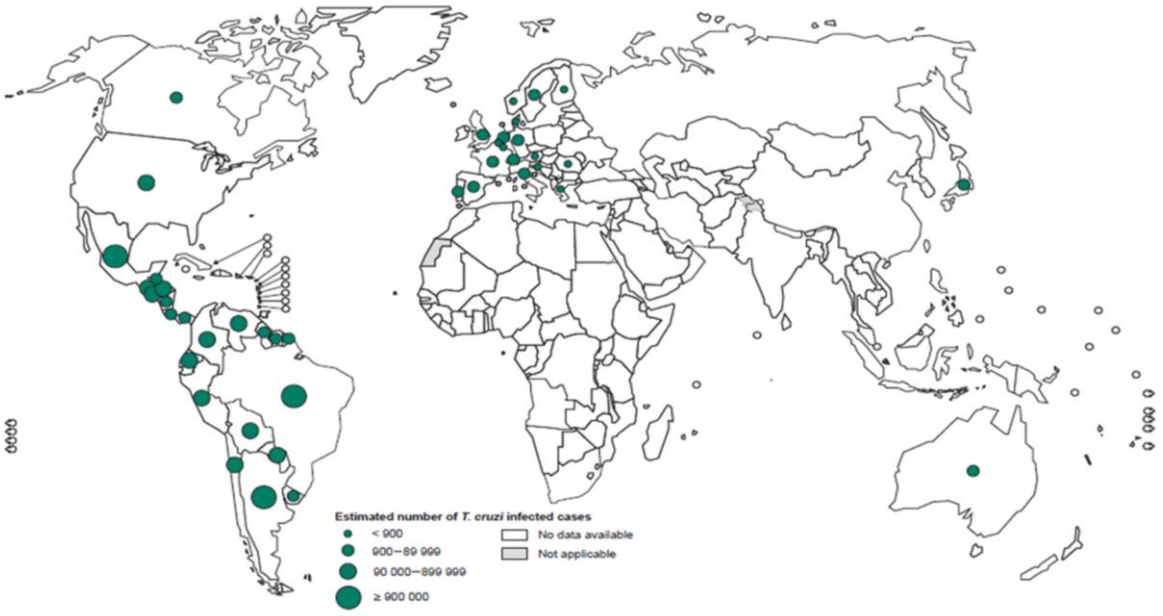


Fig. 9. Distribución de los casos de enfermedad de Chagas reportados a la OMS a nivel mundial, 2010–2013. Fuente: *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases* (WHO, 2015).

En las últimas décadas se han llevado a cabo campañas de control y eliminación que han reducido la incidencia y acotado los límites geográficos de la enfermedad en muchas regiones del área endémica (Stanaway y Roth, 2015). Los Ministerios de Salud de los diferentes países junto con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS, han coordinado una serie de Iniciativas Subregionales de Prevención, Control y Atención de la Enfermedad de Chagas: Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR) en 1991, Iniciativa Andina (IPA) en 1997, la que comprende los países de América Central y México en 1998 y la Amazónica (AMCHA) en el 2004. Esta actuación ha supuesto una considerable disminución en el área e intensidad de la transmisión vectorial, además de una importante reducción en la transmisión por vía transfusional (Coura, 2013; Stanaway y Roth, 2015).

La educación sanitaria de la población para evitar la domesticación de los vectores, la realización de mejoras en las viviendas y su separación de gallineros y establos, el rociamiento de las mismas y sus anexos con insecticidas (por ejemplo, piretroides), así como el establecimiento de controles rigurosos en los bancos de sangre o la correcta manipulación de alimentos potencialmente transmisores de la infección, son algunas de las medidas llevadas a cabo por dichas Iniciativas (Coura, 2013; Stanaway y Roth, 2015).

A pesar de los avances realizados en el área endémica en lo relativo al control de la transmisión, la enfermedad de Chagas continúa siendo uno de los mayores problemas de Salud Pública en América Latina, donde provoca más de 7.000 muertes anuales y mantiene a más de 25 millones de personas en riesgo de contraer la infección (WHO, 2015).

1.5.1.2. Área no endémica

Tradicionalmente se ha pensado que la enfermedad de Chagas era una parasitosis exclusiva de las zonas rurales pobres de Centro y Sudamérica, razón por la que la enfermedad recibe el nombre de tripanosomiasis americana (WHO, 2015). No obstante, el carácter emergente que ha adquirido en áreas no endémicas debido a los intensos movimientos migratorios, junto con la existencia de rutas de transmisión alternativas a la vectorial, como la vía transfusional, el transplante de órganos o la vía congénita, ha contribuido a su distribución a nivel mundial (Schmunis y Yadon, 2010). Estados Unidos es el principal destino en estos desplazamientos, con aproximadamente 20,5 millones de personas procedentes de América Latina viviendo en el país. En torno a 3,5 millones residen actualmente en Europa, donde la distribución varía de unos países a otros, siendo España el principal receptor de población procedente del área endémica (Strasen *et al*., 2014; Pinazo y Gascón, 2015).

En el año 2007, tras el fallecimiento de varios receptores de sangre y/u órganos en Europa, fueron detectados numerosos casos de enfermedad de Chagas entre la población procedente de los países endémicos. Estos hallazgos llevaron a la OMS a iniciar estrategias dirigidas a evaluar la prevalencia de la enfermedad y posible transmisión de *T. cruzi* en países no endémicos sin transmisión vectorial reportada como Australia, Canadá, Estados Unidos, Japón y varios países europeos, entre los que se encuentra España (WHO, 2015). Se estima que en Europa hay entre 68.000 y 123.000 personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de ellas en España; mientras que en Estados Unidos esta cifra asciende a alrededor de las 300.000 (Pinazo y Gascón, 2015). Actualmente se trabaja en un sistema de vigilancia y control de la enfermedad a nivel mundial, centrado principalmente en su transmisión por vía transfusional y trasplante de órganos, así como a través de la vía congénita (WHO, 2015).

Por otra parte, el hallazgo de triatominos en diversos países fuera del área endémica ha supuesto una alarma en cuanto a su potencial papel vectorial (WHO, 2015), habiéndose identificado varias especies en zonas de África, Sudeste Asiático, India, Vietnam y el norte de Australia (Pérez *et al*., 2015). Asimismo, se debe contemplar la posibilidad de transmisión a través de otros insectos hematófagos diferentes a los triatominos (Pérez *et al*., 2015). En este contexto, un estudio reciente muestra evidencias experimentales de que *Cimex lectularius*, la chinche de las camas, podría comportarse como un vector competente en la transmisión de *T. cruzi* (Salazar *et al*., 2015).

1.5.2. Transmisión

1.5.2.1. Transmisión vectorial

La transmisión vectorial de *T. cruzi*, que tiene lugar mediante contacto de las heces infectadas del triatomino con la sangre y mucosas del hospedador vertebrado, representa

aproximadamente el 80% de los casos (Dubner *et al*., 2008), y supone la principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas en el Hemisferio Occidental (Schmunis, 2007).

Los programas de control vectorial han conseguido interrumpir diversos ciclos de transmisión domiciliar y peridomiciliar mediante el uso de insecticidas: Uruguay en 1997, Chile en 1999 y Brasil en 2006 se declararon libres de transmisión por *T. infestans* (Stanaway y Roth, 2015). Por su parte, Guatemala lo ha certificado con *R. prolixus*, principal vector domiciliar en América Central (Pinazo y Gascón, 2015). Sin embargo, la acción de los insecticidas parece no ser permanente y la recolonización por triatominos es uno de los principales retos en el área endémica, lo que obliga a mantener activos los programas de control de vectores (Pinazo y Gascón, 2015).

Tan sólo unos pocos casos autóctonos se han reportado en Estados Unidos, donde se ha detectado una elevada tasa de infección en triatominos *(T. sanguisuga, T. gerstaeckeri, T. proctata o T. rubida)* en varias regiones al sur del país. Sin embargo, su defecación se retrasa hasta 10–20 min después de alimentarse y ocurre en una localización alejada del lugar de la ingesta de sangre. Este hecho, junto con las condiciones de las viviendas y los hábitos higiénicos y alimentarios de la población, explican el reducido número de casos ocurridos por transmisión vectorial en este país (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012).

1.5.2.2. Transmisión no-vectorial

o *Transmisión transfusional*

La vía transfusional se considera la segunda ruta de transmisión de enfermedad de Chagas. Puesto que el parásito se encuentra en la sangre de los individuos infectados sin tratar y, décadas después de la infección, es detectable en la de aquellos para los que el tratamiento no ha sido eficaz, *T. cruzi* puede transmitirse a individuos sanos mediante transfusión sanguínea (Schmunis, 2007). El riesgo de transmisión por esta vía depende de varios factores, como el tipo de componente sanguíneo transfundido, la parasitemia del donante, el estado inmunológico del receptor o la cepa de *T. cruzi* (Strasen *et al*., 2014).

Durante los últimos años, la mayoría de países de América Latina han establecido políticas para prevenir la transmisión transfusional (Schmunis, 2007), habiendo disminuido considerablemente el riesgo de infección por esta vía en el área endémica (WHO, 2015).

Fuera del área endémica la transfusión de sangre infectada debe ser considerada como la principal vía de potencial transmisión de la enfermedad (Schmunis, 2007; Strasen *et al*., 2014). En España, el Real Decreto 1088/2005 sobre hemodonación regula el control de la transmisión sanguínea de *T. cruzi* en donantes procedentes del área endémica. Dicho RD incluye tanto a los donantes que han nacido o cuyas madres han nacido en el área endémica, como a las personas transfundidas en países endémicos. Por el contrario, no considera a los

nacidos en España que han residido en zonas endémicas, siendo éstos últimos incluidos por algunos centros en sus protocolos de cribado. De acuerdo con el RD 1088/2005, la mayoría de los centros de transfusión de España realizan un cribado selectivo mediante detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* en la sangre de los donantes de riesgo, excluyendo de forma automática y definitiva aquellos con enfermedad de Chagas (Portús Vinyeta, 2010).

o *Transmisión por vía congénita*

De acuerdo con el CBDC *(Consenso Brasileiro em Doença de Chagas)*, se considera como caso congénito de enfermedad de Chagas a todo niño nacido de madre infectada con confirmación del parásito en la sangre del recién nacido y/o la detección de anticuerpos no maternos después de los 6–7 meses de edad, habiéndose excluido previamente otras vías de transmisión (Dias *et al*., 2011).

En una revisión realizada por Carlier *et al*. (2015), se definen cuatro factores que influyen sobre la transmisión y/o desarrollo de la enfermedad de Chagas congénita:

- El parásito: la virulencia y la parasitemia en la mujer embarazada se encuentran involucradas en la transmisión madre-hijo e influyen en el desarrollo de enfermedad en el feto/neonato. Sin embargo aún no se ha establecido una clara correlación entre los DTU, siendo TcV uno de los más diagnosticados en los casos de infección congénita.
- Parasitemia e inmunidad de la madre: la parasitemia aumenta durante el 2º y 3º trimestre de embarazo. Además, una respuesta inmune deficiente por parte de la madre, bien sea una baja liberación de TNFα en la inmunidad innata o una disminución en los niveles de IFNγ en la respuesta Th1, contribuye a incrementar los niveles de parasitemia.
- La placenta: en los casos más leves, los trofoblastos actúan como barrera para *T. cruzi*, de modo que la infección al feto ocurre por rutas hematógenas alternativas. En los casos más severos, *T. cruzi* invade los trofoblastos, se sobrepasan las defensas innatas de la placenta y se rompe la barrera trofoblástica, conduciendo a una mayor infección del feto con aborto y muerte neonatal.
- Parasitemia e inmunidad en el feto/neonato: en el momento del nacimiento, los casos asintomáticos generalmente presentan parasitemias inferiores a 100 parásitos/mL, mientras que en los sintomáticos ascienden a 100–1.000 parásitos/mL, pudiendo alcanzar niveles de hasta 125.000 parásitos/mL en los casos letales. A pesar de que los fetos/neonatos tienen un sistema inmune inmaduro, existe respuesta innata y adaptativa en los mismos, pero éstas son deficientes o se inician demasiado tarde en los neonatos infectados, resultando imposible controlar la multiplicación de los parásitos.

Se estima que en el área endémica hay al menos 2 millones de mujeres en edad fértil infectadas de manera crónica con *T. cruzi*. A pesar de que existen variaciones de

acuerdo con la región, la transmisión por vía congénita ocurre en aproximadamente el 5% de los niños nacidos de madres con enfermedad de Chagas crónica (Carlier *et al*., 2015).

Varias regiones de Europa han adoptado medidas oficiales para el control de mujeres embarazadas en riesgo por infección con *T. cruzi*, y de recién nacidos de madres seropositivas (Pinazo y Gascón, 2015).

o *Transmisión por vía oral*

La vía oral representa la principal ruta de contaminación de vectores y animales, así como de transmisión de la enfermedad aguda en la cuenca del Amazonas. En Brasil, entre los años 1965–2009 y en áreas fuera de la Amazonia con control vectorial establecido, se estima que ocurrieron 7–8 brotes de la enfermedad provocando 112 casos agudos. Contrastando con estas cifras, durante 2000–2010 se notificaron más de 1.000 casos agudos a partir de 138 brotes principalmente en la Cuenca Amazónica, de los que 776 (71%) se atribuyeron a la ingesta de comida o bebida contaminada (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012).

La infección por vía oral puede ocurrir mediante alimentos y bebidas contaminados con triatominos infectados y/o con sus heces, o con secreciones infectadas procedentes de las glándulas anales de marsupiales (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; Pinazo y Gascón, 2015). En Brasil se han registrado brotes provocados por el jugo de la caña de azúcar, agua o frutas autóctonas como el açaí *(Euterpe oleracea)* o la bacaba *(Oenocarpus bacaba)*, y en Colombia y Venezuela otros relacionados con zumos de guayaba, naranja o mandarina (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012).

o *Transmisión mediante trasplante de órganos*

El trasplante de órganos se ha convertido en una de las potenciales rutas de transmisión a considerar, especialmente importante por la inmunosupresión que conlleva esta práctica clínica en los individuos receptores (Pinazo y Gascón, 2015).

o *Transmisión a través de accidentes de laboratorio o quirúrgicos*

Puede ocurrir por una manipulación incorrecta de triatominos, animales de experimentación infectados o cultivos, así como de sangre de pacientes en fase aguda (Dias *et al*., 2011)

1.5.2.3. Vías de transmisión excepcionales o hipotéticas

o *Transmisión durante la lactancia*

Los estudios realizados acerca de la posible transmisión de *T. cruzi* en humanos a través de la lactancia son escasos y no concluyentes. Debido a su humedad y elevado contenido en

nutrientes, la leche resulta *a priori* un medio adecuado para la transmisión del parásito, contribuyendo además a este hecho la temperatura corporal en el caso de la leche humana. Sin embargo, aparte de algunos casos puntuales y en su mayoría atribuidos a una contaminación con sangre infectada procedente de grietas en las mamas, no se ha detectado *T. cruzi* en la leche materna y por tanto, su transmisión a través de esta vía no ha sido demostrada, siendo además poco probable (Norman y López-Vélez, 2013).

No obstante, la discontinuación temporal de la lactancia y el tratamiento térmico de la leche materna, son algunas de las recomendaciones ofrecidas a las madres con infección aguda o presencia de fisuras en las mamas, aconsejándose además su exclusión como donantes en los bancos de leche (Norman y López-Vélez, 2013).

o *Transmisión sexual*

Es una posibilidad extremadamente remota que se ha conseguido experimentalmente en animales de laboratorio por infección vía vaginal con semen infectado. La transmisión sexual no se ha demostrado en el hombre. Sin embargo, se sugirió la posibilidad de contaminación en varones susceptibles mediante coito con mujeres infectadas en los días de menstruación, posibilidad que aumentaría en los casos con parasitemia elevada (fase aguda o individuos inmunosuprimidos), debiéndose recomendar la abstinencia sexual (Dias *et al*., 2011).

1.6. FASES, MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOGÉNESIS

La enfermedad de Chagas presenta un periodo de incubación de aproximadamente 1–2 semanas en los casos de transmisión vectorial, variando éste entre 3–22 días cuando la infección se produce por vía oral. Su duración puede ser superior a un mes en aquellos casos en los que la infección ocurre a través de tripomastigotes sanguíneos (transmisión transfusional, 30–112 días), debido a su menor capacidad de invasión en comparación con las formas metacíclicas (Dubner *et al*., 2008; Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012).

Durante el transcurso de la enfermedad se suceden tres fases claramente diferenciadas en cuanto a duración y sintomatología, las cuales se describen a continuación.

1.6.1. Fase aguda

La mayoría de los casos de infección aguda por *T. cruzi* están ligados a su transmisión vectorial y ocurren durante la infancia (Teixeira *et al*., 2006a). Presenta una duración de 4 a 8 semanas y se caracteriza por una parasitemia detectable en sangre periférica (Dubner *et al*., 2008; Pereira y Navarro, 2013).

En la mayoría de los casos, la fase aguda pasa desapercibida debido a su sintomatología inespecífica. Algunas de las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, sudoración, dolor muscular, inflamación de los nódulos linfáticos, alteraciones cardíacas, signos de meningitis, hepatoesplenomegalia y edema subcutáneo general o localizado en el rostro y en las extremidades inferiores. Estas manifestaciones se resuelven de forma espontánea en un 90% de los pacientes (Dubner *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010).

En el lugar de entrada del parásito, habitualmente se genera una induración en la piel conocida como "chagoma" de inoculación ("signo de Romaña" cuando ocurre a nivel de la mucosa ocular). La ausencia de este signo en individuos inmunocomprometidos dificulta más si cabe el diagnóstico en estos pacientes (Teixeira *et al.*, 2006a). La infección por vía oral no muestra signos externos de entrada de *T. cruzi*, siendo en ocasiones reflejada por la aparición de hemorragias en la mucosa digestiva (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012).

Durante la fase aguda, el porcentaje de mortalidad es inferior al 10% y en su mayoría se encuentra asociada a fallo cardíaco y/o meningoencefalitis (Teixeira *et al.*, 2006a; Dubner *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010; Steverding, 2014).

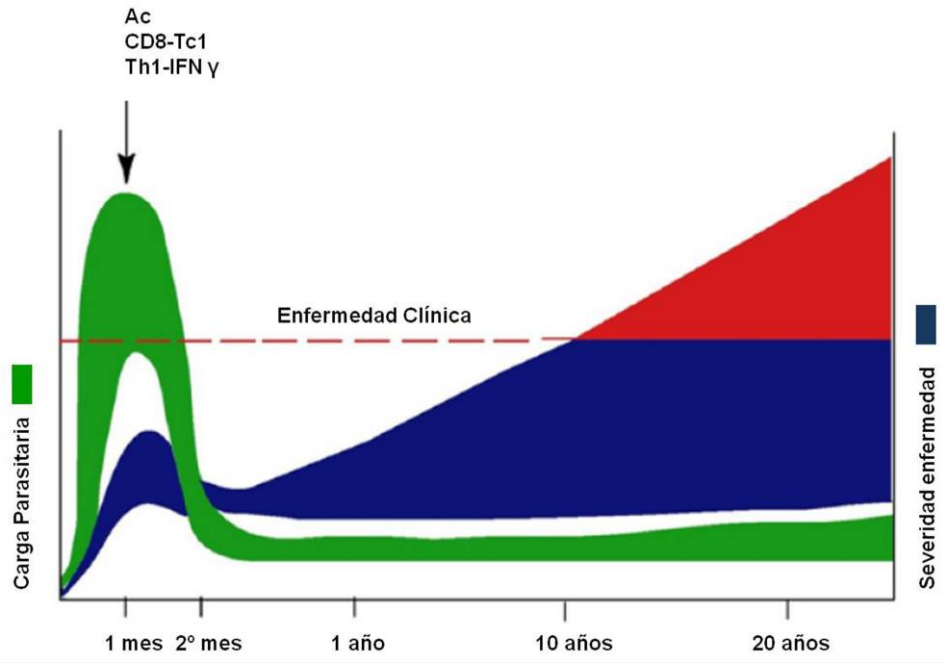


Fig. 10. Progresión de la enfermedad de Chagas. Fuente: adaptación del esquema propuesto en Chatelain (2015).

Ante la elevada carga parasitaria en la fase aguda, el sistema inmune genera una repuesta Th1 en la que intervienen células CD8 y CD4, y ocurre una intensa producción de INFγ (Fig. 10). Junto con el TNFα, activa la síntesis de óxido nítrico (NO) en los macrófagos e inhibe la replicación de *T. cruzi*, disminuyendo considerablemente la parasitemia y en

consecuencia, controlando la infección (Gutiérrez *et al*., 2009; Chatelain, 2015). Sin embargo este hecho no frena la progresión de la enfermedad, de modo que el paciente entra en fase crónica manifestando o no (fase indeterminada) la sintomatología específica de la misma (Chatelain, 2015).

1.6.2. Fase indeterminada

Unas 8–10 semanas después de la infección inicial sobreviene la fase indeterminada, caracterizada por una serología positiva, ausencia de síntomas y signos de la enfermedad, ausencia de alteraciones cardíacas y tamaño regular del corazón, esófago y colón (Teixeira *et al*., 2006a; Dubner *et al*., 2008).

De acuerdo con estos criterios, se estima que aproximadamente dos tercios de los individuos infectados permanecen en la fase indeterminada (latente) de la enfermedad durante 10–30 años o incluso de por vida, siendo en su mayoría pacientes de edad comprendida entre los 20 y los 50 años. Por el contrario, el 30% restante evoluciona hacia la enfermedad crónica sintomática (Dubner *et al*., 2008; Rassi *et al*., 2010; Chatelain, 2015).

1.6.3. Fase crónica

La fase crónica de la enfermedad puede llegar a aparecer hasta 10–30 años después de que el primer contacto con el parásito haya tenido lugar, y en ella los pacientes presentan afectación a nivel digestivo (esófago y colon), cardíaco o ambos (Chatelain, 2015). La manifestación de las distintas patologías depende en gran medida del DTU (ver Tabla 2) al que pertenezca la cepa de *T. cruzi* (Zingales *et al*., 2012).

En el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Chagas, surgen principalmente dos hipótesis basadas en la persistencia o no del parásito en la fase crónica:

- Hipótesis de la autoinmunidad: argumenta que los daños tienen lugar en tejidos con ausencia aparente de parásitos. Tal observación ha permitido sugerir que las respuestas inflamatorias que ocurren en los tejidos afectados no están directamente inducidas por *T. cruzi* sino por antígenos propios, mimetismo molecular o reacciones cruzadas (Tarleton, 2001; Gutiérrez *et al*., 2009).
- Hipótesis de la persistencia del parásito: defiende que la severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la presencia y cantidad de parásitos en el tejido afectado. Esta hipótesis se basa en evidencias que muestran la detección de antígenos de *T. cruzi* mediante técnicas de inmunohistoquímica y de material genético por PCR, así como en la repercusión que los tratamientos que actúan sobre la carga parasitaria tienen sobre la severidad de la misma (Tarleton, 2001; Gutiérrez *et al*., 2009).

A día de hoy ambas teorías siguen siendo objeto de debate, existiendo una mayor tendencia hacia la defensa de la persistencia de *T. cruzi* como responsable de la patología de la fase crónica, bien por una acción directa del parásito sobre el tejido, bien indirectamente desencadenando procesos inflamatorios o mecanismos autoinmunes (Rassi *et al*., 2010; Nagajyothi *et al*., 2012; Ribeiro *et al*., 2012). De cualquier modo, durante la fase crónica se producen daños a nivel del sistema nervioso periférico simpático y parasimpático, inducidos a su vez por procesos inmunes y/o inflamatorios desencadenados por *T. cruzi*, responsables de la fisiopatología cardíaca y digestiva, dando lugar a las diferentes formas en que se manifiesta la enfermedad (Teixeira *et al*., 2006b; Dubner *et al*., 2008).

1.6.3.1. Forma digestiva

Los problemas digestivos aparecen en un tercio de los afectados crónicos y generalmente derivan en una dilatación del tracto gastrointestinal originando "megasíndromes" (Pereira y Navarro, 2013). Éstos son frecuentes en el área endémica, en países al sur de la Cuenca Amazónica como Argentina, Brasil, Chile y Bolivia (Teixeira *et al*., 2006a; Rassi *et al*., 2010).

El megaesófago se puede manifestar desde los 2 años de edad, aunque la mayoría de los casos aparecen en edades comprendidas entre los 20–40 años (Teixeira *et al*., 2006a). Esta alteración provoca episodios de disfagia, odinofagia, acidez, hipo, salivación excesiva, dolor en el pecho y regurgitación. En los casos más severos se asocia con cuadros de caquexia, como consecuencia de la dificultad que muestran los pacientes para comer (Teixeira *et al*., 2006b; Rassi *et al*., 2010; Pereira y Navarro, 2013).

En el curso de la enfermedad, el megacolon aparece considerablemente después en comparación con el megaesófago, provocando estreñimiento crónico, dolor abdominal y obstrucción intestinal (Teixeira *et al*., 2006a; Pereira y Navarro, 2013). El uso frecuente de laxantes para paliar dicha sintomatología puede originar ulceraciones en la mucosa, septicemia, ruptura de la pared intestinal y peritonitis (Teixeira *et al*., 2006a).

Estas alteraciones ocurren como consecuencia de lesiones inflamatorias en los ganglios parasimpáticos situados entre las capas de músculo liso (plexo mientérico o de Auerbach) y en la submucosa (plexo de Meissner) de las vísceras huecas, que llevan a ganglionitis y desconexiones neuronales. El parásito persiste en estos tejidos, sin existir evidencias claras de que en ellos invada neuronas parasimpáticas o libere neurotoxinas. De hecho, se ha propuesto que la destrucción neuronal no ocurre por la muerte de la célula como consecuencia de su colonización, sino por adherencia de células mononucleares del sistema inmune a las neuronas y su posterior lisis *(minimal rejection units)* (Teixeira *et al*., 2006a,b).

1.6.3.2. Forma cardíaca

La cardiomiopatía es la manifestación más severa de la enfermedad de Chagas y junto con el fallo cardíaco asociado, han hecho de ella la enfermedad endémica de origen infeccioso más letal en el Hemisferio Occidental (Cubillos-Garzón *et al*., 2004; Teixeira *et al*., 2006a).

La patología cardíaca afecta por igual a individuos de ambos sexos, de unos 30–45 años de edad (Teixeira *et al*., 2006a). Generalmente, la forma cardíaca provoca en los pacientes crónicos alteraciones en la conducción, bradicardia y taquicardia, fallo cardíaco y muerte súbita (Rassi *et al*., 2010). Un signo característico consiste en la formación de un aneurisma apical en el ventrículo izquierdo. Asimismo, es común la presencia de trombos a nivel del ventrículo izquierdo y la aurícula derecha, y su frecuente asociación con accidentes vasculares en pulmón, cerebro, hígado y riñón (Teixeira *et al*., 2006a; Rassi *et al*., 2010).

La insuficiencia cardíaca congestiva compromete a las cámaras de ambos lados del corazón, afectando a la circulación sanguínea por completo. El corazón aumenta su tamaño ocupando la base de la cavidad torácica y proyectándose hacia la pared de la misma, pudiendo superar los 500 g en pacientes fallecidos por insuficiencia cardíaca congestiva y alcanzar los 400 g en aquellos que sufren muerte súbita (Teixeira *et al*., 2006a).

La muerte súbita es la principal causa de defunción en estos pacientes y supone aproximadamente dos tercios de las mismas, pudiendo ocurrir incluso en pacientes *a priori* asintomáticos; seguida del fallo cardíaco refractario (25–30%) y los tromboembolismos (10–15%). La ocurrencia de una u otra varía según el estadio en que se encuentre la enfermedad cardíaca, predominando la muerte súbita en las primeras etapas y el fallo cardíaco en las avanzadas (Rassi *et al*., 2010). Tras la detección de signos de fallo cardíaco, la cardiomiopatía progresa rápidamente resultando mortal en un periodo máximo de 5 años. Un hallazgo común en estas defunciones es el infarto cerebral como consecuencia de trombos liberados a partir del ventrículo izquierdo (Teixeira *et al*., 2006a).

La cardiomiopatía chagásica surge como resultado de un proceso inflamatorio exacerbado en el que se observan numerosos infiltrados de células mononucleares del sistema inmune a nivel del miocardio. La confluencia de numerosas *minimal rejection units* produce miocarditis y cambios importantes en la estructura cardíaca, debido a la intensa destrucción de cardiomiocitos y su reemplazamiento por tejido fibroso (Teixeira *et al*., 2006a). La producción de estos infiltrados se ve favorecida por el tropismo del parásito hacia células cardíacas y su persistencia en el tejido, siendo también capaz de originar daños a nivel del miocardio *per se* (Gutiérrez *et al*., 2009). También se han definido mecanismos de disautonomia producidos por una denervación de los sistemas simpático y parasimpático, alteraciones microvasculares ligadas a procesos de isquemia y la aparición de reacciones cruzadas entre autoantígenos (miosina) y antígenos de *T. cruzi*, contribuyendo todos estos procesos a la exacerbación del daño cardíaco (Marin-Neto *et al*., 2007).

1.6.3.3. Forma cardíaco-digestiva

La asociación de la enfermedad cardíaca con el megaesófago, megacolon o ambos, define la forma cardíaco-digestiva de la enfermedad. En la mayor parte de los países, el desarrollo de megaesófago normalmente precede a posteriores alteraciones cardíacas o del colon. Sin embargo, la prevalencia de esta forma no se conoce con exactitud (Rassi *et al*., 2010).

1.6.4. Reactivación

La reactivación de la enfermedad consiste en una recurrencia de los síntomas agudos que tiene lugar cuando la respuesta inmune de un individuo crónico es interrumpida o suprimida por una terapia con fármacos inmunosupresores, coinfecciones con VIH o poliparasitismo, entre otras. Como resultado, el paciente presenta una menor capacidad para controlar la infección por *T. cruzi* que conlleva un aumento en la parasitemia y en la multiplicación intracelular (Rassi *et al*., 2010; Pérez *et al*., 2015). La reactivación de la infección en individuos inmunosuprimidos es una evidencia de que el parásito se encuentra presente en el hospedador durante todo el proceso evolutivo de la enfermedad (Cançado, 1999), hecho que apoya la causa parasitaria en contra de la autoinmune.

Los pacientes que se encuentran en fase indeterminada son los que se muestran más susceptibles de sufrir un proceso de reactivación, debido a que la ausencia de síntomas dificulta la monitorización de la enfermedad. Asimismo, aquellos que manifiestan la forma crónica cardíaca corren el riesgo de reactivación como consecuencia del tratamiento, infecciones concomitantes o trasplante de órganos (Pérez *et al*., 2015).

Fiebre, miocarditis, paniculitis y lesiones en la piel, son algunos de los síntomas comunes en las reactivaciones ligadas al trasplante de órganos; mientras que en pacientes con VIH son frecuentes la meningoencefalitis y las alteraciones en el sistema nervioso central (Rassi *et al*., 2010). En el primer caso, los síntomas han de diferenciarse de los relacionados con el rechazo al órgano trasplantado, a fin de realizar un diagnóstico temprano e iniciar el tratamiento. Igualmente, las manifestaciones neurológicas que presentan los individuos con VIH y su similitud con las lesiones cerebrales ocasionadas en la toxoplasmosis, dificultan su diagnóstico y la pronta administración de tratamiento (Rassi *et al*., 2010; Pérez *et al*., 2015).

1.7. DIAGNÓSTICO

Las pruebas de laboratorio que se emplean en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas varían según la fase de la infección. Para el diagnostico de la fase aguda se recurre a los métodos parasitológicos directos, mientras que en las fases indeterminada y crónica, éste se basa fundamentalmente en la realización de pruebas serológicas y en técnicas de imagen.

1.7.1. Diagnóstico parasitológico

Debido a que durante la fase aguda la parasitemia es elevada, el diagnóstico se lleva a cabo mediante examen microscópico directo de una muestra de sangre fresca con anticoagulante y tinción de frotis. Ante la sospecha de infección aguda y obtención de resultados negativos en el examen directo, se recomienda la realización de técnicas de concentración como hematocrito o Strout (Gomes *et al*., 2009).

Finalizada la fase aguda, la enfermedad presenta una parasitemia subpatente y resulta imposible la identificación de *T. cruzi* mediante examen microscópico. A pesar de que el hemocultivo, la inoculación en ratones o el xenodiagnóstico pueden resultar útiles durante la fase crónica, estas pruebas parasitológicas indirectas muestran baja sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad avanzada (Cançado, 1999). Tales limitaciones dificultan su aplicación como método a utilizar de forma exclusiva en el seguimiento de los tratamientos, ya que mientras que la presencia de *T. cruzi* confirma el fracaso terapéutico, un resultado negativo no garantiza la cura parasitológica (WHO, 2012).

Con respecto a la enfermedad congénita, el microhematocrito es el método diagnóstico de elección debido a su sensibilidad y a la pequeña cantidad de sangre que requiere. Se recomienda el examen microscópico de sangre periférica o procedente del cordón umbilical durante el primer mes de vida (Rassi *et al*., 2010).

1.7.2. Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* es de gran utilidad en el diagnóstico de la infección, sobre todo en su estado avanzado. La cura parasitológica de los enfermos sometidos a tratamiento se atribuye a una desaparición de anticuerpos (seroconversión) confirmada mediante pruebas serológicas (WHO, 2012).

Durante la fase aguda, la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* pertenecientes a la clase IgM es indicativa de infección activa. En la fase crónica, el diagnóstico serológico recae en la detección de IgG mediante hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y el test de fijación del complemento (Cançado, 1999; CBDC, 2005; Dubner *et al*., 2008). Se deben realizar al menos dos test serológicos distintos para la confirmación del diagnóstico, acudiéndose a pruebas de diagnóstico molecular en el caso de que los resultados no sean concluyentes (Gomes *et al*., 2009).

Generalmente, los test serológicos presentan elevada sensibilidad y especificidad (WHO, 2012). No obstante, en ocasiones pueden producirse reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania* spp. o *T. rangeli* (Gomes *et al*., 1999). Asimismo, los marcadores serológicos del paciente pueden demorar varios años en desaparecer, de modo que una serología positiva no necesariamente significa una infección activa (WHO, 2012). Por tanto,

estos test no resultan definitivos para evaluar la eficacia del tratamiento, debiéndose utilizar en combinación con pruebas parasitológicas y con el test de lisis mediada por el complemento (CoML) en el seguimiento de las terapias (Gomes *et al*., 1999, 2009).

Tabla 3. Pruebas a realizar en la monitorización de los pacientes en tratamiento (Gomes *et al*., 2009).

Test serológicos [a]	Pruebas parasitológicas	CoML	Paciente tratado
Resultado –	Resultado –	Resultado –	Curado
Resultado +	Resultado –	Resultado –	Disociado (curado)
Resultado +	Resultado +	Resultado +	No curado

[a] Resultados obtenidos en al menos dos test convencionales.

En los casos congénitos en que el diagnóstico parasitológico es negativo o no se ha realizado, se recurre a la serología para detectar IgG en el niño después de los 6–9 meses de edad, una vez han desaparecido los anticuerpos procedentes de la madre (WHO, 2012).

1.7.3. Diagnóstico molecular

En las últimas décadas se ha recurrido a la biología molecular con el propósito de desarrollar pruebas parasitológicas más sensibles. La PCR debe llevarse a cabo en centros colaboradores empleando la misma metodología, con protocolos definidos y procedimientos operacionales estandarizados (CBDC, 2005). Concretamente, se ha venido trabajando en la estandarización de técnicas de PCR para la detección del parásito en muestras de sangre y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad y monitorización del tratamiento (Britto *et al*., 1995; Solari *et al*., 2001; Piron *et al*., 2007; Murcia *et al*., 2010; Schijman *et al*., 2011; Ramírez *et al*., 2015).

La mayor sensibilidad que muestra la PCR en comparación con los métodos parasitológicos tradicionales, respalda la gran utilidad de esta herramienta como método auxiliar en la monitorización de las terapias. La PCR permite identificar casos de fallo terapéutico cuando la detección de ADN de *T. cruzi* es positiva. Por el contrario, resultados de PCR negativos no necesariamente indican cura parasitológica, debiéndose complementar con la realización de pruebas serológicas (Gomes *et al*., 2009).

1.7.4. Exámenes diagnósticos específicos

Una vez confirmado el diagnóstico, el paciente debe ser explorado con el fin de identificar la forma clínica de la enfermedad. Los pacientes asintomáticos con un electrocardiograma (ECG) normal y sin afectación cardíaca o digestiva presentan un pronóstico favorable, debiendo acudir a revisión cada 12 ó 24 meses. De una manera estricta, esta forma de la

enfermedad debe definirse a partir de hallazgos normales obtenidos en pruebas radiológicas de tórax, esófago y colon. Sin embargo, en la práctica clínica no se suelen realizar estos exámenes a los pacientes asintomáticos (Rassi *et al*., 2010).

El ECG es el método de elección para el diagnóstico de la cardiopatía chagásica, por ser una prueba sencilla, de bajo coste y gran sensibilidad (Dubner *et al*., 2008). El factor pronóstico más importante de la cardiopatía chagásica crónica es la disfunción sistólica global del ventrículo izquierdo (CBDC, 2005). Aquellos pacientes que presentan cambios en el ECG reflejo de la enfermedad cardíaca deben ser monitorizados para la detección de arritmias, así como someterse a radiografía de tórax y ecocardiografía para determinar el tamaño y función del corazón (Rassi *et al*., 2010).

En el diagnóstico de la forma digestiva, las pruebas radiológicas de contraste ofrecen información sobre un posible caso de megaesófago o megacolon (Rassi *et al*., 2010).

1.8. TRATAMIENTO ETIOLÓGICO

Desde su descubrimiento en 1909, se han llevado a cabo numerosos esfuerzos orientados a la búsqueda de tratamiento para la enfermedad de Chagas. Los primeros intentos fueron realizados por Mayer y Rocha Lima, quienes en 1912 ensayan compuestos como el atoxyl (arsenical), la fucsina (colorante de la rosanilina), el tártaro emético (antimonial pentavalente) y en 1914 el cloruro de mercurio, todos sin resultados favorables (Coura y de Castro, 2002).

Desde 1912 hasta 1962, se ensayan *in vitro* e *in vivo* 27 compuestos y más de 30 antibióticos, todos ellos inactivos frente a *T. cruzi* (Coura y de Castro, 2002). También se identifican algunos compuestos con actividad frente a la infección experimental, como la bisquinaldina Bayer 7602, fenantridinas, aminoquinolinas, arsenicales trivalentes (Bayer 9736) y nitrofuranos. Sin embargo, la clasificación de varios de estos compuestos *a priori* como "buenos" o "excelentes" para el tratamiento de los casos humanos, fue posteriormente criticada en base a resultados contradictorios o al uso de una metodología inadecuada para verificar las curas parasitológicas (Coura y de Castro, 2002; Coura, 2009).

Ya en la segunda mitad del s. XX, destacan los ensayos realizados con nitrofurazona (5-nitro-2-furaldehído semicarbazona). En base a las curas parasitológicas obtenidas con su administración oral a ratones infectados con *T. cruzi*, en la década de los 60 se tratan por primera vez diez casos de enfermedad de Chagas aguda con este derivado de nitrofurano, registrándose pocos efectos colaterales pero con un xenodiagnóstico positivo en cinco de los pacientes. Al mismo tiempo, algunos enfermos crónicos se someten a tratamientos más largos, con dosis de 10–30 mg/kg/día: el tratamiento se suspendió en varios individuos por la aparición de reacciones adversas en la tercera semana de administración, muy pocos fueron considerados curados de acuerdo con los resultados obtenidos en el xenodiagnóstico

y la serología, y otros tantos casos fueron catalogados de fallo terapéutico (Coura y de Castro, 2002).

Cabe mencionar que en 1953 se descubre la actividad tripanocida del violeta de genciana y desde entonces ha sido ampliamente utilizado en las zonas endémicas, no como tratamiento etiológico de la enfermedad, sino en los centros de hemoterapia para eliminar el parásito de la sangre empleada en las transfusiones (Steverding, 2014). Este colorante no presenta efectos adversos, pero confiere un tono azulado a la sangre que hace que no sea bien aceptado por la población (Coura y de Castro, 2002).

Desde hace más de 40 años, únicamente se han introducido dos fármacos para el tratamiento específico de la enfermedad: nifurtimox (NX) y benznidazol (BZ). Así, uno de los principales problemas de la enfermedad de Chagas es la ausencia de un tratamiento completamente eficaz, ya que ambos presentan una serie de limitaciones en cuanto a su accesibilidad, eficacia y toxicidad, que suponen obstáculos en la terapia de los pacientes. La hipótesis del origen autoinmune de la enfermedad de Chagas crónica ha supuesto un freno en el desarrollo de fármacos antiparasitarios de mayor eficacia, así como en el planteamiento de las terapias realizadas en pacientes crónicos adultos ("antiguo paradigma", Fig. 11). En las dos últimas décadas, la mayor tendencia hacia la hipótesis que defiende la persistencia del parásito como condición necesaria para el desarrollo de la patología crónica ("nuevo paradigma", Fig. 11), ha proporcionado una base sólida para la reconsideración del tratamiento etiológico de estos pacientes (Viotti *et al*., 2014).

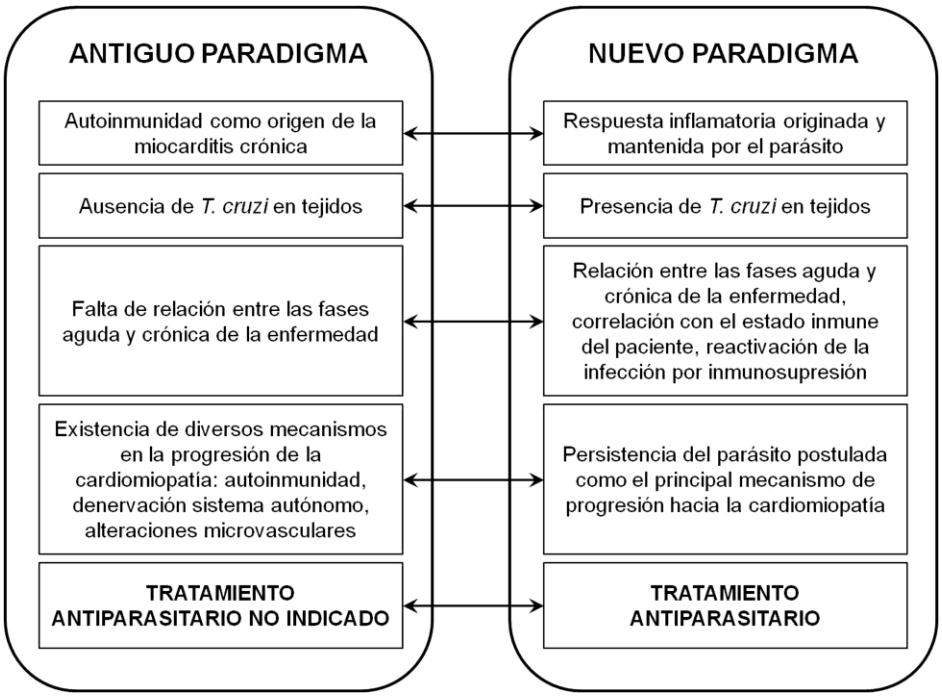


Fig. 11. Comparación de los conceptos defendidos por la hipótesis de la autoinmunidad ("antiguo paradigma") y la de la persistencia del parásito ("nuevo paradigma") en el desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica. Fuente: creado a partir del esquema propuesto en Viotti *et al*. (2009).

De acuerdo con los requerimientos establecidos por la OMS, el "fármaco ideal" para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debería cumplir con los siguientes requisitos: (i) producir cura parasitológica en los casos agudos y crónicos, (ii) resultar efectivo con la administración de una o pocas dosis, (iii) ser accesible a los pacientes y presentar bajo coste, (iv) no mostrar efectos colaterales o teratogénicos, (v) no requerir la hospitalización de los pacientes para su tratamiento y (vi) no presentar resistencias (Coura y de Castro, 2002).

Ninguno de los dos fármacos actualmente disponibles cumple con los preceptos anteriores, ya que ambos muestran actividad limitada en la fase crónica, los pacientes precisan de largos periodos de tratamiento con la administración de 2–3 dosis diarias, no son accesibles a toda la población afectada, requieren de monitorización clínica, inducen una gran variedad de efectos adversos y algunas cepas de *T. cruzi* se muestran resistentes (Coura, 2009). De esta manera, los resultados obtenidos con ambos fármacos varían de acuerdo con la fase de la enfermedad, el periodo de tratamiento y la dosis administrada, la edad y el origen geográfico del paciente (Coura y de Castro, 2002).

Debido a que a día de hoy aún no se dispone de mencionado "fármaco ideal", el desarrollo y búsqueda de alternativas terapéuticas continúa siendo una prioridad en la investigación de la enfermedad de Chagas.

1.8.1. Fármacos disponibles

El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas con los dos fármacos actualmente disponibles, está recomendado en los siguientes casos:

- Fase aguda: independientemente de cuál haya sido el mecanismo de transmisión (Coura y de Castro, 2002). El tratamiento de la infección aguda presenta hasta un 80% de curas parasitológicas (Guedes *et al*., 2011).
- Infección congénita: la administración del tratamiento en niños durante el primer año de vida muestra una eficacia próxima al 100% en la eliminación de parásito (WHO, 2012).
- Infección accidental: el tratamiento debe iniciarse de forma inmediata y durante 10 días consecutivos. Cuando la carga parasitaria es elevada, debe administrarse por un periodo mínimo de 30 días (CBDC, 2005).
- Trasplante de órganos: el donador seropositivo debe tratarse con BZ durante 60 días consecutivos antes del trasplante. Con respecto al receptor, el tratamiento debe iniciarse después de la intervención y mantenerse durante 10 días, e introducirse la terapia convencional para la fase aguda cuando exista seroconversión (CBDC, 2005).
- Fase crónica reciente: considerada cuando la infección se ha adquirido en los últimos 10 años, incluyendo niños de hasta 12–14 años y adultos infectados en áreas endémicas, o

por transfusión sanguínea en un intervalo de tiempo conocido (Coura y de Castro, 2002). Los resultados en esta fase son mejores que los del tratamiento en la fase crónica avanzada, alcanzándose en ocasiones un elevado porcentaje de curas parasitológicas en niños menores de 14 años (Coura y de Castro, 2002; Guedes *et al*., 2011).

- Fase crónica avanzada, dando prioridad a los casos en fase indeterminada o con patología cardíaca y/o digestiva leve (Coura y de Castro, 2002; Coura y Borges-Pereira, 2011). Durante la fase crónica, el porcentaje de curas parasitológicas reportadas desciende hasta el 10–20% (Coura y de Castro, 2002; Guedes *et al*., 2011). Esta pérdida de eficacia en comparación con la que muestran en la fase aguda, podría estar relacionada con una farmacocinética desfavorable y una limitada penetración en los tejidos. Ambos factores afectarían a su actividad durante la fase crónica, en la que los parásitos se encuentran preferentemente confinados en los tejidos multiplicándose lentamente (Urbina, 2010). Para la mayoría de los casos crónicos únicamente se prescribe tratamiento paliativo de los síntomas cardíacos y/o digestivos (Viotti *et al*., 2014). De otro modo, debido al riesgo de insuficiencia cardíaca y muerte que existe durante esta fase, el tratamiento específico puede resultar fundamental para evitar la progresión de la enfermedad y la aparición de lesiones en el miocardio (Guedes *et al*., 2011). Por el contrario, no hay evidencias de que evite la progresión de la enfermedad digestiva (Bern, 2015). La eficacia del NX y el BZ como tratamiento en la fase crónica sigue mostrando controversias de acuerdo con los resultados contradictorios obtenidos en diferentes ensayos clínicos (Guedes *et al*., 2011). Durante la última década se han realizado diversos estudios aleatorizados orientados a evaluar la eficacia del BZ como monoterapia *(TRAENA, BENEFIT, CHAGASAZOL)* o en terapia combinada con otros fármacos *(STOP CHAGAS y E1224)* en pacientes crónicos con o sin compromiso cardíaco (Urbina, 2015), sobre los cuales se tratará más adelante.
- Reactivación de la infección por *T. cruzi*: está indicado el tratamiento específico convencional durante 60 días consecutivos, pudiéndose prolongar hasta 90 días dependiendo de las condiciones clínicas del paciente (CBDC, 2005).

1.8.1.1. Nifurtimox

El NX es un 5-nitrofurano [3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamino)-2,3,5,6-tetrahidro-4*H*-1,4-tiazina-1,1-dióxido] (Fig. 12) comercializado por Bayer en 1967 bajo el nombre de Lampit®. Durante muchos años fue considerado el tratamiento de primera línea para la enfermedad de Chagas aguda (Patterson y Wyllie, 2014). Sin embargo, desde la década de los 80 la distribución del NX ha sido discontinua en Brasil, Argentina, Chile y Uruguay (Coura, 2009) y actualmente no se prescribe en varios países debido a sus efectos adversos y su potencial genotoxicidad (Patterson y Wyllie, 2014). Por el contrario, en 2009 se implementó su

utilización en terapia combinada con eflornitina para el tratamiento de la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño), causada por *Trypanosoma brucei* (WHO, 2015).

El NX se encuentra disponible en comprimidos de 120 y 30 mg para el tratamiento de la enfermedad en adultos y en niños, respectivamente (Dias *et al*., 2014). En general, el tratamiento en adultos consiste en la administración por vía oral de 8–10 mg/kg/día, mientras que en niños la dosis alcanza los 15 mg/kg/día, en ambos casos dividida en tres tomas diarias cada 8 h durante 60–90 días consecutivos (CBDC, 2005).

Tras su administración por vía oral, el NX se absorbe rápidamente a nivel del tracto gastrointestinal, pero no alcanza concentraciones elevadas en plasma (10–20 μM). Menos del 0,5% de la dosis es excretada en orina y presenta una semivida de eliminación de 3 h. El NX sufre un proceso de biotransformación muy rápido, probablemente ligado a un "efecto de primer paso" hepático (Raether y Hänel, 2003).

Las reacciones adversas más frecuentes son de tipo nervioso y digestivo e incluyen excitabilidad, mialgia, somnolencia, alucinaciones, anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y ocasionalmente dolor abdominal y diarrea. Raramente se han descrito convulsiones en los pacientes. Algunos de estos efectos adversos pueden ser paliados con diazepam, cimetidina o metoclopramina, entre otros fármacos (Coura, 2009).

Además, el NX es potencialmente genotóxico de acuerdo con los resultados obtenidos en pruebas como el test de Ames, el ensayo cometa o el test de los micronúcleos (Buschini *et al*., 2009). Hay que considerar que, para compuestos nitroderivados, el primero puede sobredimensionar los efectos mutagénicos por el uso de cepas de *Salmonella typhimurium* y la mayor actividad de las nitro-reductasas (NTR) en bacterias, comparada con la que exhiben en células de mamífero. De esta manera, la evaluación del efecto mutagénico para nitroderivados resulta más predictiva en pruebas con células de mamífero como el ensayo cometa y el test de los micronúcleos (Buschini *et al*., 2009; Patterson y Wyllie, 2014).

El tratamiento con NX está contraindicado en mujeres gestantes y en aquellas en edad fértil que no usen anticonceptivos. Se debe valorar su administración a pacientes con afecciones graves como infecciones sistémicas, insuficiencia cardíaca, respiratoria, renal o hepática, ancianos y personas muy debilitadas (Coura y de Castro, 2002; CBDC, 2005).

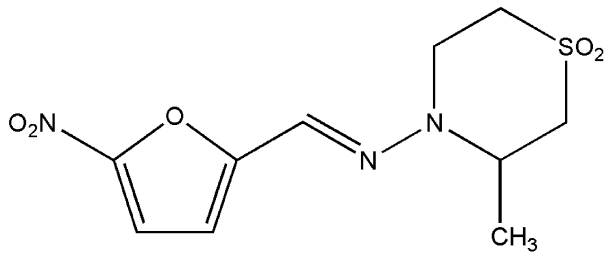


Fig. 12. Estructura química del fármaco de referencia nifurtimox.

o *Mecanismo de acción*

El NX actúa como un profármaco cuya activación ocurre mediante dos tipos de NTR (Fig. 13):

- Las NTR-I, comunes en bacterias y menos frecuentes en organismos eucariotas, son enzimas dependientes de NAD(P)H que catalizan la reducción del grupo nitro mediante 2 electrones, generando un intermediario nitroso (R-NO) que rápidamente se reduce captando 2 electrones al derivado hidroxilamina (R-NHOH), el cual puede metabolizarse para dar lugar a una amina (inerte) o a cationes nitrenio que promueven daños a nivel del DNA. Los intermediarios electrófilos pueden reaccionar con otras moléculas en la célula, caso del R-NO con los tioles, y alternativamente, el anillo de furano puede romperse originando nitrilos de cadena abierta. Esta reducción llevada a cabo por las NTR-I es "independiente de oxígeno", ya que no supone la intervención de O_2 y por tanto, no se generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Las enzimas NTR-I pueden actuar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Wilkinson y Kelly, 2009; Hall *et al*., 2011).
- Por el contrario, la actividad de las ubicuas NTR-II es "dependiente de oxígeno". Éstas catalizan la reducción del R-NO_2 a través de 1 electrón originando el correspondiente anión-radical nitro (R-$NO_2^{\bullet -}$), el cual en presencia de oxígeno se regenera al nitrofurano de partida al tiempo que se producen aniones-radicales superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (Hall *et al*., 2011).

El estrés oxidativo generado por la actividad de las NTR-II se ha aceptado como principal mecanismo tripanocida para el NX (Wilkinson y Kelly, 2009). Sin embargo, continúa siendo objeto de estudio debido a que el ciclo redox ocurre también en células de mamífero, de modo que este mecanismo, en el que la actividad está ineludiblemente ligada a una toxicidad celular, no explicaría una acción selectiva del fármaco (Raether y Hänel, 2003; Urbina, 2010; Hall *et al*., 2011).

La identificación de una *bacterial-like* NTR-I en *T. cruzi* y *T. brucei*, junto con una relación directa entre los niveles de expresión de esta enzima y la susceptibilidad al fármaco, propone la activación del NX a través de esta vía (Wilkinson *et al*., 2008). Conjuntamente, estudios *in vitro* han mostrado una mayor sensibilidad de las células de mamífero hacia el nitrilo de cadena abierta insaturado obtenido vía NTR-I en comparación con su relativa resistencia al nitrofurano, apuntando que la reducción vía NTR-I, que ocurre únicamente en el parásito, es la responsable de la selectividad del NX hacia los tripanosomas (Hall *et al*., 2011). Se desconoce el mecanismo exacto por el que el nitrilo insaturado ejerce su actividad en el parásito, habiéndose sugerido la reacción del carbonilo α,β-insaturado con grupos SH de proteínas y otras biomoléculas (adición de Michael) produciendo su inhibición irreversible y la muerte celular (Patterson y Wyllie, 2014). Las células de mamífero expresan enzimas que pueden mediar este tipo de reducción de 2 electrones en los nitroheterociclos, sin embargo esta actividad es baja en los tejidos normales y elevada en células tumorales, estrategia que se ha venido explotando en el desarrollo de compuestos antitumorales (Hall *et al*., 2011).

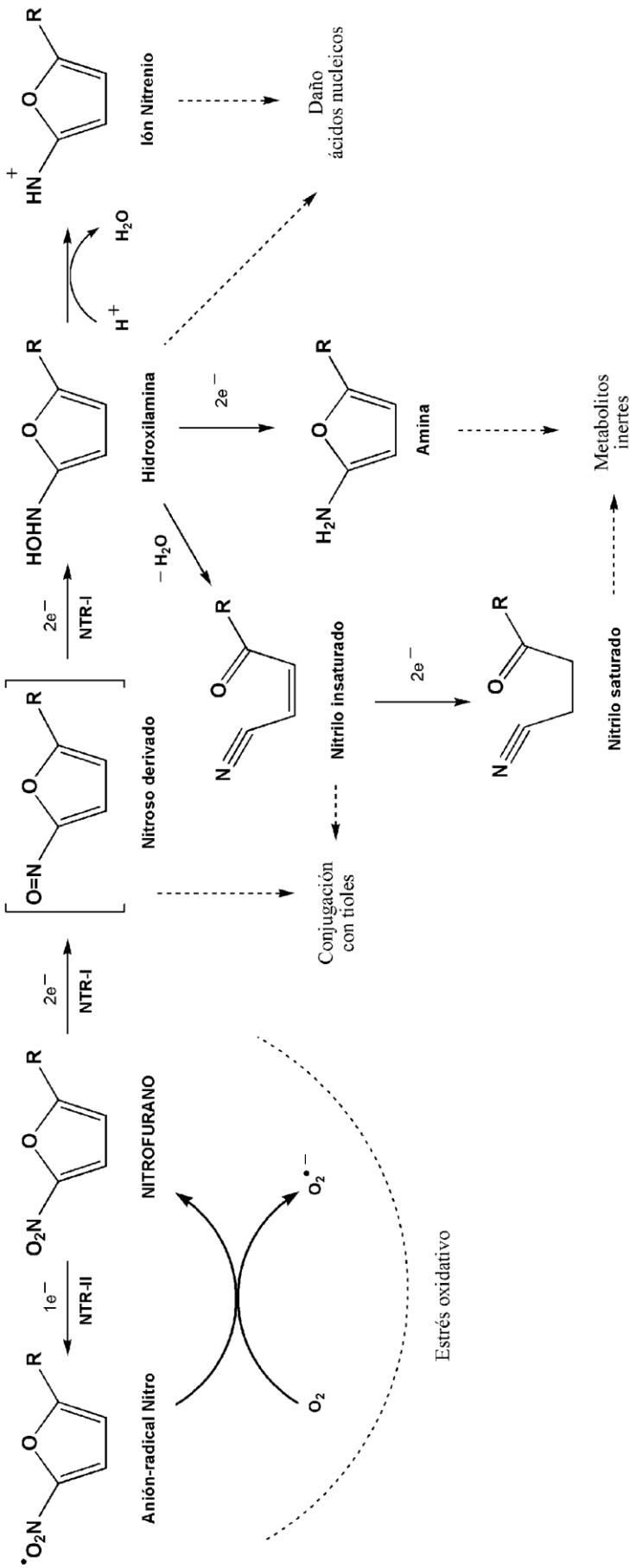


Fig. 13. Mecanismo de acción del nifurtimox. NTR-I: nitro-reductasa de tipo I. NTR-II: nitro-reductasa de tipo II. Fuente: esquema creado a partir de los propuestos por Wilkinson y Kelly (2009) y Hall *et al*. (2011).

1.8.1.2. Benznidazol

El BZ es un 2-nitroimidazol [N-bencil-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida] (Fig. 14) comercializado por primera vez en el año 1972 por Roche con el nombre de Rochagan®, Radanil® en Argentina. A finales del s. XX Roche transfiere la producción del BZ a LAFEPE *(Laboratório Farmacêutico de Pernambuco)* y en 2012 se anuncia la producción del BZ por parte del laboratorio argentino ELEA y su distribución bajo el nombre de Abarax®, con el propósito de asegurar el abastecimiento nacional del fármaco y responder a su demanda internacional (Dias *et al*., 2014).

En la mayoría de los países, el BZ es el fármaco de primera línea para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (WHO, 2015). En caso de que exista intolerancia al BZ puede utilizarse el NX como alternativa, y en caso de que se produzca fracaso terapéutico con alguno de los dos y a pesar de que existe la posibilidad de resistencia cruzada, se puede intentar el tratamiento con el otro fármaco (CBDC, 2005).

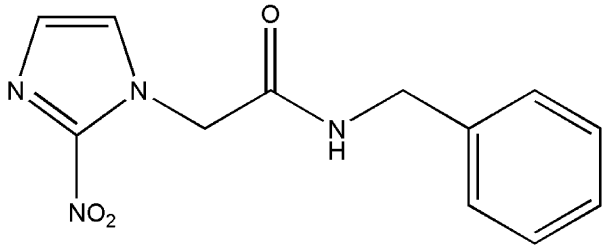


Fig. 14. Estructura química del fármaco de referencia benznidazol.

En la actualidad el BZ está disponible en comprimidos de 100 mg producidos por LAFEPE, así como en dos nuevas formulaciones de Abarax® que se introdujeron en el año 2012: (i) comprimidos dispersables de 50 mg doblemente ranurados para cubrir la administración en la población pediátrica, desde recién nacidos (debido la posibilidad de dividirse en cuatro partes de 12,5 mg) a adolescentes y jóvenes de menos de 40 kg de peso, y (ii) comprimidos dispersables de 100 mg doblemente ranurados para su administración en niños y adultos de más de 40 kg de peso (Dias *et al*., 2014). En el año 2013 fue incluida en la Lista de Medicinas Esenciales para niños de la OMS, una nueva formulación pediátrica de BZ desarrollada por LAFEPE en colaboración con DNDi *(Drug for Neglected Diseases iniciative):* comprimidos de 12,5 mg dirigidos al tratamiento de recién nacidos y niños de hasta 2 años, permitiendo de esta manera administrar una dosis más exacta a la población infantil sin necesidad de fraccionar comprimidos de mayor dosis (DNDi, 2013).

El tratamiento en adultos se realiza con dosis de 5 mg/kg/día y en niños con dosis de 5–10 mg/kg/día, siendo en ambos grupos administradas por vía oral y repartidas en 2–3 tomas diarias durante 60 días consecutivos (CBDC, 2005).

La administración oral de 100 mg de BZ presenta una concentración plasmática máxima de aproximadamente 10 μM, una biodisponibilidad media del 92% y una semivida de eliminación de 12 h. El BZ es metabolizado a nivel hepático, excretándose un 20% de la dosis sin modificar en orina, y su unión a proteínas plasmáticas es del 44% (Raether y Hänel, 2003).

En general, el BZ es mejor tolerado por los pacientes que el NX. Sin embargo, presenta un amplio espectro de reacciones adversas que comprende síntomas de hipersensibilidad, dermatitis con erupción cutánea (generalmente entre el 7–10º día de tratamiento), edema generalizado, dolor articular y muscular, depresión de la médula ósea con neutropenia, púrpura trombocitopénica y agranulocitosis como las manifestaciones más severas, así como polineuropatía periférica. Los efectos adversos leves pueden ser controlados con la introducción de antihistamínicos y corticosteroides. Con respecto a los casos más severos que presentan agranulocitosis, púrpura trombocitopénica o síndrome de Stevens-Johnson, el tratamiento con BZ debe suspenderse e iniciarse un tratamiento con antibióticos en el caso de que haya septicemia, y costicosteroides para controlar los cuadros de agranulocitosis y púrpura trombocitopénica (Coura y de Castro, 2002; Coura, 2009).

De manera similar al NX, el potencial genotóxico del BZ se ha confirmado mediante el test de Ames, el ensayo cometa y el test de los micronúcleos (Buschini *et al*., 2009). En modelos animales se ha demostrado que dosis elevadas de BZ pueden aumentar el riesgo de linfoma; sin embargo, éste no se ha detectado en humanos a las dosis comúnmente utilizadas en el tratamiento de la enfermedad (Viotti *et al*., 2014). La administración de BZ está contraindicada en los mismos casos que el NX (Coura y de Castro, 2002; CBDC, 2005).

o *Mecanismo de acción*

Como el NX, el BZ también se comporta como un profármaco cuya activación da lugar a una serie de metabolitos capaces de producir daños a nivel del ADN, así como una depleción en los niveles de tioles de *T. cruzi* (Fig. 15).

De acuerdo con su estructura química, el BZ es susceptible de actuar como sustrato de las enzimas NTR. Sin embargo y a diferencia del NX, el BZ no genera grandes niveles de ROS en el parásito, de modo que su mecanismo de acción no se encuentra vinculado a la inducción de estrés oxidativo (Urbina, 2010). La activación del BZ probablemente ocurre de forma exclusiva a través de la reducción catalizada por las NTR-I, obteniéndose finalmente el metabolito glioxal, capaz de formar aductos con proteínas, ADN y moléculas pequeñas como el glutatión (GSH), conduciendo a la muerte del parásito (Hall *et al*., 2012). Por otra parte, debido a su capacidad para liberar residuos de timina, el grado de alteración que los 2-nitroimidazoles producen en el ADN depende del contenido en adenina-timina (Tocher, 1997), elevado a nivel de los minicírculos del ADNk (Soeiro y de Castro, 2009).

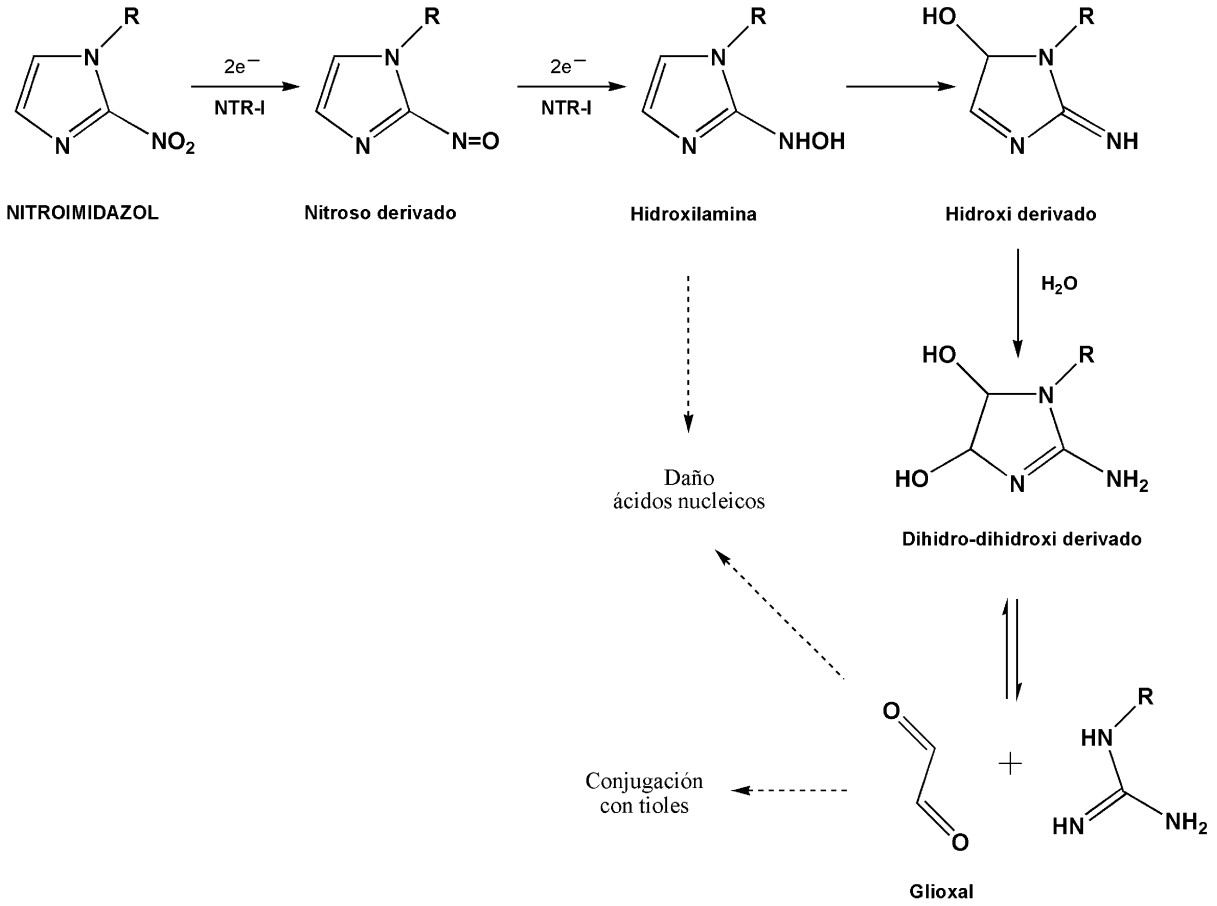


Fig. 15. Mecanismo de acción del benznidazol. NTR-I: nitro-reductasa de tipo I. Fuente: creado a partir del esquema propuesto por Wilkinson *et al*. (2011).

No obstante, la contribución del glioxal a la toxicidad del BZ se ve dificultada por la presencia del sistema glioxalasa, encargado de la detoxificación de dicho metabolito y otros dialdehídos antes de que éstos reaccionen con componentes celulares (Hall *et al*., 2012). En células de mamífero las enzimas glioxalasa I y II utilizan GSH como cofactor, mientras que en *T. cruzi* éstas dependen del tripanotión [$T(SH)_2$] (Irigoín *et al*., 2008; Krauth-Siegel y Comini, 2008). De esta manera, se acepta que la actividad tripanocida del BZ es consecuencia de una acción conjunta del glioxal y otros metabolitos intermediarios tales como el nitroso derivado, la hidroxilamina o el ion nitrenio (Hall *et al*., 2012).

o *Ensayos clínicos para la evaluación del tratamiento con BZ en fase crónica*

– *TRAENA: TRAtamiento EN pacientes Adultos (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02386358)*

Ensayo clínico aleatorizado en fase III, doble ciego placebo-controlado, llevado a cabo en Argentina (1999–2012) sobre 763 pacientes con enfermedad crónica con o sin compromiso cardíaco, a los que se les administró 5 mg/kg/día de BZ por vía oral durante 60 días, o placebo, y cuya evolución post-tratamiento se siguió mediante técnicas de ELISA y RT-PCR.

Los pacientes incluidos en el ensayo tenían edades comprendidas entre los 20 y los 55 años y diagnóstico positivo para *T. cruzi* por al menos dos pruebas serológicas distintas. La mortalidad, desarrollo de insuficiencia cardíaca, arritmias severas, implante de marcapasos o cardiodesfibrilador; así como la negativización serológica permanente, fueron las principales variables a valorar en el estudio (disponible en http://clinicaltrials.gov/show/NCT02386358, acceso: febrero de 2016).

- *BENEFIT: BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00123916)*

Se trata de un estudio en fase III llevado a cabo durante 2004–2011, en el que 2.854 pacientes crónicos con cardiomiopatía chagásica fueron tratados de forma aleatoria, con BZ o placebo por vía oral, y se les realizó seguimiento durante una media de 5 años.

Los pacientes incluidos en el ensayo tenían entre 18 y 75 años de edad, estaban diagnosticados con al menos dos pruebas serológicas positivas y mostraban cardiopatía. La dosis de BZ administrada fue de 5 mg/kg/día durante 60 días. A partir de febrero de 2009, pasó a ser una dosis fija de 300 mg/día administrada durante un periodo variable de 40–80 días ajustada según el peso del paciente, manteniéndose en todo caso la dosis total de BZ.

Los pacientes fueron evaluados durante el tratamiento, una vez concluido éste, a los 6 meses y anualmente, hasta la finalización del estudio. Durante el tratamiento se monitorizó su función hepática y cardíaca por electrocardiografía, y se controló la presencia de parásitos circulantes mediante PCR. Se estudió la ocurrencia de muerte, implante de marcapasos o cardiodesfibrilador, taquicardia ventricular, trasplante cardíaco, fallo cardíaco, isquemia o eventos tromboembólicos sistémicos o pulmonares. Además, se evaluó la respuesta al tratamiento en base a los resultados de PCR y el DTU prevalente en el área geográfica de procedencia: Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia y El Salvador.

Los resultados señalan que el tratamiento con BZ en pacientes con cardiomiopatía chagásica establecida disminuye considerablemente la detección de parásitos circulantes, pero no reduce de manera significativa el deterioro clínico cardíaco (Morillo *et al.*, 2015).

1.9. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN INVESTIGACIÓN

La identificación de agentes antiparasitarios puede surgir a partir del cribado farmacológico de compuestos naturales y de síntesis, moléculas con similitud estructural a fármacos de actividad reconocida, fármacos aprobados para el tratamiento de otras enfermedades o mediante la identificación de dianas y rutas metabólicas específicas del parásito (Coura y de Castro, 2002). Además de los nuevos candidatos, es importante considerar la aplicación de recursos de tecnología farmacéutica orientados a potenciar la biodisponibilidad y eficacia de

los dos fármacos actualmente disponibles, como estrategia para mejorar el arsenal terapéutico de la enfermedad de Chagas (Bahia *et al.*, 2014a).

1.9.1. Principales dianas terapéuticas y candidatos al tratamiento

1.9.1.1. Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol

A lo largo de su ciclo biológico, *T. cruzi* requiere de esteroles específicos para garantizar su supervivencia (formación de membranas) y diferenciación (proliferación celular) (Urbina, 2010; Soeiro *et al.*, 2013). Al igual que en los hongos y en otros protozoos, el esterol mayoritario de *T. cruzi* es el ergosterol y, a diferencia de las formas sanguíneas de *T. brucei*, capaces de construir sus membranas a partir de colesterol exógeno, el ergosterol endógeno de *T. cruzi* no puede ser reemplazado por colesterol procedente del hospedador (Lepesheva y Waterman, 2011).

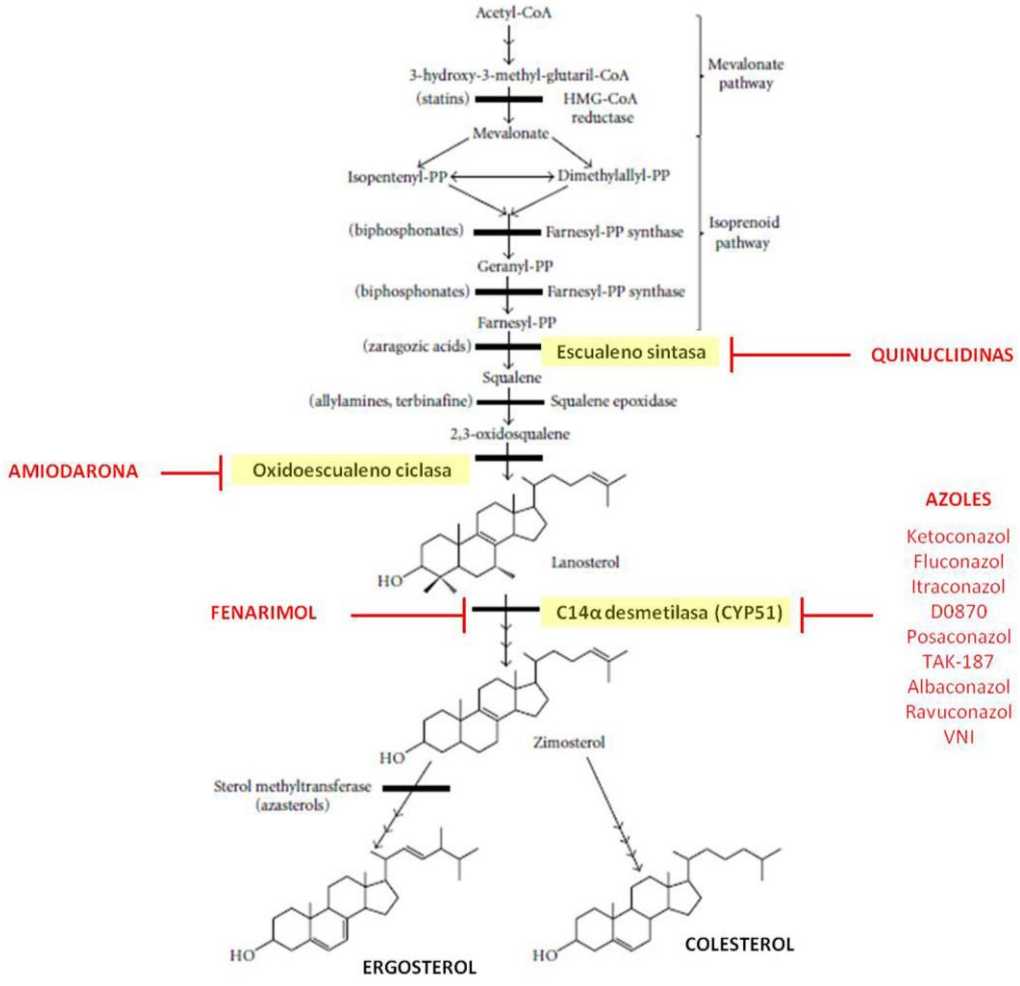


Fig. 16. Biosíntesis del ergosterol y colesterol mostrando los pasos principales, enzimas involucradas e inhibidores. En rojo: diversos compuestos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) con actividad frente a *T. cruzi*. Fuente: esquema adaptado de de Souza y Rodrigues (2009).

Se han considerado diversos compuestos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) como potenciales agentes tripanocidas: inhibidores de las enzimas escualeno sintasa, escualeno epoxidasa, oxidoesqualeno ciclasa y C14α-desmetilasa (CYP51). Las tres primeras son comunes a la biosíntesis del colesterol y ergosterol, pudiendo sus inhibidores tener efectos nocivos para los humanos. Sin embargo, una vez sintetizado el lanosterol ambas rutas se diferencian, y en cada una se originan compuestos distintos participando enzimas específicas (Guedes *et al*., 2011).

o *Inhibidores de la escualeno sintasa*

Varias quinuclidinas inhibidoras de la enzima escualeno sintasa y potenciales agentes anticolesteremiantes presentan actividad sobre *T. cruzi*. Su selectividad podría deberse a la capacidad de las células hospedadoras para compensar un bloqueo en la síntesis *de novo* del colesterol, mediante incorporación del colesterol exógeno presente en el medio o el suero, proceso que no ocurre en *T. cruzi*, incapaz de responder ante un bloqueo en la biosíntesis del ergosterol. En cualquier caso, en la aplicación de estos compuestos como agentes antiparasitarios se prefiere una inhibición específica de la enzima homóloga de *T. cruzi*, a fin de evitar efectos adversos en el hospedador derivados de su uso prolongado (Urbina, 2010).

o *Inhibidores de la oxidoescualeno ciclasa*

El fármaco amiodarona, antiarrítmico utilizado frecuentemente en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Chagas crónica con afectación cardíaca, ha demostrado actividad anti-*T. cruzi in vitro* e *in vivo*, y un efecto sinérgico con el posaconazol (POS). Como antichagásico presenta un mecanismo de acción dual: alteración en la homeostasis del calcio y bloqueo de la biosíntesis del ergosterol a nivel de la enzima oxidoescualeno ciclasa (Urbina, 2010).

o *Inhibidores de la CYP51*

La CYP51 de los tripanosomátidos presenta menos del 30% de similitud con su homólogo en humanos, indicando una actividad selectiva de los inhibidores de la TcCYP51. Su homología con la CYP51 de hongos es inferior al 25%, de modo que no todo antifúngico tiene que resultar activo en *T. cruzi* (Lepesheva y Waterman, 2011). En este contexto, azoles como el ketoconazol, fluconazol o itraconazol, inhibidores de la CYP51 altamente eficaces como antifúngicos, no muestran efecto curativo en la infección por *T. cruzi* en humanos, y son incapaces de frenar la progresión de la enfermedad (Coura y de Castro, 2002; Urbina, 2010). Los compuestos D0870 y POS, nuevos derivados de triazol inhibidores de la CYP51 de hongos y protozoos, fueron los primeros en producir curas parasitológicas en el modelo murino de infección aguda y crónica, atribuidas a su potencia y selectividad intrínseca hacia *T. cruzi*, además de a su farmacocinética favorable (Urbina, 2010).

Concretamente, los resultados obtenidos con el POS *in vitro* e *in vivo* señalaron a este compuesto, inicialmente registrado para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas, como candidato para la terapia específica de la enfermedad de Chagas crónica (Urbina, 2010). El POS ha demostrado una importante actividad *in vitro* frente a amastigotes de cepas representativas de los DTU TcI, TcII, TcIV y TcVI (CI_{50} < 12 nM), aunque de acuerdo con su mecanismo de acción requiere mayor tiempo de exposición que los nitroderivados para eliminar la infección (Moraes *et al*., 2014). Por otra parte, se ha visto como la exposición de *T. cruzi* al POS induce una sobreexpresión en los niveles de CYP51, pudiendo este hecho contribuir al desarrollo de resistencias (Lepesheva *et al*., 2010). Con respecto a los ensayos *in vivo*, la administración del POS en las fases aguda y crónica alcanza curas parasitológicas superiores al 50% en ratones infectados con cepas de *T. cruzi* de distinta sensibilidad a los fármacos de referencia – CL, Y y Colombiana – (Guedes *et al*., 2011). Comparado con el BZ, la actividad del POS está menos influida por el estado inmunológico del hospedador, e independientemente de la cepa de *T. cruzi*, presenta una eficacia similar en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes, ligeramente superior a la del BZ (Urbina, 2010; Molina *et al*., 2015). Su combinación con el BZ, así como con otros fármacos como el amlodipino (bloqueante de los canales de calcio) o la clemastina (antihistamínico), ha sido evaluada en el modelo murino de infección aguda, siendo la asociación más efectiva la combinación POS + amlodipino (Planer *et al*., 2014). Ya en humanos, Pinazo *et al*. (2010) publican el caso de una mujer diagnosticada con la enfermedad crónica y lupus eritematoso sistémico, tratada con BZ (5 mg/kg/día durante 60 días) y fármacos inmunosupresores, en la que tras corroborarse el fracaso terapéutico, se realiza tratamiento compasivo con POS (400 mg/12 h, 90 días). Se obtuvieron resultados de RT-PCR negativos durante los 13 meses de seguimiento, en los que se le mantuvo el tratamiento inmunosupresor. En la última década se han realizado dos ensayos clínicos para evaluar el tratamiento de la enfermedad crónica con POS *(CHAGASAZOL, STOP CHAGAS),* cuyos resultados discrepan con los obtenidos experimentalmente (Urbina, 2015). Una eficacia dependiente del tiempo de exposición al fármaco, obtención de niveles plasmáticos en humanos inferiores a los del modelo animal, o una menor susceptibilidad a los IBE de los parásitos con baja actividad metabólica (formas quiescentes) o no replicativos (tripomastigotes), son algunas de las explicaciones a la diferente actividad del POS en los ensayos preclínicos y clínicos (Molina *et al*., 2015).

Otros triazoles como TAK-18, albaconazol y ravuconazol son activos sobre *T. cruzi* tanto *in vitro* (CMI en amastigotes 1–10 nM) como *in vivo* y bien tolerados por el hospedador a distintas posologías (Guedes *et al*., 2011). El compuesto TAK-187 cura la infección aguda y crónica en ratón ocasionada por cepas de distinta sensibilidad a los fármacos de referencia (Urbina, 2010). El albaconazol muestra una actividad importante en el modelo canino de infección aguda (100% de curas parasitológicas en perros infectados con *T. cruzi* cepa Y tratados 90 días con 1,5 mg/kg/día). Aunque se han detectado resistencias naturales hacia

el albaconazol, se presenta como candidato al tratamiento de la infección en humanos por su mayor semivida (120 h), en comparación con la que tiene en diversos modelos animales (Guedes *et al*., 2011). Con respecto al ravuconazol, pese a su excelente actividad *in vitro*, se ha observado la ausencia de efecto curativo en los modelos de infección aguda murino (cepa Colombiana) y canino (cepas Berenice-78 e Y), atribuida a su corta semivida en ratón y perro. Este hecho no ha impedido su consideración como tratamiento de la infección en humanos, para los que muestra una semivida de 4–8 días (Guedes *et al*., 2011). Así, un acuerdo entre DNDi y la compañía Eisai, permitió el desarrollo de E1224, profármaco del ravuconazol sometido a ensayo clínico para el tratamiento de la enfermedad crónica (Urbina, 2015).

En los últimos años han surgido otros compuestos inhibidores de la CYP51 como el imidazol experimental VNI o análogos del fenarimol. Con respecto al VNI, Villalta *et al*. (2013) obtienen 100% de curas parasitológicas junto con un 100% de supervivencia, durante las fases aguda y crónica, en ratones infectados con la cepa Tulahuen (DTU TcVI) y tratados 30 días con 25 mg/kg/12 h p.o. Asimismo, confirman la eliminación del parásito en sangre y tejidos tras inmunosuprimir a los animales. Soeiro *et al*. (2013) corroboran su excelente actividad en ratones infectados con las cepas Y (DTU TcII) y Colombiana (DTU TcI). Sin embargo, la administración de ciclofosfamida conllevó una reactivación de la parasitemia, indicando que el VNI no produce efecto curativo en la infección con estas cepas, ligada a una diferente susceptibilidad a los inhibidores. Por su parte, la optimización del compuesto fenarimol, inhibidor no azólico de la CYP51 empleado como fungicida en agricultura, dio lugar a una serie de compuestos con destacable actividad *in vitro* frente a amastigotes de la cepa Tulahuen (CI_{50} en el rango nM). El derivado más prometedor de la serie, administrado en dosis de 20 mg/kg/día p.o. durante 20 días, induce en el modelo murino de infección aguda una supresión de la parasitemia similar a la obtenida con 100 mg/kg/día de BZ administrados durante el mismo periodo de tiempo (Keenan *et al*., 2012). De una nueva generación de análogos del fenarimol, surgieron dos compuestos capaces de producir un efecto curativo en dicho modelo, confirmado con PCR negativa tras inmunosupresión, similar al obtenido con el POS y mejorando la eficacia del BZ a la posología antes referida (Keenan *et al*., 2013). No obstante y en base a los resultados obtenidos con el POS y E1224 en los ensayos clínicos, los estudios con análogos del fenarimol se han interrumpido (DNDi, 2013).

- *Ensayos clínicos para la evaluación del tratamiento de la enfermedad crónica con posaconazol y E1224 (profármaco del ravuconazol)*

  - *CHAGASAZOL: Clinical trial for the treatment of chronic Chagas disease with posaconazol and benznidazole (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01162967)*

Se trata de un estudio clínico aleatorizado en fase II, realizado en España (2010–2011) con 78 pacientes crónicos, con el objetivo de comparar la eficacia del POS frente al tratamiento

con BZ. Como criterio de inclusión, se estableció tener más de 18 años, presentar dos pruebas serológicas distintas positivas a *T. cruzi* y un resultado de RT-PCR positivo.

Los pacientes se distribuyeron en tres grupos de tratamiento: (i) BZ vía oral en dosis de 150 mg/12 h, (ii) POS vía oral en dosis de 100 mg/12 h y (iii) POS vía oral en dosis de 400 mg/12 h, todos administrados 60 días. Durante el periodo de tratamiento, los pacientes fueron controlados mediante análisis sanguíneo y RT-PCR, y se evaluó la adherencia al mismo y la aparición de efectos adversos. Asimismo, se realizaron pruebas serológicas al inicio del tratamiento, 6 meses post-tratamiento y finalizado el periodo de seguimiento (40 semanas post-tratamiento).

La negativización permanente de los resultados de RT-PCR, discontinuación del tratamiento y seroconversión, fueron los parámetros considerados para la evaluación de los tratamientos finalizado el periodo de seguimiento. De acuerdo con estos procedimientos, se consideró como fracaso terapéutico a los pacientes que no se les pudo realizar seguimiento, los que abandonaron el tratamiento por reacciones adversas y a aquellos que presentaron al menos un resultado positivo para la RT-PCR una vez concluido el tratamiento.

El estudio indica una falta de eficacia del POS como tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, de acuerdo con los resultados de RT-PCR positivos obtenidos durante el seguimiento en la mayoría de los pacientes. Por el contrario, muestra la gran capacidad del BZ para reducir los niveles de parásitos circulantes en dicha fase, de acuerdo con una negativización de la RT-PCR mantenida durante el seguimiento (Molina *et al.*, 2014).

Como se ha comentado anteriormente, la negativización de la PCR no implica la cura parasitológica de los pacientes (Molina *et al.*, 2014), debido a que no proporciona información sobre la presencia de *T. cruzi* en los órganos internos (Urbina, 2015). Sin embargo, una eliminación sostenida de la parasitemia puede asociarse con una reducción de la carga parasitaria en los mismos y de acuerdo con la hipótesis de la persistencia, con una disminución en la intensidad del proceso inflamatorio desencadenado por *T. cruzi* en los tejidos, que puede conducir a una mejora en la clínica de los pacientes (Urbina, 2015).

- *STOP CHAGAS: STudy of the use of Oral Posaconazole in the treatment of asymptomatic chronic CHAGAS disease (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01377480)*

Es un estudio en fase II, aleatorizado, placebo-controlado y ciego para POS, realizado en 120 pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomática (Argentina, Colombia, México y Venezuela), con el objetivo de comparar la eficacia del POS (400 mg/12 h) y su combinación con el BZ (POS 400 mg/12 h + BZ 200 mg/12 h), con el tratamiento con BZ (200 mg/12 h).

Los pacientes incluidos en el estudio tenían edades comprendidas entre los 18 y los 50 años, y un diagnóstico positivo a la infección por *T. cruzi* en dos pruebas serológicas distintas.

De acuerdo con los resultados de negativización de la PCR obtenidos en el día 180, el porcentaje de éxito terapéutico fue similar entre el grupo tratado con POS *versus* placebo, así como entre el grupo tratado con la terapia combinada POS + BZ *versus* el tratado con BZ (disponible en http://clinicaltrials.gov/show/NCT01377480, acceso: febrero de 2016).

- *E1224: Proof-of-concept study of E1224 to treat adult patients with Chagas Disease (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01489228)*

Estudio clínico en fase II, aleatorizado, doble ciego para E1224 y placebo, iniciado en julio de 2011 en Bolivia y llevado a cabo en 231 pacientes de edades comprendidas entre los 18 y los 50 años presentando la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas, con el objetivo de evaluar la seguridad y eficacia del tratamiento con E1124 (disponible en http://clinicaltrials.gov/show/NCT01489228, acceso: febrero de 2016).

Los pacientes se distribuyeron en los siguientes grupos de tratamiento: (i) E1224 200 mg/semana por 8 semanas, (ii) E1224 400 mg/semana por 8 semanas, (iii) E1224 400 mg/semana por 4 semanas y (iii) BZ 5 mg/kg/día durante 60 días. Todos los tratamientos se administraron oralmente, y el seguimiento se realizó durante los 10 meses posteriores a su finalización (Urbina, 2015).

Como criterio de valoración primario se estableció la cantidad de pacientes con resultados negativos en tres pruebas de RT-PCR al finalizar el tratamiento. El tiempo requerido para la erradicación de la parasitemia y su mantenimiento durante un año, cambios en la serología, seguimiento de los cambios producidos en distintos biomarcadores y su correlación con la eliminación del parásito, farmacocinética e incidencia de reacciones adversas, también fueron considerados para la evaluación del tratamiento (disponible en http://clinicaltrials.gov/show/NCT01489228, acceso: febrero de 2016).

Los resultados presentados en 2013 muestran una importante disminución en los niveles de parásitos circulantes al final del tratamiento con E1224: 79–91% (E1224), 91% (BZ) y 26% (placebo). Sin embargo, ésta no se mantuvo durante el año posterior: 8–31% (E1224), 81% (BZ) y 8,5% (placebo), acusando su ausencia de eficacia a largo plazo (DNDi, 2013).

Con el objetivo de potenciar la eficacia de E1224 y reducir los efectos adversos del BZ, la terapia combinada E1224 + BZ se presenta como una alternativa al tratamiento de la enfermedad crónica. En este contexto, se han realizado ensayos en individuos sanos para la detección de posibles interacciones en la administración combinada de ambos (DNDi, 2014).

1.9.1.2. Inhibidores del metabolismo de fosfolípidos

Dada la estructura molecular de los alquil-lisofosfolípidos (ALP), estos compuestos han sido objeto de estudio como potenciales inhibidores de la síntesis, ruptura o modificación de los

lípidos de membrana. Tradicionalmente, los ALP se han investigado como potenciales antitumorales, ganando interés en las últimas décadas como agentes antiparasitarios frente a *Leishmania* spp. o *T. cruzi*. Concretamente, el efecto que ejercen a nivel de la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina resulta de gran importancia en farmacología, debido a que se ha observado una correlación entre su inhibición y el bloqueo en la proliferación celular (Urbina *et al*., 2006). Como consecuencia de esta acción y de acuerdo con Urbina *et al*. (2006), entre los mecanismos que los ALP desencadenan en la célula, se encuentran los siguientes:

- Alteración en la composición de esteroles.
- Disminución en la producción de esfingomielina, con el consiguiente aumento en los niveles de ceramida, inductor de la apoptosis.
- Interferencia con procesos de señalización intracelular reguladores de la proliferación celular, a nivel de la fosfolipasa C o de la proteína quinasa C.

Dentro de los ALP con aplicación terapéutica se encuentra la miltefosina, usada en el tratamiento oral de la leishmaniosis cutánea y único fármaco actualmente disponible para el tratamiento oral de la leishmaniosis visceral (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015). Sin embargo, es necesario evaluar su eficacia clínica como tratamiento de la enfermedad de Chagas, debido a que la vía congénita es una de las principales vías de transmisión de la misma y la miltefosina presenta potencial teratogénico (Maya *et al*., 2003; Apt, 2010). Como alternativa, la edelfosina se ha ensayado en diferentes modelos experimentales de *T. cruzi* (Croft *et al*., 1996; Lira *et al*., 2001; Santa-Rita *et al*., 2000, 2006).

1.9.1.3. Inhibidores de la cisteín proteasa cruzipaína

La principal cisteín proteasa de *T. cruzi* es la cruzipaína (gp57/51 o cruzaína), presente en las diferentes formas del parásito a lo largo de su ciclo biológico. En los epimastigotes, está confinada en los reservosomas y se encuentra involucrada en la degradación de proteínas de la sangre ingerida por el vector; además, participa en los procesos de metaciclogénesis. En los amastigotes, tiene dos localizaciones distintas: a nivel de compartimentos *reservosoma-like* y principalmente en la superficie del parásito en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora. En los tripomastigotes, la cruzipaína se ubica a nivel de la bolsa flagelar. Esta diferente localización indica, además de su multifuncionalidad, su capacidad para actuar en microambientes distintos, tanto de carácter ácido (a nivel lisosomal) como fisiológico (en la superficie del parásito) (McKerrow *et al*., 2009; Branquinha *et al*., 2015).

La cruzipaína juega un papel importante en la supervivencia de *T. cruzi*, participando en la adquisición de nutrientes, diferenciación celular, invasión de la célula hospedadora y evasión al sistema inmune, y constituye una diana viable para el desarrollo de agentes antichagásicos (McKerrow *et al*., 2009; Branquinha *et al*., 2015).

Entre sus inhibidores irreversibles destaca la vinil sulfona peptídica K777 (K11777). Este prototipo es activo *in vitro* sobre cepas de *T. cruzi* sensibles y resistentes a BZ y NX, y frente a la infección en ratón (McKerrow *et al*., 2009). En el modelo canino, el tratamiento oral durante 14 días en dosis de 50 mg/kg/12 h no elimina por completo la parasitemia, pero protege de la patología cardíaca derivada de la infección por *T. cruzi* (Barr *et al*., 2005).

De acuerdo con su actividad, en el año 2002 se anuncia el desarrollo clínico de K777 como nuevo tratamiento potencial para combatir la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en 2005 se comunica el abandono del proyecto aludiendo a la hepatotoxicidad del compuesto y problemas en su producción (Urbina, 2010; Branquinha, 2015). Debido a que entonces la toxicidad de K777 fue atribuida a un aumento en los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), marcador de daño hepático reversible, posteriormente se llevaron a cabo rigurosos estudios de seguridad que informaron del incremento de ALT únicamente a dosis mayores que la MTD *(maximum tolerated dose)*, y reversible tras el cese de la terapia (McKerrow *et al*., 2009). Algunos de los estudios preclínicos realizados con K777 incluyen pruebas en ratón, perro y mono (Branquinha *et al*., 2015) y están en consideración estudios de MTD y toxicidad crónica en primates no humanos (DNDi, 2014).

A partir de K777 surge el análogo WRR-483, con actividad pH dependiente por la presencia de grupos protonables en su estructura (residuo de Arg × Phe). En comparación con K777, WRR-483 inhibe la cruzipaína de forma moderada a pH ácido. Sin embargo, muestra una actividad tripanocida *in vitro* y en el modelo murino de infección aguda que es comparable a la de su precursor, viéndose potenciada a pH fisiológico y probablemente ligada a una inhibición de la cruzipaína extracelular (Chen *et al*., 2010).

También se han evaluado frente a *T. cruzi* inhidores reversibles de la cruzipaína. La semejanza estuctural que existe entre esta enzima y la catepsina K humana plantea un mejor perfil de toxicidad para estos inhibidores, particularmente si se consigue su selectividad hacia la proteasa del parásito. En un modelo murino de infección aguda que incorpora el tratamiento en la comida en dosis de 3 mg/kg durante 28 días, Ndao *et al*. (2014) obtienen un 90% (compuesto Cz007) y un 78% (compuesto Cz008) de curas parasitológicas tras inmunosuprimir a los animales supervivientes, frente al 71% obtenido con 50 mg/kg de BZ.

1.9.1.4. Inhibidores del metabolismo del pirofosfato

En los tripanosomátidos, la acumulación de cationes y de fósforo en forma de polifosfato ocurre en el acidocalcisoma. Concretamente, el pirofosfato (PPi) y otros polifosfatos de cadena corta son cruciales en la respuesta de estos organismos al estrés y en los procesos de osmorregulación (Docampo *et al*., 2005).

Los bisfosfonatos son análogos del PPi metabólicamente inertes, que se acumulan selectivamente en los acidocalcisomas, de modo que pueden inhibir enzimas y mecanismos

en los que se encuentra involucrado el PPi, como la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS). Diversos N-alquil-bisfosfonatos como el risedronato, pamidronato o ibandronato, utilizados en el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades relacionadas con la resorción ósea, han mostrado cierta actividad sobre *T. cruzi* (Urbina, 2010). En concreto, el risedronato es activo *in vitro* en epimastigotes y amastigotes, y reduce drásticamente los niveles de parasitemia en el modelo murino de infección aguda (hasta 10 mg/kg/día i.v., durante 14 días), pero no consigue la cura parasitológica de los animales (Garzoni *et al.*, 2004a,b).

Debido a que la FPPS es la principal diana de estos compuestos, el tratamiento con bisfosfonatos puede derivar en una alteración de la biosíntesis de esteroles en células eucariotas (ver Fig. 16). Sin embargo, se ha visto una mayor afectación a nivel del parásito que en la célula hospedadora (Garzoni *et al.*, 2004a). Su selectividad como antirresortivos se debe a su diferente acumulación en osteoclastos en comparación con otras células. De una manera similar, la selectividad de estos compuestos hacia *T. cruzi* podría deberse en parte a la presencia de acidocalcisomas y a la elevada concentración de PPi (Garzoni *et al.*, 2004a). No obstante, aquellos bisfosfonatos orientados al tratamiento de la enfermedad de Chagas deben presentar además una baja afinidad por osteoclastos (Bustamante y Tarleton, 2014).

1.9.1.5. Inhibidores de la síntesis y metabolismo redox del tripanotión

En el hospedador, el metabolismo redox dependiente de tioles recae sobre el sistema GSH/glutatión reductasa (GluR) y tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. Los tripanosomátidos carecen de las enzimas GluR y tiorredoxina reductasa y su metabolismo redox depende del ditiol $T(SH)_2$ y la enzima tripanotión reductasa (TryR) (Irigoín *et al.*, 2008).

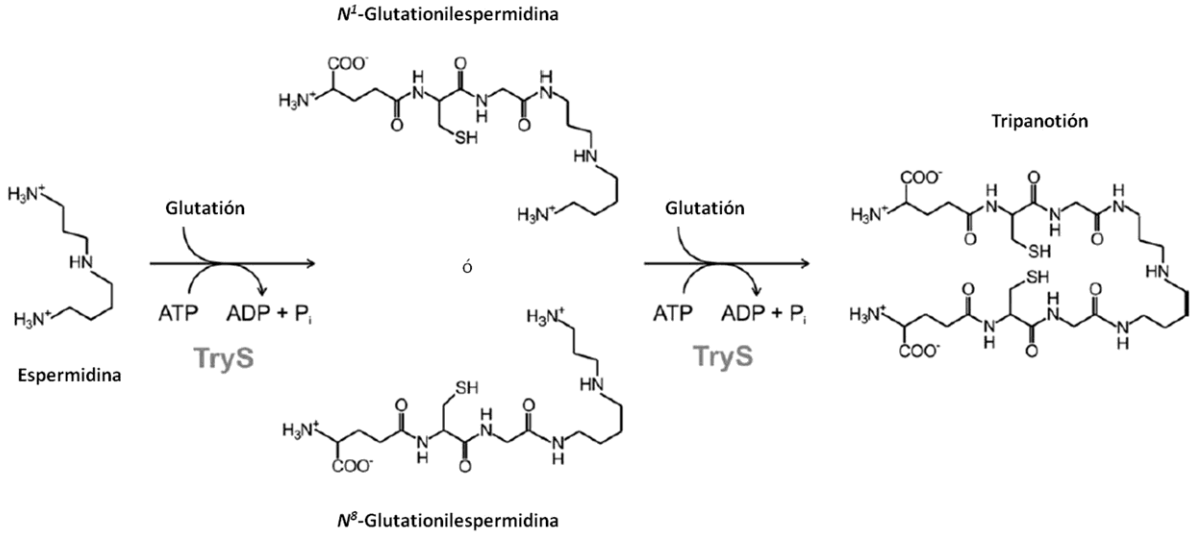


Fig. 17. La biosíntesis del $T(SH)_2$ ocurre en dos pasos consecutivos mediante la incorporación de dos moléculas de GSH a una de espermidina. El proceso consume dos moléculas de ATP y es catalizado por la enzima tripanotión sintetasa (TryS). Fuente: esquema adaptado de Irigoín *et al.* (2008).

Como muestra la Fig. 18, el $T(SH)_2$ es mantenido en su forma reducida gracias a la acción de la TryR. Esta enzima dependiente de NADPH presenta un 35% de homología con la GluR humana, con la que comparte muchas propiedades físicas y químicas. Sin embargo, la principal diferencia entre ambas reside en su especificidad por los disulfuros: mientras que la TryR interacciona con las formas oxidadas de conjugados glutatión-poliamina cargados positivamente (Fig. 17), la GluR sólo lo hace con la forma oxidada del GSH (GSSG), de carga negativa (Irigoín *et al.*, 2008; Krauth-Siegel y Comini, 2008).

El $T(SH)_2$ interviene como donador de electrones en varias reacciones (Fig. 18) y conduce una serie de procesos redox en que la reducción de las moléculas intermediarias triparredoxina (TXN), ácido dehidroascórbico (dhAsc) y GSSG, culmina con la descomposición de especies oxidantes como hidroperóxidos (ROOH, H_2O_2) y con su participación en la síntesis del ADN. El $T(SH)_2$ puede también reaccionar con una gran variedad de electrófilos, mediando en los procesos de detoxificación de aldehídos (sistema glioxalasa), metales o xenobióticos (Müller *et al.*, 2003; Irigoín *et al.*, 2008; Krauth-Siegel y Comini, 2008).

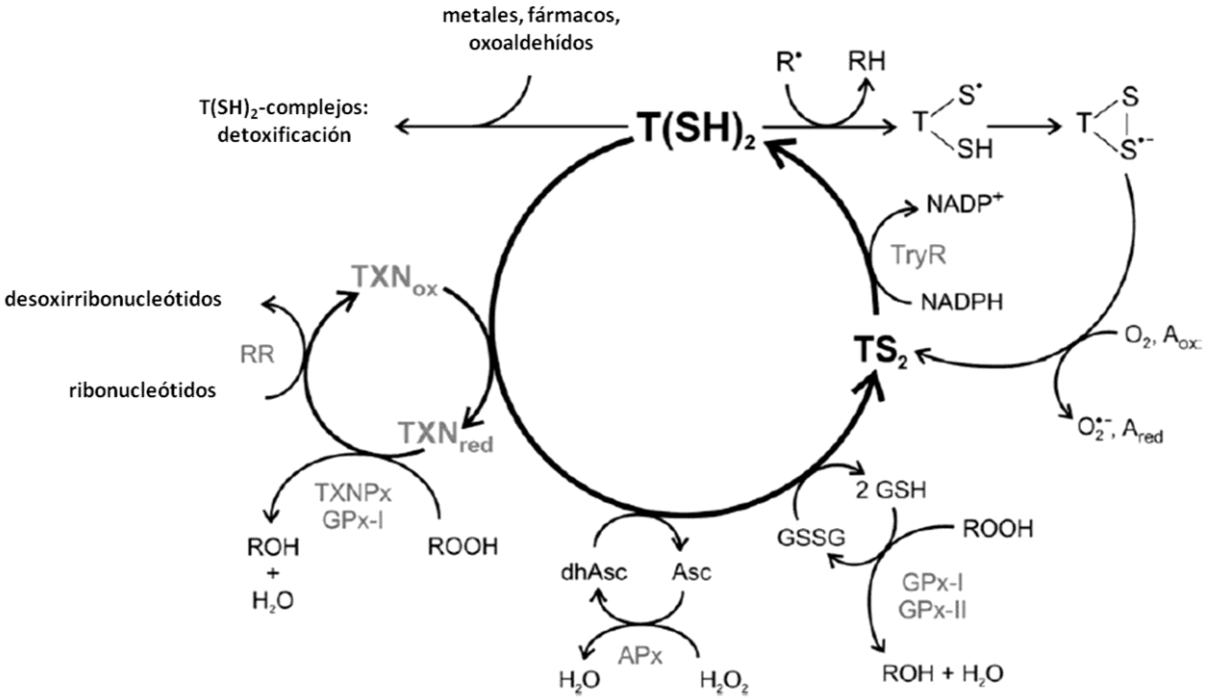


Fig. 18. Reacciones dependientes del $T(SH)_2$. TryR: tripanotión reductasa, TXN: triparredoxina, Asc: ascorbato, GSH: glutatión, RR: ribonucleótido reductasa, ROOH: hidroperóxidos, A: oxidante, TXNPx: triparredoxina peroxidasa, GPx-I y GPx-II: glutatión peroxidasa-*like* triparredoxina peroxidasas I y II, APx: peroxidasa dependiente de ascorbato. Fuente: esquema adaptado de Irigoín *et al.* (2008).

El *pool* de tioles en los tripanosomátidos lo completan otras moléculas como la glutationilespermidina y el ovotiol A, que junto con el GSH se mantienen en su forma reducida por reacción directa con el $T(SH)_2$ (Fig. 18). La concentración de tioles varía entre

las distintas formas del parásito, predominado en todas ellas el $T(SH)_2$ y jugando un papel importante en las defensas antioxidantes de parásito (Irigoín *et al*., 2008).

En lugar de las catalasas y GSH peroxidasas presentes en las células de mamífero, el arsenal antioxidante de *T. cruzi* lo componen peroxirredoxinas, triparredoxina peroxidasas homólogas a las glutatión peroxidasas (GPx) y una peroxidasa dependiente de Asc (APx) (Fig. 18), además de cuatro superóxidodismutasas (Fe-SOD) (Irigoín *et al*., 2008). El metabolismo redox en los tripanosomátidos es *a priori* eficiente, ya que resisten al estallido oxidativo durante la infección del hospedador, y se adaptan perfectamente a distintas condiciones metabólicas y ambientales a lo largo de su ciclo de vida digenético (Krauth-Siegel y Comini, 2008). Sin embargo, a pesar de la variedad de enzimas antioxidantes que poseen, se muestran vulnerables al estrés oxidativo, probablemente por una menor eficacia de sus peroxidasas en comparación con las del hospedador (Müller *et al*., 2003).

La importancia y exclusividad del sistema $T(SH)_2$ en los tripanosomátidos se ha considerado para el desarrollo de quimioterapia antiparasitaria. La ausencia de TryS y TryR en el hospedador, junto con las diferencias entre la TryR y su homólogo GluR en mamíferos relativas a la especificidad del sustrato, han hecho de estas enzimas potenciales dianas para el diseño racional de fármacos tripanocidas (Coura y de Castro, 2002; Irigoín *et al*., 2008; Urbina, 2010; Bustamante y Tarleton, 2014).

Se han identificado varios compuestos como inhibidores de la TryR y agentes tripanocidas *in vitro*, citando como ejemplo las fenotiazinas. Los fármacos clomipramina y tioridazina, utilizados en clínica como antidepresivo y antipsicótico, respectivamente, presentan actividad *in vitro* frente a *T. cruzi*. Además, reducen la parasitemia de la infección aguda en ratón, provocando una consiguiente mejora del daño cardíaco y un aumento de la supervivencia en fase crónica (Rivarola y Paglini-Oliva, 2002). Con respecto a la fase crónica, el tratamiento con clomipramina iniciado el 90 d.p.i. en dosis de 5 mg/kg/día i.p. durante 60 días consecutivos reduce la carga parasitaria y mejora la evolución de la infección, pero no produce la cura parasitológica de los animales (Fauro *et al*., 2013). Igualmente, el tratamiento con tioridazina (180 mg/kg/día p.o. 3 días/semana durante 4 semanas a partir del 180 d.p.i.) repercute favorablemente sobre la patología cardíaca asociada a la fase crónica (Bustamante *et al*., 2007). Sin embargo, la elevada actividad que muestra la TryR en *T. cruzi* ha cuestionado la idoneidad de esta enzima como diana terapéutica (Urbina, 2010), debido a que su actividad tiene que ser reducida en más del 90% para afectar a la viabilidad del parásito (Irigoín *et al*., 2008; Soeiro y de Castro, 2009; Flohé, 2012). De acuerdo con la limitada actividad *in vivo* de los inhibidores reversibles y la alta especificidad requerida por los irreversibles para no interferir con el metabolismo del hospedador, ningún compuesto inhibidor de la TryR ha entrado por el momento en desarrollo clínico como posible tratamiento de la enfermedad de Chagas (Flohé, 2012).

Por otra parte, la enzima TryS cataliza un menor flujo metabólico en el parásito y presenta una secuencia única que avalan su mayor idoneidad como diana para el desarrollo de agentes tripanocidas (Urbina, 2010; Flohé, 2012). El diseño de potenciales inhibidores basado en moléculas miméticas del GSH y el ATP, selectivas hacia los respectivos lugares de unión en la enzima, supuso el inicio de los estudios relativos a la identificación de la TryS como diana terapéutica (Flohé, 2012).

1.9.1.6. Inhibidores de la glucólisis

A diferencia de otros organismos en los que la glucólisis tiene lugar en el citosol, en los tripanosomátidos se lleva a cabo mayoritariamente en el glicosoma. Algunas de las enzimas involucradas en el catabolismo de la glucosa con la consiguiente producción de ATP, como son la hexoquinasa (HK) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), han sido caracterizadas y validadas como dianas terapéuticas (Verlinde *et al.*, 2001).

o *Inhibidores de la hexoquinasa*

La HK es la primera enzima involucrada en la glucólisis y cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa 6-fosfato en una reacción dependiente de ATP. En *T. cruzi* esta enzima presenta gran afinidad por la glucosa y no es inhibida por la glucosa 6-fosfato, no encontrándose estas dos propiedades juntas en ninguna de las cuatro HK humanas. Sin embargo, la TcHK puede ser inhibida por el PPi, probablemente debido a la gran cantidad que se acumula en el parásito (Cáceres *et al.*, 2003). En este contexto, se ha publicado que algunos bisfosfonatos inhiben selectivamente la TcHK sin mostrar actividad frente a la FPPS (apartado 1.9.1.4.) y *viceversa*, siendo diferentes los requerimientos estructurales para inhibir una y otra enzima (Hudock *et al.*, 2006; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2007).

o *Inhibidores de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa*

La enzima GAPDH cataliza la oxidación fosforilativa del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato en presencia de NAD^+ y P inorgánico. Esta enzima presenta menos del 50% de homología con la GADPH humana, así como diferencias en el lugar de unión de la adenosina del NAD^+. De este modo, es posible el desarrollo de inhibidores específicos para la GADPH glicosomal que no afecten a la enzima del hospedador (Verlinde *et al.*, 2001; Soeiro y de Castro, 2009). Varios análogos de síntesis de la adenosina se han propuesto como inhibidores selectivos de la TcGADPH, puesto que frenan la proliferación de amastigotes sin efecto sobre la enzima humana (Bressi *et al.*, 2001).

1.9.1.7. Inhibidores de la ruta de las pentosas fosfato

Además de la glucólisis, la mayoría de los organismos utilizan la ruta de las pentosas fosfato en el metabolismo de la glucosa, estando ambas a su vez conectadas a través de diversos metabolitos intermedios. La ruta de las pentosas fosfato se lleva a cabo mayoritariamente en el citosol, estando presente en parte a nivel de los glicosomas. A partir de la glucosa 6-fosfato se produce la ribosa 5-fosfato, necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos, y se genera NADPH. Como se ha comentado en el apartado 1.9.1.5., las defensas antioxidantes de *T. cruzi* dependen directamente del $T(SH)_2$, el cual se mantiene en su forma reducida por acción de la TryR, que utiliza NADPH. Por tanto, resulta absolutamente esencial para la supervivencia del parásito mantener un *pool* de NADPH en cuyo aporte participan, entre otras, las dos deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato (Maugeri y Cazzullo, 2004; Igoillo-Esteve *et al*., 2007; Gupta *et al*., 2011).

Las siete enzimas que participan en esta vía metabólica están presentes en todas las formas de *T. cruzi*. Concretamente, la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), considerada en muchas ocasiones como la enzima reguladora de la vía, es mucho menor en epimastigotes que en las otras formas del parásito. Este hecho sugiere que la ruta de las pentosas fosfato es más activa en las formas infectivas o presentes en el hospedador vertebrado, probablemente en respuesta a un mayor estrés oxidativo (Maugeri y Cazzullo, 2004). Teniendo en cuenta que *T. cruzi* es más sensible que las células del hospedador a la acción de los ROS, la G6PDH puede considerarse una diana adecuada para el desarrollo de agentes quimioterápicos selectivos (Igoillo-Esteve *et al*., 2007). De hecho, la G6PDH de los tripanosomátidos comparte cerca del 50% de homología con la enzima humana (Gupta *et al*., 2011). Así, varios derivados esteroideos inhibidores de la G6PDH requieren menor concentración para actuar sobre la enzima de *T. cruzi* que sobre la humana y se contemplan como punto de partida para el desarrollo de agentes tripanocidas (Gupta *et al*., 2011).

Una deleción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), la otra enzima deshidrogenasa implicada en el mantenimientdo del NAPDH, resulta letal para la célula, debido a un acúmulo de 6-fosfogluconato que bloquea la glucólisis por inhibición de la glucosa 6-fosfato isomerasa. Por tanto, compuestos inhibidores selectivos de la 6PGDH del parásito deben considerarse como potenciales tripanocidas (Igoillo-Esteve *et al*., 2007).

1.9.1.8. Inhibidores de la vía de salvamento de purinas

Las diferencias entre el metabolismo de purinas de *T. cruzi* y el hospedador, han sido también utilizadas en la investigación de agentes antiparasitarios. Los mamíferos sintetizan nucleótidos *de novo* o mediante el reciclado de purinas. Sin embargo, los tripanosomátidos son completamente deficientes en la biosíntesis *de novo* de purinas y en ellos la síntesis de ácidos nucleicos recae exclusivamente sobre la vía de salvamento. Varias de las enzimas

involucradas en este proceso se localizan en el glicosoma del parásito. A través de esta vía y por acción de la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT), los tripanosomátidos convierten las purinas en ribonucleótidos. En *T. cruzi*, la HGPRT también puede iniciar el metabolismo de pirazolopirimidinas, análogos de purinas de carácter tóxico, proceso que no ocurre en los mamíferos. Este hecho implica que compuestos que actúen como inhibidores o como sustratos de la enzima HGPRT, pueden comportarse como agentes quimioterapéuticos selectivos (Coura y de Castro, 2002; Maya *et al*., 2007; Soeiro y de Castro, 2009).

El alopurinol es un fármaco utilizado en el tratamiento de la gota debido a que en los vertebrados éste se metaboliza a oxipurinol, potente inhibidor de la enzima xantina oxidasa, e inhibe la producción de acido úrico. En los tripanosomátidos, deficientes en dicha enzima, el alopurinol se comporta como un análogo de purinas y es incorporado en el ADN del parásito a través de la HGPRT, perturbando como consecuencia la síntesis del ARN y de proteínas (Soeiro y de Castro, 2009; Urbina, 2010). Por el contrario, en los humanos no se han registrado interferencias del alopurinol con la biosíntesis de purinas (Maya *et al*., 2007).

Tras la realización de ensayos preliminares *in vitro* e *in vivo* que demostraron la eficacia del alopurinol frente a *T. cruzi*, se llevaron a cabo varios estudios en humanos con resultados contradictorios (Urbina, 2010; Bustamante y Tarleton, 2014). En el año 1992, la OMS inicia un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble-ciego y placebo controlado, realizado en Argentina, Brasil y Bolivia para evaluar su eficacia como tratamiento de la infección crónica en humanos (Soeiro y de Castro, 2009; Urbina, 2010). Los resultados obtenidos en Brasil muestran cómo el tratamiento oral con 300 mg/8 h de alopurinol durante 60 días consecutivos es ineficaz en el control de la parasitemia, generando además efectos adversos derivados de la dosis elevada; no siendo por ello recomendado como alternativa terapéutica (Rassi *et al*., 2007). Un estudio llevado a cabo en Chile en pacientes crónicos tratados durante dos meses con 8,5 mg/kg/día de alopurinol alude a un 44% de curas parasitológicas de acuerdo con la negativización del xenodiagnóstico y la elevada tasa de normalización en el ECG tras cuatro años de seguimiento, junto con una buena tolerancia en los pacientes que apoya su introducción como tratamiento en fase crónica (Apt *et al*., 1998). Las causas de esta variabilidad se han sustentado en cuestiones geográficas ligadas a la distinta susceptibilidad de las cepas, en la sensibilidad de los métodos diagnósticos usados en el seguimiento o en una farmacocinética inapropiada (Rassi *et al*., 2007).

La asociación con otros fármacos también ha sido planteada experimentalmente, como la combinación alopurinol + clomipramina (Gobbi *et al*., 2010) o alopurinol + BZ (Bustamante *et al*., 2014) sin suponer grandes ventajas frente a la monoterapia. También se ha evaluado como tratamiento de la infección crónica en humanos la administración de alopurinol (600 mg/día, 90 días) seguida de BZ (5 mg/kg/día, 30 días), mostrando todos los pacientes una disminución en la activación de la respuesta inmune específica reflejo de una reducción en la carga parasitaria (Pérez-Mazliah *et al*., 2013).

1.9.1.9. Inhibidores de la síntesis de nucleótidos

La enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) es de gran interés en el campo de la quimioterapia experimental, habiéndose identificado como diana para el tratamiento de la malaria, el cáncer o diversas infecciones bacterianas (Gangjee *et al*., 2007). La DHFR es responsable de la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, el cual es metilado a metilentetrahidrofolato y participa directamente en la síntesis de timidina, en una reacción catalizada por la enzima timidilato sintasa (Fig. 19). La inhibición de la DHFR impide por tanto la síntesis del ADN y conduce a la muerte celular (Zuccotto *et al*., 2001).

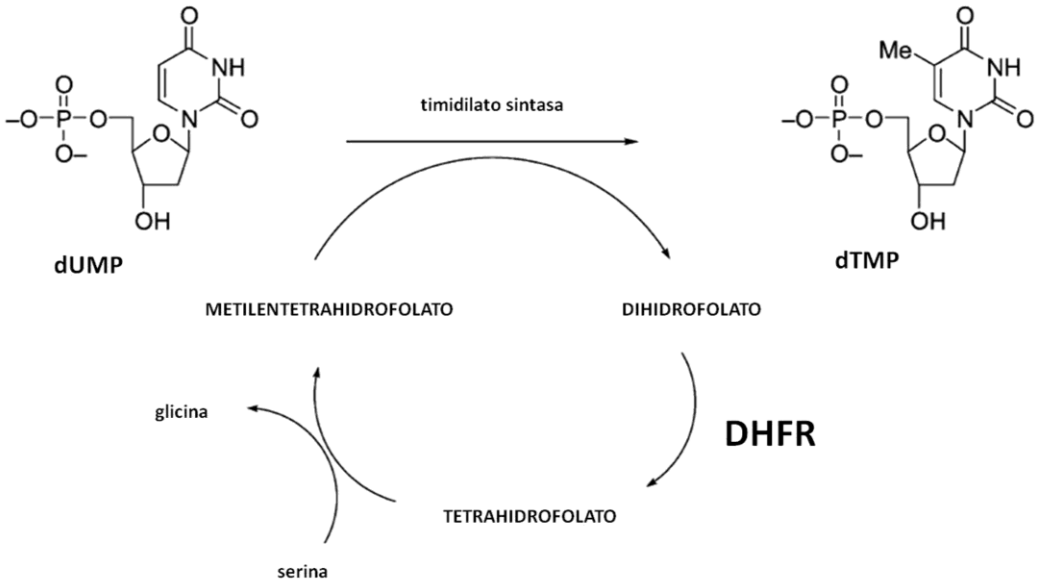


Fig. 19. Reacción catalizada por la DHFR. Fuente: esquema adaptado de Gilbert (2002).

En los tripanosomátidos, la DHFR y la timidilato sintasa constituyen una proteína bifuncional, a diferencia de los mamíferos y bacterias en los que la DHFR es una enzima monofuncional (Zuccotto *et al*., 1998; Senkovich *et al*., 2005). La DHFR es esencial en humanos, de modo que cualquier reacción de los inhibidores con la hDHFR genera toxicidad en el hospedador (Schormann *et al*., 2010). El trimetrexato, utilizado en el tratamiento de la infección por *Pneumocystis carinii* en pacientes con VIH, inhibe la TcDHFR y es activo *in vitro* en tripomastigotes y amastigotes. Sin embargo, al ser un potente inhibidor de la hDHFR requiere ser coadministrado con leucovorina (5-formil tetrahidrofolato) para contrarrestar su efecto citotóxico (Senkovich *et al*., 2005). Por otra parte, diversos fármacos antimicrobianos inhibidores de la DHFR como el antimalárico pirimetamina o el antibacteriano trimetoprim, no presentan actividad frente a la TcDHFR (Gangjee *et al*., 2007). Ante esta situación, la caracterización del sitio activo de la DHFR de los tripanosomátidos y sus diferencias con respecto a las enzimas humana y bacteriana, supuso el punto de partida para la identificación y diseño de inhibidores selectivos (Zuccotto *et al*., 1998).

Los trabajos de Zuccotto *et al*. (2001), Pez *et al*. (2003), Khabnadideh *et al*. (2005) o Schormann *et al*. (2010) son buen ejemplo de la investigación de compuestos inhibidores de la DHFR de *T. cruzi*.

1.9.2. Candidatos identificados mediante *drug-repurposing*

El denominado como *drug-repurposing* consiste en la selección de candidatos para el tratamiento de una determinada afección a partir de fármacos y/o compuestos disponibles e inicialmente pensados para otros usos terapéuticos. Este recurso resulta muy atractivo debido a que en ocasiones, acelera y reduce los costes en el desarrollo de un fármaco, especialmente si éste puede basarse en datos disponibles relativos a la seguridad del mismo (Andrews *et al*., 2014). Varios de los antifúngicos citados anteriormente (apartado 1.9.1.1.) o el alopurinol (apartado 1.9.1.8.) constituyen claros ejemplos de estrategias de *drug-repurposing* en la identificación de nuevos tratamientos para la enfermedad de Chagas.

1.9.2.1. Fexinidazol

En la década de 1970–1980, el desarrollo preclínico del 5-nitroimidazol fexinidazol como antiprotozoario de amplio espectro fue llevado a cabo por Hoechst (actualmente Sanofi), aunque no se continuó con su evaluación clínica (Bahia *et al*., 2012). Tres décadas después, DNDi "redescubre" el fexinidazol mediante *compound mining* y lo selecciona como candidato para el tratamiento de la tripanosomiasis africana. Su selectividad hacia *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, eficacia en las fases hemolinfática y cerebral del modelo murino, biodisponibilidad oral y rápida transformación a los metabolitos activos sulfóxido y sulfona, junto con la ausencia de genotoxicidad en todos ellos (Torreele *et al*., 2010), motivó la realización de ensayos clínicos en fase I en voluntarios sanos, y de ensayos en fase II/III en pacientes de tripanosomiasis africana (Tarral *et al*., 2014). El fexinidazol también ha mostrado una importante actividad frente a *Leishmania donovani* y actualmente se encuentra en desarrollo clínico para el tratamiento de la leishmaniosis visceral, como monoterapia y en combinación con miltefosina (DNDi, 2014).

Con respecto a la enfermedad de Chagas, en un estudio realizado en ratones infectados con cepas sensibles (CL), parcialmente resistentes (Y) y resistentes (VL-10 y Colombiana) al BZ, el tratamiento con fexinidazol (300 mg/kg/día p.o. durante 20 días) logra mayor porcentaje de curas en la infección aguda (78–88,9%) que la dosis estándar de BZ (70, 50 y 0% para las cepas de menor a mayor resistencia), así como en la infección crónica ocasionada por la cepa VL-10 (70 y 30% para el fexinidazol y el BZ, respectivamente), además de prevenir la inflamación cardíaca en ambas fases y mostrar una buena tolerancia (Bahia *et al*., 2012).

La actividad anti-*T. cruzi* de sus dos metabolitos principales, fexinidazol sulfóxido y fexinidazol sulfona, ha sido también evaluada *in vitro* e *in vivo* frente a la cepa Y. *In vitro*, ambos muestran un comportamiento similar al del BZ frente a amastigotes, mientras que en el modelo murino de infección aguda, el 100% de los animales tratados durante 20 días con 100 mg/kg/día de uno u otro metabolito se curaron, frente al 80% de los tratados con BZ. Los resultados de este estudio indican además una mayor eficacia *in vivo* del fexinidazol sulfóxido y sulfona con respecto a la del compuesto parental (Bahia *et al*., 2014b).

En el año 2014 se inicia en Bolivia un estudio clínico en fase II, placebo controlado, para evaluar la eficacia y seguridad del fexinidazol como tratamiento de pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica, en el que se han administrado oralmente seis regímenes distintos de 1200 o 1800 mg/día durante un periodo de 2, 4 u 8 semanas consecutivas (disponible en http://clinicaltrials.gov/show/NCT02498782, acceso: febrero de 2016).

En caso de confirmarse su eficacia como tratamiento de la infección humana provocada por *T. brucei*, *L. donovani* y *T. cruzi*, el fexinidazol constituiría una panacea para la terapia de las enfermedades causadas por tripanosomátidos (Patterson y Wyllie, 2014).

o *Mecanismo de acción*

Pese a que su mecanismo de acción no se encuentra elucidado, se sabe que el fexinidazol sufre metabolismo oxidativo originando los correspondientes sulfóxido y sulfona activos (Torreele *et al*., 2010; Bahia *et al*., 2014b). Se ha planteado que la excelente actividad *in vivo* que muestra el fexinidazol tras su administración oral estaría probablemente relacionada con una exposición acumulativa no a uno, sino a tres compuestos activos (Torreele *et al*., 2010). No obstante, los resultados obtenidos por Bahia *et al*. (2014b) señalan a la sulfona y a sus metabolitos nitro-reducidos como las principales especies responsables de dicha eficacia. Igual que ocurre en otros nitroimidazoles como el BZ, el grupo nitro del fexinidazol y de sus metabolitos sulfóxido y sulfona, es susceptible a la acción de las enzimas NTR-I, formando de esta manera las especies propiamente reactivas (Patterson y Wyllie, 2014).

1.9.2.2. Oxaboroles

Debido a las propiedades electrónicas del boro, los compuestos que incorporan este átomo en sus estructuras han recibido en los últimos años una especial atención en farmacología. Concretamente, a partir de los benzoxaboroles, compuestos en los que el átomo de B se integra en un anillo heteroaromático, han surgido diversos candidatos con propiedades antiinflamatorias, antifúngicas o antibacterianas. Benzoxaboroles pertenecientes a la biblioteca de compuestos de la compañía Anacor Pharmaceuticals, se han evaluado como potenciales agentes antiparasitarios en su aplicación al tratamiento de varias enfermedades, entre las que se incluye la enfermedad de Chagas. Aunque no se encuentren totalmente

exploradas para cada nuevo candidato, la seguridad y ausencia de toxicidad de los distintos benzoxaboroles que han progresado a ensayos clínicos como antibacterianos o antiinflamatorios, supone un punto de partida alentador para su aplicación en la terapia antiparasitaria (Jacobs *et al*., 2011).

En este contexto surge el benzoxaborol SCYX-7158 (AN5568), con gran actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *T. brucei*, cuyo ensayo clínico en fase I ha concluido recientemente y se postula para una posterior evaluación como tratamiento de la tripanosomiasis africana en humanos (DNDi, 2014). La actividad tripanocida de estas moléculas sobre *T. brucei*, junto con sus excelentes propiedades farmacocinéticas y perfil ADME, han señalado a los oxaboroles como prototipos ideales para el desarrollo de un tratamiento nuevo y eficaz para la enfermedad de Chagas (Bustamante y Tarleton, 2014).

Recientemente, un estudio *in vivo* realizado con el oxaborol AN4169 administrado oralmente en dosis de 20 mg/kg/día durante 40 días consecutivos, ha alcanzado un 100% de curas en ratones infectados con *T. cruzi*, similar al obtenido con BZ y NX en dosis de 100 mg/kg/día (Bustamante *et al*., 2014). Además, mediante ensayos *in vitro* realizados en amastigotes, se ha demostrado el amplio espectro de actividad del compuesto AN4169, resultando activo frente a parásitos representativos de los seis DTU (CI_{50} 0,15–0,44 μM) (Moraes *et al*., 2014). El proyecto Oxachagas llevado a cabo por DNDi en colaboración con Anacor y otras instituciones, persigue la optimización de prototipos identificados a partir de la serie del oxaborol y su consideración como candidatos a evaluación clínica (DNDi, 2014).

A día de hoy se desconoce el mecanismo y/o dianas moleculares implicadas en la actividad tripanocida de los oxaboroles (Bustamante y Tarleton, 2014; Moraes *et al*., 2014).

1.9.3. Desarrollo de nuevas formulaciones de los fármacos de referencia como recurso para mejorar la eficacia del tratamiento

La producción de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades parasitarias capta menor atención en comparación con otras patologías: de los más de 1.200 nuevos fármacos introducidos en el mercado durante 1975–1996, tan sólo el 1% se encuentran destinados al tratamiento de enfermedades tropicales como la malaria, la leishmaniosis o la tripanosomiasis (Date *et al*., 2007). Ante la gran inversión que requiere el desarrollo e introducción de un nuevo fármaco, el hecho de que gran parte de los compuestos activos identificados experimentalmente presenten una elevada lipofilia, resulta a menudo contraproducente (Ranjita, 2013). Aproximadamente el 40% de los principios activos que se encuentran en fase de desarrollo son de baja solubilidad acuosa, lo que obstaculiza la correcta formulación de los fármacos, su aplicación clínica y comerciabilidad, así como una adecuada biodisponibilidad (Vo *et al*., 2013). Por el contrario, un cierto carácter lipófilo de

los fármacos contribuye a su paso a través de membranas biológicas, fundamental para el desempeño de su actividad biológica (Ranjita, 2013).

La administración de dosis elevadas de un fármaco generalmente se realiza con el propósito de compensar su baja solubilidad acuosa, limitada biodisponibilidad, rápida eliminación y/o baja eficacia para alcanzar el lugar de acción, lo que a menudo conlleva reacciones adversas de carácter serio en los pacientes, como ocurre en el tratamiento con BZ y NX (Romero y Morilla, 2010; Bahia *et al*., 2014a). Ante esta situación, surge el desarrollo de nuevas formulaciones de los fármacos de referencia antichagásicos como alternativa a las convencionales, con el objetivo de potenciar su eficacia mediante una mejora de su farmacocinética y biodisponibilidad (Bahia *et al*., 2014a), reduciendo de esta manera la dosis a administrar y en consecuencia sus efectos tóxicos (Romero y Morilla, 2010; Ranjita, 2013).

De acuerdo con su solubilidad acuosa y permeabilidad, el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (Amidón *et al*., 1995) agrupa los fármacos en las siguientes clases:

- Clase I: fármacos con alta solubilidad y alta permeabilidad.
- Clase II: fármacos con baja solubilidad y alta permeabilidad.
- Clase III: fármacos con alta solubilidad y baja permeabilidad.
- Clase IV: fármacos con baja solubilidad y baja permeabilidad.

El BZ presenta baja solubilidad acuosa – 0,4 mg/mL de acuerdo con Kasim *et al*. (2004) y 0,2 mg/mL de acuerdo con el valor experimental obtenido por Maximiano *et al*. (2010) – y una permeabilidad relativa (LogP < 1,72) que le sitúan en la clase IV (Maximiano *et al*., 2010), habiéndose clasificado también dentro de la clase III (Kasim *et al*., 2004) e incluso de la clase II (Soares-Sobrinho *et al*., 2008). No obstante y pese a las contradicciones que existen en lo referido a su clasificación biofarmacéutica, en los últimos años ha sido objeto de diversos estudios fármaco-técnicos para la búsqueda de una mejor eficacia terapéutica.

Con respecto al NX, los valores de solubilidad y permeabilidad aportados por Kasim *et al*. (2004) – 33 mg/mL y LogP = 0,02 – lo sitúan en la clase III. Sin embargo, no se encuentran muchos trabajos en la literatura dirigidos al desarrollo de nuevas formulaciones de NX, probablemente debido a que el BZ es el fármaco antichagásico de primera elección.

1.9.3.1. Mejora del perfil de solubilidad

La disminución del tamaño de partícula conlleva un aumento de la superficie específica, estrategia a la que se recurre frecuentemente para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de los fármacos con baja solubilidad acuosa y conseguir una mejor eficacia (Salomón, 2012). Otros factores como la pérdida de la estructura cristalina del principio activo o su mayor grado de humectación, intervienen en la mejora del perfil de solubilidad (Ranjita, 2013).

o *Reducción del tamaño de partícula*

Existen varios métodos para reducir el tamaño de partícula, como la molienda, el secado por atomización, procesos que utilizan fluidos supercríticos o métodos basados en el cambio de disolvente (Patel *et al*., 2012). La reducción del tamaño de partícula mediante aplicación de métodos mecánicos o físicos como la molienda, a menudo supone una serie de desventajas como son la obtención de un tamaño de partícula uniforme, la inestabilidad física o química de los cristales o la formación de aglomerados (Maximiano *et al*., 2011; Salomón, 2012).

Como alternativa a los métodos físicos, Leonardi *et al*. (2009) obtienen micropartículas de BZ en quitosán, mejorando considerablemente el perfil de solubilidad del fármaco (98% de BZ disuelto a los 30 min frente al 48,51% del compuesto puro) gracias a una disminución en el tamaño de partícula y una óptima eficacia de encapsulación. Por su parte, Maximiano *et al*. (2011) desarrollan microcristales de BZ mediante el método de cambio de disolvente, precipitando BZ en presencia de polímeros hidrófilos (agentes estabilizadores) que cubren la superficie hidrófoba del principio activo micronizado, de modo que se obtiene un tamaño de partícula más uniforme y un producto menos cohesivo. La evaluación de estas formulaciones en el modelo murino de infección aguda muestra una mayor eficacia en comparación con el Rochagan®, correlacionada con los resultados del ensayo de disolución *in vitro* y reflejo de un incremento en la biodisponibilidad oral del BZ.

o *Complejos de inclusión*

La obtención de complejos de inclusión con ciclodextrinas (oligosacáridos cíclicos) también confiere mayor solubilidad a este tipo de fármacos mediante la generación de una estructura con forma de cono truncado en cuyo interior hidrófobo se localiza el fármaco, mientras que su exterior hidrófilo, constituido por grupos hidroxilo, es responsable de la solubilidad acuosa del sistema (Patel *et al*., 2012). Lyra *et al*. (2012) preparan complejos de inclusión con BZ y derivados de β-ciclodextrinas que favorecen la solubilidad en agua del BZ. Aunque estas formulaciones no muestran ningún impacto sobre la actividad en epimastigotes, consiguen reducir el efecto tóxico del fármaco de referencia sobre cultivos de macrófagos.

Otra alternativa consiste en el desarrollo de sistemas ternarios, también llamados sistemas o complejos multicomponente, los cuales se obtienen mediante la asociación de ciclodextrinas con un fármaco de baja solubilidad acuosa y un polímero de carácter hidrófilo. En comparación con los complejos de inclusión, la asociación de β-ciclodextrinas y BZ con polivinilpirrolidona (PVP) o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), potencia la solubilidad del BZ en formulaciones líquidas, siendo mayor en presencia de HPMC. Por el contrario, estos sistemas no suponen ninguna ventaja con respecto a los binarios (BZ:ciclodextrinas) cuando se trata de formulaciones en estado sólido (Soares-Sobrinho *et al*., 2012).

o *Sistemas líquidos*

Se han obtenido varias formulaciones líquidas de BZ mediante la aplicación de sistemas de cosolventes, y han sido ensayadas frente a *T. cruzi* en modelos *in vitro* e *in vivo* (Lamas *et al*., 2006; Manarin *et al*., 2013). El estudio de la solubilidad del BZ en presencia de distintas combinaciones de solventes y surfactantes, consigue aumentar ésta hasta 10 mg/mL gracias a un sistema basado en polietilenglicol 400 (PEG400), etanol y buffer de biftalato de potasio (ratio 7:1:2) a pH 2,5. Su evaluación frente a epimastigotes de la cepas Tulahuen 2, CL Brener e Y muestra un perfil similar al del BZ disuelto en sulfóxido de dimetilo (DMSO), además de tener baja citotoxicidad en macrófagos (Lamas *et al*., 2006). Pese a que estos sistemas fueron inicialmente pensados para su administración por vía parenteral, un trabajo posterior evalúa la actividad del sistema BZ en PEG400/agua pH 2,5 (ratio 7:3) en dosis de 20, 40 y 60 mg/kg/día administradas oralmente durante 14 días a ratones en fase aguda. Los resultados obtenidos *in vivo* con la formulación líquida, aunque similares a los del grupo tratado con BZ, permiten a los autores proponer ventajas en la formulación líquida, relativas a una mejor homogeneización del principio activo y ajuste de la dosis (Manarin *et al*., 2013).

o *Dispersiones sólidas*

El desarrollo de dispersiones sólidas (DS) se considera una de las estrategias más exitosas para aumentar la solubilidad de los fármacos. Estos sistemas se definen como dispersiones de principios activos de baja solubilidad acuosa en una matriz inerte, en los que la liberación del fármaco depende de las características de la matriz. De acuerdo con la composición de ésta, las DS se clasifican en cuatro generaciones (Vasconcelos *et al*., 2007; Vo *et al*., 2013):

- Primera generación: utilizan excipientes de naturaleza cristalina, como urea o azúcares como manitol o sorbitol. Estas DS son termodinámicamente más estables que las amorfas y liberan el principio activo más lentamente.
- Segunda generación: son las DS más comunes. Utilizan polímeros de estructura amorfa en los que el principio activo se dispersa de forma irregular. Entre los polímeros sintéticos empleados se encuentran el PEG y la PVP, mientras que los basados en productos naturales comprenden derivados de celulosa o de almidón.
- Tercera generación: emplean surfactantes o mezclas de polímeros con surfactantes como matriz. Con la incorporación de surfactantes se pretende obtener el mayor grado de biodisponibilidad y estabilidad para las DS, evitando la recristalización o precipitación del principio activo, problemas a menudo asociados con estas formulaciones.
- Cuarta generación: comprende las DS de liberación controlada y se aplican en fármacos de corta vida media. Utilizan polímeros que se disuelven lentamente en agua como el Eudragit® o el Carbopol®, proporcionando una liberación mantenida del principio activo.

En la aplicación de estas formulaciones a los fármacos de referencia antichagásicos, Lima *et al*. (2011, 2015) elaboran DS de BZ utilizando como matriz PEG o PVP, así como HPMC. La reducción del tamaño de partícula, aumento de la superficie específica y mayor humectabilidad del principio activo que proporcionan los polímeros hidrófilos, son responsables del aumento en la solubilidad del BZ.

No obstante, Leonardi y Salomón (2013) sugieren ciertos inconvenientes en la producción de comprimidos y cápsulas a partir de DS, como la dificultad de pulverización o su pobre compresibilidad, que suponen algunas limitaciones en la introducción de formas farmacéuticas desarrolladas a partir de DS. De hecho, los resultados obtenidos en este trabajo con comprimidos producidos a partir de mezclas físicas (MF) o DS de BZ en PEG, muestran un perfil de solubilidad *in vitro* similar para ambas formulaciones, que lleva a los autores a preferir las MF sobre las DS en base a la simplicidad del proceso de obtención de las primeras.

1.9.3.2. Mejora de la permeabilidad

En ocasiones un incremento en la solubilidad del fármaco no basta para mejorar la eficacia del tratamiento, sobre todo durante la fase crónica, en la que los parásitos se encuentran diseminados intracelularmente. La membrana plasmática, junto con la complejidad del microambiente en la célula hospedadora, interfieren en la selectividad y liberación del fármaco sobre los amastigotes (Romero y Morilla, 2010). De esta manera, la limitada permeabilidad que muestran los fármacos tripanocidas es otro de los aspectos a solventar en la mejora de su actividad, para lo que el desarrollo de formulaciones basadas en nanosistemas es uno de los recursos más prometedores (Bahia *et al*., 2014a).

o *Nanosistemas*

La definición física de nanotecnología limita el tamaño de los objetos a un máximo de 100 nm, sin embargo en el ámbito biológico éste se acepta hasta 100–300 nm (Romero y Morilla, 2010). La mayor superficie específica que muestran los nanosistemas es responsable de su habilidad para superar barreras anatómicas como el tracto gastrointestinal, la piel o la barrera hematoencefálica (Romero y Morilla, 2010), además del endotelio vascular o la membrana plasmática, que dificultan el acceso de los fármacos a los lugares de acción (Bahia *et al*., 2014a). La capacidad que presentan los nanosistemas para reducir la toxicidad de los fármacos, modular su cinética, biodistribución y tráfico intracelular, ha servido de punto de partida para su aplicación en el tratamiento experimental de diversas enfermedades infecciosas (Durán *et al*., 2009; Bahia *et al*., 2014a). Sin embargo, a pesar de que pueden atravesar cualquier barrera anatómica con facilidad, aquellos que están elaborados con polímeros biodegradables son degradados en su administración oral,

quedando por tanto su acceso a sangre relegado a la administración por vía intravenosa (Romero y Morilla, 2010).

Entre las posibilidades que estos sistemas ofrecen en la búsqueda de alternativas terapéuticas para la enfermedad de Chagas se encuentran las siguientes, resumidas por Bahia *et al*. (2014a):

- Fase aguda*:* tiene lugar un *targeting* de tipo pasivo. Por una parte, existen nanosistemas que proporcionan un mayor tiempo de circulación del fármaco en el torrente sanguíneo y actúan directamente sobre los tripomastigotes. De otro modo, los convencionales son rápidamente opsonizados y fagocitados, actuando sobre los amastigotes en el interior de las células del sistema inmune. Además, los nanosistemas con un tamaño inferior a 200 nm pueden extravasar a tejido a través de capilares fenestrados.
- Fase crónica: el tamaño de los sistemas empleados ha de ser inferior a 200 nm y junto con su mayor tiempo de circulación, se busca la liberación del fármaco en lugares de difícil acceso donde se acantonan los amastigotes. Estos nanosistemas acceden desde el torrente sanguíneo atravesando el endotelio dañado como consecuencia de la respuesta inflamatoria y la fibrosis, interaccionan con la membrana celular y son interiorizados en las células infectadas mediante endocitosis u otros mecanismos, liberando su contenido en el citoplasma celular. Mediante *targeting* activo es posible además funcionalizar estos sistemas con ligandos o moléculas en su superficie, lo que permite su direccionamiento específico, por ejemplo hacia tejido cardíaco.

Entre las formulaciones diseñadas para potenciar la permeabilidad de los fármacos se encuentran los liposomas, aunque no existen muchos trabajos referidos a su aplicación a los dos fármacos antichagásicos. Este hecho puede deberse a que tras su administración i.v. los liposomas son rápidamente fagocitados por los macrófagos y en el caso de la enfermedad de Chagas, los amastigotes se diseminan en células no fagocíticas, resultando difícil su abordaje con estas formulaciones (Date *et al*., 2007). Los liposomas son estructuras esféricas cuya membrana está formada por una doble capa de fosfolípidos y otros derivados lipídicos, en la que los primeros se disponen con las colas hidrófobas enfrentadas y la cabeza polar orientada hacia el medio acuoso de ambos lados de la membrana. De esta manera, los liposomas pueden encapsular fármacos hidrófilos en su cavidad acuosa o incluir los hidrófobos como componente de la bicapa lipídica (Salomón, 2012). Un estudio realizado en rata, muestra que la administración vía i.v. de liposomas multilaminares aumenta la concentración de BZ en hígado con respecto al fármaco libre, al ser fagocitados por las células de Kupffer. Sin embargo, no presentan efectos sobre la parasitemia en fase aguda de ratones infectados con *T. cruzi* cepa RA. El confinamiento del BZ liposomal a nivel de los lisosomas una vez fagocitadas estas formulaciones, sin la posterior difusión del fármaco al citoplasma celular, parece ser una de las causas de su baja actividad *in vivo* (Morilla *et al*.,

2004). En ocasiones, este hecho puede solventarse con el desarrollo de liposomas sensibles al pH que permiten modular el tráfico intracelular del fármaco en la célula infectada, liberando su contenido ante una bajada de pH que desestabiliza el liposoma y desencadena la ruptura de la bicapa lipídica (Romero y Morilla, 2010; Bahia *et al*., 2014a), técnica que resulta ineficaz para fármacos de naturaleza hidrófoba como el BZ (Morilla *et al*., 2004).

Con respecto al NX, su encapsulación en nanopartículas biodegradables de polialquilcianocrilato mejora la actividad *in vitro* del fármaco cuando se ensaya a bajas concentraciones frente a epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes albergados en células Vero (Sánchez *et al*., 2002). De acuerdo con los resultados de este trabajo, la revisión realizada por Romero y Morilla (2010) hace mención al posible mecanismo de acción de estas nanopartículas de tamaño inferior a 200 nm, aludiendo a la ausencia de endocitosis por los tripomastigotes para sugerir que mecanismos diferentes de la interacción superficial nanosistema-forma extracelular tendrían poco éxito en la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, no se plantean hipótesis acerca de su mecanismo de acción frente a amastigotes.

1.10. MÉTODOS DE CRIBADO FARMACOLÓGICO

1.10.1. Métodos *in vitro*

Los métodos *in vitro* constituyen una pieza fundamental en los procedimientos de cribado farmacológico secuencial, debido a que permiten la evaluación simultánea de un gran número de compuestos con una consistente discriminación de activos e inactivos, sin comprometer en un primer momento el uso de animales de experimentación. Para este propósito, se emplean frecuentemente ensayos fenotípicos o basados en la diana. Los primeros suponen una ventaja frente a los segundos para la identificación de nuevos compuestos activos, ya que en el *screening* fenotípico el organismo completo se somete a la acción del compuesto, quedando por tanto expuestas la totalidad de dianas y rutas metabólicas de la célula (Sykes y Avery, 2013). De hecho, la mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento de las enfermedades provocadas por tripanosomátidos, presentan mecanismos de acción que a día de hoy son desconocidos o no del todo claros. Hasta el momento, los ensayos basados en la diana no han identificado candidatos para su desarrollo clínico, en parte por una falta de correlación entre la actividad de los mismos y los ensayos fenotípicos o *in vivo* (Don e Ioset, 2014). Una vez identificado el prototipo, las aproximaciones basadas en la diana son herramientas fundamentales para la elucidación de su modo de acción (Sykes y Avery, 2013).

Durante muchos años, el recuentro microscópico manual del número de parásitos viables ha sido el método de referencia empleado en el *screening* fenotípico, adecuado cuando el número de compuestos a evaluar es reducido. La estandarización de técnicas

colorimétricas y fluorimétricas basadas en la cuantificación de la actividad metabólica del parásito, o en la utilización de cepas modificadas genéticamente de forma estable, ha supuesto una optimización de los métodos clásicos en cuanto al número de compuestos a evaluar y a la mayor objetividad de los resultados obtenidos (Bustamante y Tarleton, 2011). El uso de cepas transgénicas para el cribado farmacológico está aceptado siempre que dicha modificación genética no suponga graves alteraciones en su comportamiento biológico con respecto al de la cepa parental (Zingales *et al*., 2009). Asimismo, la reciente implementación de técnicas de *high-content analysis* (HCA) ha supuesto un avance en el cribado farmacológico frente a *T. cruzi*, especialmente en las pruebas sobre el parásito intracelular (Bustamante y Tarleton 2011; Don e Ioset, 2014).

Los distintos tipos morfológicos que muestra *T. cruzi* a lo largo de su ciclo biológico, aportan múltiples y variados modelos de ensayos fenotípicos. A pesar de que el epimastigote es la forma que se encuentra en el vector, ésta se emplea con frecuencia en el cribado primario debido al mantenimiento relativamente sencillo de los cultivos. No obstante, su utilización no exime de una posterior evaluación de los compuestos activos sobre las formas de *T. cruzi* presentes en el hombre, antes de ensayarse en modelos *in vivo*.

1.10.1.1. Ensayos de actividad en epimastigotes

El recuento microscópico en cámara de Neubauer continúa siendo uno de los métodos a menudo empleados en el cribado farmacológico frente a epimastigotes (Pizzo *et al*., 2011; Fernandes *et al*., 2012; Salomão *et al*., 2013; Muro *et al*., 2014; Olmo *et al*., 2015; Wong-Baeza *et al*., 2015). Sin embargo, en los últimos veinte años se ha conseguido la estandarización de ensayos basados en técnicas espectrofotométricas y fluorimétricas, que permiten realizar las pruebas en epimastigotes de una manera más rápida, objetiva y reproducible (Bustamante y Tarleton, 2011).

Muelas-Serrano *et al*. (2000) ponen a punto el ensayo colorimétrico de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] en epimastigotes de la cepa Y, el cual se basa en que la reducción de la sal de tetrazolio a cristales de formazán tiene lugar en presencia de células metabólicamente activas. Posteriormente, Vega *et al*. (2005) hacen lo propio con epimastigotes de la cepa CL transfectada con el gen de la β-galactosidasa de *Escherichia coli* (Bucker *et al*., 1996), enzima que cataliza la hidrólisis del sustrato CPRG (rojo de clorofenol β-D-galactopiranósido) a rojo de fenol. Existen otras cepas de *T. cruzi* transfectadas con genes que expresan proteínas fluorescentes como la tdTomato (cepas CL, Brasil, Tulahuen o Colombiana) o la proteína verde fluorescente (cepa Dm28c), que permiten su cuantificación mediante fluorimetría o citometría de flujo, así como realizar el seguimiento de la curva de crecimiento (Canavaci *et al*., 2010; Kessler *et al*., 2013), a diferencia de los ensayos anteriores con MTT o CPRG, que culminan con la lisis del parásito

(end-point assays) para proceder con su revelado (Muelas-Serrano *et al*., 2000; Vega *et al*., 2005). También es posible monitorizar la cinética de los cultivos por nefelometría, siendo la absorbancia proporcional al número de epimastigotes suspendidos en el medio (Boiani *et al*., 2006, 2010; Salas *et al*., 2008). Con la resazurina y los colorantes basados en resazurina como el alamarBlue® y el PrestoBlue®, se introduce el uso de sustratos redox que experimentan una reacción colorimétrica emitiendo fluorescencia al mismo tiempo; Rolón *et al*. (2006a) estandarizan el ensayo en epimastigotes de la cepa Y con este indicador.

1.10.1.2 Ensayos de actividad en tripomastigotes

Entre las pruebas que se realizan con tripomastigotes encontramos experimentos con tripomastigotes metacíclicos, tripomastigotes derivados de cultivo celular (TDC) o tripomastigotes sanguíneos (TS). Mientras que las dos primeras formas de *T. cruzi* se obtienen estrictamente *in vitro*, los ensayos con TS requieren la infección previa de animales de experimentación.

o *Tripomastigotes metacíclicos*

Existen distintas maneras de obtener tripomastigotes metacíclicos *in vitro*, desde la metaciclogénesis espontánea que ocurre en los cultivos de epimastigotes en medio LIT que se encuentran en fase estacionaria (Camargo, 1964) hasta su estimulación con medios específicos como el Grace (Martínez-Díaz *et al*., 2001; Le-Senne *et al*., 2002; Hashimoto *et al*., 2015; Miranda *et al*., 2015) o pases sucesivos en TAU y TAU3AAG (Sykes y Avery, 2013; Muro *et al*., 2014; Olmo *et al*., 2015). Aunque los tripomastigotes metacíclicos no se suelen emplear directamente en los ensayos de actividad, en ocasiones se recurre a estas formas para la infección de cultivos celulares en los ensayos frente a amastigotes intracelulares (Muelas *et al*., 2002; Muro *et al*., 2014; Miranda *et al*., 2015; Olmo *et al*., 2015) o de ratones para obtener formas sanguíneas (Muro *et al*., 2014; Miranda *et al*., 2015).

o *Tripomastigotes derivados de cultivo celular*

Además de emplearse habitualmente para la infección celular inicial en las pruebas sobre amastigotes (Saraiva *et al*., 2007; da Silva *et al*., 2008; Soeiro *et al*., 2013; Bahia *et al*., 2014b; Timm *et al*., 2014), a menudo se recurre a los TDC para los ensayos de actividad, y a su revelado en presencia de MTT (Salas *et al*., 2008; Rodríguez *et al*., 2009b; Aravena *et al*., 2011) o resazurina (Miguel *et al*., 2010) como alternativa al recuento microscópico manual. Las cepas de *T. cruzi* modificadas genéticamente han posibilitado la estandarización de ensayos colorimétricos y fluorimétricos también a este nivel del cribado. Tal es el caso de las cepas transfectadas con el gen de la β-galactosidasa de *Escherichia coli* y el ensayo de actividad puesto a punto por Buckner *et al*. (1996) en TDC. Algunas cepas transfectadas con

el gen de la proteína verde fluorescente son susceptibles de utilizarse en estos ensayos, como *T. cruzi* K-98 que expresa la proteína en todas sus formas (Miranda *et al*., 2015), a diferencia de *T. cruzi* Dm28c en la que la fluorescencia es exclusiva de las formas replicativas del parásito (Kessler *et al*., 2013).

Es importante señalar que debido a que el tripomastigote es la forma no replicativa de *T. cruzi*, los ensayos de actividad evalúan el efecto lítico de los compuestos. Por tanto, los sustratos empleados en el revelado de estas pruebas no pueden vehiculizarse en reactivos que provoquen la lisis del parásito, ya que no se obtendrían diferencias entre los grupos tratados y control. De esta manera, en el ensayo que emplea las cepas que expresan β-galactosidasa se incuban tripomastigotes y CPRG junto con/sin los compuestos a ensayar durante las 24 h de transcurso de la prueba (Buckner *et al*., 1996; Bettiol *et al*., 2009).

o *Tripomastigotes sanguíneos*

Indiscutiblemente, las formas sanguíneas son las más adecuadas para el ensayo de actividad en tripomastigotes. Éstas se emplean también para la infección de la célula hospedadora en el ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares (Soeiro *et al*., 2013; Timm *et al*., 2014). No obstante, el uso de animales de experimentación que requieren estos experimentos muchas veces limita su uso.

Los experimentos sobre TS engloban ensayos de actividad realizados a 37 ºC en medio de cultivo y de quimioprofilaxis de sangre infectada realizados a 4º C en medio de cultivo o en presencia de sangre procedente de ratón. Tanto en unos como en otros, el recuento microscópico manual, bien en cámara de Neubauer o aplicando el método descrito por Brener (1962), se considera el *gold standard* para la evaluación del efecto lítico de los compuestos (Boiani *et al*., 2006; da Silva *et al*., 2008, 2012; Salomão *et al*., 2013; Soeiro *et al*., 2013; Muro *et al*., 2014; Timm *et al*., 2014; Olmo *et al*., 2015).

1.10.1.3. Ensayos de actividad en amastigotes

o *Amastigotes intracelulares*

Los ensayos en amastigotes intracelulares son de gran relevancia en el *screening* farmacológico *in vitro*, al explorar la actividad del compuesto sobre la forma replicativa de *T. cruzi* en el hombre, además de proporcionar información sobre su interacción con la célula hospedadora y sobre el impacto que ésta puede ejercer en la disponibilidad del compuesto a nivel intracelular (Miranda *et al*., 2015).

Como se ha comentado anteriormente, Buckner *et al*. (1996) transfectan de forma estable las cepas CL y Tulahuen de *T. cruzi* con el gen de la β-galactosidasa de *Escherichia coli*, logrando también la automatización del ensayo de actividad frente a amastigotes

intracelulares de ambas cepas. A pesar de que las células de mamífero presentan una β-galactosidasa endógena a nivel de los lisosomas, ésta alcanza su máximo de actividad a pH ácido, mientras que la enzima bacteriana lo hace a pH básico, no interfiriendo por tanto en la realización del ensayo (Ablett *et al*., 1998). Numerosos trabajos confirman la utilidad de estas cepas en la identificación de compuestos activos frente a la forma intracelular de *T. cruzi* (Rolón *et al*., 2006b; Saraiva *et al*., 2007; Bettiol *et al*., 2009; Romanha *et al*., 2010; Planer *et al*., 2014; Timm *et al*., 2014; Lavorato *et al*., 2015). De manera similar, existen otras cepas transfectadas con el gen de la luciferasa como la CL Brener, Dm28c o Brasil (ésta última en un primer trabajo identificada como cepa Y-luc) que facilitan el *screening* a este nivel mediante oxidación del sustrato luciferina, generando una luminiscencia proporcional al número de parásitos vivos (Bot *et al*., 2010; Canavaci *et al*., 2010; Andriani *et al*., 2011; Henriques *et al*., 2014; Vieira *et al*., 2014); aunque actualmente estos parásitos están teniendo mayor aplicación en los ensayos *in vivo*. A diferencia de las anteriores y como se introdujo en el apartado 1.10.1.1., otras cepas modificadas genéticamente y que expresan proteínas que no requieren de sustratos específicos para su detección (tdTomato, proteína verde fluorescente), también resultan muy útiles para seguir la infección celular, aplicando técnicas de imagen o citometría de flujo (Canavaci *et al*., 2010; Kessler *et al*., 2013; Villalta *et al*., 2013; Miranda *et al*., 2015).

Sin embargo, y a diferencia de las pruebas frente a parásitos extracelulares, el uso de sustratos como el MTT o la resazurina se encuentra limitado en los ensayos de actividad sobre amastigotes intracelulares (Bustamante y Tarleton, 2011), debido a que no es posible discriminar entre la actividad metabólica de célula y parásito. En este contexto resulta de interés el ensayo de resazurina estandarizado en *Leishmania* spp. por Bilbao-Ramos *et al*. (2012), quienes mediante una lisis selectiva de los macrófagos evalúan la actividad en amastigotes intracelulares cuantificando por fluorimetría su proliferación a promastigotes.

La introducción del HCA ha supuesto un claro avance en las pruebas de actividad frente a amastigotes intracelulares. Estos ensayos se basan en técnicas de imagen que permiten diferenciar entre células infectadas y no infectadas mediante tinción del ADN o el uso de anticuerpos, de acuerdo con la localización de marcadores específicos de la célula hospedadora o del parásito. Además de proporcionar información sobre la selectividad del compuesto, el HCA permite identificar alteraciones a nivel subcelular indicativas de mecanismos de acción específicos. Asimismo, cualquier cepa *wild type* de *T. cruzi* es susceptible de someterse a HCA sin necesidad de recurrir a cepas transgénicas (Bustamante y Tarleton, 2011; Don e Ioset, 2014). Recientemente, se han puesto a punto varios métodos basados en HCA aplicado al cribado de alto rendimiento o *high throughput screening* (HTS) que proporcionan información acerca del número total de células, amastigotes por célula infectada y porcentaje de células infectadas, capaces de obtener en un único experimento

resultados de actividad y citotoxicidad (Alonso-Padilla *et al*., 2015) o de discriminar entre parásitos extracelulares e intracelulares (Moraes *et al*., 2014).

A pesar de los avances producidos en los últimos años, el hecho de que la mayoría de las técnicas anteriormente referidas no se puedan aplicar a las cepas *wild type* de *T. cruzi* o el elevado coste de los equipos a menudo requeridos para la realización de estos ensayos, hacen que la tinción con Giemsa y el posterior recuento microscópico manual continúe siendo uno de los métodos de rutina empleados en el cribado farmacológico sobre amastigotes intracelulares (Soeiro *et al*., 2013; Bahia *et al*., 2014b; da Silva *et al*., 2014; Muro *et al*., 2014; Timm *et al*., 2014; Olmo *et al*., 2015).

o *Amastigotes extracelulares*

La obtención de amastigotes extracelulares *in vitro* ha posibilitado el manejo de esta forma de *T. cruzi*, sin la interferencia de la célula hospedadora. Su aislamiento y purificación por centrifugación en gradiente de metrizamida a partir del sobrenadante de cultivos celulares infectados (de Castro y Meirelles, 1990) o la inducción del proceso de amastigogénesis a partir de TDC en condiciones de pH ácido (Tomlinson *et al*., 1995) o de tripomastigotes metacíclicos incubados a 37 ºC en medio MEMTAU (Contreras *et al*., 2002) son algunos de los métodos descritos para su obtención. Mientras que los primeros, a menudo referidos en la literatura como amastigotes derivados de cultivo o amastigotes axénicos, son formas intracelulares liberadas al medio en una ruptura prematura de la célula, se ha demostrado que los amastigotes generados estrictamente al margen de la célula hospedadora comparten en gran medida características morfológicas y biológicas con los amastigotes intracelulares (Tomlinson *et al*., 1995; Contreras *et al*., 2002). La utilización de los primeros es preferible en la investigación en quimioterapia, aunque como ha quedado reflejado en el apartado anterior, los grandes avances producidos en las pruebas frente a amastigotes intracelulares hacen que este modelo no se encuentre muy difundido en los protocolos de cribado farmacológico y se emplee más en la exploración de los mecanismos de acción que los compuestos desencadenan en el parásito (de Castro y Meirelles, 1990; Santa-Rita *et al*., 2006; Veiga-Santos *et al*., 2013).

1.10.1.4. Pruebas de citotoxicidad inespecífica

En los protocolos de cribado farmacológico *in vitro*, la citotoxicidad de un compuesto sobre células de mamífero se evalúa de forma paralela a su actividad. Estos experimentos resultan fundamentales a la hora de descartar que la actividad de un compuesto surja como consecuencia de un efecto meramente tóxico, y en el caso de los patógenos intracelulares, que éste resulte de daños producidos en la célula hospedadora. Por tanto, mediante los ensayos de citotoxicidad se pretende demostrar que el compuesto actúa de manera

selectiva, es decir, ejerce su actividad frente al parásito a unas concentraciones que no causan efecto tóxico sobre las células (Miranda *et al*., 2015).

Con respecto a los ensayos de citotoxicidad implementados en los protocolos de cribado farmacológico frente a *T. cruzi*, estas pruebas se realizan preferentemente en la misma célula que ejerce como hospedadora en el correspondiente ensayo sobre amastigotes intracelulares (Miranda *et al*., 2015). Debido a que *T. cruzi* es capaz de infectar un amplio espectro de células nucleadas, en la literatura se encuentran ensayos de actividad en células procedentes de líneas continuas o de cultivos primarios de origen diverso, tanto fagocíticas como no fagocíticas y en concordancia con los mismos, pruebas de citotoxicidad en células de mamífero de distinta naturaleza. Puesto que la obtención de cultivos primarios supone la utilización de animales de experimentación, existe una mayor tendencia hacia la realización de estas pruebas en líneas celulares continuas. No obstante, resulta de gran interés la realización de estos ensayos en cultivos primarios de células cardíacas (da Silva *et al*., 2012, 2014; Soeiro *et al*., 2013; Timm *et al*., 2014) o de macrófagos peritoneales (da Silva *et al*., 2007, 2008; Salomão *et al*., 2013), debido al papel que desempeñan en la enfermedad de Chagas y la importancia de que un compuesto activo frente a *T. cruzi* resulte inocuo para las mismas. Como alternativa, el uso de líneas celulares continuas proporciona un acceso a los cultivos de forma inmediata y responde ante la elevada demanda de células que requieren los ensayos *in vitro* (Allen *et al*., 2005). Entre las líneas empleadas con más frecuencia en los ensayos de citotoxicidad para la selección de agentes tripanocidas, encontramos macrófagos murinos J774 (Muelas *et al*., 2001, 2002; Boiani *et al*., 2006; Gómez-Barrio *et al*., 2006) y preferentemente células no fagocíticas como fibroblastos murinos L929 (Rolón *et al*., 2006b; Romanha *et al*., 2010; Lavorato *et al*., 2015), fibroblastos murinos 3T3 (Bettiol *et al*., 2009; Planer *et al*., 2014), células Vero de riñón de mono verde (da Silva *et al*., 2007; Bot *et al*., 2010; Pizzo *et al*., 2011; Muro *et al*., 2014; Olmo *et al*., 2015) o mioblastos L6 de rata (Zuccotto *et al*., 2001; Khabnadideh *et al*., 2005; Keenan *et al*., 2012).

En los trabajos anteriormente referidos se emplean diferentes métodos para explorar la citotoxicidad de los compuestos, desde los clásicos basados en el uso de colorantes vitales como el azul tripán y el recuento microscópico manual en cámara de Neubauer de las células viables (da Silva *et al*., 2007, 2008), los que cuantifican la actividad metabólica mediante espectrofotometría en presencia de MTT (Muelas *et al*., 2001; Boiani *et al*., 2006; Gómez-Barrio *et al*., 2006; da Silva *et al*., 2012, 2014; Salomão *et al*., 2013; Soeiro *et al*., 2013) o por espectrofluorimetría con resazurina (Rolón *et al*., 2006b; Bettiol *et al*., 2009; Bot *et al*., 2010; Keenan *et al*., 2012; Planer *et al*., 2014), o los más sofisticados que recurren a la citometría de flujo tras incubar las células con yoduro de propidio/diacetato de fluoresceína (Muro *et al*., 2014; Olmo *et al*., 2015) o a técnicas de HCA (Alonso-Padilla *et al*., 2015).

1.10.2. Métodos *in vivo*

El gran desarrollo que han experimentado los métodos *in vitro* ha permitido que en los protocolos secuenciales de cribado farmacológico los métodos *in vivo* queden relegados a una fase posterior, a la que únicamente se someten aquellos compuestos que han mostrado una remarcable selectividad *in vitro*.

Existe una gran variedad de modelos animales que pretenden simular el curso de la enfermedad de Chagas en humanos; sin embargo, hasta el momento ninguno se ha constituido como modelo óptimo para predecir los resultados del tratamiento antichagásico. Por cuestiones prácticas, el ratón es el modelo comúnmente utilizado en los experimentos de cribado farmacológico. En comparación con animales de mayor tamaño, el uso de ratones es más económico, permite trabajar con un mayor número de individuos y ofrece una manipulación y mantenimiento más sencillo. Indiscutiblemente, cualquier experimento *in vivo* ha de cumplir con las consideraciones éticas pertinentes, siendo éstas más restrictivas si cabe en lo relativo al uso de animales de gran tamaño (Chatelain y Konar, 2015).

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los modelos *in vivo* (Chatelain y Konar, 2015).

Animal	Ventajas	Inconvenientes
Ratón, rata, hámster, cobaya, conejo	Imita diversos aspectos de la infección humana: inmunológicos, patológicos y fisiológicos. El modelo agudo proporciona resultados de forma rápida. En comparación con animales de mayor tamaño: – Práctico: manipulación y mantenimiento sencillo. – Económico, permite trabajar con un número mayor de individuos. – Requerimiento de menores cantidades de fármaco.	Algunos modelos de infección aguda no reflejan el curso de la enfermedad en humanos. Ausencia de correlación entre la parasitemia y la severidad de las manifestaciones. Los modelos crónicos para la evaluación de tratamientos experimentales son largos y caros y por tanto, a menudo no compatibles con los procedimientos iterativos de optimización de compuestos.
Pollo	Puede resultar útil en la elucidación de la patogénesis de la enfermedad (procesos autoinmunes). Los animales con inserciones de ADNk en su genoma desarrollan una cardiomiopatía similar a la humana.	Modelo no adecuado para la evaluación de la actividad tripanocida.
Perro	Buen modelo para estudiar los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en la fase crónica. Reproducción de los hallazgos clínicos e inmunológicos descritos en pacientes chagásicos.	Consideraciones de carácter ético y económico.

Tabla 4. Continuación.

Primates no humanos	Pueden contribuir al desarrollo de terapias para el tratamiento de la enfermedad en humanos. Los cambios en el ECG se correlacionan con las lesiones.	Algunos no son susceptibles al desarrollo de la enfermedad. Consideraciones de carácter ético y económico.

1.10.2.1. Toxicidad aguda

De acuerdo con la definición de Walum (1998), la toxicidad aguda engloba cualquier efecto adverso ocurrido de forma inmediata o en un corto periodo de tiempo después de la exposición única o breve a una sustancia, así como los efectos adversos ocurridos poco después de administrar una sustancia en una única o en múltiples dosis durante 24 h.

La determinación de la toxicidad aguda debe considerarse como el primer paso a realizar en el protocolo de experimentos *in vivo*, con el fin de excluir aquellos compuestos que resulten tóxicos para el hospedador vertebrado (Romanha *et al*., 2010). La MTD o el NOAEL *(no observed adverse effects level)* son algunas de la determinaciones que definen la toxicidad aguda de los compuestos y sus experimentos se realizan con frecuencia previamente a los ensayos de eficacia como antichagásicos (Batista *et al*., 2010; da Silva *et al*., 2012, 2013, 2014; Timm *et al*., 2014). La metodología aplicada para definir estos parámetros cumple además con el "Principio de las 3R" (reducir, refinar y reemplazar) en lo relativo al uso de animales en los ensayos de toxicidad aguda (Romanha *et al*., 2010).

1.10.2.2. Modelo murino de infección aguda

Los modelos murinos de infección aguda permiten evaluar de un modo sencillo y rápido la parasitemia y la mortalidad asociadas a la eficacia del tratamiento. Estos experimentos se diseñan de tal manera que la combinación entre las cepas de ratón y parásito empleadas, suponga niveles elevados de parasitemia durante el mes posterior a la infección. A pesar de que la parasitemia y la mortalidad asociada son parámetros indicativos de la actividad anti-*T. cruzi*, ninguno proporciona información acerca de la capacidad de los compuestos para inducir cura parasitológica. Además, puesto que la fase aguda en humanos resulta fatal en un bajo porcentaje de los casos (< 10%), a diferencia del modelo murino, éste no reproduce fielmente el curso de la infección humana. No obstante, el ratón es considerado el modelo más adecuado para los ensayos iniciales del cribado farmacológico *in vivo* (Bustamante y Tarleton, 2011; Chatelain y Konar, 2015).

Con el fin de armonizar los experimentos realizados en el modelo murino de infección aguda, Romanha *et al*. (2010) proponen un protocolo basado en tres ensayos secuenciales en ratones Swiss: (i) eficacia para reducir los niveles de parasitemia, (ii) eficacia

para producir la cura parasitológica (ambos experimentos realizados en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Y) y (iii) eficacia para producir la cura parasitológica en ratones infectados con la cepa Colombiana (DTU TcI, resistente al BZ). Como se ha venido comentando a lo largo de esta memoria, una vez concluida la fase aguda, los métodos empleados para evaluar la cura parasitológica de los animales supervivientes se basan en el repunte de la parasitemia tras la inmunosupresión con ciclofosfamida, que junto con la cuantificación directa mediante examen microscópico y técnicas de PCR en sangre o tejidos, permite detectar la parasitemia residual (Romanha *et al*., 2010; Bustamante y Tarleton, 2011; Chatelain y Konar, 2015). Recientemente, Chatelain y Konar (2015) sugieren que de acuerdo con la esperanza de vida media en ratón (2–3 años) el seguimiento debería realizarse durante los 6–12 meses post-tratamiento, sin inducir inmunosupresión y evaluando su capacidad para prevenir la enfermedad cardíaca y/o digestiva, a fin de obtener un modelo más representativo de la evolución clínica en humanos. No obstante, el retraso que supondría en la obtención de resultados, junto con la mayor laboriosidad y coste de los experimentos, son claras desventajas de dicha propuesta.

Como alternativa a los ensayos clásicos, el uso de parásitos transgénicos también ha irrumpido en los modelos *in vivo* de infección aguda. La utilización de cepas que expresan la enzima β-galactosidasa se plantea como una alternativa a la tinción clásica de hematoxilina-eosina empleada en histología, aludiendo a una mejor visualización de los amastigotes en tejido y a la detección de parásitos viables mediante su tinción con X-Gal (Buckner *et al*., 1999). Sin duda alguna, la aparición de cepas que permiten monitorizar en tiempo real el curso de la infección mediante técnicas de imagen basadas en la emisión de fluorescencia (*T. cruzi*-tdTomato) o bioluminiscencia (*T. cruzi*-luciferasa) supone un claro avance en este contexto, debido a su mayor sensibilidad en la detección de la parasitemia, la aplicación de métodos no invasivos en el seguimiento y la no manipulación de sangre infectada, así como a la información que facilitan acerca de la distribución del parásito en el animal (Bustamante y Tarleton, 2011; Chatelain y Konar, 2015). Estas técnicas en ocasiones proporcionan resultados relacionados con la cura parasitológica (inhibición en la replicación de los amastigotes) de una forma rápida y eficaz, sin necesidad de recurrir a los esquemas de inmunosupresión que prolongan los experimentos en fase aguda, habiendo mostrado además buena correlación entre ambas metodologías (Canavaci *et al*., 2010).

1.10.2.3. Modelo murino de infección crónica

A pesar de que el principal problema de los fármacos de referencia antichagásicos reside en su ineficacia como tratamiento en la fase crónica de la enfermedad, varios investigadores sostienen que el modelo *in vivo* de infección crónica no contribuye de manera significativa a la identificación de nuevos compuestos con actividad tripanocida, objetivo primordial del cribado farmacológico, siendo sin embargo este modelo más relevante en el estudio de la

patogénesis de la enfermedad (Romanha *et al*., 2010). De hecho, la mayoría de los estudios emplean modelos murinos de infección aguda debido a que el modelo crónico generalmente se considera inapropiado como procedimiento para la optimización de compuestos (Chatelain y Konar, 2015). A pesar de todo, Chatelain (2015) se reafirma en la necesidad de que los compuestos sean capaces de erradicar los parásitos en su administración durante la fase crónica de la infección en ratón.

La fase crónica sobreviene cuando la infección experimental se realiza con un número reducido de parásitos o los tratamientos administrados durante la fase aguda no producen la cura parasitológica. En comparación con los ensayos realizados en fase aguda, los experimentos que evalúan la eficacia de un compuesto en fase crónica requieren de más tiempo hasta la obtención de resultados, debido a que el ratón tarda varios meses en entrar en esta fase y los regímenes de tratamiento son más prolongados (Chatelain y Konar, 2015)

En el modelo murino, el comienzo de la fase crónica depende de la combinación parásito/hospedador. La variabilidad que existe en la transición entre las formas aguda y crónica, hace que sea difícil estandarizar un modelo unificado *in vivo* de infección crónica (Chatelain y Konar, 2015). Como ejemplo, Villalta *et al*. (2013) inoculan 50 TS de la cepa Tulahuen en ratones BALB/c, frente a los 1×10^5 del experimento en fase aguda, consiguiendo así un elevado porcentaje de individuos entrando en fase crónica para comenzar el tratamiento en el día 90 p.i. De manera similar proceden Bustamante *et al*. (2007) y Fauro *et al*. (2013) con ratones Swiss, administrando los tratamientos a partir de los días 180 y 90 p.i., respectivamente. Por su parte, Bahia *et al*. (2012) comienzan el tratamiento de ratones Swiss infectados con la cepa VL-10 el día 120 p.i., basándose en el curso de la enfermedad en humanos y su entrada en la fase indeterminada a los 2–3 meses de la infección inicial.

La parasitemia subpatente característica de la infección crónica, hace que los métodos utilizados para evaluar la eficacia del tratamiento en esta fase requieran de la inmunosupresión con ciclofosfamida. Una vez reactivada la parasitemia, se aplican las mismas técnicas empleadas para evaluar la cura parasitológica de los tratamientos en la fase aguda: recuento parasitológico, detección de ADN parasitario por PCR, hemocultivo, serología o histología (Bahia *et al*., 2012; Fauro *et al*., 2013; Villalta *et al*., 2013).

Una vez más, las cepas de *T. cruzi* transfectadas con el gen de la luciferasa muestran gran aplicación en el modelo de infección crónica. Concretamente, la reciente modificación de la cepa CL Brener con el gen de una variante de la enzima que genera luminiscencia roja (frente a la luciferasa común, cuya señal emite en la región azul-verde del espectro) y de mayor poder de penetración a través de los tejidos, ha posibilitado la puesta a punto de una técnica de imagen *in vivo* que permite detectar la carga parasitaria en tiempo real y su localización en las vísceras con una elevada sensibilidad (límite de detección

100–100.000 parásitos). La combinación de esta técnica de imagen con protocolos de inmunosupresión post-tratamiento, supone una herramienta sumamente eficaz para la evaluación de la cura parasitológica de los tratamientos realizados en fase crónica (Lewis *et al*., 2014, 2015).

1.10.2.4. Modelos no murinos

Una vez confirmada la eficacia del tratamiento para curar la infección por *T. cruzi* en el modelo murino, éste debe ser evaluado en un modelo *in vivo* más próximo al humano, con el fin de evitar fallos terapéuticos en los ensayos clínicos posteriores (Bahia *et al*., 2014a). Bustamante y Tarleton (2014) expresan la necesidad de que los tratamientos sean ensayados al menos en un modelo murino y un modelo de primate no humano antes de ser evaluados en humanos. En este sentido, Chatelain y Konar (2015), afirman que los perros y los primates no humanos muestran una progresión a la fase crónica más semejante al curso de la enfermedad humana, considerándoles por ello como los mejores modelos *in vivo*. No obstante, los mismos autores exponen que la idoneidad de un modelo no necesariamente ha de significar la fiel reproducción de la enfermedad humana, sino la capacidad para responder a la hipótesis planteada en cada caso, y que en el campo de la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas demuestre los siguientes aspectos: (i) eficacia similar o superior a la del tratamiento con BZ, (ii) supresión de la parasitemia y/o mejora de los síntomas asociados a la fase crónica, (iii) distribución del fármaco en tejidos y (iv) correlación entre las propiedades farmacocinéticas y la eficacia.

Con respecto al modelo canino, el perro desarrolla unos niveles de parasitemia, manifestaciones clínicas, respuesta inmunológica y lesiones cardíacas en ambas fases que son comparables a las de la infección por *T. cruzi* en humanos (Guedes *et al*., 2012). Además, la respuesta que este modelo presenta al tratamiento con BZ se correlaciona en mayor medida con los resultados obtenidos en los pacientes, ya que alcanza un 68,75% y un 37,50% de curas parasitológicas en las fases aguda y crónica, respectivamente, y no previene la cardiomiopatía asociada a la fase crónica (ver apartado 1.8.1. y resultados de *BENEFIT*) (Guedes *et al*., 2002; Santos *et al*., 2012). A juzgar por estos hallazgos, el perro resulta un buen modelo *in vivo* y como se ha comentado anteriormente, ha sido utilizado en los estudios preclínicos de varios candidatos como el albaconazol, ravuconazol o K777 (Guedes *et al*., 2011; Bahia *et al*., 2014a).

Además de actuar como reservorios naturales de la enfermedad, entre los primates no humanos, los monos del Nuevo Mundo – *Callithrix penicillata, Cebus apella* y *Saimiri sciureus* – son utilizados en la infección experimental por *T. cruzi*. Junto a los anteriores, otros primates como el macaco Rhesus *(Macaca mullata)* y los babuinos *(Papio* spp.*)* desarrollan alteraciones cardíacas como consecuencia de la infección, incluidos cambios en

el ECG y muerte ocasional por cardiomiopatía crónica, además de megacolon y megaesófago en el caso de los últimos (Teixeira *et al*., 2006a). Las similitudes encontradas en el progreso de la infección en estos animales y la enfermedad de Chagas humana, sugiere su importante contribución al desarrollo de nuevas terapias antichagásicas (Chatelain y Konar, 2015).

1.10.3. Métodos *in silico*

En el ámbito de la Farmacología, los métodos *in silico* hacen referencia a técnicas computacionales aplicadas a la recopilación, análisis e integración de datos biológicos procedentes de diversas fuentes, destinadas al desarrollo virtual de modelos y simulaciones capaces de predecir o plantear hipótesis, con el fin último de proporcionar hallazgos y avances relativos a la medicina y terapéutica (Ekins *et al*., 2007).

En los últimos años, el cribado virtual (CV) se ha introducido como una herramienta de apoyo al HTS, que se sirve de diversos métodos computacionales para dirigir la selección y evaluación de moléculas pertenecientes a grandes bases de datos (BD), dando prioridad al ensayo en los correspondientes modelos experimentales a aquellas que muestran mayor probabilidad de ser activas. De acuerdo con Talevi y Bruno-Blanch (2009), la incorporación del CV aporta los siguientes beneficios a los protocolos de cribado farmacológico:

- Rapidez en la selección de las moléculas a ensayar.
- Reducción del coste de la metodología empleada.
- Adquisición y/o síntesis racional de los productos a evaluar experimentalmente.
- Aplicabilidad a las estrategias de *drug-repurposing*.

Según se tenga o no conocimiento de la estructura de la proteína sobre la que actúan los fármacos, el CV puede realizarse de acuerdo a técnicas basadas en la diana o basadas en el ligando, siendo ambas metodologías igualmente válidas (Ekins *et al*., 2007).

1.10.3.1. Métodos basados en la diana

Estos métodos, entre los que se encuentra el conocido como *docking*, se aplican en aquellos casos en que la estructura tridimensional de la diana biológica está disponible (Willett, 2006). Entre otras técnicas, la cristalografía de rayos X aporta información sobre la estructura de la proteína o del complejo proteína-ligando, contribuyendo a la identificación del farmacóforo mediante exploración de las regiones del ligando que interaccionan directamente con la proteína, y *viceversa* (Escalona *et al*., 2003).

El *docking* resulta de gran interés cuando las dianas farmacológicas son enzimas, mientras que presenta ciertas limitaciones cuando éstas consisten en receptores de membrana (Talevi y Bruno-Blanch, 2009). Un ejemplo lo constituye la elucidación de la

estructura cristalina de la cruzipaína y su validación como diana terapéutica, hecho que ha derivado en estudios de *docking* para la identificación de inhibidores a partir de bibliotecas químicas (Branquinha *et al*., 2015).

1.10.3.2. Métodos basados en el ligando

Se aplican cuando se desconoce la estructura de la diana y comprenden: (i) métodos basados en la búsqueda del farmacóforo, mediante superposición geométrica de las moléculas en una o múltiples conformaciones, para la identificación de aquellas regiones que son indispensables en su actividad, (ii) métodos de aprendizaje automático, en los que se establece una regla de clasificación de acuerdo con las propiedades de una serie de entrenamiento constituida por moléculas activas e inactivas y (iii) métodos basados en la similitud estructural de las moléculas con un compuesto de referencia con actividad reconocida (Willett, 2006).

El denominador común de los métodos basados en el ligando es el "Principio de Similitud" *(Similarity-Property Principle)* formulado por Johnson y Maggiora, que sostiene que las moléculas que son estructuralmente similares han de poseer propiedades similares (Ekins *et al*., 2007).

o *Modelos QSAR de predicción de actividad para el cribado virtual basado en el ligando*

Los métodos *in silico* que relacionan la estructura química de las moléculas con su actividad biológica pueden dividirse en dos grandes grupos: los métodos de modelado molecular o SAR *(Structure-Activity Relationship)* y los métodos QSAR *(Quantitative Structure-Activity Relationship)*. Con respecto a los últimos, estos métodos consisten en la construcción de modelos matemáticos que relacionan la estructura de las moléculas con sus propiedades químicas y efectos biológicos (Escalona *et al*., 2003; Ekins *et al*., 2007).

En otras palabras, los métodos QSAR establecen que la actividad biológica del fármaco es una función dependiente de las características estructurales de la molécula (Escalona *et al*., 2003), y la predicción de actividad se realiza mediante el cálculo de descriptores moleculares (DM) y la aplicación de técnicas estadísticas o quimiométricas (Ekins *et al*., 2007). Éstos a su vez pueden dividirse en dos grupos de acuerdo con el tipo de DM (o índices) sobre los que se construyen los modelos:

- QSAR-2D: los modelos se generan mediante DM calculados a partir de la estructura química de las moléculas, siendo éstos por tanto independientes de su orientación tridimensional y conformación (Dudek *et al*., 2006; Talevi y Bruno-Blanch, 2009). El QSAR-2D se basa en la utilización de descriptores fisicoquímicos claramente definidos y en comparación con el QSAR-3D, son métodos más sencillos, rápidos y susceptibles de

automatización, habiéndose considerado tradicionalmente como los más adecuados para el CV de grandes BD (Verma *et al*., 2010). Uno de los programas ampliamente difundidos para el cálculo de este tipo de DM en la construcción de modelos de predicción de actividad es el software TOMOCOMD-CARDD *(TOpological MOlecular COMputer Design – Computer Aided "Rational" Drug Design)* que, en combinación con técnicas estadísticas como el análisis discriminante lineal (ADL), ha dado lugar a la identificación de potenciales agentes antiparasitarios mediante CV de diversas series de síntesis, entre los que también encontramos compuestos activos frente a *T. cruzi* (Montero-Torres *et al*., 2005; Vega *et al*., 2006; Roldos *et al*., 2008; Gastillo-Garit *et al*., 2010, 2011, 2012, 2015).

- QSAR-3D: los DM se obtienen a partir de la estructura tridimensional de la molécula y requieren de un análisis conformacional previo a su cálculo (Talevi y Bruno-Blanch, 2009). Teóricamente derivan en mejores modelos de predicción, al construirse sobre DM más representativos de las características que adquiere la molécula en su interacción con la correspondiente proteína. Sin embargo no siempre es así, al depender los resultados del correcto alineamiento de las moléculas (Dudek *et al*., 2006; Ekins *et al*., 2007; Verma *et al*., 2010). Ejemplos de QSAR-3D son los métodos CoMFA *(Comparative Molecular Field Analysis)* y CoMSIA *(Comparative Molecular Similarity Indices Analysis)*, basados en la cuantificación de los campos electrostáticos, estéricos e interacciones hidrofóbicas de las moléculas (Dudek *et al*., 2006; Verma *et al*., 2010). Ambas estrategias también han sido utilizadas en la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas, para predecir la actividad de compuestos inhibidores de la cruzipaína (Méndez-Lucio *et al*., 2011) o de la HK (Hudok *et al*., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

"A scientist in his laboratory is not a mere technician,
he is also a child confronting natural phenomena
that impress him as though they were fairy tales"

- Marie Curie -

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cribado farmacológico de moléculas de síntesis

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1.1. El parásito: *Trypanosoma cruzi*

Para la realización de este trabajo se han utilizado tres cepas de *Trypanosoma cruzi*, de comportamiento biológico diferente y distinta susceptibilidad a los fármacos antichagásicos de referencia, ampliamente extendidas en el campo de la quimioterapia experimental.

Las cepas CL Brener y Tulahuen, ambas pertenecientes al DTU TcVI y sensibles a benznidazol (BZ) y nifurtimox (NX), fueron utilizadas en las pruebas *in vitro*. La cepa Y (DTU TcII) de moderada resistencia al BZ, se eligió para la realización de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

- **Cepa CL clon B5 *lacZ***

Tanto la cepa CL parental de *T. cruzi*, aislada en el año 1963 por Brener y Chiari a partir de un ejemplar de *Triatoma infestans* en Rio Grande do Sul (Brasil), como el clon CL Brener aislado a partir de la anterior, presentan características interesantes en cuanto a su capacidad para infectar células de mamífero, diferenciación *in vitro* y sensibilidad al NX y BZ (Zingales *et al*., 1997).

Posteriormente, Buckner *et al*. (1996) modifican genéticamente esta cepa de *T. cruzi* mediante la inserción del gen de la enzima β-galactosidasa *(lacZ)* de *Escherichia coli.* La expresión de esta enzima por el parásito permite la hidrólisis del sustrato cromogénico rojo de clorofenol β-D-galactopiranósido (CPRG) a rojo de fenol, con un consiguiente cambio de color que va del amarillo al rojo (Fig. 20). La intensidad del color, directamente proporcional al número de parásitos, permite estimar los porcentajes de actividad de los compuestos mediante cuantificación de la absorbancia por espectrofotometría (Buckner *et al*., 1996).

La cepa CL clon B5 *lacZ* (CL-B5 *lacZ)* de *T. cruzi* fue cedida a nuestro laboratorio a través del Instituto Conmemorativo Gorgás, Panamá.

- **Cepa Tulahuen clon C4 *lacZ***

La cepa Tulahuen de *T. cruzi* es originaria del norte de Chile y fue aislada por Pizzi en 1945 a partir de un ejemplar de *Triatoma infestans*. Esta cepa fue igualmente modificada por

Buckner *et al*. (1996) dando lugar a la cepa Tulahuen clon C4 *lacZ*, capaz de expresar la enzima β-galactosidasa (Fig. 20).

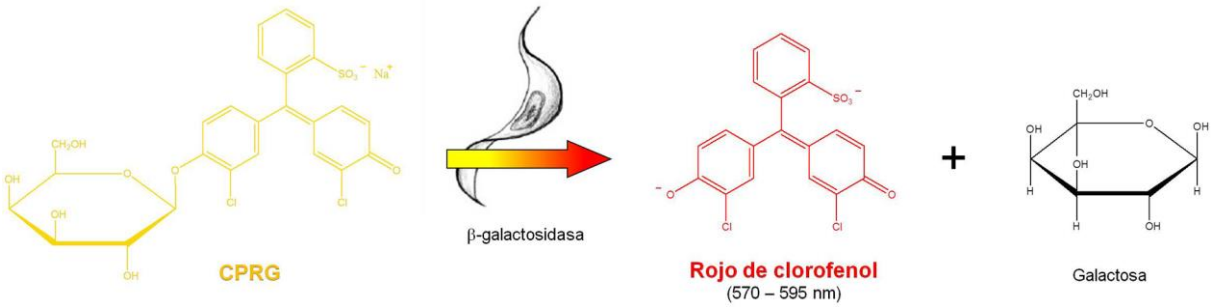


Fig. 20. Reacción colorimétrica experimentada por el sustrato CPRG en presencia de parásitos pertenecientes a las cepas CL-B5 *lacZ* y Tulahuen C4 *lacZ.*

Los ensayos de actividad realizados con la cepa Tulahuen C4 *lacZ* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto Oswaldo Cruz (LBC/IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), supervisados por la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro.

- **Cepa Y**

La cepa Y de *T. cruzi* fue aislada a partir de un caso agudo procedente de Marilia (Brasil) y caracterizada por Silva y Nussenzweig (1953). Debido a su alta virulencia, en este trabajo ha sido utilizada para las pruebas *in vivo*, siendo capaz de originar elevadas parasitemias y una alta tasa de mortalidad durante la fase aguda de la infección murina (Brener, 1962).

Parte de los ensayos *in vivo*, así como los ensayos *in vitro* realizados con la cepa Y, se realizaron en el LBC/IOC/Fiocruz, bajo la supervisión de la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro.

2.1.1.2. Líneas celulares

Para las pruebas de citotoxicidad inespecífica y como células hospedadoras de *T. cruzi*, se emplearon las siguientes líneas celulares de mamíferos: macrófagos murinos J774 y fibroblastos murinos NCTC clon 929 (L929).

- **Macrófagos murinos J774**

Esta línea celular de crecimiento continuo y adherente, constituida por macrófagos peritoneales de origen murino *(Mus musculus)*, fue obtenida por Ralph en el año 1968 y cedida a nuestro laboratorio por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

- **Fibroblastos murinos NCTC clon 929 (L929)**

La línea celular NCTC-929, también denominada L929, fue originada por Sanford y Earl en 1948 a partir de la línea parental L formada por fibroblastos procedentes de tejido conectivo murino *(Mus musculus)* (Sandford *et al.*, 1948). Dicha línea celular, de crecimiento continuo y capacidad adherente, fue cedida a nuestro laboratorio por la Facultad de Odontología de la UCM.

2.1.1.3. Cultivos primarios de células cardíacas

Diversos ensayos de citotoxicidad, así como pruebas de actividad frente a amastigotes intracelulares llevados a cabos en el LBC/IOC/Fiocruz, se realizaron en cultivos primarios de células cardíacas (CC) procedentes de tejido embrionario de origen murino *(Mus musculus)*.

Las células musculares requieren de su anclaje a un sustrato sólido para llevar a cabo su proliferación, metabolismo y diferenciación. El uso de tejidos embrionarios permite el seguimiento del proceso de miogénesis, con la ventaja de ser estéril desde el inicio de su aislamiento. Las células aisladas a partir de este tipo de tejido presentan una gran capacidad de adhesión al sustrato, alta motilidad, elevada multiplicación y diferenciación celular *in vitro* (Araújo-Jorge y de Castro, 2000).

2.1.1.4. Hospedador experimental: *Mus musculus*

Los ensayos *in vivo* fueron realizados en ratones Swiss no consanguíneos *(Mus musculus*, cepa NMRI). Los animales se alojaron en jaulas de plástico provistas de cama limpia, agua y comida *ad libitum*, mantenidas en estancias con condiciones estables de temperatura (20–24 ºC), humedad (55 ± 10%), renovación de aire y fotoperiodo (12 h luz/12 h oscuridad).

Todos los procedimientos que supusieron el uso de ratones fueron realizados de acuerdo con las Directivas 86/609/CEE y 2010/63/UE, controlados en España por los RD 1201/2005 de 10 de octubre y el actualmente vigente RD 53/2013 de 1 de febrero, por los que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Para los ensayos de actividad y toxicidad *in vivo* realizados durante la estancia en el LBC/IOC/Fiocruz se emplearon ratones Swiss *(Centro de Criação de Animais de Laboratório* - CECAL/Fiocruz*)* alojados en jaulas de plástico provistas de cama limpia, agua y comida *ad libitum*, mantenidos en similares condiciones controladas de temperatura, humedad, renovación de aire y fotoperiodo. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Ética de Fiocruz para el Uso de Animales (CEUA LW16/14) y fueron supervisados por la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro.

2.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1.2.1. Medio empleado para el mantenimiento de *T. cruzi*

- ***Liver Infusion Tryptose*** **(LIT)**

LIT madre

NaCl	4,06 g
KCl	0,46 g
Na_2HPO_4	8,06 g
Glucosa	2,00 g
Triptosa	5,00 g
Infusión de hígado	5,00 g
Agua destilada	1000 mL
Solución de hemina 2,5% (NaOH 1 N)	1 mL

Autoclavar (12 min, 121 ºC, 1 atm).

LIT suplementado

LIT madre	900 mL
Suero bovino fetal (SBF) inactivado (30 min, 56 ºC)	100 mL
Penicilina	100 UI/mL
Estreptomicina	100 μg/mL

Ajustar el pH a 7,4.
Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

2.1.2.2. Medios empleados para el mantenimiento de cultivos celulares

- ***Minimal Essential Medium*** **(MEM)**

MEM sin rojo de fenol	7,52 g
HEPES	4,00 g
L-Glutamina	0,30 g
$NaHCO_3$	1,20 g
Penicilina	100 UI/mL
Estreptomicina	100 μg/mL
SBF inactivado (30 min, 56 ºC)	100 mL
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

Ajustar el pH a 7,2.
Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

- ***Roswell Park Memorial Institute*** **(RPMI)**

RPMI 1640 sin rojo de fenol	8,32 g
HEPES	4,00 g
$NaHCO_3$	1,20 g
Penicilina	100 UI/mL
Estreptomicina	100 μg/mL
SBF inactivado (30 min, 56 ºC)	100 mL
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

Ajustar el pH a 7,2.
Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

- ***Dulbecco's Modified Eagle's Medium*** **completo (DMEM)**

Medio DMEM	1000 mL
Suero equino inactivado (30 min, 56 ºC)	10%
SBF inactivado (30 min, 56 ºC)	5%
$CaCl_2$ 25 mM	10%
L-Glutamina 200 mM	1%
Extracto embrionario de pollo	2%

Ajustar el pH a 7,2.
Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

2.1.3. SOLUCIONES, COLORANTES Y REACTIVOS

2.1.3.1. Soluciones

- **PBS** ***(Phosphate-buffer saline)***

PBS 10x (Solución stock)

NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
Na_2HPO_4	14,40 g
KH_2PO_4	2,40 g
Agua destilada	1000 mL

PBS 1x (Solución de uso)

PBS 10x.....100 mL
Agua destilada ..... c.s.p.1000 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

- **Solución Tritón X-100**

Solución Tritón X-100 0,9%

Tritón X-100 .....0,90 mL
PBS 1x..... c.s.p. 100 mL

Ajustar el pH a 7,4.

Solución Tritón X-100 3%

Tritón X-100 .....3 mL
PBS 1x..... c.s.p. 100 mL

Ajustar el pH a 7,4.

- **Solución Ringer**

NaCl .....9,00 g
KCl 5%.....8,40 mL
$CaCl_2$ 5%.....5,00 mL
Agua tridestilada ..... c.s.p. 1000 mL

Ajustar el pH a 7,0.
Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

- **Solución de gelatina**

Gelatina .....0,01 g
Solución Ringer.....100 mL

Ajustar el pH a 7,0.
Esterilizar mediante autoclavado (20 min, 121 ºC, 1 atm).
Conservar refrigerado a 4 ºC.

- **Solución de disociación**

Solución de tripsina 0,1%

Tripsina	0,10 g
PBS 1x pH 7,0	100 mL

Agitar a 4 ºC hasta su completa disolución.
Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.

Solución de colagenasa 0,8%

Colagenasa	0,80 g
PBS 1x pH 7,0	100 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.

Solución de disociación

Tripsina 0,1%	0,02%
Colagenasa 0,8%	0,01%
PBS 1x pH 7,0	200 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Mantener en baño María a 37 ºC durante todo el experimento.

- **Solución de EDTA/tripsina**

EDTA	30 mg
Tripsina	50 mg
PBS 1x pH 7,2	100 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Conservar en alícuotas de 10 mL a -20 ºC.

- **Solución fijadora de Bouin**

– *Solución stock*

Solución saturada de ácido pícrico (filtrada) diluida en formaldehido acuoso (aprox. 37%) a la proporción 3:1 (300 mL de ácido pícrico + 100 mL de formol).

– *Solución de uso*

Añadir ácido acético en proporción 1/20 (1 mL de ácido acético en 19 mL de solución stock).

- **Solución de carboximetilcelulosa sódica**

Carboximetilcelulosa sódica	2 g
Agua destilada	100 mL

Agitar hasta su completa disolución.
Conservar refrigerado a 4 ºC.

- **Solución anestésica de uretano**

Uretano	15 g
Solución salina 0,9%	100 mL

Agitar hasta su completa disolución.

2.1.3.2. Colorantes

- **Solución Giemsa 10%**

Giemsa	1 mL
Agua destilada	9 mL

Filtrar el colorante con papel de filtro para eliminar impurezas.

- **Tintura de yodo**

Yodo metálico	2,50 g
KI	5,00 g
Agua destilada	50 mL

Filtrar con papel de filtro para eliminar impurezas.

- **Azul tripán**

Azul tripán 0,4% (stock)	5 mL
PBS 1x	c.s.p. 50 mL

Filtrar para eliminar impurezas.

2.1.3.3. Reactivos

- **Solución de CPRG**

Solución de CPRG 0,5 mM

CPRG	15,20 mg
Nonidet P40 0,5%	50 mL

Conservar a -20 ºC.

Solución de CPRG 1 mM

CPRG	30,40 mg
Tritón X-100 0,9%	50 mL

Conservar a -20 ºC.

Solución CPRG 4 mM

CPRG	121,50 mg
Tritón X-100 3%	50 mL

Conservar a -20 ºC.

- **Solución de resazurina**

Solución de resazurina 1 mM

Resazurina	2,51 mg
PBS 1x pH 7,0	10 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Preparar extemporáneamente y protegida de la luz.

Solución de resazurina 2 mM

Resazurina	5,02 mg
PBS 1x pH 7,0	10 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm.
Preparar extemporáneamente y protegida de la luz.

2.1.4. REACTIVOS EMPLEADOS EN MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

2.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido

- **Tampón Milloning**

Solución A

$NaHPO_4.H_2O$	22,60 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

Mantener a 4 ºC.

Solución B

NaOH	25,20 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

Mantener a 4 ºC.

Tampón Milloning

Solución A	58,10 mL
Solución B	11,90 mL

Ajustar el pH a 7,2.

- **Solución de lavado**

Tampón Milloning	45 mL
Glucosa 5,4%	5 mL

- **Solución fijadora de glutaraldehído 2%**

Tampón Milloning	46 mL
Glutaraldehído 25%	4 mL
$CaCl_2$ 1%	0,50 mL

- **Agente deshidratante**

Para las pruebas de microscopía electrónica de barrido (MEB) se utilizó como agente deshidratante etanol (30, 50, 70, 95 y 100%), además de acetona anhidra.

2.1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

- **Tampón cacodilato de sodio-HCl 0,1 M**

Solución stock de cacodilato 0,2 M	50 mL
HCl 0,2 N	4,20 mL
Agua tridestilada	c.s.p. 100 mL

Ajustar a pH 7,2.

- **Solución fijadora de glutaraldehído 2,5%**

Glutaraldehído 25%	1 mL
Tampón cacodilato de sodio-HCl 0,1 M pH 7,2	9 mL

- **Solución post-fijadora de OsO_4 1%**

Solución stock OsO_4 2%	5 mL
Tampón cacodilato de sodio-HCl 0,1 M pH 7,2	5 mL

- **Agente deshidratante**

En las pruebas de microscopía electrónica de transmisión (MET) la deshidratación se realizó con soluciones de acetona (30, 50, 70, 90 y 100%).

- **Resina epoxi**

Epon 812	25 mL
Anhídrido metil nádico (AMN)	17 mL
DMP-30	32 gotas

Agitar 30 min a temperatura ambiente sin que se formen burbujas.
Conservar en un bote bien cerrado a -20 ºC para evitar su polimerización.

- **Acetato de uranilo 2%**

Acetato de uranilo	2,00 g
Agua tridestilada	100 mL

- **Citrato de plomo**

Previamente a su preparación, hervir aproximadamente 100 mL de agua tridestilada para eliminar el CO_2 y evitar la formación de precipitados. Añadir los reactivos en el orden indicado y agitar tras la adición de $Pb(NO_3)_2$ y citrato de sodio, favoreciendo así la formación de citrato de plomo.

$Pb(NO_3)_2$	1,33 g
Citrato de sodio	1,76 g
Agua tridestilada	30 mL
NaOH 1N	8 mL
Agua tridestilada	c.s.p. 50 mL

Ajustar el pH a 12,0.
Conservar a 4 ºC.

2.1.5. REACTIVOS EMPLEADOS EN RESPIROMETRÍA

- **Tampón de respiración**

Para las pruebas de respirometría se utilizó una adaptación del tampón de respiración propuesto por Vercesi *et al.* (1991).

Sacarosa	125 mM
KCl	65 mM
Tris-HCl (pH 7,2)	10 mM
$MgCl_2$	1 mM
K_2PO_4	2,50 mM

2.1.6. REACTIVOS EMPLEADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

En las pruebas de citometría de flujo, realizadas para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial (PMM), se utilizó como marcador fluorescente TMRE, tetrametilrodamina etil éster.

2.1.7. SERIES QUÍMICAS DE SÍNTESIS

Para la evaluación de su actividad, los compuestos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO, soluciones stock) y se añadieron extemporáneamente a los correspondientes medios de cultivo, de modo que la concentración final de disolvente en el mismo no pasó el 0,2% (v/v). Excepcionalmente, en aquellos casos en que ésta superó el 0,2% (v/v), siempre fue inferior al 1% (v/v), evitando de esta manera cualquier efecto tóxico del DMSO sobre células y/o parásitos.

2.1.7.1. Derivados de 5-nitroindazol. Serie I

Todos los derivados de 5-nitroindazol ensayados en el presente trabajo fueron sintetizados por el Dr. Vicente J. Arán, del Instituto de Química Médica del CSIC.

La Fig. 21 muestra las estructuras químicas de los 35 derivados de 5-nitroindazol que constituyen la denominada serie I, cuya síntesis se encuentra publicada en Vega *et al*. (2012). Ésta se compone de 17 indazolinonas 1,2-disustituidas (serie IA: **VATR1–16** y **VATR33**), 15 3-alcoxiindazoles 2-sustituidos (serie 1B: **VATR17–29**, **VATR34** y **VATR35**) y 3 3-alcoxiindazoles 1-sustituidos (serie 1C: **VATR30–32**).

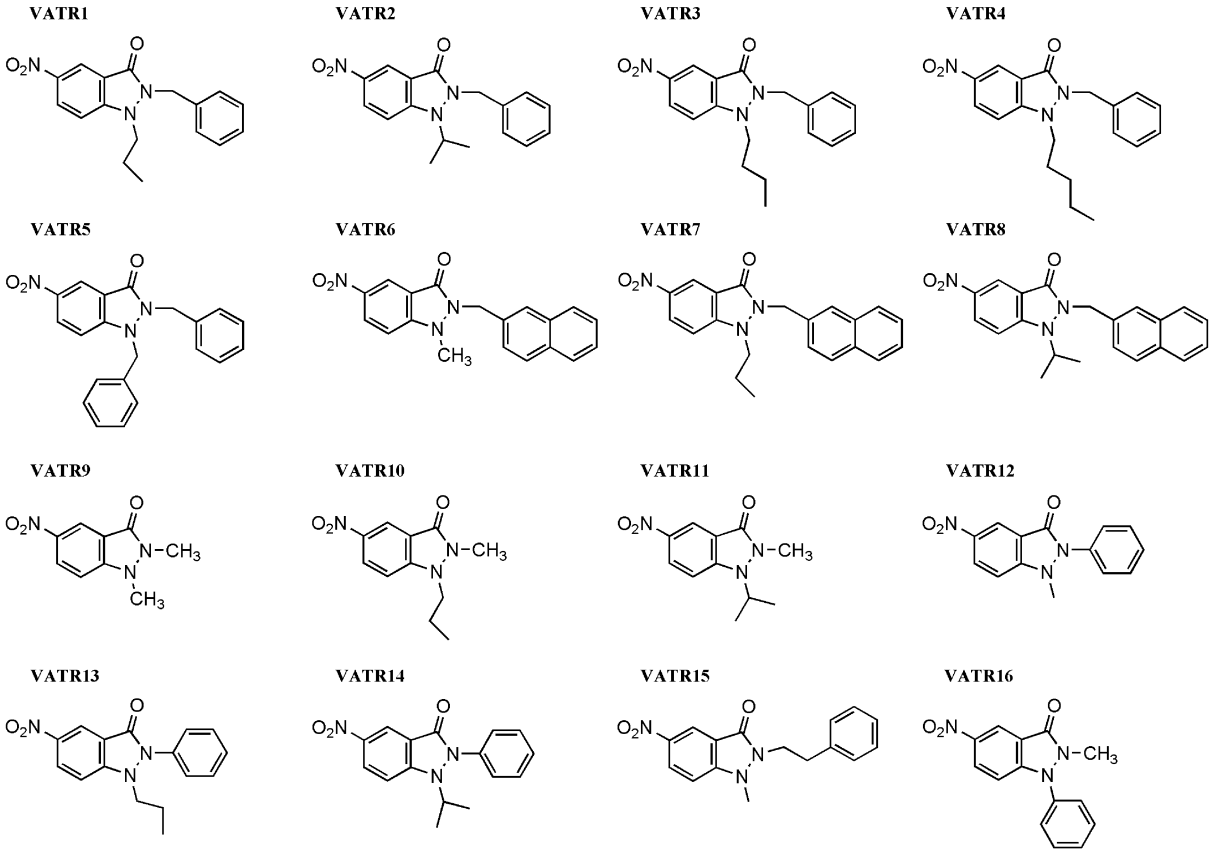


Fig. 21. Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie I.

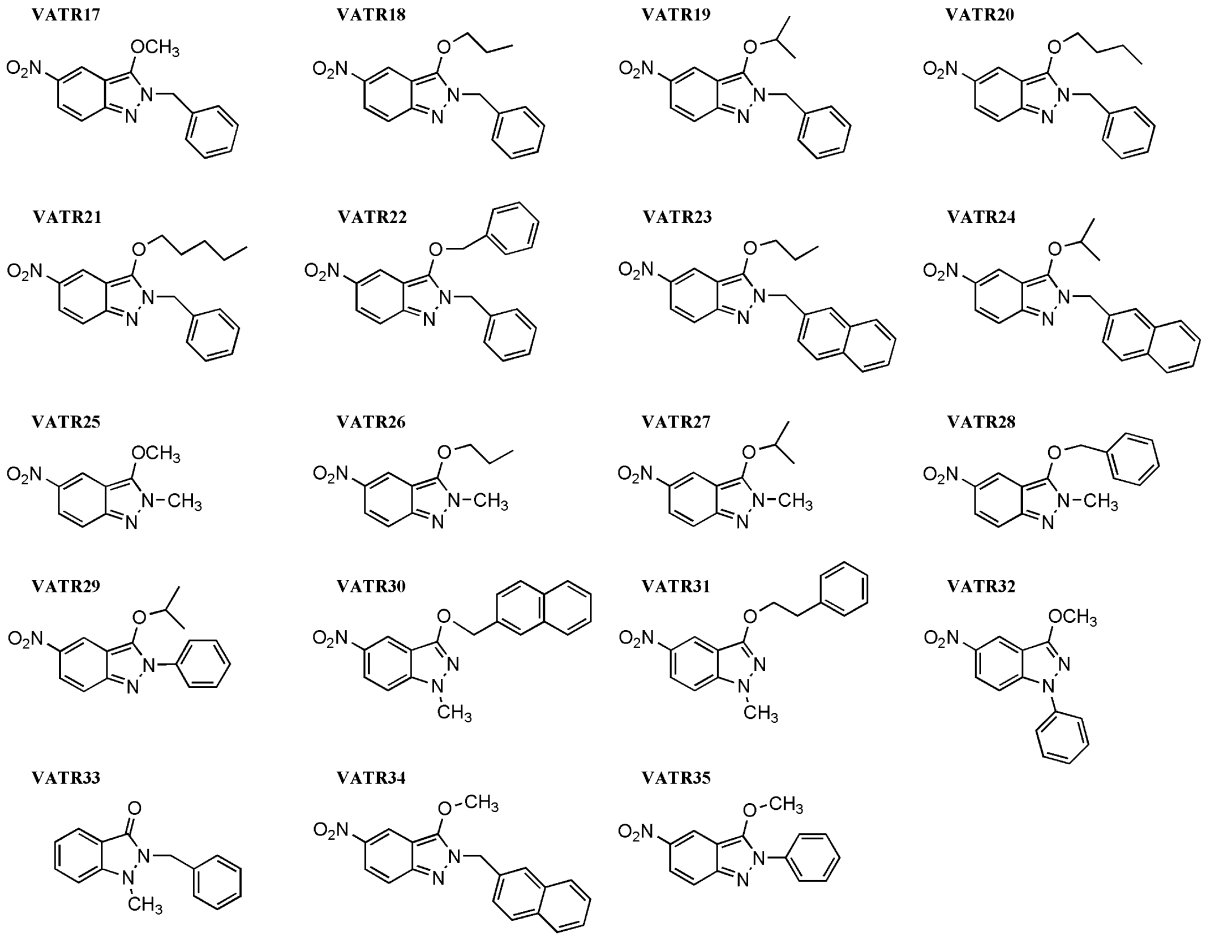


Fig. 21 (continuación). Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie I.

2.1.7.2. Derivados de 5-nitroindazol. Serie II

La serie II (Fig. 22) la forman 9 indazolinonas 1,2-disustituidas (**VATR106-114**), el 3-propoxi indazol **VATR115** y la quinazolina **VATR118**, siendo los dos últimos subproductos de la preparación del 2-picolil derivado **VATR114**.

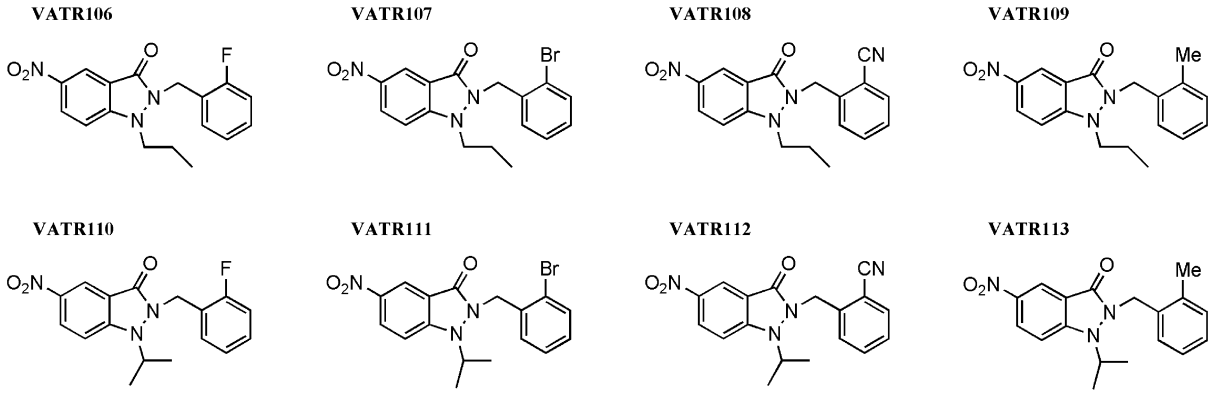


Fig. 22. Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie II.

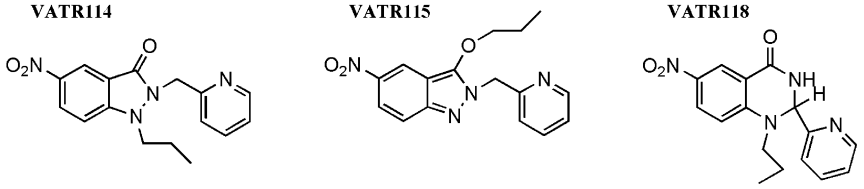


Fig. 22 (continuación). Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie II.

2.1.7.3. Derivados de 5-nitroindazol. Serie III

La serie III de derivados de 5-nitroindazol y compuestos relacionados, cuya síntesis ha sido recientemente publicada en Fonseca-Berzal *et al*. (2016), se muestra en la Fig. 23.

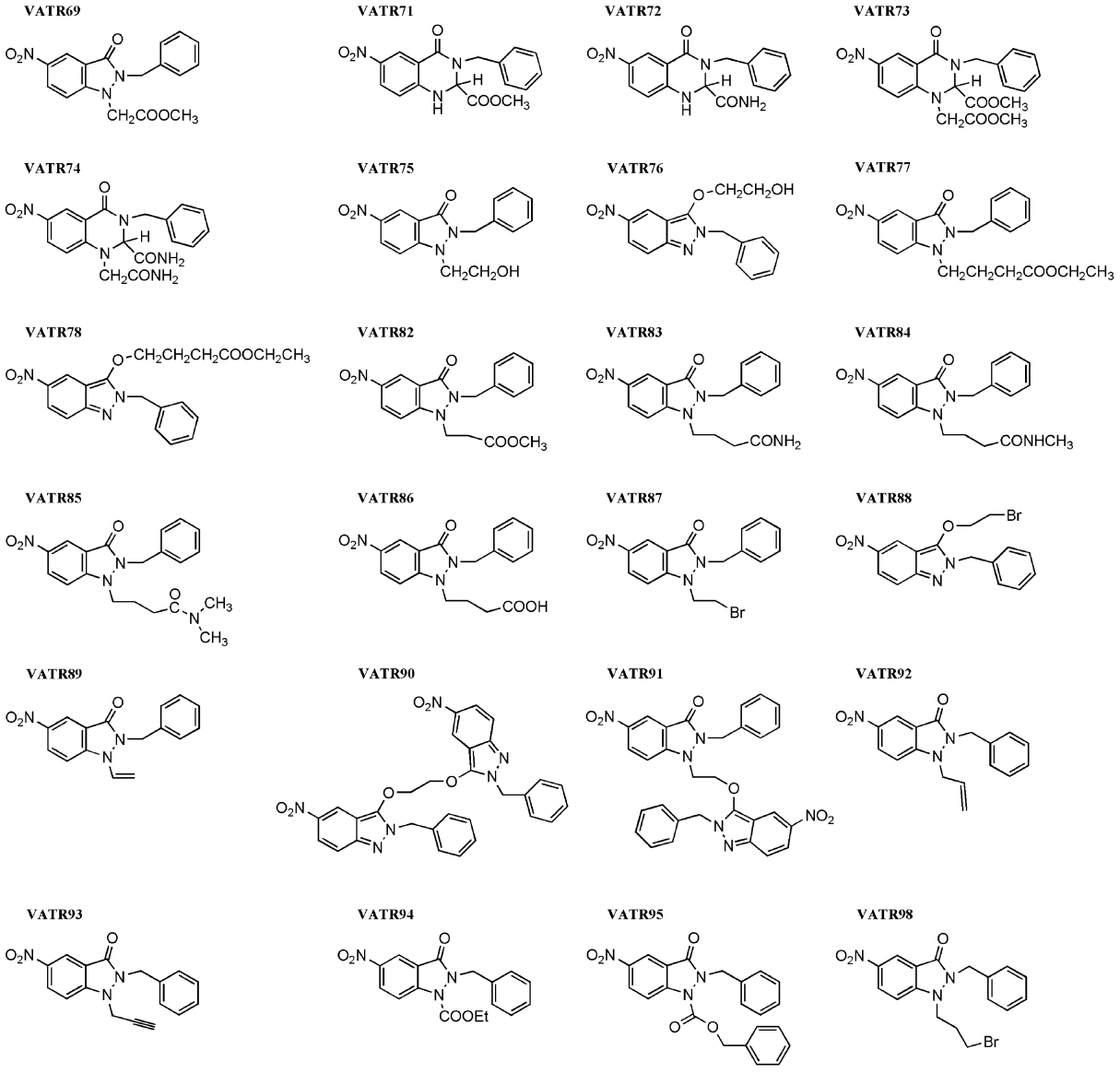


Fig. 23. Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie III y compuestos relacionados.

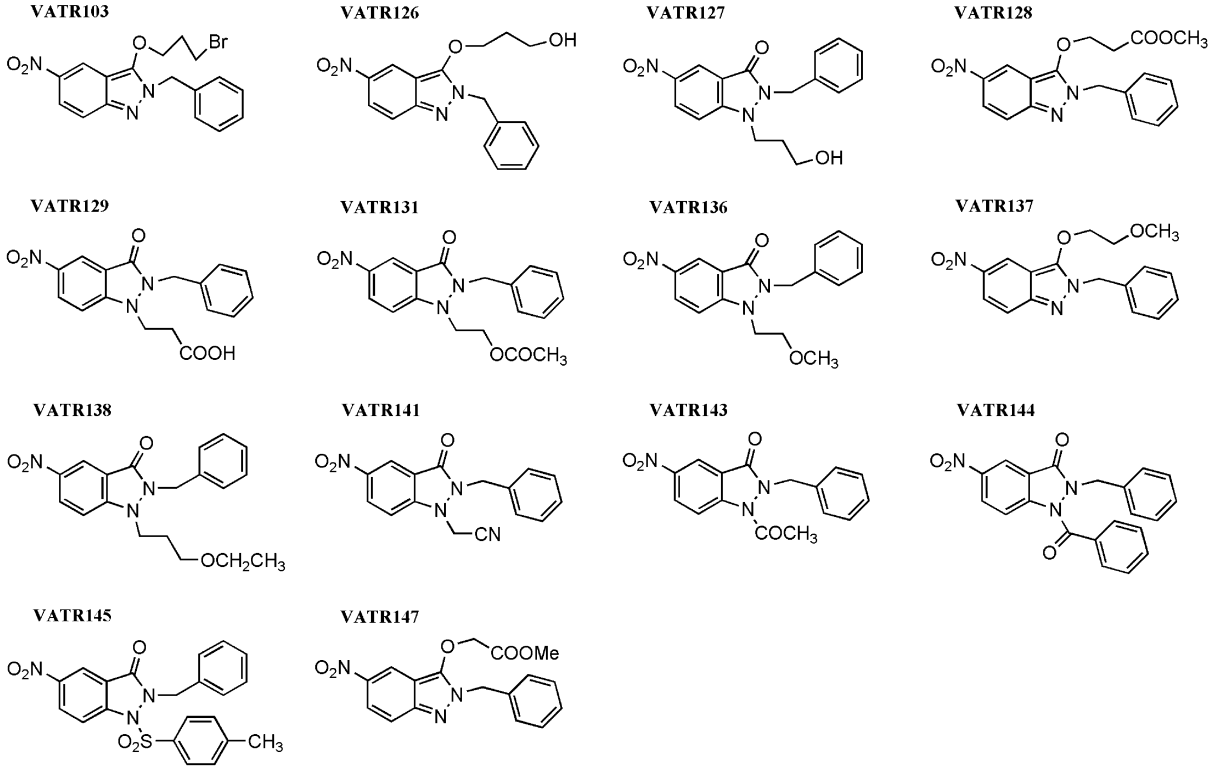


Fig. 23 (continuación). Estructuras químicas de derivados de 5-nitroindazol, serie III y compuestos relacionados.

La serie III la forman 24 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas (**VATR69**, **VATR75**, **VATR77**, **VATR82–87**, **VATR89**, **VATR92–98**, **VATR127**, **VATR129–136** y **VATR138–145**), 10 3-alcoxiindazoles (**VATR76**, **VATR78**, **VATR88**, **VATR90–91**, **VATR103**, V**ATR126**, **VATR128**, **VATR137** y **VATR147**) y 4 quinazolinas (**VATR71–74**) obtenidas por transposición de algunas indazolinonas

2.1.7.4. Derivados de 5-nitroindazol. Serie IV

La serie IV la componen 19 derivados de 5-nitroindazol, cuya estructura concreta no se puede representar por motivos de confidencialidad debido a que está en proceso la correspondiente patente. Dentro de la serie IV encontramos tres familias diferentes:

- 1-(ω-Aminoalquil)-2-bencil-5-nitroindazolinonas: **VATR79–81**, **VATR99–102** y **VATR120**, así como algunos ftalimido-derivados precursores: **VATR116** y **VATR122**.
- 3-(ω-Aminoalcoxi)-2-bencil-5-nitroindazoles: **VATR97** y **VATR130**, así como los ftalimido-derivados precursores **VATR117** y **VATR123**.
- 3-(Alquilamino)-2-bencil-5-nitroindazoles: **VATR96**, **VATR104**, **VATR105**, **VATR121** y **VATR124**.

2.1.7.5. Derivados de 2,4-diaril-1,2,3,4-tetrahidroquinolina

Los compuestos pertenecientes a las series **AR** (Fig. 24) y **DM** (Fig. 25) fueron sintetizados por el grupo de investigación del Dr. Vladimir V. Kouznetsov del Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga, Colombia. La síntesis de estos compuestos fue previamente publicada en Kouznetsov *et al*. (2007) y en Romero Bohórquez y Kouznetsov (2010).

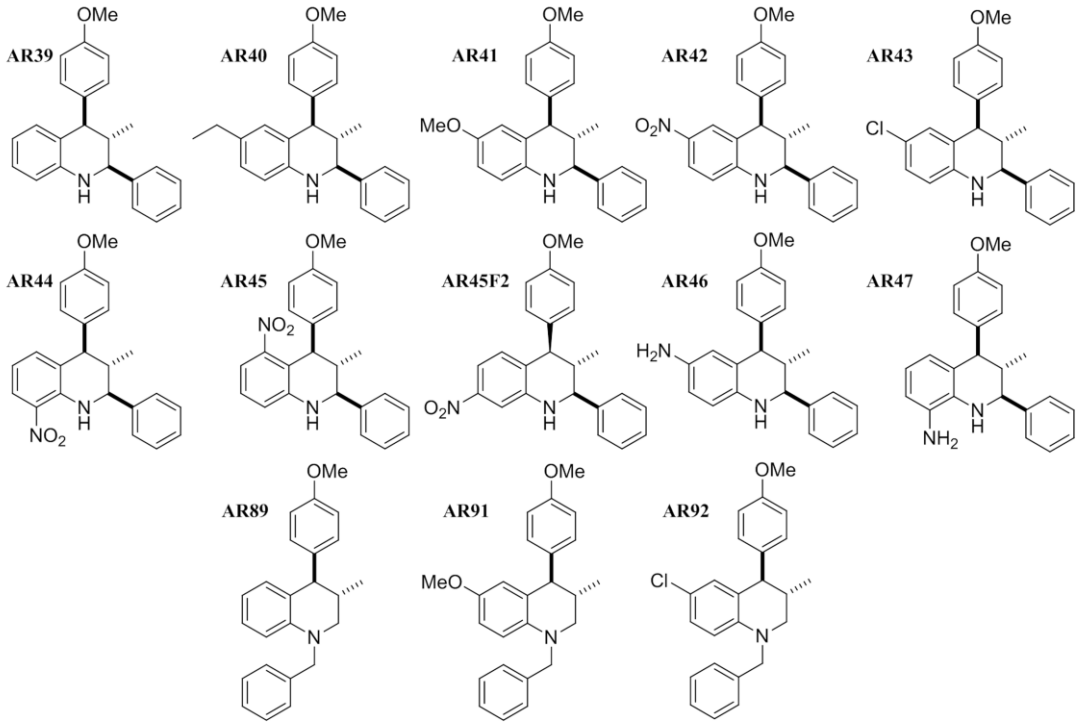


Fig. 24. Estructuras químicas de los compuestos de la serie **AR** (Fonseca-Berzal *et al*., 2013).

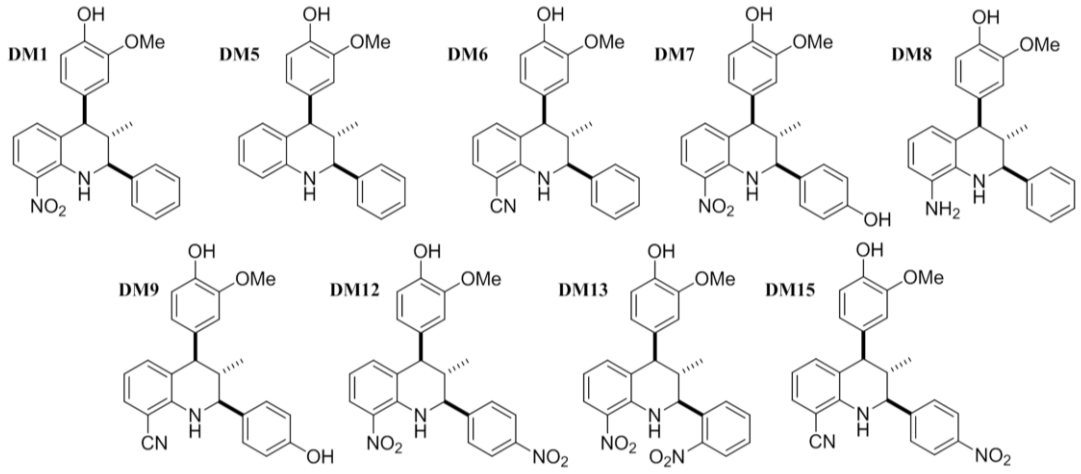


Fig. 25. Estructuras químicas de los compuestos de la serie **DM** (Fonseca-Berzal *et al*., 2013).

2.1.7.6. Derivados de 7-cloro-4-amino(oxi)quinolina

Las dos series de compuestos derivados de 7-cloro-4-amino(oxi)quinolina fueron igualmente sintetizados por el equipo del Dr. Vladimir V. Kouznetsov. La síntesis de estos compuestos fue previamente publicada por Rojas Ruiz *et al*. (2011) y Bueno *et al*. (2012), habiéndose dividido en dos grupos (**Grupo 1** y **2**) de acuerdo con sus estructuras químicas (Fig. 26 y 27).

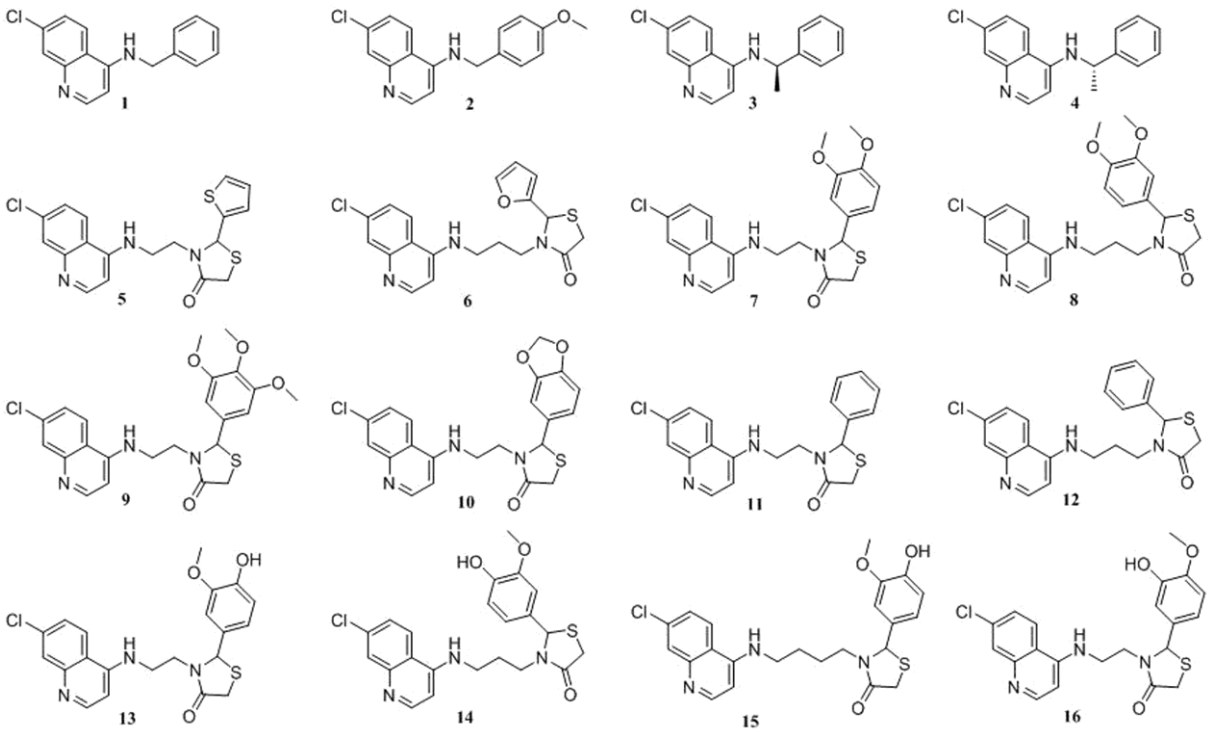


Fig. 26. Estructuras químicas de los compuestos con estructura de 4-bencilamino-7-cloroquinolina (**1**–**4**) y conjugados de 7-cloroquinolina−1,3-tiazolidin-4-ona (**5**–**16**) pertenecientes al denominado **Grupo 1** (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a).

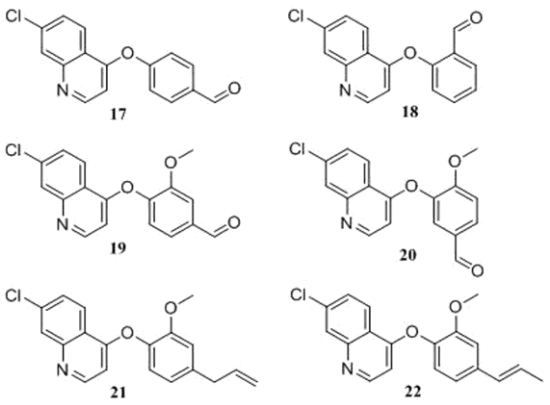


Fig. 27. Estructuras químicas de los compuestos con estructura de 4-ariloxi-7-cloroquinolina pertenecientes al denominado **Grupo 2** (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a).

2.1.7.7. 2,2-dióxidos de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina

La Fig. 28 muestra la serie **DIT** de derivados de 2,2-dióxido de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina, cuya síntesis fue llevada a cabo por el equipo del Dr. Juan A. Páez, del Instituto de Química Médica del CSIC.

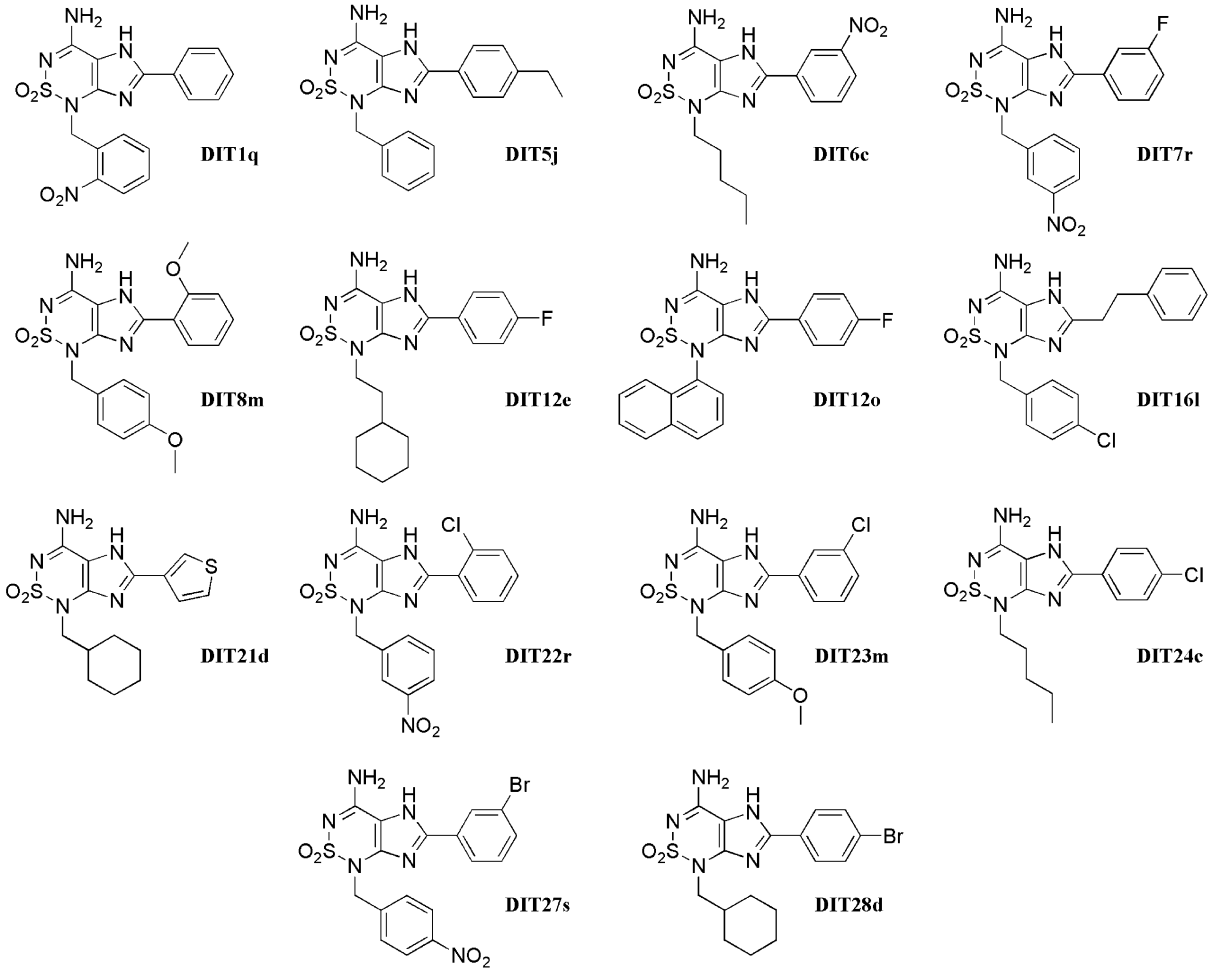


Fig. 28. Estructuras químicas de los compuestos pertenecientes a la serie **DIT**.

2.1.7.8. Quelantes heterocíclicos

Los 22 compuestos evaluados (Fig. 29) fueron sintetizados por el Dr. Oluyomi S. Adeyemi de la Universidad de Landmark (Omu-Aran, Nigeria) y enviados a nuestro laboratorio a través de la Dra. María Teresa Molina, del Instituto de Química Médica del CSIC.

Dentro de esta serie constituida por derivados de imidazol, encontramos algunos compuestos que incorporan estructuras de fenantrolina (compuestos **4**, **5**, **6**, **10** y **29**), fenantreno (compuestos **24**, **25** y **28**) o estilbeno (compuestos **1**, **7**, **16–22** y **27**), a parte de

los imidazoles **12–15**. Una excepción son los compuestos **4** y **6**, los cuales presentan un anillo de oxazol en sustitución al correspondiente imidazol.

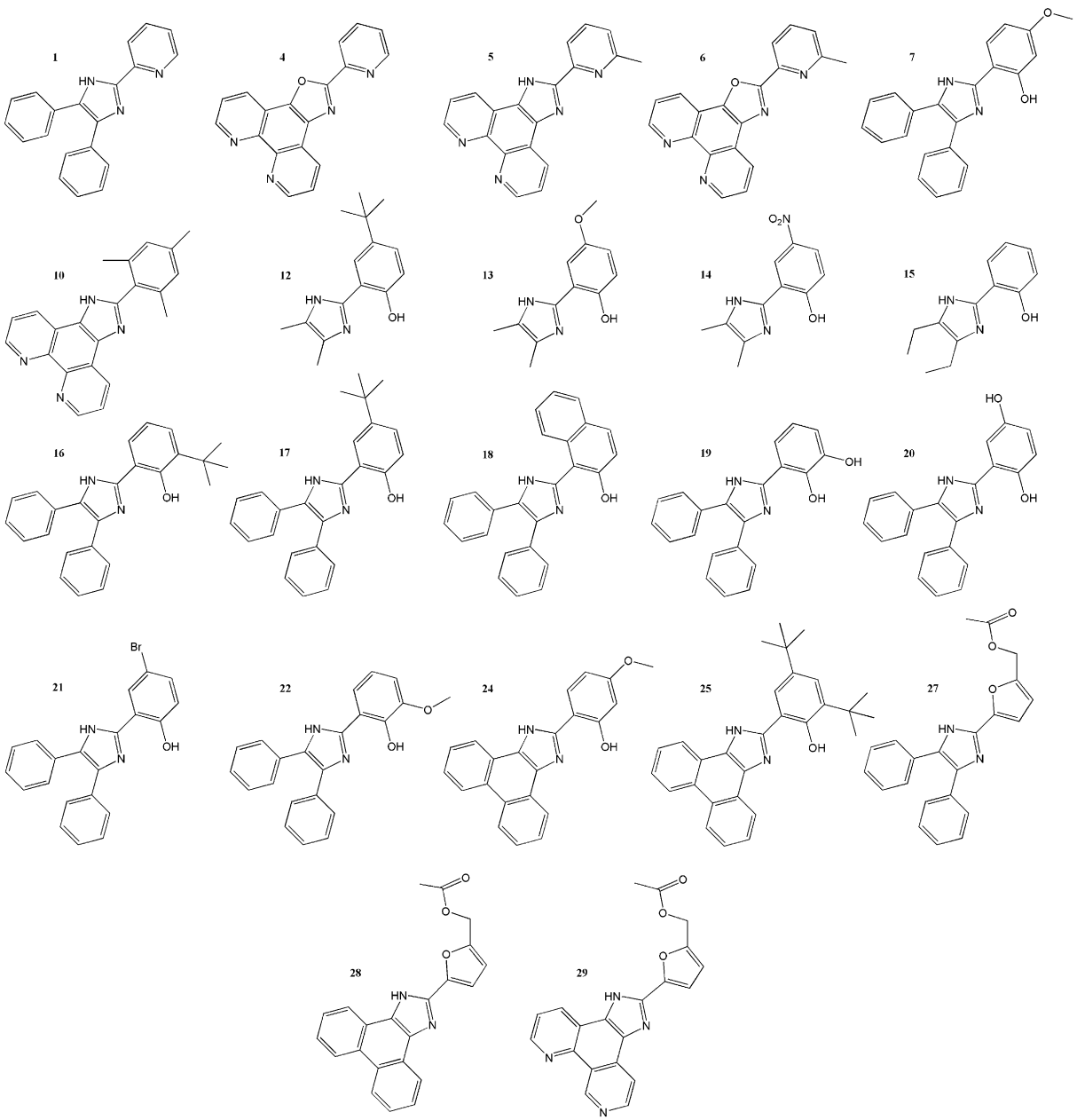


Fig. 29. Estructuras químicas de los quelantes heterocíclicos evaluados.

2.1.7.9. Cromenoazoldionas

La serie **PM**, constituida por 7 derivados de quinona (Fig. 30), fue sintetizada por el equipo de la Dra. Nadine Jagerovic, del Instituto de Química Médica del CSIC.

La síntesis de los compuestos con estructura de cromenopirazoldiona (**PM199**, **PM52**, **PM401**, **PM357**, **PM402** y **PM203**) se encuentra publicada en Morales *et al*. (2015).

Cabe destacar que dentro de esta serie el compuesto **PM154** presenta estructura de cromenoisoxazol.

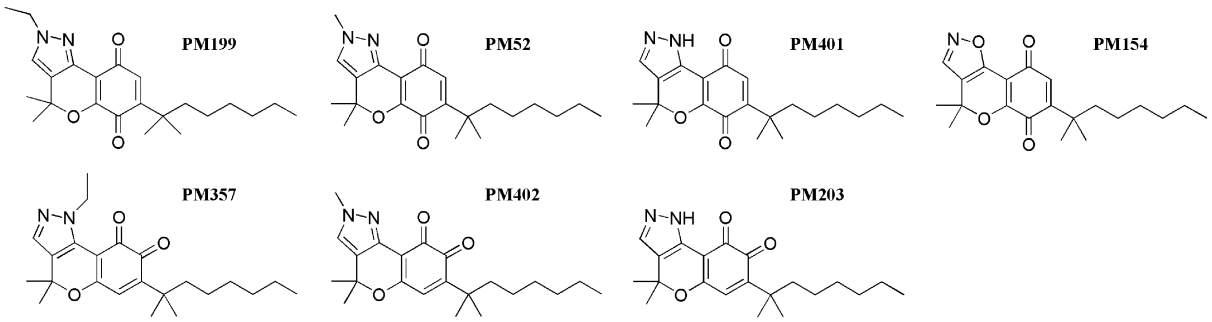


Fig. 30. Estructuras químicas de las quinonas pertenecientes a la serie **PM**.

2.1.7.10. Edelfosina

La edelfosina (Fig. 31) empleada para los ensayos de actividad *in vitro* fue facilitada por el Dr. Faustino Mollinedo del Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

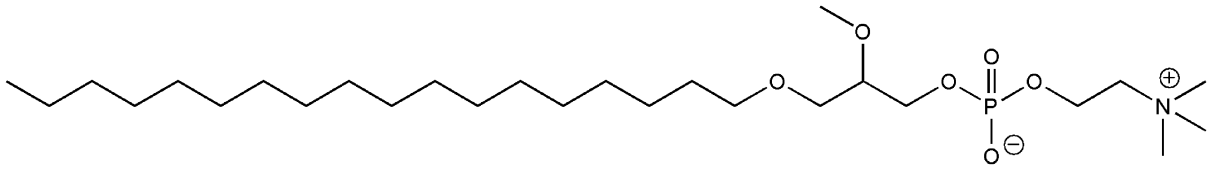


Fig. 31. Estructura química de la edelfosina.

2.1.7.11. Fármacos de referencia

El fármaco BZ, facilitado por LAFEPE *(Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco*, *Brasil)*, fue incluido en todos los ensayos de actividad como fármaco de referencia. Asimismo, para determinados ensayos se incluyó además el fármaco NX (Lampit®, Bayer). Las estructuras de ambos antichagásicos se han detallado previamente en el apartado 1.8.1. de esta memoria.

2.1.8. MÉTODOS

2.1.8.1. Criopreservación y descongelación de células y parásitos

Todas las cepas de *T. cruzi*, así como las líneas celulares empleadas se mantienen criopreservadas en nitrógeno líquido utilizando como agente crioprotector DMSO al 5% (v/v).

Para su criopreservación, los cultivos deben encontrarse en fase de crecimiento exponencial, de modo que las células mantengan una óptima capacidad de división. Una vez concentrado el cultivo (2000 rpm durante 5 min para epimastigotes, 2800 rpm durante 10 min para tripomastigotes y 1500 rpm durante 5 min para células de mamífero) y resuspendido en medio fresco, se repartió en crioviales diluyendo en proporción 1:1 con el correspondiente medio de cultivo suplementado al 10% con DMSO (v/v). La congelación se llevó a cabo en un congelador progresivo (Nicool, LM10), disminuyendo aproximadamente 1 ºC/min durante 2 h. Una vez finalizado este proceso, los crioviales se introdujeron en el tanque de nitrógeno líquido para su conservación definitiva.

La descongelación se realizó en un baño de agua a 37 ºC e inmediatamente se diluyó su contenido utilizando un volumen de medio cinco veces superior al del cultivo criopreservado, para diluir el DMSO y evitar un efecto tóxico del mismo sobre las células.

2.1.8.2. Mantenimiento de cultivos celulares

Partiendo de cultivos celulares criopreservados y descongelados como se detalla en el apartado 2.1.8.1., se realizó un cambio de medio a las 24 h para retirar el DMSO y las células no adheridas al frasco de cultivo celular. Los cultivos se mantuvieron en sus respectivos medios sin rojo de fenol (MEM en el caso de los fibroblastos L929, RPMI para la línea J774), suplementados con antibiótico y 10% de SBF (apartado 2.1.2.2.), incubándose a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2.

Los cultivos de fibroblastos L929 y macrófagos J774 se mantuvieron en monocapa utilizando frascos de cultivo celular de 75 cm^2 de superficie. Cada 2–3 días, los medios consumidos se sustituyeron por medio fresco y se realizaron subcultivos semanalmente usando una solución de EDTA/tripsina (apartado 2.1.3.1.) para despegar las células.

2.1.8.3. Obtención y mantenimiento de cultivos primarios de células cardíacas

Todos los ensayos de actividad que implicaron el uso de cultivos primarios de CC se realizaron en el LBC/IOC/Fiocruz, siguiendo los protocolos de rutina estandarizados por dicho laboratorio (Araújo-Jorge y de Castro, 2000).

Las células se obtuvieron a partir de ratones hembra Swiss de 18–20 días de gestación, previamente anestesiadas y con el área abdominal esterilizada con alcohol al 70%. A continuación se abrió el abdomen dejando expuesta la membrana peritoneal y se extrajo el útero con los embriones, que se transfirió a una placa Petri (100 × 15 mm) con solución Ringer (apartado 2.1.3.1.) en frío. Se abrió la cavidad torácica de los embriones a la altura del esternón y se retiraron los corazones, los cuales se lavaron en otra placa Petri (35 × 10 mm) con Ringer en frío. A continuación, se retiraron los atrios y los vasos, que contienen gran número de fibroblastos, y se fragmentaron los ventrículos, que se colocaron en una nueva placa Petri (35 × 10 mm) con Ringer en frío. Posteriormente, los fragmentos se lavaron con Ringer en un erlenmeyer, en agitación durante 5 min en caliente, proceso que se repitió dos veces para eliminar cualquier resto de células sanguíneas.

A continuación se inició el proceso de disociación enzimática. Para ello, los fragmentos de tejido cardíaco se sumergieron en una solución de disociación (apartado 2.1.3.1.) en caliente durante 5 min y en agitación muy lenta, etapa que se repitió hasta la completa disociación del tejido. De esta manera, el líquido de disociación con las células aisladas (controlando con el microscopio número, morfología y viabilidad) se recogió en tubos de centrífuga de 15 mL con 2 mL de DMEM completo (apartado 2.1.2.2.), mantenidos a 4 ºC hasta terminar el proceso de disociación para inactivar la actividad enzimática. Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 900 rpm y 4 ºC, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en DMEM completo. La suspensión de células se colocó en un frasco de cultivo de 75 cm^2 y se incubó 10 min a 37 ºC para eliminar los fibroblastos mediante su adhesión a la superficie del frasco, ya que su velocidad de anclaje al sustrato es muy superior a la de los mioblastos. Por último, se retiró el sobrenadante y se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer con un microscopio de contraste de fases.

Finalmente, las CC se sembraron en placas de cultivo previamente revestidas con gelatina al 0,01% (apartado 2.1.3.1.) y se incubaron 24 h a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2.

2.1.8.4. Reproducción *in vitro* del ciclo biológico de *T. cruzi*

- **Mantenimiento de cultivos axénicos de epimastigotes**

Para el cultivo y mantenimiento de formas epimastigote se partió de cultivos criopreservados en fase de crecimiento exponencial, los cuales fueron inicialmente diluidos en 5 mL de medio LIT suplementado (apartado 2.1.2.1.) e incubados en estufa a 28 ºC. Los cultivos de epimastigotes se mantuvieron de manera continua en fase de crecimiento exponencial realizando semanalmente subcultivos en medio LIT fresco.

Como alternativa, el cultivo se puede iniciar con una muestra de sangre obtenida por punción cardíaca de ratones infectados, previamente anestesiados con una solución de

uretano al 15% (apartado 2.1.3.1.). La muestra con tripomastigotes sanguíneos (TS) se coloca en medio LIT a razón 1:10 (sangre:medio) y se incuba a 28 ºC. Posteriormente se realizan pases sucesivos en medio LIT hasta obtener un cultivo puro de epimastigotes.

La viabilidad y axenicidad de los cultivos se controló mediante su observación al microscopio y recuento de epimastigotes en cámara de Neubauer.

- **Obtención de tripomastigotes derivados de cultivo celular**

– *Cepa CL-B5* lacZ

La obtención de tripomastigotes derivados de cultivo celular (TDC) se realizó en frascos de 75 cm^2 mediante la infección de fibroblastos o macrófagos no confluentes con 1×10^6 epimastigotes/mL en fase estacionaria de crecimiento (cultivos de epimastigotes de 14 días) (Le-Senne *et al*., 2002). Los cultivos se incubaron durante 24 h a 33 ºC en atmósfera con 5% CO_2 para establecer la invasión celular, se lavaron con PBS para retirar aquellos parásitos que no habían penetrado en la célula y se adicionó medio fresco. Finalmente, los cultivos infectados se mantuvieron en dichas condiciones de temperatura y humedad durante 7 días, momento a partir del cual se recogieron TDC del sobrenadante.

En la cepa CL, definida por Brener como termosensible, la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes en el interior de la célula hospedadora ocurre a 33 ºC, estando fuertemente inhibida a 37 ºC (Brener *et al*., 1976). Se ha demostrado que el clon CL Brener es capaz de sufrir tal diferenciación a ambas temperaturas (Zingales *et al*., 1997). Sin embargo, en el caso de la cepa CL-B5 *lacZ* observamos un comportamiento similar al de la parental, no liberándose TDC cuando los cultivos se incuban a 37 ºC (Vega Gómez, 2005). Este comportamiento de la cepa CL sugiere que la población originalmente aislada a partir del vector era heterogénea, predominado los clones termosensibles (Zingales *et al*., 1997).

– *Cepa Tulahuen C4* lacZ

Los ensayos realizados con esta cepa se llevaron a cabo en el LBC/IOC/Fiocruz. Los TDC se recolectaron del sobrenadante de cultivos de células L929 previamente infectados con formas invasivas de *T. cruzi* cepa Tulahuen *lacZ* y mantenidos en RPMI a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2 (Romanha *et al*., 2010).

- **Obtención de amastigotes intracelulares**

– *Cepa CL-B5* lacZ

En función de la célula seleccionada como hospedadora (fibroblastos L929 o macrófagos J774), las infecciones siempre se realizaron con TDC liberados a partir de la misma línea celular. De esta manera, las células procedentes de cultivos sin infectar fueron despegadas

con una solución de EDTA/tripsina y tras confirmar su viabilidad con azul tripán (apartado 2.1.3.2.) se tapizó el soporte deseado y se mantuvieron durante 2 h a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2, para favorecer su adhesión. Posteriormente, se añadieron los TDC en proporción 1:6 (L929:TDC) o 1:10 (J774:TDC) y se incubaron 24 h a 33 ºC en atmósfera con 5% CO_2 para establecer la infección. Finalmente, se realizaron lavados con PBS para retirar los TDC, se repuso medio fresco y se incubaron a 33 ºC con 5% CO_2.

– *Cepa Tulahuen C4* lacZ

Los amastigotes intracelulares de la cepa Tulahuen se obtuvieron mediante interacción de células L929 con TDC en proporción 1:10 (L929:TDC) durante 2 h a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2. Una vez realizado el lavado con PBS para retirar los TDC, se colocó RPMI fresco y se incubaron 48 h a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2 para favorecer la infección.

– *Cepa Y*

La obtención de amastigotes intracelulares de la cepa Y se realizó a través de la infección de CC con TS. Tras purificar y resuspender los TS en medio RPMI (Gonçalves *et al*., 2011), éstos se añadieron a las CC en proporción 1:10 (CC:TS). Después de 24 h de incubación a 37 ºC en atmósfera con 5% CO_2, los cultivos se lavaron con Ringer (apartado 2.1.3.1.), se repuso DMEM fresco y se incubaron durante 48 h en las mismas condiciones de temperatura y humedad, momento a partir del cual se comienzan a visualizar los amastigotes.

- **Tinción Giemsa**

Para una mejor observación de la morfología del parásito, se realizaron tinciones con Giemsa al 10% (apartado 2.1.3.2.) durante 20 min, previa fijación con metanol (10 min). Finalmente, se retiró el colorante por desplazamiento con agua destilada y se dejaron secar las tinciones. En el caso de que se deseara una preparación permanente, se colocó un cubreobjetos con una gota de líquido de montaje (DPX). El mismo protocolo de tinción se siguió para las muestras de sangre con TS.

Para las tinciones de amastigotes se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos provistas con cubreobjetos estériles de 12 mm de diámetro en el fondo de cada pocillo, sobre los que se adhirieron 25.000 células y se realizaron infecciones con TDC como se ha indicado anteriormente. Tras eliminar el medio, las células infectadas se fijaron 10 min con metanol, se tiñeron durante 20 min con Giemsa al 10% y se lavaron con agua destilada para eliminar los restos del colorante. Una vez secos, se extrajeron los cubreobjetos y se procedió a su montaje definitivo con DPX sobre un portaobjetos.

La Fig. 32 muestra un ejemplo de tinciones Giemsa de los diferentes tipos morfológicos de *T. cruzi*, realizadas según el protocolo descrito.

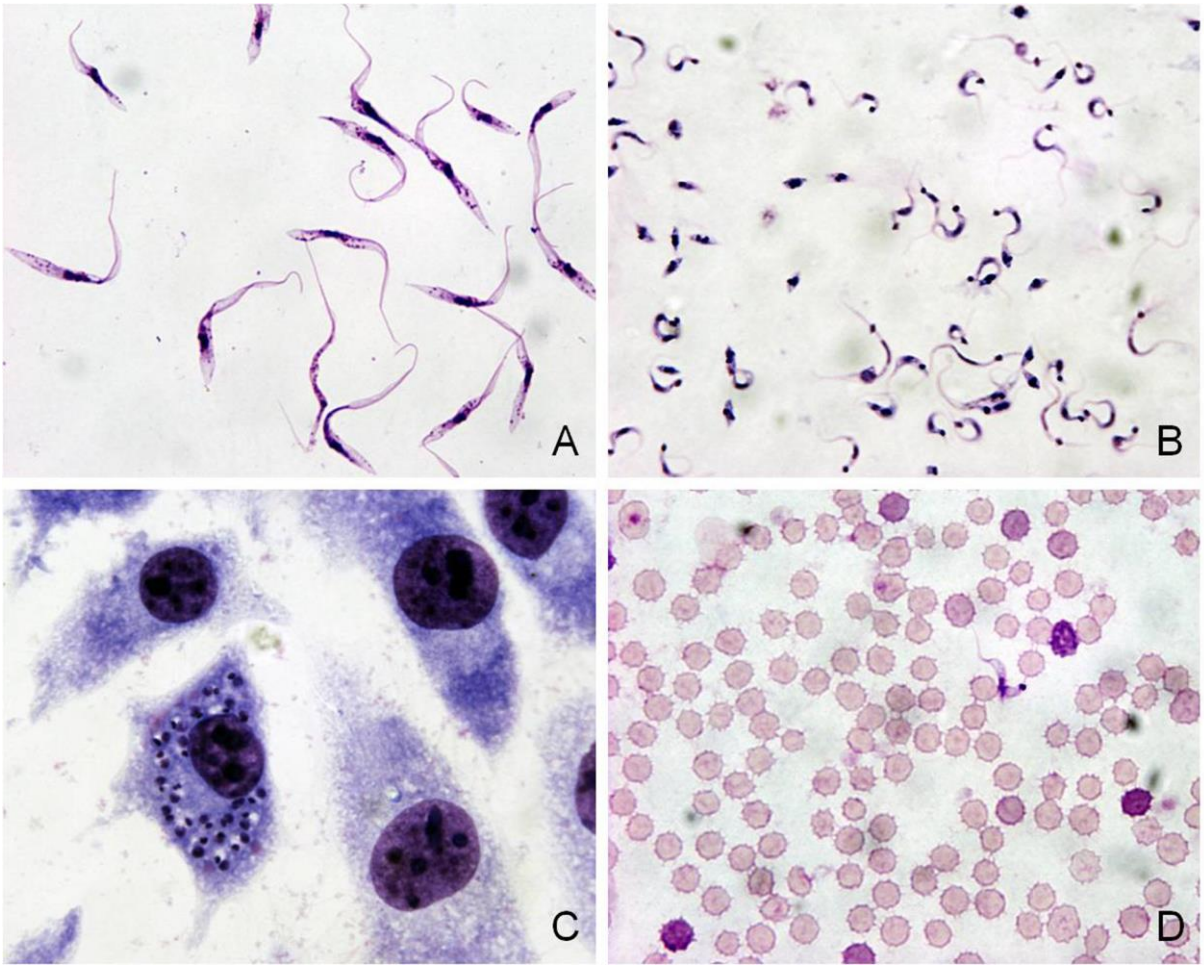


Fig. 32. Tinciones Giemsa de epimastigotes (A), tripomastigotes derivados de cultivo celular (B), amastigotes intracelulares en cultivos de células L929 (C) y tripomastigotes sanguíneos (D) (100×).

2.1.8.5. Infección experimental y obtención de tripomastigotes sanguíneos

Todos los ensayos en modelos *in vivo*, así como las pruebas de actividad *in vitro* sobre TS, se llevaron a cabo con la cepa Y de *T. cruzi*.

La infección experimental de ratones Swiss, de 45 días y aproximadamente 18–20 g de peso, se efectuó por inoculación intraperitoneal de 10^5 TS/animal (ratones donadores) o de 10^4 TS/animal (grupos experimentales), siempre en un volumen inferior a 0,5 mL.

La extracción de sangre de los animales infectados se realizó a partir de ratones donadores, previamente anestesiados y mediante punción cardíaca realizada el día de máxima parasitemia (7–8º día post-infección para la cepa Y). Seguidamente, se procedió bien a la eliminación de las células sanguíneas por centrifugación diferencial y posterior purificación de TS para la realización de ensayos *in vitro* (Gonçalves *et al*., 2011) o al recuento de TS para la infección controlada de ratones en las pruebas de actividad *in vivo.*

2.1.8.6. Ensayos de actividad farmacológica *in vitro*

Durante la realización de este trabajo, se siguió un esquema de *screening* farmacológico secuencial, constituido en primer lugar por pruebas de actividad *in vitro* sobre formas extracelulares (epimastigotes) y ensayos de toxicidad inespecífica sobre líneas celulares de mamíferos. Tras comprobar la selectividad de los compuestos hacia epimastigotes, se determinó su actividad en un posterior ensayo *in vitro* sobre amastigotes intracelulares.

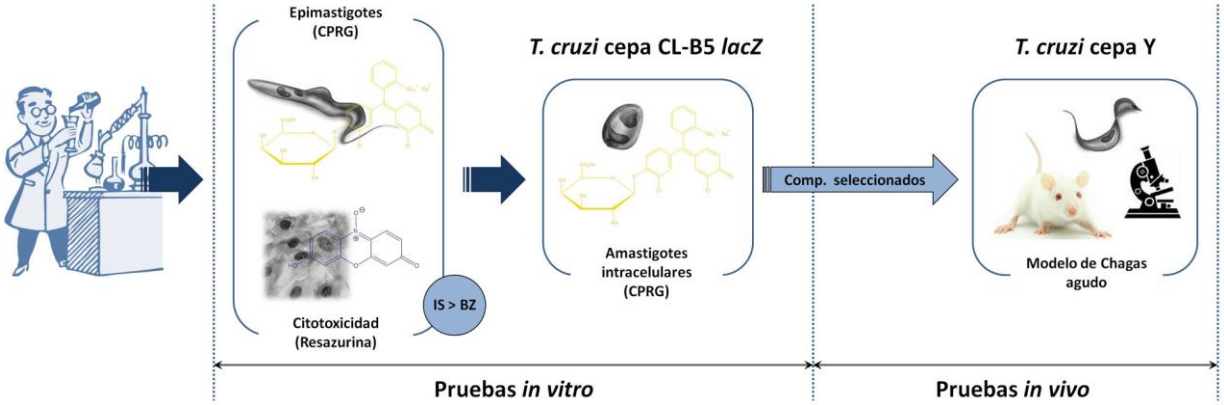


Fig. 33. Representación esquemática del modelo de cribado farmacológico secuencial de rutina.

Como indica la Fig. 33, los ensayos de actividad *in vitro* llevados a cabo en nuestro laboratorio, se realizan rutinariamente sobre la cepa CL-B5 *lacZ*. En este trabajo, algunos compuestos fueron además seleccionadas para evaluar su actividad en otras cepas de *T. cruzi*, siguiendo protocolos específicos que se detallan más adelante (apartado 2.1.8.7.).

- **Pruebas de actividad sobre epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL-B5 *lacZ***

El perfil de actividad frente a epimastigotes de la cepa transfectada, se determinó en presencia del sustrato CPRG mediante espectrofotometría (Buckner *et al*., 1996). Para la realización de estos experimentos se aplicó el microensayo previamente estandarizado por nuestro grupo de investigación (Vega *et al*., 2005), con algunas modificaciones (Fonseca-Berzal *et al*., 2013), tal y como se detalla a continuación.

Las pruebas se realizaron sobre cultivos axénicos de epimastigotes en fase de crecimiento exponencial, utilizando placas de 96 pocillos y fondo plano en las que se distribuyeron 2,5 × 10^6 epimastigotes/mL en volúmenes de 200 μL/pocillo junto con los compuestos a evaluar. Cada concentración se ensayó por triplicado, incluyendo además en cada placa controles de crecimiento (cultivos de epimastigotes sin tratar), así como blancos de medio (LIT) y de los compuestos a las concentraciones ensayadas (compuesto en LIT). De forma paralela, en cada experimento se evaluó la actividad del BZ o el NX, como control

interno. Las placas se incubaron 72 h a 28 ºC y posteriormente se añadieron 50 μL/pocillo de una solución de CPRG en Tritón X-100 0,9% (apartado 2.1.3.3.) incubándose 3 h a 37 ºC, temperatura a la que actúa la enzima β-galactosidasa. Finalmente, se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas (ELx808 ELISA reader, Biotek Instruments Inc.), estimándose los porcentajes de actividad en epimastigotes (%AE) comparando la absorbancia de los pocillos tratados con la del control de crecimiento, mediante la siguiente fórmula:

$$\%\mathrm{AE} = 100 - \left[\frac{\mathrm{A_E} - \mathrm{A_{EM}}}{\mathrm{A_{CC}} - \mathrm{A_M}}\right] \times 100$$

donde A_E, $A_{EM,}$ A_{CC} y A_M representan el valor medio de absorbancia de los pocillos experimentales, compuesto en medio, control de crecimiento y medio, respectivamente. En cada placa se incluye un grupo control de crecimiento con 10% DMSO (concentración 100% tóxica para el parásito), cuya absorbancia media se resta como *background* a ambos grupos, experimental y control de crecimiento. De esta manera se sustrae la absorbancia dada por la β-galactosidasa presente a t = 0 de incubación con los compuestos (Vega Gómez, 2005).

Para cada compuesto, se estimó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento en epimastigotes (CI_{50}) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AE). Los resultados de actividad se expresan como la media ± desviación estándar (SD), a partir de los valores obtenidos en varios experimentos independientes ($n \geq 2$). Los índices de selectividad (IS) hacia epimastigotes también fueron calculados ($IS = CL_{50}/CI_{50}$)

Para las series de compuestos con actividad más prometedora, se estimaron además las correspondientes CI_{90}, así como las potencias relativas a BZ ($PR_{BZ} = CI_{90}$ BZ$/CI_{90}$ compuesto) o a NX ($PR_{NX} = CI_{90}$ NX$/CI_{90}$ compuesto)

- **Pruebas de citotoxicidad inespecífica**

Estos ensayos se realizaron para descartar cualquier efecto tóxico de los compuestos sobre células de mamífero y determinar su selectividad hacia *T. cruzi*. El perfil de citotoxicidad se determinó en presencia del sustrato redox resazurina y posterior cuantificación de la absorbancia o de la intensidad de fluorescencia (Rolón *et al.*, 2006b; Fonseca-Berzal *et al.*, 2013).

Como se muestra en la Fig. 34, la reducción del sustrato resazurina a resorufina conlleva un cambio de color que va del azul al rosa junto con la emisión de fluorescencia, cuya intensidad en ambos casos es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Esta reacción de reducción de la resazurina puede continuar hasta la final obtención de hidroresorufina, compuesto de color rosa palo y no fluorescente (alamarBlue® Assay, U.S. Patent 5.501.959).



Fig. 34. Reacción de reducción experimentada por el sustrato resazurina en presencia de células metabólicamente activas.

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron en microplacas de cultivo celular de 96 pocillos, distribuyendo 100 μL/pocillo de una suspensión de células cuya concentración se ajustó según la línea celular empleada y el tiempo de incubación con los compuestos. Para las pruebas realizadas con fibroblastos L929 se utilizaron suspensiones de 30×10^4, 15×10^4 ó 10×10^4 células/mL para ensayos de 24, 48 ó 72 h de incubación, respectivamente. En el caso de los macrófagos J774, la suspensión fue de 50×10^4 células/mL tanto para las pruebas de 24 como de 48 h de tratamiento. Los compuestos previamente disueltos en DMSO, se añadieron al medio fresco (MEM o RPMI, según corresponda) a las concentraciones deseadas. Una vez adheridas las células al fondo de la placa (3 h a 37 ºC, 5% CO_2), se descartó el medio de cultivo y se añadió por cada pocillo 200 μL de dichas soluciones. Cada concentración se ensayó por triplicado, incluyéndose en cada placa controles de crecimiento celular, blancos de medio y de los compuestos, así como un control interno con BZ o NX. Las placas se incubaron durante 24, 48 ó 72 h a 37 ºC con 5% CO_2. A continuación, se añadieron 20 μL/pocillo de una solución de resazurina en PBS (concentración 2 mM para L929 ó 1 mM para J774, apartado 2.1.3.3.) y se incubaron 3 h en similares condiciones de temperatura y humedad. Finalmente, se leyó la absorbancia a 570 nm y 595 nm en un espectrofotómetro de placas (ELx800 ELISA reader, Biotek Instruments Inc.) o la intensidad de fluorescencia a 535 nm (excitación) y 590 nm (emisión) en un espectrofluorímetro de placas (Infinite 200 multifunctional microplate reader, Tecan), estimándose los porcentajes de citotoxicidad (%C) de la siguiente manera:

– *Absorbancia*

$$\%C = 100 - \left[\frac{(A_{570} \times 117.216 - A_{595} \times 80.586)_{exp}}{(A_{570} \times 117.216 - A_{595} \times 80.586)_{cc}} \right] \times 100$$

siendo A_{570} y A_{595} el valor medio de absorbancia de los pocillos experimentales (exp) y control de crecimiento (cc), respectivamente. Las constantes 80.586 M^{-1} cm^{-1} y 117.216 M^{-1} cm^{-1} representan los coeficientes de extinción molar (ε) de la resazurina oxidada a 570 nm y 595 nm, respectivamente.

– *Fluorescencia*

$$\%C = 100 - \left[\frac{IF_E - IF_{EM}}{IF_{CC} - IF_M}\right] \times 100$$

donde IF_E, IF_{EM}, IF_{CC} e IF_M representan la intensidad de fluorescencia media para los pocillos experimentales, compuesto en medio, control de crecimiento y medio, respectivamente.

Para cada compuesto, se estimó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (CL_{50}) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %C). Los resultados de actividad se expresan como la media ± SD, a partir de los valores obtenidos en varios experimentos independientes ($n \geq 2$).

Cabe destacar que los ensayos realizados con resazurina a lo largo de este trabajo fueron en su mayoría revelados mediante ensayos fluorimétricos.

- **Pruebas de actividad sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cepa CL-B5 *lacZ***

Los ensayos de actividad en amastigotes se realizaron únicamente con los compuestos que superaron el cribado primario con una selectividad hacia epimastigotes igual o superior a la del BZ (Fonseca-Berzal *et al*., 2013). La actividad se determinó en presencia del sustrato CPRG mediante espectrofotometría, aplicando las condiciones descritas en Fonseca-Berzal *et al*. (2014b).

Las pruebas se realizaron en placas de cultivo celular de 48 pocillos. Tras despegar las células de sus frascos de cultivo mediante tripsinización, se distribuyeron por cada pocillo 10.000 fibroblastos L929 ó 20.000 macrófagos J774 en 120 µL de medio MEM o RPMI, respectivamente y se incubaron durante 2 h a 37 ºC y 5% CO_2. Una vez adheridas las células, se infectaron con TDC en proporción 1:6 (L929:TDC) ó 1:10 (J774:TDC) y se incubaron durante 24 h a 33 ºC y 5% CO_2. A continuación, se retiró el medio de cultivo, se realizaron lavados con PBS para eliminar los TDC que no penetraron en las células y se añadieron 450 µL/pocillo de los compuestos a ensayar disueltos en medio fresco. Las placas se incubaron 7 días a 33 ºC y 5% CO_2 y en ellas se evaluó cada concentración por triplicado, se incluyeron controles de infección, de crecimiento celular, blancos de medio y de compuesto, así como un control interno con BZ o NX. Finalizado el tiempo de incubación con los compuestos, se añadieron 50 µL/pocillo de una solución de CPRG en Tritón X-100 3% (apartado 2.1.3.3.) y se incubaron las placas durante 3 h a 37 ºC. Finalmente, se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas (ELx800 plate reader, Biotek Instruments Inc.) o en un espectrofluorímetro de placas (Infinite 200 multifunctional microplate reader, Tecan). Los porcentajes de actividad frente a amastigotes (%AA) se calcularon con la fórmula que se expresa a continuación, donde cada valor representa la absorbancia media de los pocillos experimentales (A_E), compuesto en medio (A_{EM}), control de

infección (A_{CI}) y medio (A_M). El valor medio de absorbancia del control de crecimiento celular (sólo células) se restó de ambos grupos (experimental y control de infección) como *background*.

$$\%AA = 100 - \left[\frac{A_E - A_{EM}}{A_{CI} - A_M}\right] \times 100$$

Para cada compuesto, se estimó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento en amastigotes (CI_{50}) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AA). Los resultados de actividad se expresan como la media ± SD, a partir de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3). Los IS hacia amastigotes también fueron calculados (IS = CL_{50}/CI_{50})

Para las series con actividad más prometedora, se estimaron las correspondientes CI_{90}, así como las potencias relativas a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto) o a NX (PR_{NX} = CI_{90} NX/CI_{90} compuesto).

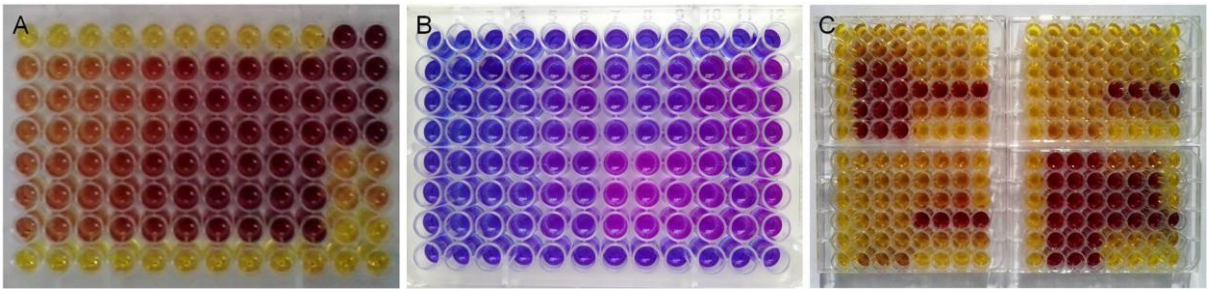


Fig. 35. Cribado farmacológico *in vitro* de rutina: pruebas de actividad en epimastigotes CL-B5 *lacZ* en presencia de CPRG (A), citotoxicidad inespecífica en células L929 en presencia de resazurina (B) y pruebas de actividad en amastigotes intracelulares CL-B5 *lacZ* en presencia de CPRG (C).

2.1.8.7. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

La estancia realizada en el LBC/IOC/Fiocruz permitió la evaluación *in vitro* de algunos de los compuestos sobre las cepas Tulahuen *lacZ* e Y. Además, se determinó su citotoxicidad sobre cultivos primarios de CC, siguiendo los protocolos de rutina empleados en dicho laboratorio.

- **Ensayos de actividad en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cepa Tulahuen *lacZ***

Para la realización de este ensayo se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos en las que se distribuyeron 4.000 células L929 en 100 μL de RPMI por pocillo, y se incubaron durante 24 h a 37 ºC y 5% CO_2. A continuación, las células se mantuvieron durante 2 h en contacto con los TDC (proporción 1:10, L929:TDC), se retiró el medio de cultivo con los parásitos y se añadieron 200 μL/pocillo de RPMI fresco. Con el fin de establecer la infección,

las placas se incubaron 48 h a 37 ºC y 5% CO_2 y después, se reemplazó el medio de cultivo por las correspondientes soluciones en RPMI de los compuestos a evaluar (200 μL/pocillo). En cada placa, cada concentración se ensayó por triplicado y se incluyeron controles de infección, controles de crecimiento celular, así como un control interno con BZ. Las placas se incubaron durante 96 h en las mismas condiciones de temperatura y humedad. Una vez finalizado el tiempo de incubación con los compuestos, se añadieron 50 μL/pocillo de una solución de CPRG en Nonidet P40 0,5% (apartado 2.1.3.3.) y se incubaron las placas 18 h a 37 ºC. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (SpectraMax 190 microplate reader, Molecular Devices). Los resultados expresan el porcentaje de inhibición en los pocillos tratados frente a los controles de infección (Romanha *et al*., 2010).

Para cada compuesto, se estimaron las CI_{50} y CI_{90} a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AA). Los resultados se expresan como la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3). De manera similar a los ensayos anteriores, se estimaron los IS y PR_{BZ} para esta cepa.

- **Ensayos de actividad frente a tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y**

Estas pruebas se realizaron con TS obtenidos por punción cardíaca a partir de ratones Swiss (apartado 2.1.8.5.). Una vez purificados, se preparó una suspensión en RPMI (5×10^6 TS/mL) que se distribuyó en placas de 96 pocillos junto con diluciones seriadas de los compuestos en dicho medio (volumen final, 200 μL/pocillo) y se incubaron 24 h a 37 ºC y 5% CO_2. Cada concentración se ensayó por duplicado, incluyéndose en cada placa controles de TS sin tratar y un control interno con BZ. Los porcentajes de mortalidad se determinaron tras 2 y 24 h de tratamiento, mediante recuento microscópico en cámara de Neubauer (da Silva *et al*., 2008; Batista *et al*., 2010; de Araújo *et al*., 2014).

Por último, se estimó la CI_{50} y CI_{90} de cada compuesto a partir de la curva dosis-respuesta generada tras 2 y 24 h (concentración *versus* porcentaje de mortalidad de TS). Los resultados se expresan como la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3). Igualmente, se calcularon los IS y PR_{BZ} de cada compuesto para TS.

- **Ensayos de citotoxicidad en células cardíacas**

El perfil de toxicidad *in vitro* sobre cultivos primarios de CC, obtenidos como se detalló en el apartado 2.1.8.3., se evaluó en presencia del indicador redox PrestoBlue®. El componente mayoritario de este sustrato es la resazurina (azul, no fluorescente), la cual se reduce a resorufina (rosa, fluorescente) en presencia de células metabólicamente activas (ver Fig. 34).

Las pruebas se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 96 pocillos, previamente revestidas con una solución de gelatina para proporcionar una mejor adhesión de las células al sustrato. Se distribuyeron por cada pocillo 6×10^4 CC en 100 μL de DMEM y se incubaron durante 24 h a 37 ºC y 5% CO_2. Una vez adheridas las células a la placa, se reemplazó el medio de cultivo por 200 μL/pocillo de los compuestos diluidos en DMEM fresco y se incubaron las placas durante 24 y 48 h (37 ºC y 5% CO_2). En cada placa, se evaluó cada concentración por triplicado y se incluyeron controles de crecimiento celular y un control interno con BZ. Una vez concluidos los tiempos de incubación, se examinó la morfología y contractilidad de las células mediante microscopía, y se determinó su viabilidad mediante adición de PrestoBlue® (10% v/v). Tras 5 h de incubación a 37 ºC y 5% CO_2, se leyó la absorbancia a 570 nm y 600 nm en un espectrofotómetro de placas (SpectraMax 190 microplate reader, Molecular Devices), calculándose los porcentajes de citotoxicidad (%C) de la siguiente manera:

$$\%C = 100 - \left[\frac{(A_{570} \times 117.216 - A_{600} \times 80.586)_{exp}}{(A_{570} \times 117.216 - A_{600} \times 80.586)_{cc}} \right] \times 100$$

siendo A_{570} y A_{600} la absorbancia media de los grupos experimental (exp) y control (cc), respectivamente (Fonseca-Berzal *et al.*, 2015a, 2016). Las constantes 80.586 M^{-1} cm^{-1} y 117.216 M^{-1} cm^{-1} representan los coeficientes de extinción molar (ε) de la resazurina oxidada a 570 nm y 600 nm, respectivamente.

- **Ensayos de actividad frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cepa Y**

Como célula hospedadora de *T. cruzi* cepa Y se utilizaron cultivos primarios de CC (apartado 2.1.8.3.). Los ensayos se realizaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos provistas de cubreobjetos redondos de 12 mm en el fondo y previamente revestidas con gelatina, en las que se sembraron 100.000 CC/pocillo y se incubaron 24 h en DMEM a 37 ºC y 5% CO_2. A continuación, se añadieron los TS en proporción 1:10 (CC:TS) manteniéndose la interacción con las CC durante 24 h (37 ºC, 5% CO_2). Posteriormente se retiraron los TS mediante lavados con Ringer y se incubaron las células infectadas junto con los compuestos diluidos en DMEM durante 48 h a 37 ºC. En cada placa, cada concentración se ensayó por duplicado y se incluyeron controles de infección. Por último, los cubreobjetos se fijaron con Bouin (apartado 2.1.3.1.), se tiñeron con Giemsa y se realizó su montaje definitivo con Permount (da Silva *et al.*, 2007; de Araújo *et al.*, 2014; Fonseca-Berzal *et al.*, 2015a, 2016).

El recuento de CC infectadas, así como del número de amastigotes por cada célula, se realizó para 400 células, por duplicado y utilizando muestras independientes. Se contaron sólo los parásitos con núcleo y kinetoplasto bien diferenciado, no considerándose los amastigotes que presentaban una morfología irregular de los mismos. Los resultados de

actividad se expresan mediante cálculo del índice endocítico (porcentaje de células infectadas × número de amastigotes/célula infectada) y su porcentaje de inhibición (%IE) en las células tratadas con respecto a las no tratadas:

$$\%\ \text{Inhibición IE} = 100 - \left(\frac{\text{IE}_\text{E}}{\text{IE}_\text{C}} \times 100\right)$$

donde IE_E e IE_C corresponden al valor medio de los índices endocíticos estimados para los grupos experimentales y control, respectivamente.

Para cada compuesto, se obtuvo la CI_{50} a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %IE). Los resultados se expresan como la media ± SD, a partir de los valores obtenidos en al menos dos experimentos independientes ($n \geq 2$). Similar a los ensayos anteriores, se estimaron también los valores de CI_{90}, IS y PR_{BZ}.

2.1.8.8. Ensayos de toxicidad *in vivo*. Determinación del NOAEL

Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron en el LBC/IOC/Fiocruz, previamente a los de eficacia *in vivo*. Con objeto de determinar el NOAEL *(no observed adverse effects level)*, ratones hembra Swiss se sometieron al siguiente esquema de trabajo (da Silva *et al*., 2012):

- Día 1: administración oral (p.o.) o intraperitoneal (i.p.) cada 2 h de dosis crecientes del compuesto a evaluar, comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar una dosis acumulativa (DA) en el ratón de 200 mg/kg. El volumen administrado por cada dosis fue de 0,1 mL.
- Días 2–3: periodo de observación clínica de los ratones durante las 48 h posteriores a la finalización del tratamiento, registrando cualquier posible signo de toxicidad aguda de acuerdo con las normas de la OECD *(Organization for Economic Cooperation and Development).*
- Día 3 (48 h post-tratamiento): tras determinar los valores del NOAEL se procedió al sacrificio y necropsia de los ratones, con extracción y examen macroscópico de los órganos internos (corazón, bazo, hígado y riñón) y su conservación en tampón Milloning-Rosman (10% formaldehído en PBS) para un posterior estudio histológico. Asimismo, se tomaron muestras de sangre y suero para su análisis bioquímico y hematológico, respectivamente.

En cada ensayo se utilizaron dos ratones por grupo de tratamiento y se introdujo un grupo control de vehículo (solución al 10% de DMSO en agua destilada estéril) para p.o. y otro para i.p., además de un grupo control de ratones sin tratar.

Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos a partir de dos experimentos de toxicidad aguda independientes (n = 2) y se refieren al porcentaje de

variación del peso en los ratones, peso normalizado de los órganos extraídos, valores de bioquímica y valores de hemograma.

2.1.8.9. Ensayos de actividad farmacológica *in vivo*

Los compuestos que obtuvieron una actividad destacable en el *screening* secuencial *in vitro*, se sometieron a un ensayo de actividad *in vivo* en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda, siguiendo el esquema propuesto por Fiocruz y DNDi (Romanha *et al*., 2010). Parte de estos ensayos se realizaron en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM, mientras que otros se llevaron a cabo en el LBC/IOC/Fiocruz.

Todos los ensayos *in vivo* se realizaron con la cepa Y de *T. cruzi*. Para el desarrollo del experimento, la sangre infectada obtenida de ratones donadores mediante punción cardíaca (apartado 2.1.8.5.) se mezcló con sangre procedente de ratones sanos ajustándose a una concentración de 10^5 TS/mL, a partir de la cual se infectaron los ratones vía i.p. a razón de 10^4 TS en 0,1 mL/animal.

– *Distribución de los grupos experimentales*

Una vez infectados los animales, se distribuyeron aleatoriamente en lotes de 6–10 ratones a los que se les administró el compuesto a evaluar. En cada experimento se incluyó siempre un grupo control de infección (animales infectados a los que se les administró el vehículo), un grupo tratado con BZ y un grupo control constituido por animales sanos sin tratar.

– *Tratamiento*

Todos los tratamientos comenzaron el 5º día post-infección (d.p.i), momento en el cual comienzan a observarse TS en sangre periférica. En cada experimento únicamente se incluyeron los animales con parasitemia positiva.

Con respecto a los ensayos realizados en la UCM, los tratamientos se realizaron vía oral utilizando una sonda bucogástrica y una solución de carboximetilcelulosa sódica al 2% (apartado 2.1.3.1.) como vehículo para su administración. Las dosis variaron en función del experimento y la posología consistió en una dosis cada 24 h administrada durante 5 días consecutivos (Romanha *et al*., 2010).

Los compuestos que fueron evaluados *in vivo* en el LBC/IOC/Fiocruz se disolvieron en una solución al 10% de DMSO en agua destilada estéril y se administraron tanto por vía oral como i.p. Con respecto al BZ, éste fue disuelto en agua destilada estéril con un 3% de Tween 80 (Guedes-da-Silva *et al*., 2015). Las dosis a administrar se seleccionaron de acuerdo con los resultados obtenidos para cada compuesto en el ensayo de toxicidad aguda. Se realizó un primer ensayo en el que los animales fueron tratados con dos únicas dosis administradas el 5º (comienzo de la parasitemia) y el 8º (día de máxima parasitemia) d.p.i.

Basándose en los resultados de dicho experimento, se diseñó uno posterior con pautas de tratamiento prolongadas: 10 días consecutivos, 1 dosis administrada cada 24 o cada 12 h.

– *Evaluación de la actividad mediante examen de la parasitemia*

La eficacia del tratamiento se evaluó mediante seguimiento de la parasitemia y su comparación con el grupo control de infección. Las curvas se trazaron hasta el 30º d.p.i, periodo que comprende la fase aguda de la infección en ratón, siendo claves los siguientes d.p.i. en las infecciones realizadas con la cepa Y de *T. cruzi*: 5º (inicio de la parasitemia), 8º (máxima parasitemia), 10º (en función del experimento, corresponde al primer día post-tratamiento), 14º (aparece un segundo pico de parasitemia en torno a este día) y 30º (último día de detección de parásitos en sangre periférica).

El recuento de la parasitemia se realizó aplicando el método descrito por Brener (1962). Para ello, a partir del extremo apical de la cola del ratón y con una micropipeta, se tomó una muestra de 5 μL de sangre que se colocó en un portaobjetos y sobre la que se aplicó un cubreobjetos de 22 × 22 mm, de modo que formara una monocapa de células sanguíneas ocupando todo el área bajo el mismo, siendo 3.500 el número de campos microscópicos ocupados por la misma. Finalmente, la herida del animal fue cauterizada.

Para cada muestra se realizó el recuento de TS en 50 campos microscópicos, expresándose los niveles de parasitemia en cada grupo como la media del número de TS/mL de sangre ± SD.

– *Seguimiento del peso y de la supervivencia*

Durante el transcurso de la fase aguda se evaluó semanalmente el peso de los ratones y se realizó diariamente un seguimiento de la mortalidad hasta el 30º día post-tratamiento, expresándose los resultados para cada grupo como porcentaje de supervivencia (%S) (Romanha *et al*., 2010).

Los animales que superaron la fase aguda fueron sacrificados el día 30º después de finalizar el tratamiento, realizándose la extracción y examen macroscópico del corazón, bazo, hígado y riñón. Estos órganos se conservaron en tampón Milloning-Rosman para su posterior estudio histológico.

2.1.8.10. Microscopía electrónica de barrido. Estudio de las alteraciones morfológicas ocasionadas en el parásito

Las pruebas de microscopía electrónica de barrido (MEB) se realizaron en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia y en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Alcalá de Henares, supervisadas por el Dr. Jorge Pérez Serrano.

– *Preparación de las muestras*

Los estudios de MEB se realizaron sobre epimastigotes de *T. cruzi,* previamente tratados con la CI_{50} de los compuestos a ensayar, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el apartado 2.1.8.6. Se incluyó un grupo de epimastigotes tratados con BZ, otro con NX y un grupo control de crecimiento (epimastigotes sin tratar, con 0,2% DMSO). Tras 72 h de tratamiento, las muestras se centrifugaron 5 min a 2000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con tampón Milloning con 0,54% de glucosa (apartado 2.1.4.1.).

– *Fijación de las muestras*

Las muestras se colocaron en placas de 24 pocillos provistas de cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro, estériles e impregnados con polilisina al 0,01%, y se incubaron durante 1 h a 28 ºC. A continuación, se eliminó el líquido sobrante y se fijaron las muestras con una solución de glutaraldehído al 2% (apartado 2.1.4.1.), incubándose 90 min a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se lavaron con tampón Milloning con 0,54% de glucosa.

– *Deshidratación de las muestras*

La deshidratación se realizó mediante pases sucesivos en soluciones de etanol de graduación creciente (30, 50, 70, 95 y 100%), manteniendo los cubreobjetos sumergidos en cada una de ellas durante 10 min. Una vez deshidratadas, las muestras se mantuvieron en acetona anhidra hasta la realización del punto crítico.

– *Punto crítico*

Las muestras deshidratadas se sometieron a un proceso de secado completo en un Polaron Critical Point Dryer CPD7501, a temperatura ambiente y con CO_2 como fluido de transición.

– *Montaje y metalizado*

Una vez secos, los cubreobjetos se situaron en soportes *stub* de aluminio para MEB y se colocaron en un metalizador Polaron E5400, en el que se recubrieron las muestras con una capa de oro/paladio a 500 Å.

– *Observación de las alteraciones morfológicas*

Por último, las muestras fueron observadas y fotografiadas a 5–10 kV en un microscopio electrónico de barrido digital, modelo Zeiss DSM-950.

2.1.8.11. Microscopía electrónica de transmisión. Estudio de los daños ultraestructurales ocasionados en el parásito

Con el fin de iniciar estudios dirigidos a conocer el mecanismo de acción o dianas sobre las que actúan algunos de los compuestos más activos, se realizaron pruebas de microscopía

electrónica de transmisión (MET). Estos experimentos se realizaron en el LBC/IOC/Fiocruz, supervisados por la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro.

– *Preparación de las muestras*

Las pruebas de MET se realizaron con TS de *T. cruzi*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de actividad siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.1.8.7., en los que se trataron los parásitos con la CI_{50} /24 h correspondiente a cada compuesto y se incluyó un control de TS tratados con BZ (CI_{50} /24 h) y otro de TS sin tratar (DMSO, sin exceder el 0,6% v/v). El procesamiento de las muestras para MET se inició tras 2 y 24 h de incubación con los compuestos (Araújo-Jorge y de Castro, 2000).

– *Fijación de las muestras*

Los TS se centrifugaron a 4200 rpm durante 10 min, se lavaron con PBS y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2,5% (apartado 2.1.4.2.) durante 60 min a 4 ºC. A continuación, las muestras se centrifugaron 10 min a 4200 rpm para retirar el exceso de fijador y se resuspendieron en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,2 (apartado 2.1.4.2.), en el cual se pueden conservar a 4 ºC durante un tiempo prolongado.

– *Post-fijación de las muestras*

Las muestras se lavaron en tampón cacodilato y se post-fijaron con una solución de OsO_4 al 1% en el mismo tampón (apartado 2.1.4.2.) manteniéndose a 4 ºC y en oscuridad durante 1 h. Los restos de OsO_4 se retiraron mediante lavados sucesivos con tampón cacodilato.

– *Deshidratación*

La deshidratación de las muestras se llevó a cabo mediante pases sucesivos de 10 min en soluciones de acetona de concentración creciente (30, 50, 70, 90 y 100%), realizándose el último paso por duplicado. A continuación, se retiró la acetona 100% y se sustituyó por una solución de acetona pura en resina epoxi (v/v) en la que permanecieron las muestras a 4 ºC durante 18 h en un frasco bien cerrado.

– *Inclusión en resina epoxi y polimerización*

Tras retirar la mezcla de acetona/resina de las muestras, éstas se incluyeron en resina epoxi (apartado 2.1.4.2.) utilizando moldes específicos para su polimerización y se mantuvieron a 60 ºC durante un periodo mínimo de 72 h.

– *Ultramicrotomía y contraste de las muestras*

A partir de los bloques, se obtuvieron cortes ultrafinos que se colocaron en rejillas de cobre y se acondicionaron en placas Petri pequeñas donde se procedió a su contraste. Los cortes se embebieron en una solución de acetato de uranilo al 2% (apartado 2.1.4.2.) durante 10

min protegiendo las placas de la luz y posteriormente se sumergieron durante 3 min en una solución de citrato de plomo (apartado 2.1.4.2.).

– *Observación al microscopio de los daños ultraestructurales*

Las muestras se examinaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión modelo Jeol JEM1011, en el Servicio de Microscopía Electrónica de Fiocruz.

2.1.8.12. Respirometría

Los ensayos de respirometría se realizaron en el LBC/IOC/Fiocruz bajo la supervisión del Dr. Rubem F.S. Menna-Barreto y la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro.

El consumo de oxígeno de los TS se midió utilizando un respirómetro de alta resolución (Oxygraph 2 K, OROBOROS Instruments) en el que se mantuvo la temperatura constante a 37 ºC durante todo el procedimiento. En la cámara del respirómetro se colocaron 5×10^7 TS resuspendidos en 2 mL de tampón de respiración (apartado 2.1.5.). Durante el experimento, la concentración y el flujo de oxígeno fueron registrados mediante el software DatLab (OROBOROS Instruments). A lo largo de un periodo de 2 h, se añadieron sobre los TS concentraciones crecientes de los compuestos a evaluar, siendo la concentración final alcanzada en la cámara la CI_{50}/24 h definida en el ensayo de actividad *in vitro*. Finalmente, se bloqueó el consumo de oxígeno con antimicina A 22 μM. En paralelo, se evaluó el consumo de oxígeno en muestras de TS tratados únicamente con el vehículo (DMSO, sin exceder el 0,6% v/v).

Los resultados indican el porcentaje de inhibición en el consumo de oxígeno (pmol/min/mL/10^7 parásitos) sufrido por los TS tratados con respecto al control, expresado como la media ± el error estándar (SEM) de tres experimentos independientes (n = 3).

2.1.8.13. Citometría de flujo

Los experimentos de citometría de flujo se llevaron a cabo en el LBC/IOC/Fiocruz y fueron supervisados por la Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro.

Las alteraciones producidas en el PMM de los TS se evaluaron en presencia del marcador fluorescente TMRE. Para la realización del ensayo, suspensiones de 5×10^6 TS/mL en medio RPMI fueron tratadas con la CI_{50}/24 h de los compuestos a evaluar e incubadas durante 2 y 24 h a 37 ºC, 5% CO_2. En paralelo, se preparó una muestra control de TS tratados únicamente con el vehículo (DMSO, sin exceder el 0,6% v/v), así como un control positivo de muerte celular con TS sometidos a choque térmico (2 h a 56 ºC). Una vez concluidos los correspondientes tiempos de tratamiento, todas las muestras se incubaron durante 15 min a 37 ºC en presencia del marcador TMRE (50 nM).

La adquisición y análisis de los datos se obtuvo en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur equipado con el software Cell Quest (Becton Dickinson), mediante el que se registraron un total de 10.000 eventos en la región previamente establecida como la correspondiente a la población de TS.

Los resultados reflejan el porcentaje de la población de TS que experimenta una pérdida en el PMM, expresados como la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

2.1.8.14. Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el software SPSS (versión 20, IBM). A continuación se indican cuales fueron los diferentes test aplicados en cada prueba.

- **Ensayos de actividad frente a amastigotes en placas de 48 pocillos**

La reproducibilidad de los ensayos *in vitro* realizados en amastigotes (apartado 2.1.8.6.), fue en principio analizada utilizando el Factor-Z' (Zhang *et al*., 1999). Dicho parámetro estadístico evalúa la calidad de los ensayos a partir de sus controles positivo y negativo (en este caso, control de infección y de crecimiento celular, respectivamente), siendo de gran aplicación en el desarrollo y optimización de los mismos.

- **Ensayos de actividad farmacológica *in vitro***

La actividad *in vitro* de los compuestos (CI_{50} y CL_{50}) así como su potencia (CI_{90}), se comparó con la del BZ mediante los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis o U de Mann-Whitney. En ambos casos, se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

- **Ensayos de toxicidad *in vivo*. Determinación del NOAEL**

Las diferencias referentes al peso de los ratones, peso relativo de los órganos extraídos, así como entre los valores de los parámetros estudiados en las pruebas de hemograma y bioquímica, fueron analizadas mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

- **Ensayos de actividad farmacológica *in vivo***

Los valores de parasitemia obtenidos entre los diferentes grupos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), realizándose el correspondiente análisis *post hoc* en el caso de rechazarse la hipótesis nula de igualdad entre los tratamientos ($P < 0,05$).

El mismo análisis se aplicó en el estudio de las diferencias relativas al peso de los animales durante la fase aguda, así como al de los supervivientes y sus órganos internos.

- **Ensayos de respirometría**

Las variaciones registradas en el consumo de oxígeno se compararon mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

- **Ensayos de citometría de flujo**

El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos de citometría de flujo se realizó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

2.2. Formulaciones de compuestos antichagásicos

El presente estudio, en el que se llevó a cabo el desarrollo, caracterización fisicoquímica y evaluación biológica sobre *T. cruzi* de diferentes dispersiones sólidas (DS) del fármaco de referencia BZ, así como de los derivados de 5-nitroindazol **VATR1** y **VATR3**, se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Santiago Torrado, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM.

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

La evaluación biológica *in vitro* de las distintas formulaciones se llevó a cabo con la cepa CL-B5 *lacZ*, mientras que la cepa Y se eligió de nuevo para la realización de los ensayos *in vivo*.

Con respecto a la línea celular, tanto los ensayos de citotoxicidad inespecífica, como los ensayos sobre amastigotes intracelulares, se realizaron con fibroblastos L929.

El mantenimiento de la línea celular y de los parásitos se ha detallado previamente en los apartados 2.1.8.2. y 2.1.8.4., respectivamente.

Para los ensayos de actividad *in vivo* se utilizaron ratones Swiss NMRI, mantenidos en las condiciones detalladas en el apartado 2.1.1.4. Todos los procedimientos que conllevaron el uso de ratones fueron realizados de acuerdo con las Directivas 86/609/CEE y 2010/63/UE, controlados en España por los RD 1201/2005 de 10 de octubre y el actualmente vigente RD 53/2013 de 1 de febrero, por los que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

2.2.2. FORMULACIONES EVALUADAS

2.2.2.1. Dispersiones sólidas de benznidazol

- **Preparación**

Las DS de BZ se obtuvieron mediante un proceso de disolución y posterior evaporación del solvente por liofilización, utilizándose dos tipos de excipiente: desoxicolato de sodio (NaDC) o hidroxipropilcelulosa de bajo peso molecular (L-HPC). Las DS fueron preparadas en las proporciones 1:0,8, 1:1,5, 1:3, 1:6 y 1:10 (p/p) de principio activo:excipiente.

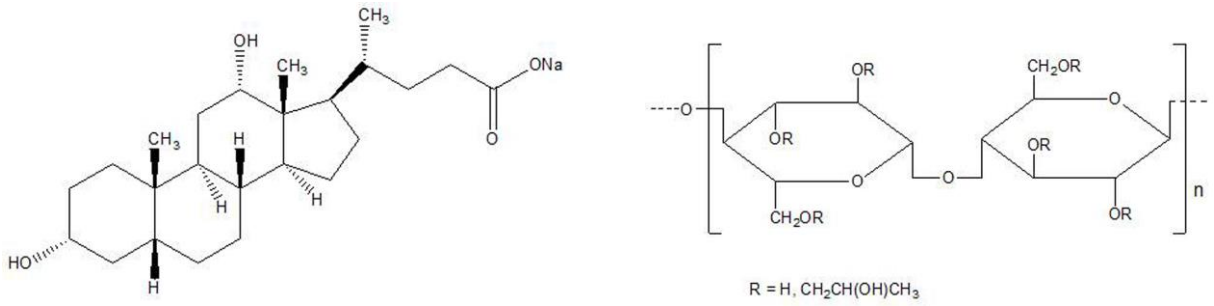


Fig. 36. Estructura del NaDC (izquierda) y de la L-HPC (LH-31, contenido en grupos hidroxipropoxi: 11%, derecha), utilizados como excipiente en las distintas formulaciones de BZ.

Las correspondientes cantidades de BZ y excipiente se mezclaron en agua destilada, agitándose la mezcla en un vórtex (2 min, 2500 rpm), después mediante ultrasonicación durante 5 min y finalmente 2 min a 2500 rpm en vórtex. A continuación, las mezclas se congelaron a -40º C y se liofilizaron (Liolabar 7, Telstat Inc.), siendo posteriormente molidas y tamizadas para separar la fracción granulométrica de 1,4–0,1 mm.

De forma paralela se prepararon mezclas físicas (MF) de BZ y excipiente en proporción 1:3 y 1:10 (p/p), mezclando manualmente la correspondiente cantidad de la fracción anterior. El mismo método de preparación, sin la incorporación de excipiente, se aplicó para la obtención de BZ recristalizado (R-BZ).

Las formulaciones se almacenaron en viales tapados mantenidos a temperatura ambiente (22–24 ºC) en un desecador con gel de sílice para protegerlas de la humedad.

- **Ensayo de velocidad de disolución *in vitro***

El ensayo de velocidad de disolución se realizó de acuerdo con el método de paletas descrito en la Farmacopea Estadounidense (USP) aparato 2, en un equipo ERWEKA DT80. La velocidad de rotación de la paleta se fijó en 50 rpm y en el vaso se colocaron 500 mL de medio de disolución (HCl 0,1 N).

El aparato 2 consta de un vaso cilíndrico de fondo esférico, fabricado en vidrio o plástico, de 16–17,5 cm de altura, 10–10,5 cm de diámetro interno y 1 L de capacidad, inmerso en un baño de agua termostatizado a fin de mantener la temperatura del medio de disolución constante (37 ± 0,5 ºC). La paleta presenta un diámetro de 74–75 mm y una altura de 19 mm, y se encuentra recubierta de un polímero fluorocarbonado que impide el contacto del metal con el medio de disolución en el cual se sumerge, manteniendo una separación de 2,5 cm con el fondo del vaso (Fig. 37).

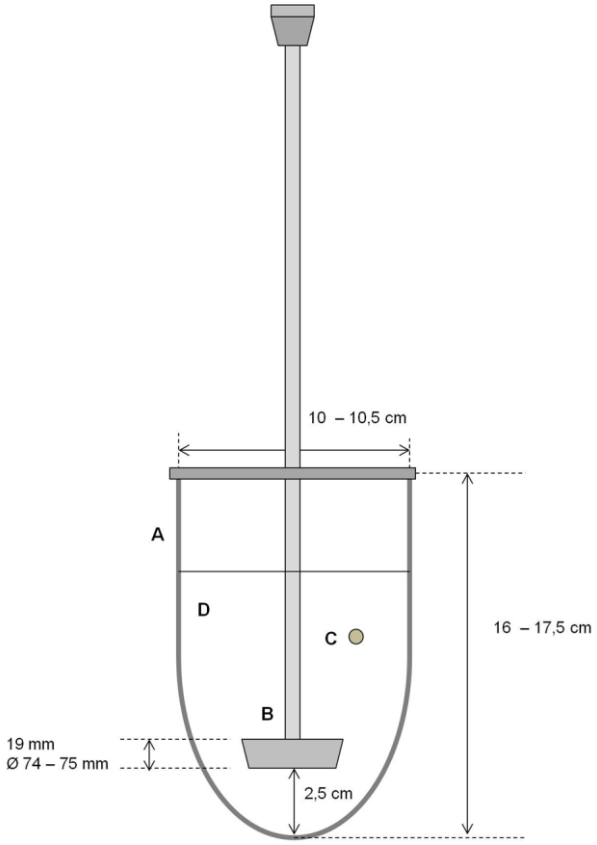


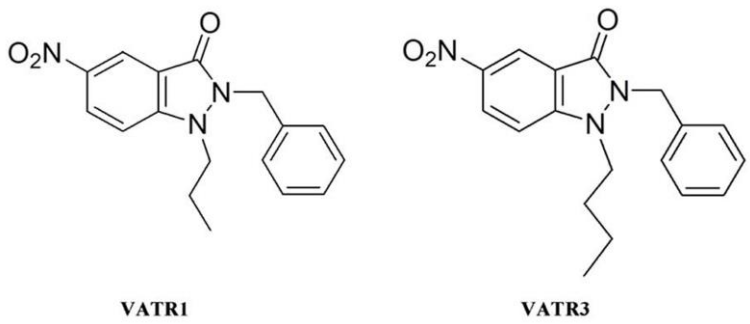
Fig. 37. Esquema del aparato empleado en el ensayo de disolución (USP aparato 2): vaso (A), paleta (B), punto de muestreo (C) y medio de disolución (D).

Para la realización del ensayo, las formulaciones se dosificaron en cápsulas duras de gelatina, cada una de ellas conteniendo una cantidad equivalente a 10 mg de BZ. Se colocó una cápsula por vaso de disolución y periódicamente se tomaron muestras de 5 mL con una jeringa que se hicieron pasar por un filtro de 0,45 μm (Acrodisc®). La cantidad de BZ en cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 322 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7. La cantidad acumulada de BZ liberado se determinó a partir de la curva de calibración $y = 0,0254x + 0,0071$ ($r^2 = 0,9988$). Cada determinación en cada punto (2, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min) se llevó a cabo por triplicado. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de BZ disuelto (%BZ) ± SD (n = 3).

2.2.2.2. Dispersiones sólidas de derivados de 5-nitroindazol

- **Preparación**

Las DS de los derivados de 5-nitroindazol **VATR1** y **VATR3** (Fig. 38) se prepararon mediante el método de evaporación del solvente, utilizando L-HPC como excipiente en las siguientes proporciones derivado:excipiente (p/p): 1:2,5 y 1:10 (**VATR1**), 1:5, 1:10 y 1:20 (**VATR3**).



VATR1 **VATR3**

Fig. 38. Derivados de 5-nitroindazol seleccionados para el desarrollo de nuevas DS en L-HPC: 2-bencil-1-propil- (**VATR1**) y 2-bencil-1-butil-5-nitroindazolin-3-ona (**VATR3**).

La correspondiente cantidad de derivado **VATR1** o **VATR3**, se disolvió en un volumen mínimo de dimetilacetamida (DMA) y se mezcló con la cantidad requerida de L-HPC. La mezcla se mantuvo durante 24 h a 80 ºC y vacío, para evaporar por completo la DMA y obtener las DS. A continuación, las formulaciones se tamizaron para separar la fracción con un tamaño de partícula comprendido entre 1,2–0,1 mm. El mismo método de preparación, sin la incorporación de L-HPC, se llevó a cabo para obtener los respectivos derivados recristalizados: R-**VATR1** y R-**VATR3**.

Finalmente, las formulaciones se mantuvieron a temperatura ambiente (22–24 ºC), almacenadas en viales tapados en un desecador con gel de sílice protegidas de la humedad.

- **Ensayo de velocidad de disolución *in vitro***

– *Elaboración de comprimidos*

Siguiendo la metodología descrita en Palmeiro-Roldán *et al*. (2014), a partir de las distintas formulaciones se elaboraron comprimidos superdisgregables con el fin de asegurar su total exposición al medio de disolución. Para ello, las formulaciones se sometieron a un proceso de granulación por vía seca previo al de compresión. Como excipiente de relleno y disgregante se utilizó celulosa microcristalina y se eligió la crospovidona de acuerdo a su función disgregante por hinchamiento. Ambos excipientes se mezclaron primeramente junto con los gránulos (adición intragranular) y se incorporaron nuevamente antes del proceso de

compresión (adición extragranular), para garantizar la disgregación rápida y efectiva de los comprimidos y gránulos al correspondiente principio activo y excipientes.

Las mezclas a partir de las que se llevó a cabo el proceso de granulación se constituyeron por un 31,75% de la correspondiente DS de **VATR1** o **VATR3**, un 63,50% de celulosa microcristalina y un 4,75% de crospovidona – adición intragranular –. Éstas se sometieron a un proceso de aglomeración (obtención de briquetas) en una máquina de comprimir excéntrica (Bonals B/30) ajustada con punzones planos de 12 mm de diámetro, con posterior fractura de las briquetas para obtener los gránulos y tamizado para seleccionar finalmente aquellos con un tamaño comprendido entre 1,4–0,5 mm.

Los gránulos así obtenidos (31,50%) se mezclaron con celulosa microcristalina (61%) y crospovidona (7,50%) – adición extragranular – y se comprimieron en la máquina excéntrica mencionada ajustada con los mismos punzones. Por último, cada comprimido se dosificó con una cantidad de formulación equivalente a 5 mg del correspondiente derivado.

– *Ensayo de velocidad de disolución* in vitro

Los ensayos se realizaron siguiendo el método de paletas descrito en la USP (aparato 2), en un equipo ERWEKA DT80. El aparato se fijó con una velocidad de rotación de 50 rpm, en el que se colocaron 500 mL de medio de disolución (HCl 0,1 N) y se mantuvo la temperatura a 37 ± 0,5º C durante el transcurso del experimento.

Los comprimidos, dosificados con una cantidad equivalente a 5 mg de **VATR1** o **VATR3**, se colocaron individualmente en los vasos de disolución. Periódicamente, se tomaron muestras de 5 mL que se pasaron a través de un filtro de 0,45 μm (Acrodisc®). La cantidad de derivado en cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 271 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7. La cantidad acumulada de **VATR1** liberado del sistema se determinó a partir de la recta de calibración $y = 0,0343x + 0,0024$ ($r^2 = 0,9998$). Con respecto al derivado **VATR3,** ésta se determinó mediante la recta de calibración $y = 0,0359x + 0,0013$ ($r^2 = 0,9927$). Cada determinación en cada punto (2, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 150 y 180 min) se realizó por triplicado. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de derivado disuelto (%**VATR1** o %**VATR3**) ± SD (n = 3).

2.2.3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

2.2.3.1. Ensayos de actividad farmacológica *in vitro*

- **Dispersiones sólidas de benznidazol**

Para su evaluación *in vitro*, las DS de BZ se disolvieron directamente en los correspondientes medios de cultivo (LIT o MEM, según el ensayo a realizar) sin la incorporación de solventes

(DMSO), de modo que la concentración final de BZ en los cultivos comprendió desde 256 a 0,5 μM. En cada ensayo se incluyeron soluciones de BZ materia prima preparadas en las mismas condiciones, las cuales fueron evaluadas como formulación de referencia.

La actividad de las DS de BZ se ensayó sobre epimastigotes y amastigotes intracelulares de la cepa CL-B5 *lacZ* en presencia del sustrato CPRG (Fig. 20), siguiendo los respectivos protocolos anteriormente detallados en el apartado 2.1.8.6.

La citotoxicidad de las formulaciones se determinó en presencia del sustrato redox resazurina tras 48 h de contacto con cultivos de células L929 (Fig. 34, apartado 2.1.8.6.).

Todas las pruebas de actividad *in vitro* se realizaron bajo las mismas condiciones experimentales en tres ensayos independientes. Los resultados se expresan como la media de los porcentajes de inhibición (%AE, %C o %AA) obtenidos a la mayor concentración ensayada (256 μM), así como la media de los valores de CI_{50} (pruebas en epimastigotes y amastigotes) y de los valores de CL_{50} (citotoxicidad inespecífica) ± SD (n = 3).

- **Dispersiones sólidas de derivados de 5-nitroindazol**

Debido a que ambos derivados se ensayaron previamente en diversos modelos *in vitro*, la evaluación biológica de las DS de **VATR1** y **VATR3** se llevó a cabo únicamente en el modelo *in vivo* de infección aguda.

2.2.3.2. Ensayos de actividad farmacológica *in vivo*

De acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, las mejores DS se sometieron a un ensayo *in vivo* aplicando el modelo murino de infección aguda propuesto por Romanha *et al*. (2010), descrito en apartado 2.1.8.9.

Brevemente, grupos de ratones NMRI infectados vía i.p. con 10^4 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y fueron tratados a partir del 5º d.p.i., administrándose una dosis cada 24 h durante 5 días consecutivos. Los tratamientos se realizaron oralmente, utilizando como vehículo una solución de carboximetilcelulosa sódica al 2%. En cada experimento siempre se incluyó un grupo control de animales infectados únicamente tratados con el vehículo, además de un grupo tratado con BZ materia prima. Con respecto a los ensayos realizados con los derivados de 5-nitroindazol, en éstos se incluyó además un grupo tratado con el correspondiente derivado **VATR1** o **VATR3** materia prima.

La eficacia de los tratamientos se determinó mediante seguimiento de los niveles de parasitemia en el 5º, 8º, 12º, 16º, 20º y 30º d.p.i., aplicando el método descrito por Brener (1962). La supervivencia de los animales se siguió diariamente durante los 30 días posteriores a la finalización del tratamiento (40º d.p.i.).

En esta ocasión, los resultados se expresan como el porcentaje de reducción del área bajo la curva de parasitemia (%AUPC) trazada para cada grupo a partir de los niveles medios de parasitemia ± SEM (Muscia *et al.*, 2011). Asimismo, se indica el porcentaje de supervivencia (%S) de cada grupo durante la fase aguda.

2.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS (versión 20, IBM). El estudio comparativo de la velocidad de disolución entre las diferentes formulaciones se llevó a cabo aplicando el test de la *t* de Student. Con respecto a los ensayos biológicos *in vitro*, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal- Wallis para la comparación de los valores de CI_{50} y CL_{50} de las distintas formulaciones con los resultados obtenidos por el BZ materia prima. En los ensayos *in vivo*, los niveles de parasitemia entre los distintos grupos se compararon mediante ANOVA, con el consiguiente análisis *post hoc* caso de existir diferencias significativas. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo para todos los análisis.

2.3. Modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida

Los estudios *in silico* se realizaron en colaboración con el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

2.3.1. CONSTRUCCIÓN DE LA BASE DE DATOS

La base de datos (BD) a partir de la que se construyeron los modelos QSAR la constituyen 1.308 moléculas evaluadas en *T. cruzi* mediante *screening* fenotípico. Éstas se recopilaron mediante búsqueda bibliográfica utilizando diversas fuentes, principalmente las Tesis Doctorales desarrolladas en el campo de la quimioterapia experimental para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en el Departamento de Parasitología de la UCM (Atienza Serna, 1994; Martínez Díaz, 1996; Muelas Serrano, 2001; Rolón, 2005; Vega Gómez, 2005) y la BD de DNDi *(Drug for Neglected Diseases iniciative)* en CheMBL (https://www.ebi.ac.uk/chembl ntd/download/#dndi_dataset_chagas, acceso: marzo de 2012); otras se obtuvieron de artículos científicos y de PubChem (Szajnman *et al.*, 2000, 2003; del Olmo *et al.*, 2001; Vega *et al.*, 2005, 2012; Ravaschino *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2007; Pinto y de Castro, 2009; Gómez-Ayala *et al.*, 2010; Nava-Zuazo *et al.*, 2010; Urbina, 2010).

Como criterio de inclusión en el grupo de moléculas activas se consideró presentar un IS en epimastigotes > 10. En aquellos compuestos en los que no estaba determinada su

citotoxicidad, resultando imposible estimar su IS, se consideraron CI_{50} < 30 μM. De acuerdo con estos criterios, el grupo de compuestos activos inicialmente lo formaron 759 moléculas.

El grupo de inactivos fue constituido originalmente por un total de 549 compuestos, entre los cuales se incluyeron aquellos que no cumplieron los requisitos anteriores (410 compuestos), así como otros de uso farmacológico diverso (139 compuestos) cuya actividad tripanocida no ha sido descrita, pero que han sido clasificados como inactivos en estudios *in silico* previos (Vega *et al.*, 2006; Castillo-Garit *et al.*, 2010, 2011, 2012). La dificultad que existe en la búsqueda bibliográfica de compuestos inactivos frente a *T. cruzi* corroborados experimentalmente, obliga a incluir en este grupo compuestos que *a priori* no son activos frente al parásito. No obstante, la clasificación de estas 139 moléculas como inactivas no garantiza que realmente lo sean, pudiendo este hecho reflejarse posteriormente en los resultados de clasificación para la serie de compuestos inactivos (Castillo-Garit *et al.*, 2012).

Los códigos SMILES *(simplified molecular-input line-entry system)* de todas las moléculas que constituyen la BD se pueden consultar en el Anexo suplementario 1 incluido en el CD que se adjunta a la presente memoria.

2.3.1.1. Diseño de las series de entrenamiento y predicción

La variedad estructural entre las moléculas que constituyen la BD se exploró mediante análisis de conglomerados según el procedimiento no jerárquico de k-medias (Montero-Torres *et al.*, 2005). A través del software STATISTICA (versión 10, StatSoft), se fijó en 20 el número de *clusters* en los que se subdividió el grupo de activos e inactivos, a partir de los cuales se retiró aproximadamente el 25% de los compuestos de manera aleatoria, para formar la correspondiente serie de predicción (SP) (Martins Alho *et al.*, 2014). Mediante este procedimiento se asegura la presencia de compuestos pertenecientes a todos los *clusters* en ambas series de entrenamiento (SE) y SP. Asimismo, este análisis permite descartar aquellas moléculas que pudieran estar repetidas dentro de la BD.

Mientras que los compuestos que constituyen la SE se emplean en la confección de los modelos QSAR de predicción, aquellos incluidos en la SP se utilizan para la validación de los mismos (Martins Alho *et al.*, 2014), procedimiento que se explicará más adelante.

2.3.2. DESARROLLO DE MODELOS QSAR DE PREDICCIÓN DE ACTIVIDAD

2.3.2.1. Cálculo de los descriptores moleculares

Definidas las SE y SP, mediante el módulo QuBiLs-MAS *(Quadratic, Bilinear and Linear MapS – based on Graph-Theoretical Electronic-Density Matrices and Atomic weightS)* del software

TOMOCOMD-CARDD *(TOpological MOlecular COMputer Design – Computer Aided "Rational" Drug Design)* se llevó a cabo el cálculo de los descriptores moleculares (DM) a partir de los que se crearon los modelos de predicción de actividad (Marrero-Ponce *et al.*, 2012).

En este trabajo se calcularon los DM basados en relaciones de átomos, de índice lineal totales y locales (L), no considerando y considerando H en el grafo molecular (G) $[\mathbf{f}_k(v), \mathbf{f}_{kL}(v), \mathbf{f}_k^H(v), \mathbf{f}_{kL}^H(v)]$, correspondientes a las matrices de adyacencia (**M**) no estocástica (NS), estocástica (SS), doble estocástica (dS) y de probabilidad mutua (PM).

En cada G, los diferentes grupos de átomos considerados en el cálculo de los índices locales fueron: aceptores de H, carbonos en cadenas alifáticas, donadores de H, halógenos, grupos metilo terminales, carbonos en fragmentos aromáticos y heteroátomos. Con el objetivo de diferenciar los vértices (átomos) de los G, se contemplaron además los diez sistemas de propiedades atómicas del software: masa atómica (MA), electronegatividad (E), polarizabilidad (P), volumen de van der Waals (VdW), coeficiente de reparto (LogP), carga (C), dureza (H), área de superficie polar (PSA), refractividad (R) y blandura (S).

2.3.2.2. Análisis discriminante lineal

A partir de los DM, se confeccionaron los modelos de predicción utilizando el análisis discriminante lineal (ADL) como técnica estadística para clasificar los compuestos como activos e inactivos, mediante la generación de una función discriminante. El ADL se realizó con el software STATISTICA (versión 10, StatSoft), obteniéndose una ecuación matemática lineal (función discriminante) que relaciona la variable dependiente (clasificación) con las variables predictoras calculadas a partir de los correspondientes DM. De acuerdo con esta técnica, la clasificación de un compuesto viene dada por los valores de "probabilidad posterior" obtenidos y utilizados en el cálculo de la diferencia de probabilidades (ΔP): $\Delta P\% = [P(\text{act}) - P(\text{inact})] \times 100$; donde P(act) y P(inact) son las probabilidades con que la ecuación clasifica un compuesto como activo e inactivo, respectivamente. Aquellos con valores de $\Delta P\% > 0$ son clasificados como activos, mientras que los que presentan $\Delta P\% < 0$ se clasifican como inactivos (Montero-Torres *et al.*, 2005).

La calidad de los modelos se estudió mediante diversos parámetros estadísticos como: (i) la λ de Wilks, que indica su capacidad de discriminación general tomando valores de 0 (discriminación perfecta) a 1 (no discriminación), (ii) el cuadrado de la distancia de Mahalanobis (D^2), que indica la separación entre los grupos de activas e inactivas y por tanto su capacidad para diferenciar entre ambos tipos de moléculas, (iii) el valor de F, (iv) la exactitud total (Q), coeficiente de correlación de Matthews (C), sensibilidad (S), especificidad (E), razón de falsa alarma (RFA) y precisión ($Prec$) (Castillo-Garit *et al.*, 2012; Casañola-Martín *et al.*, 2015).

Tabla 5. Parámetros estadísticos empleados en la evaluación de los modelos.

Parámetro	Definición	Cálculo
Exactitud Total (*Q*)	Compuestos bien clasificados en relación al total	$(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN) \times 100$
Coeficiente de correlación de Matthews (*C*)	Correlación existente entre la variable dependiente (clasif.) e independientes (DM)	$[(VP \times VN - FP \times FN) / \sqrt{(VN + FN) \times (VN + FP) \times (VP + FP) \times (VP + FN)}] \times 100$
Sensibilidad (*S*)	Compuestos activos clasificados correctamente en relación al total de activos	$VP / (VP + FN) \times 100$
Especificidad (*E*)	Compuestos inactivos clasificados correctamente en relación al total de inactivos	$VN / (VN + FP) \times 100$
Razón de Falsa Alarma (*RFA*)	Compuestos inactivos clasificados erróneamente en relación al total de inactivos	$FP / (FP + VN) \times 100$
Precisión (*Prec*)	Compuestos activos clasificados correctamente en relación al total de compuestos predichos por el sistema como activos	$VP / (VP + FP) \times 100$

VP: verdadero positivo, FN: falso negativo, VN: verdadero negativo, FP: falso positivo.

Como estrategia para la selección de los modelos siempre se tuvo en cuenta el principio de parsimonia *(Occam's razor)*, de modo que ante resultados estadísticos similares se eligió siempre aquel modelo que presentó el menor número de variables (Montero-Torres *et al.*, 2005; Castillo-Garit *et al.*, 2012).

De esta manera se construyeron un total de 45 modelos QSAR/ADL de predicción, uno por cada una de las diez propiedades atómicas dentro de la correspondiente **M** (10 NS, 10 SS, 10 dS y 10 PM), uno general dentro de cada **M** que combina las variables de los modelos anteriores (1 NS, 1 SS, 1 dS y 1 PM) y un último modelo por combinación de todas las variables seleccionadas en los generales (1 NS + SS + dS + PM).

2.3.2.3. Validación de los modelos

Construidos los modelos, resulta imprescindible confirmar su poder predictivo y robustez, para lo que se llevaron a cabo los siguientes procedimientos de validación externa e interna.

- **Validación externa**

El proceso de validación externa es necesario para confirmar la calidad y el poder que presentan los modelos para predecir la actividad de moléculas que no han sido utilizadas en su construcción (Castillo-Garit *et al.*, 2012, 2015).

Como se adelantó en el apartado 2.3.1.1., la SP confeccionada se evaluó por la función discriminante generada en cada modelo, de modo que los parámetros estadísticos obtenidos para dicha SP son un reflejo del mayor o menor poder predictivo de los mismos.

- **Validación interna**

La robustez de un modelo se refiere a la estabilidad de sus parámetros predictivos y por tanto, a la que presenta su poder de predicción cuando se produce una perturbación en la SE. Ésta se exploró mediante las técnicas de validación cruzada *(LGO, Leave-Group-Out)* y de aleatorización de la variable respuesta *(Y-scrambling)* (Castillo-Garit *et al*., 2012, 2015).

– *Validación cruzada*

De manera sucesiva y aleatoria se extraen diferentes proporciones de la BD (5, 10, 15, 20, 25 y 30%), construyéndose nuevos modelos a partir de una "SE reducida" que se utiliza para predecir el comportamiento de los compuestos que han sido excluídos de la misma *(LGO)* cada vez (nueva "SP reducida"). Este procedimiento se repite hasta que todos los compuestos han sido extraídos de la BD una vez y sus actividades predichas por el modelo generado.

Como consecuencia de esta perturbación, los parámetros estadísticos de la SE no deben sufrir grandes variaciones con respecto a los del modelo original, lo que indica que en la BD no existe un grupo específico de moléculas que ejerza mayor influencia sobre su capacidad de predicción.

– *Aleatorización de la variable respuesta (Y-scrambling, intercambio de la Y)*

Aleatoriamente se invierte la clasificación original de activo o inactivo en el 5, 10, 20, 30 y 40% de los compuestos que constituyen la SE, contruyéndose un nuevo modelo a partir del cual se calculan los parámetros estadísticos pertinentes para la "nueva SE" y la SP.

A medida que se aumenta el porcentaje de moléculas con la clasificación invertida (errónea) en la SE, los valores de Q de los nuevos modelos han de disminuir gradualmente con respecto al valor del modelo original. Este comportamiento confirma la estabilidad del mismo y descarta que los valores estadísticos hayan sido obtenidos de forma casual.

2.3.3. SISTEMA MULTICLASIFICADOR DE MODELOS QSAR

Los sistemas ensamblados o sistemas multiclasificadores (SMC) se construyeron mediante combinación de los clasificadores individuales (modelos) como estrategia para potenciar los resultados de la clasificación. Para ello se utilizó el programa DASDE *(Diversity Analysis, Selection and Discovery of best Ensemble from bases models)* versión 1.0., el cual combina

los modelos mediante fusión y asume que todos ellos son competitivos y complementarios, en otras palabras, igualmente *expertos* (Meneses Gómez y Cedré Gutiérrez, 2013).

2.3.3.1. Evaluación de la diversidad

La diversidad existente entre los modelos QSAR/ADL con respecto a la clasificación de las SE y SP, se cuantificó a través de todas las medidas implementadas en el programa DASDE: desacuerdo, doble fallo, diferencia, correlación y Q-estadístico; las cuales calculan la diversidad mediante comparación por pares de los modelos (Meneses Gómez y Cedré Gutiérrez, 2013):

- Desacuerdo: caracteriza la complementariedad entre los clasificadores, evalúa la cantidad de compuestos en los que ha habido desacuerdo sobre el conjunto total de la BD. Cuanto mayor sea su valor (0−1), mayor será la diversidad.
- Doble fallo: evalúa el fallo de los dos clasificadores al mismo tiempo. Mientras menor sea el valor (0−1), mayor es la diversidad.
- Diferencia: es la diferencia entre la medida de desacuerdo y la de doble falta, existiendo una mayor diversidad cuanto mayor sea el valor obtenido (0−1).
- Correlación: mide la correlación existente entre las decisiones tomadas por los diferentes clasificadores, adquiriendo valores entre -1 y 1 en función de la mayor (-1) o menor (1) debilidad de la asociación, indicando el valor de 0 una ausencia en la asociación.
- Q-estadístico: evalúa la similitud entre los clasificadores, siendo $Q = 0$ cuando éstos son independientes, $Q > 0$ cuando hay una tendencia a reconocer las mismas estructuras y $Q < 0$ cuando los errores se dan en distintos compuestos.

2.3.3.2. Ensamble

La combinación de los modelos QSAR/ADL seleccionados, se llevó a cabo considerando las técnicas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M); implementadas en el programa DASDE (Meneses Gómez y Cedré Gutiérrez, 2013).

Para evaluar el comportamiento de los diferentes SMC, se calcularon los parámetros estadísticos habituales: *Q, C, S, E, RFA y Prec*. De esta manera, el SMC seleccionado debe presentar una optimización de estos parámetros con respecto a los obtenidos por los respectivos modelos individuales que lo integran. El principio de parsimonia *(Occam's razor)* se consideró igualmente en la selección del SMC.

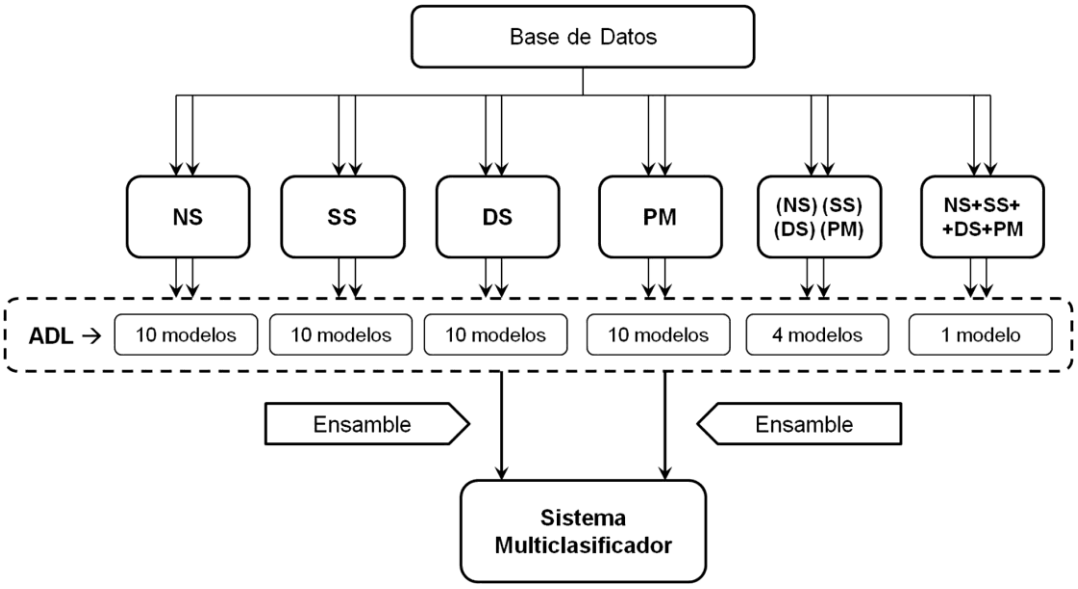


Fig. 39. Protocolo para la obtención del SMC a partir de los clasificadores individuales (modelos). Fuente: esquema adaptado del propuesto en Martins Alho *et al.* (2014).

2.3.4. CRIBADO VIRTUAL DE LAS SERIES DE SÍNTESIS

Como corroboración experimental de los diferentes SMC, se llevó a cabo la evaluación *in silico* de las series de síntesis previamente ensayadas frente a *T. cruzi*, con el propósito de explorar la correlación existente entre los resultados de predicción de actividad y los obtenidos experimentalmente.

De esta manera se procedió con el cribado virtual (CV) de un total de 148 moléculas distribuidas ahora en seis grupos de acuerdo con sus estructuras químicas, detalladas en el apartado 2.1.7. de la presente memoria: derivados de 5-nitroindazol, tetrahidroquinolinas, derivados de cloroquina, tiadiazinas, quelantes heterocíclicos y cromenoazoldionas.

2.3.5. EXPLORACIÓN DEL DOMINIO DE APLICACIÓN

Una vez realizado el CV de las distintas series de síntesis, se estudiaron diversos aspectos relacionados con el dominio de aplicación (DAp) de los sistemas de clasificación, con el propósito de conocer la aplicabilidad de los mismos así como sus posibles limitaciones.

2.3.5.1. Dominio de aplicación

El DAp de los sistemas de clasificación se determinó a partir de los correspondientes DM que definen cada uno, aplicando el método basado en la distancia euclídea disponible en el programa Ambit (Jaworska *et al*., 2005).

2.3.5.2. Análisis de conglomerados

Mediante el software STATISTICA (versión 10, StatSoft), se realizó un nuevo análisis de conglomerados de tipo *k*-medias a partir de los DM que constituyen el SMC objeto de estudio, con el propósito de explorar la representatividad en la SE de las 148 moléculas sometidas al CV.

2.3.5.3. Análisis de componentes principales

Finalmente, se empleó el software STATISTICA (versión 10, StatSoft) para la realización de un análisis de componentes principales (ACP) a través del cual se llevó a cabo un último estudio de las estructuras que consituyen la SE, así como de aquellas que fueron evaluadas *in silico*.

Mediante esta técnica se reduce el número de variables iniciales, manteniéndose aquellas que proporcionan mayor variabilidad al conjunto de datos. Por combinación lineal de las mismas, se obtienen nuevas variables denominadas componentes principales (CP) o factores, las cuales son independientes entre sí y de cuya proyección para cada muestra (en este caso, las moléculas) en los ejes X (CP1, aquel que aporta mayor varianza) e Y (sucesivos CP) surge el denominado *score plot* a partir del cual se pueden detectar agrupaciones, tendencias y posibles *outliers* entre los compuestos estudiados (Eriksson *et al.*, 2003; Sieg *et al.*, 2007).

RESULTADOS

"Tudo o que acontece uma vez
poderá nunca mais acontecer,
mas tudo o que acontece duas vezes,
certamente acontecerá uma terceira"

- Paulo Coelho -

3. RESULTADOS

3.1. Cribado farmacológico de moléculas de síntesis

3.1.1. EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE *Trypanosoma cruzi* DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL, SERIE I

Se evaluó la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* de una serie constituida por 35 derivados de 5-nitroindazol, entre los que se encuentran 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituídas y 5-nitroindazoles 2,3- ó 1,3-disustituídos. Dicha serie fue sintetizada por el Dr. Vicente J. Arán (Instituto de Química Médica, CSIC) y sus estructuras se detallaron en el apartado 2.1.7.1.

3.1.1.1. Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ*

Antes de comenzar los ensayos con la cepa CL-B5 *lacZ* de *T. cruzi*, se determinó su curva de crecimiento con el fin de conocer su dinámica y ajustar las correspondientes pruebas al momento preciso. Para ello, se partió de un cultivo axénico de epimastigotes a partir del cual se realizaron subcultivos de 500.000 epimastigotes/mL en 5 mL de medio LIT que se mantuvieron a 28 ºC. Durante un periodo aproximado de 20 días y a partir de 3 subcultivos independientes (n = 3), se realizaron recuentos periódicos del número de epimastigotes en cámara Neubauer utilizando tintura de yodo (Fig. 40).

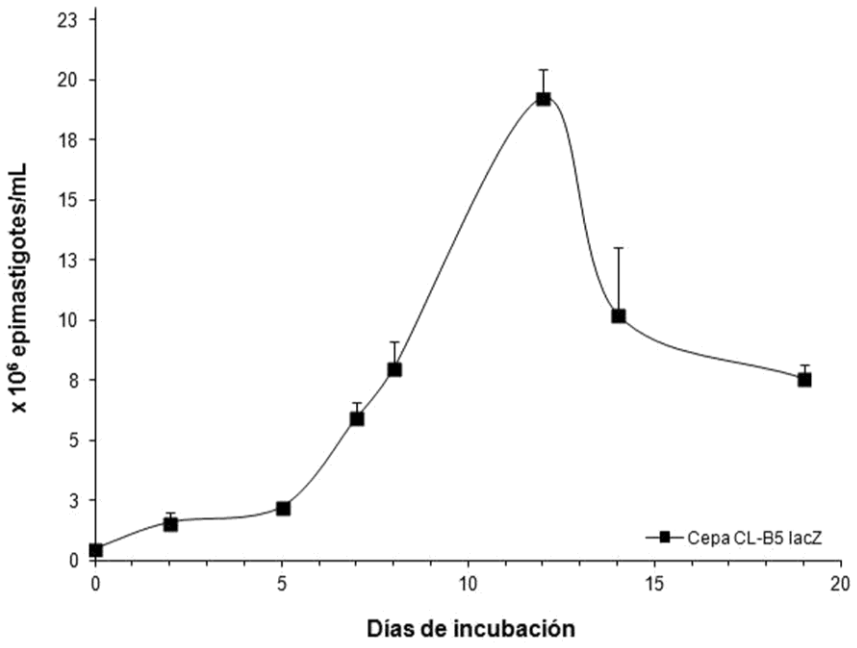


Fig. 40. Curva de crecimiento de epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ.* Cada punto indica la media ± desviación estándar (SD) de los recuentos realizados en tres subcultivos independientes (n = 3).

3.1.1.2. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Una vez conocida la dinámica de crecimiento de la cepa, se realizó un *screening* primario en el que se determinó la actividad de los derivados a las 72 h de incubación con epimastigotes y su citotoxicidad tras 24 h de incubación con macrófagos murinos J774 (Tablas 6 y 7). Benznidazol (BZ) y nifurtimox (NX) se evaluaron paralelamente como fármacos de referencia.

Tabla 6. Actividad de 5-nitroindazolinonas (**VATR1**–**VATR16**) e indazolinona (**VATR33**) 1,2-disustituídas en epimastigotes (cepa CL-B5 *lacZ*), expresada como porcentaje de inhibición (%AE), y citotoxicidad en macrófagos J774 ($\%C_{J774}$) a las tres concentraciones inicialmente ensayadas.

Compuesto	256 μM[a]		128 μM		64 μM	
	%AE	$\%C_{J774}$	%AE	$\%C_{J774}$	%AE	$\%C_{J774}$
VATR1	94,75	0,00	92,76	0,00	92,73	0,00
VATR2	90,38	0,00	88,31	0,00	87,60	14,60
VATR3	84,05	81,58	88,34	67,52	82,76	33,27
VATR4	90,16	80,99	90,01	71,75	85,16	54,14
VATR5	69,21	57,87	83,72	64,00	74,50	9,77
VATR6	37,72	0,00	40,90	0,00	42,53	0,00
VATR7	41,85	15,52	70,40	11,88	77,95	0,00
VATR8	24,18	0,00	13,04	0,00	10,67	0,00
VATR9	67,99	0,00	42,75	0,00	42,67	11,42
VATR10	11,55	0,00	7,92	0,00	3,05	0,00
VATR11	13,23	0,00	10,54	0,00	7,45	0,00
VATR12	89,14	20,71	84,31	9,95	81,81	0,00
VATR13	86,13	0,00	76,51	0,00	71,75	0,00
VATR14	83,99	16,79	54,68	0,00	28,33	0,00
VATR15	23,38	0,00	29,12	0,00	49,64	0,00
VATR16	26,56	43,13	19,43	–	14,23	–
VATR33[b]	55,81	–	36,60	–	28,03	–
NX	100	25,02	97,07	5,12	91,57	0,00
BZ	82,01	12,98	79,75	14,81	70,95	13,02

[a] Los resultados expresan la media de al menos dos experimentos realizados de manera independiente ($n \geq 2$). La SD fue inferior al 10%. [b] Indazolinona 1,2-disustituida (sin grupo NO_2).

Tabla 7. Actividad de 5-nitroindazoles 2,3- (**VATR17**–**29** y **VATR34**–**35**) y 1,3-disustituídos (**VATR30**–**32**) en epimastigotes (cepa CL-B5 *lacZ*), expresada como porcentaje de inhibición (%AE), y citotoxicidad en macrófagos J774 ($\%C_{J774}$) a las tres concentraciones inicialmente ensayadas.

Compuesto	256 μM[a]		128 μM		64 μM	
	%AE	$\%C_{J774}$	%AE	$\%C_{J774}$	%AE	$\%C_{J774}$
VATR17	21,16	6,83	38,12	0,00	48,31	0,00
VATR18	0,00	0,00	26,05	0,00	15,66	0,00
VATR19	70,77	41,43	67,13	–	56,25	–

Tabla 7. Continuación

VATR20	54,72	26,33	48,51	–	24,57	–
VATR21	79,31	0,00	78,80	0,00	53,41	0,00
VATR22	34,50	64,65	43,50	15,22	51,75	–
VATR23	22,46	0,00	16,39	28,50	61,20	22,41
VATR24	63,67	–	76,56	–	76,50	26,52
VATR25	78,74	21,61	79,20	6,57	67,79	0,00
VATR26	91,16	62,41	16,94	35,33	27,41	0,00
VATR27	71,86	20,00	70,49	19,17	71,52	6,34
VATR28	68,54	0,00	56,15	1,39	36,73	21,51
VATR29	6,26	–	11,27	–	20,71	–
VATR30	11,30	–	23,62	9,00	46,39	13,28
VATR31	49,35	0,00	40,56	2,99	66,99	0,00
VATR32	56,26	27,11	40,29	–	21,41	–
VATR34	72,54	9,31	35,65	–	27,01	–
VATR35	2,81	–	0,00	–	0,00	–
NX	100	25,02	97,07	5,12	91,57	0,00
BZ	82,01	12,98	79,75	14,81	70,95	13,02

[a] Los resultados expresan la media de al menos dos experimentos realizados de manera independiente (n ≥ 2). La SD fue inferior al 10%.

En general, todos los compuestos presentaron una baja citotoxicidad inespecífica a la mayor concentración ensayada (256 μM), a excepción de **VATR3**, **VATR4**, **VATR5**, **VATR16**, **VATR19**, **VATR22** y **VATR26**.

Varios de los compuestos mostraron %AE ca. 80% o mayor (**VATR1–4**, **VATR12–14**, **VATR21**, **VATR25** y **VATR26**) a 256 μM, similar a la del BZ (%AE = 82,01%), aunque inferior a la del NX (%AE = 100%). A pesar de que algunos compuestos experimentaron una importante pérdida de actividad a concentraciones inferiores (**VATR14**, **VATR21**, **VATR26** y **VATR34**), la mayoría de los derivados que presentaron gran actividad a 256 μM mantuvieron ésta en torno al 70–90% [**VATR1–5**, **VATR7**, **VATR12** y **VATR13** (5-nitroindazolinonas 1,2-disustituídas); **VATR24** y **VATR27** (3-alcoxi-2-alquilindazoles)] a 128 y 64 μM.

Cabe destacar la actividad de **VATR1**, **VATR2** y **VATR3**, los cuales mantuvieron un %AE > 80% hasta 8 μM, acompañada de una evidente ausencia de toxicidad sobre macrófagos J774 a concentraciones inferiores a 64 μM. Estos tres derivados obtuvieron sobre epimastigotes valores de CI_{50} = 0,93, 2,39 y 1,17 μM para **VATR1**, **VATR2** y **VATR3**, respectivamente (Fig. 41). Estos resultados, junto con los respectivos índices de selectividad (IS) para los tres compuestos, se muestran más adelante en la Tabla 9, una vez completado el cribado *in vitro* para esta primera serie.

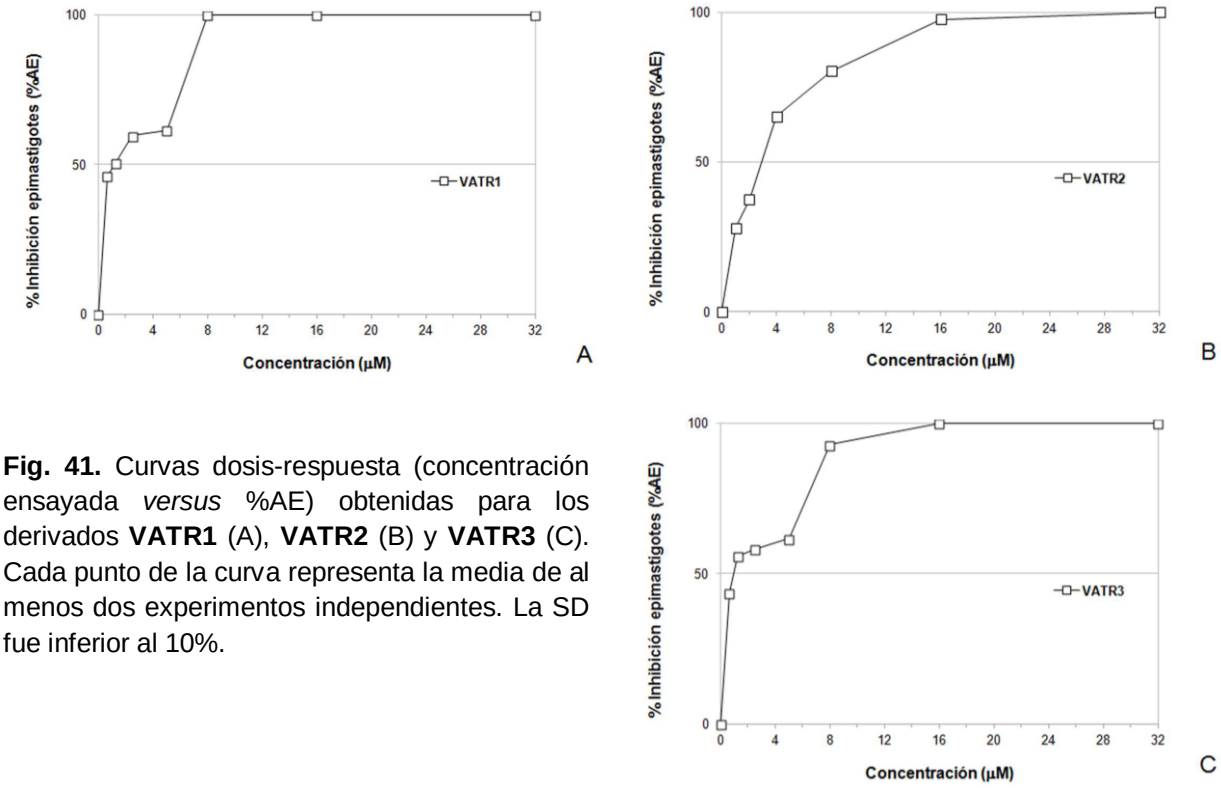


Fig. 41. Curvas dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AE) obtenidas para los derivados **VATR1** (A), **VATR2** (B) y **VATR3** (C). Cada punto de la curva representa la media de al menos dos experimentos independientes. La SD fue inferior al 10%.

Únicamente 10 (**VATR8**, **VATR10**, **VATR11**, **VATR15**, **VATR17**, **VATR18**, **VATR23**, **VATR29**, **VATR30** y **VATR35**) de los 35 compuestos evaluados en la serie I de derivados de 5-nitroindazol, resultaron prácticamente inactivos a este nivel (%AE < 25% a 256 μM).

Es importante destacar la ausencia de correlación dosis-respuesta (concentración ensayada-actividad) observada para varios de los compuestos ensayados, especialmente a concentraciones elevadas, atribuida a problemas en la solubilidad de los mismos.

3.1.1.3. Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de conocer las alteraciones morfológicas inducidas por los derivados de 5-nitroindazol, se prepararon muestras para su estudio mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) a partir de cultivos de epimastigotes tratados con la CI_{50} de los dos derivados más activos de la serie (**VATR1** y **VATR3**, CI_{50} = 0,93 y 1,17 μM; respectivamente) durante 72 h a 28 ºC. Se prepararon además muestras de epimastigotes con DMSO al 0,2% (control de crecimiento), así como de epimastigotes tratados con BZ (CI_{50} = 27,32 μM) y NX (CI_{50} = 3,61 μM) en las mismas condiciones.

Las fotografías correspondientes al control de crecimiento (Fig. 42A–B), muestran la morfología típica de los epimastigotes, con su cuerpo celular alargado y un flagelo que emerge hacia la mitad del mismo generándose una membrana ondulante que queda libre

por la parte anterior del parásito. Sin embargo, cuando éstos fueron incubados con los fármacos de referencia (Fig. 42C–D), se produjo una clara retracción del cuerpo celular, con gran afectación de la morfología en el caso de los epimastigotes tratados con NX (Fig. 42D). Con respecto a la morfología de los epimastigotes tratados con **VATR1** (Fig. 42E–F) y **VATR3** (Fig. 42G–H), se observaron alteraciones en la superficie de los parásitos como son la generación de poros de pequeño tamaño (Fig. 42F y H, **VATR1** y **VATR3**, respectivamente), así como una aparente alteración en la membrana celular, más evidente en los epimastigotes expuestos al derivado **VATR1** (Fig. 42F).

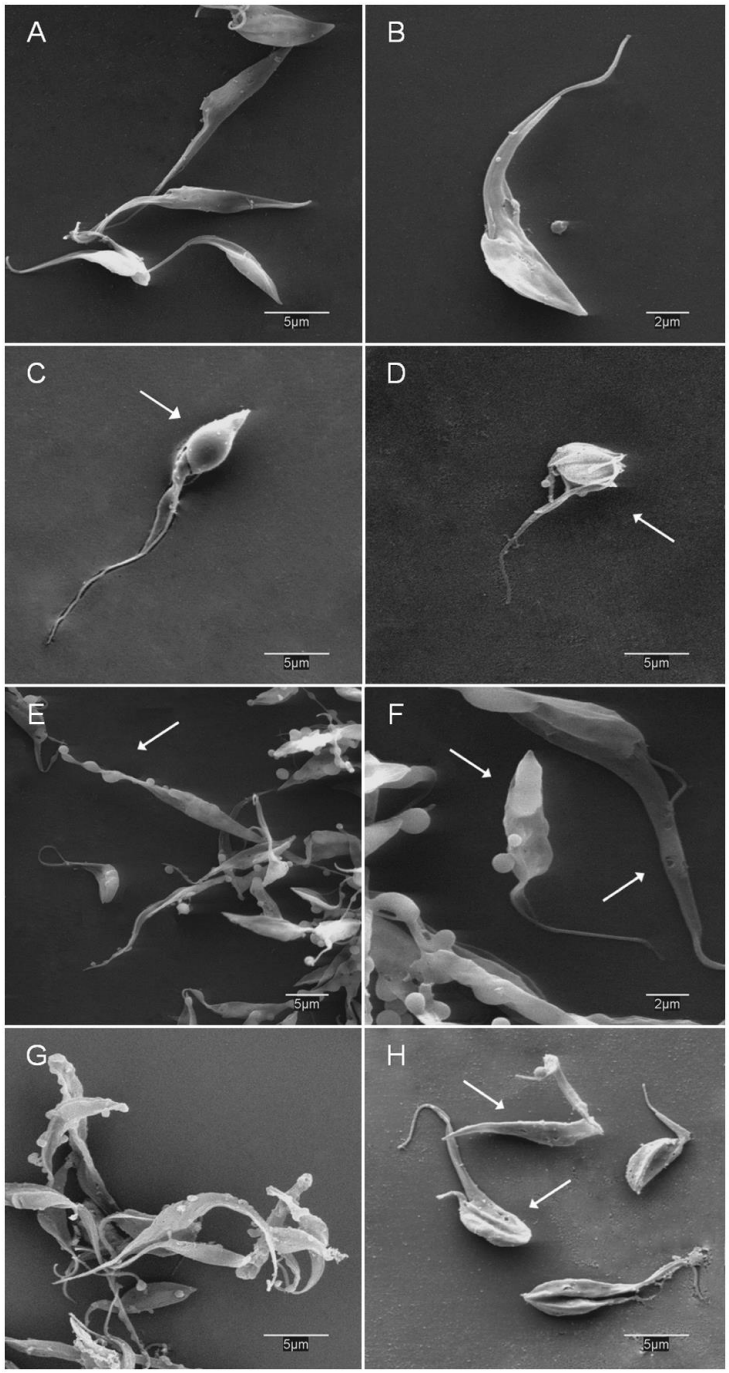


Fig. 42. MEB realizada en cultivos de epimastigotes cepa CL-B5 *lacZ* tras 72 h de tratamiento: (A–B) los parásitos sin tratar muestran la morfología típica de epimastigotes, (C–D) el tratamiento con BZ y NX produjo retracción en el cuerpo celular de los epimastigotes, (E–F) **VATR1** y (G–H) **VATR3** dieron lugar a alteraciones a nivel de la superficie, más evidentes en el caso del derivado **VATR1** (F).

3.1.1.4. Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares

Tras el *screening* primario, se seleccionaron 12 moléculas para evaluar su actividad frente a amastigotes intracelulares de la cepa CL-B5 *lacZ*. Asimismo, se aprovechó este trabajo para estandarizar el ensayo *in vitro* en placas de 48 pocillos en las condiciones especificadas en el apartado 2.1.8.6. de la presente memoria.

La Fig. 43 muestra un ejemplo de las absorbancias medias obtenidas por los grupos control de infección, control de crecimiento y medio, en presencia de CPRG en Tritón X-100 3% (concentración final 400 μM, pH 7,4) en las pruebas de actividad realizadas en placas de 48 pocillos. Se aprecia cómo tras 3 h de incubación con el sustrato, existe gran diferencia entre las absorbancias del control de infección y crecimiento celular, discriminándose perfectamente la actividad β-galactosidasa correspondiente al parásito.

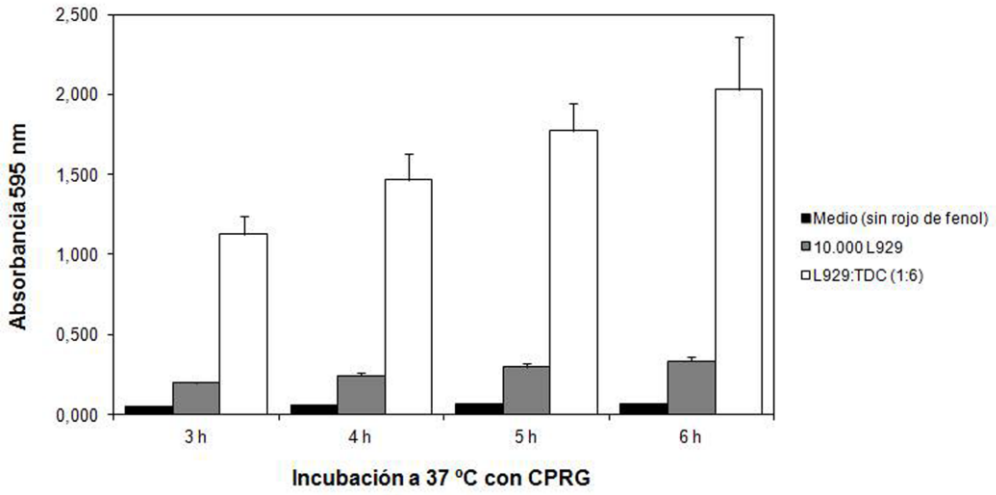


Fig. 43. Absorbancias medias registradas para los controles de infección, crecimiento y medio en las pruebas de amastigotes realizadas en placas de 48 pocillos mediante infección 1:6 (L929:TDC).

La Tabla 8 muestra los resultados de actividad obtenidos. Únicamente se evaluaron las concentraciones que resultaron activas para epimastigotes y no citotóxicas (Rolón *et al.*, 2006b), siendo éstas inicialmente 256, 128 y 64 μM. Sin embargo, los compuestos que a 64 μM obtuvieron %AE > 80% (Tablas 6 y 7) fueron evaluados a concentraciones inferiores.

Las 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituídas (**VATR1**, **VATR2**, **VATR3**, **VATR12** y **VATR13**) fueron generalmente más activas que los nitroindazoles 2,3- o 1,3-disustituídos (**VATR21**, **VATR25**, **VATR27** y **VATR31**) (Tabla 8), con **VATR1** (CI_{50} < 1 μM), **VATR2** (CI_{50} = 4,65 μM) y **VATR3** (CI_{50} = 3,71 μM) como los derivados más activos (Tabla 8, Fig. 44). Por el contrario, no se pudo determinar la actividad de **VATR4**, **VATR7** y **VATR14** a las concentraciones ensayadas, por ser inactivas en epimastigotes (NE-epis) o citotóxicas (NE-cito), o detectarse toxicidad para la célula hospedadora durante el ensayo (ND).

Tabla 8. Actividad tripanocida frente a amastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ*, expresada como la media del porcentaje de inhibición (%AA) ± SD (n = 3) obtenido para cada concentración.

Compuesto	256 μM	128 μM	64 μM	32 μM	16 μM	8 μM
VATR1	100 ± 3,12	100 ± 5,44	100 ± 2,37	100 ± 4,75	100 ± 4,20	100 ± 1,22
VATR2	NE (cito)[a]	NE (cito)	100 ± 1,84	100 ± 1,10	100 ± 1,41	100 ± 2,79
VATR3	NE (cito)	NE (cito)	NE (cito)	NE (cito)	100 ± 5,78	100 ± 3,60
VATR4	NE (cito)	NE (cito)	NE (cito)	ND[c]	ND	NE (epis)[b]
VATR7	ND	ND	ND	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
VATR12	NE (cito)	100 ± 6,62	100 ± 8,74	74,70 ± 2,90	58,85 ± 8,82	NE (epis)
VATR13	68,24 ± 4,25	87,83 ± 0,52	70,44 ± 0,83	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
VATR14	ND	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
VATR21	61,89 ± 3,03	66,88 ± 0,92	66,23 ± 7,35	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
VATR25	NE (cito)	100 ± 1,32	100 ± 2,17	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
VATR27	NE (cito)	NE (cito)	78,49 ± 3,04	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
VATR31	NE (epis)	NE (epis)	49,88 ± 8,44	NE (epis)	NE (epis)	NE (epis)
NX	ND	ND	100 ± 0,02	100 ± 1,64	100 ± 2,70	100 ± 1,04
BZ	100 ± 0,04	100 ± 2,18	100 ± 1,43	100 ± 7,62	100 ± 4,91	98,88 ± 1,94

[a] No evaluado (citotóxico). [b] No ensayado (baja actividad frente a epimastigotes). [c] No determinado.

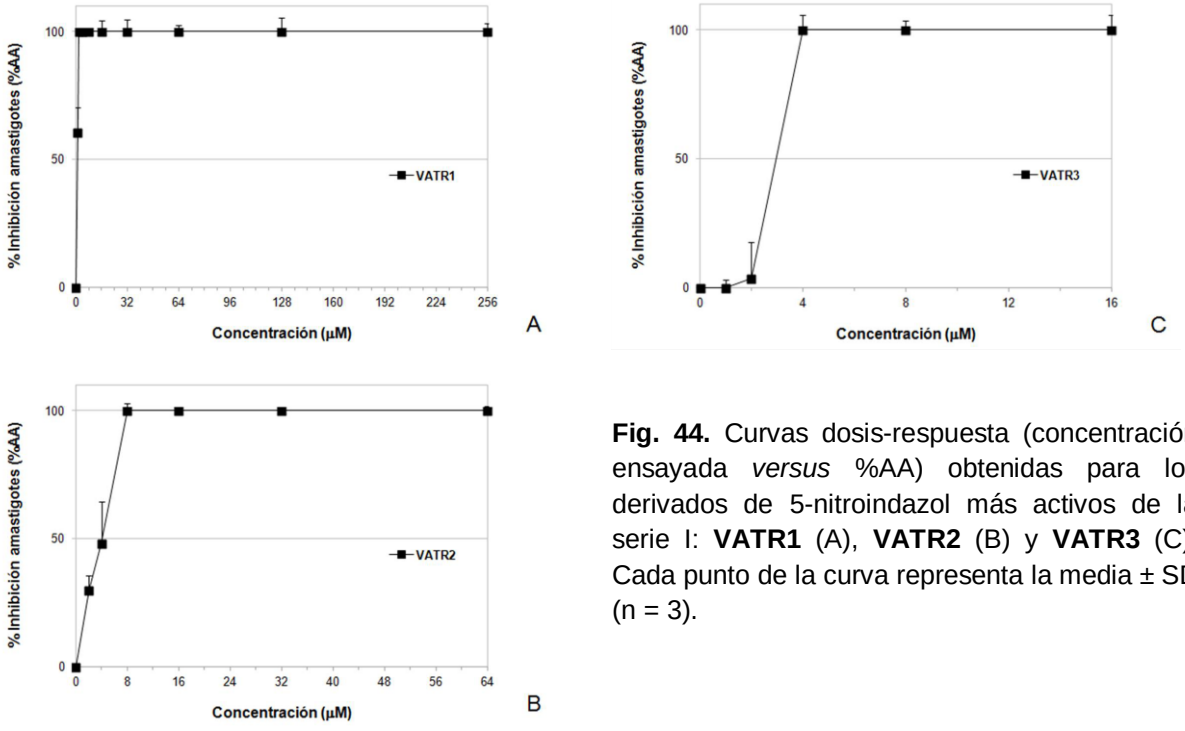


Fig. 44. Curvas dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AA) obtenidas para los derivados de 5-nitroindazol más activos de la serie I: **VATR1** (A), **VATR2** (B) y **VATR3** (C). Cada punto de la curva representa la media ± SD (n = 3).

Los ensayos de actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de la cepa CL-B5 *lacZ* se realizaron en las condiciones experimentales especificadas en el apartado 2.1.8.6. y en todos los casos los valores de Z' estaban comprendidos entre 0,3–0,9, indicando la reproducibilidad de los mismos.

Una vez completado el cribado farmacológico *in vitro*, se estimaron los IS en epimastigotes y amastigotes para los compuestos más activos de la serie (**VATR1**, **VATR2**, y **VATR3**), habiéndose alcanzado IS > 30 en todos ellos (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad frente a epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ* y citotoxicidad inespecífica en macrófagos J774 expresadas como CI_{50} y CL_{50}, respectivamente.

Compuesto	CI_{50} epis (μM)[a]	CI_{50} amas (μM)	CL_{50} (μM)	IS epis[b]	IS amas
VATR1	0,93	< 1	> 256	> 275,27	> 256
VATR2	2,39	4,65	> 256	> 107,11	> 55,05
VATR3	1,17	3,71	111,65	95,42	30,09
NX	3,61	< 8	> 256	> 70,91	> 32
BZ	27,32	< 8	> 256	> 9,37	> 32

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índices de selectividad calculados como $IS = CL_{50}/CI_{50}$.

3.1.1.5. Actividad *in vivo*

Finalmente, **VATR1** y **VATR3** fueron sometidos a un ensayo de actividad *in vivo* con el fin de evaluar su capacidad para reducir la parasitemia en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda (Romanha *et al*., 2010). Ambos se administraron oralmente a grupos de ratones NMRI (n = 6) en dosis de 100 mg/kg/día durante 5 días consecutivos a partir del 5º d.p.i. En el ensayo se incluyó un grupo de ratones infectados al que se administró el vehículo (solución de carboximetilcelulosa sódica al 2%) y otro tratado con BZ a las mismas dosis.

Los dos derivados redujeron la parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Y, aunque ninguno de ellos la eliminó completamente al final del tratamiento, a diferencia de lo ocurrido en el grupo tratado con BZ. Sin embargo y como se muestra en la Fig. 45, ambos derivados dieron lugar a importantes reducciones en la parasitemia ($P < 0,05$) una vez concluido el tratamiento el 10º d.p.i.

Con respecto a la supervivencia (Fig. 46), todos los ratones tratados sobrevivieron a la fase aguda, habiéndose registrado una única muerte en el grupo control de infección durante los 30 días posteriores a la finalización del tratamiento (40º d.p.i.).

La aparente ausencia de indicadores de toxicidad aguda durante el transcurso del experimento, tales como diarrea, pérdida de pelo o de peso, sugiere que los derivados **VATR1** y **VATR3** son bien tolerados en ratón a la posología administrada.

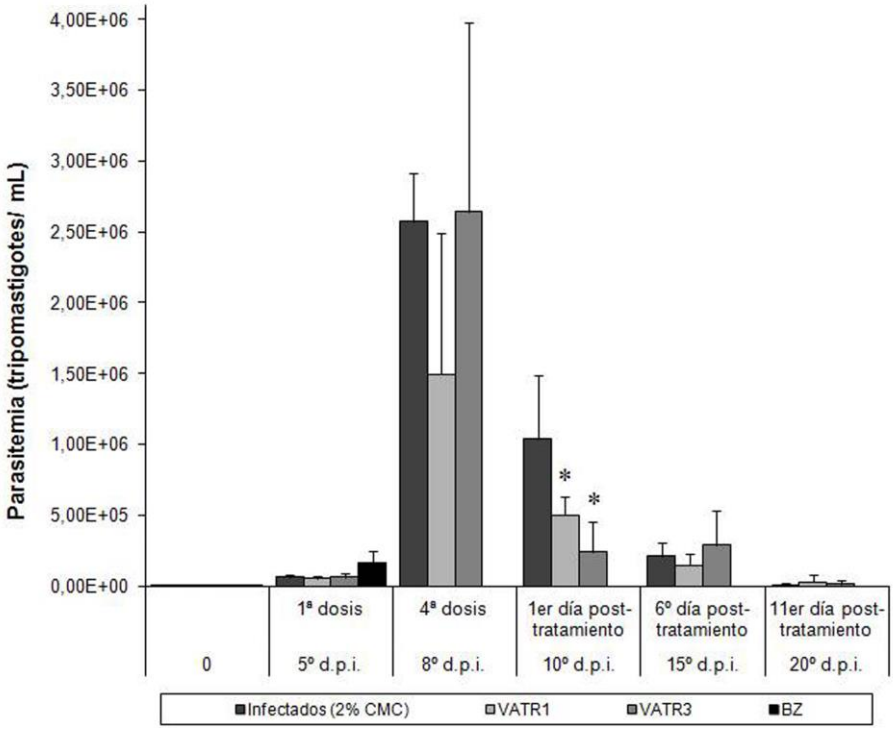


Fig. 45. Tratamiento con **VATR1** y **VATR3**, 100 mg/kg/día vía oral por 5 días consecutivos (5–9º d.p.i): niveles de parasitemia en ratones NMRI infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6).
* Indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA.

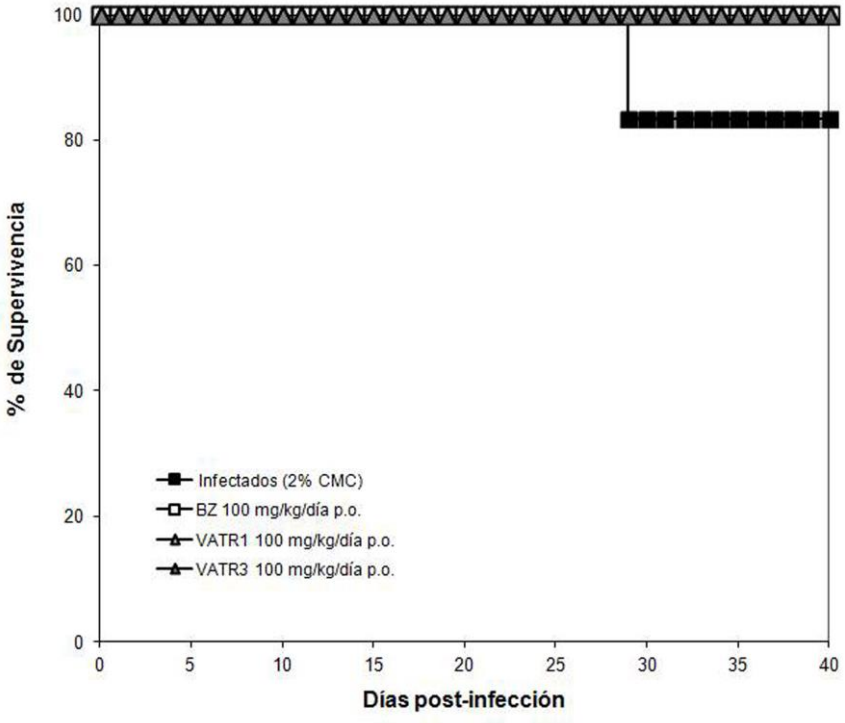


Fig. 46. Tratamiento con **VATR1** y **VATR3**, vía oral: supervivencia durante la fase aguda.

Los resultados del cribado farmacológico *in vitro* e *in vivo* anteriormente expuestos, correspondiente a la serie I de derivados de 5-nitroindazol, se encuentran publicados en Vega *et al*. (2012) y Fonseca-Berzal *et al*. (2014b).

3.1.1.6. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

De acuerdo con la actividad que demostraron los derivados **VATR1** y **VATR3** sobre la cepa CL-B5 de *T. cruzi*, éstos fueron seleccionados para llevar a cabo un estudio más completo de su perfil de actividad tripanocida durante la estancia realizada en el LBC/IOC/Fiocruz.

- **Citotoxicidad en cultivos primarios de células cardíacas y en fibrobrastos L929**

A continuación se muestran los resultados de citotoxicidad sobre cultivos primarios de células cardíacas (CC) tras 24 y 48 h de incubación a 37 ºC y 5% CO_2, así como sobre fibroblastos L929 tras 96 h de incubación en las mismas condiciones de temperatura y humedad (Tabla 10).

Tabla 10. Citotoxicidad (%C) de **VATR1** y **VATR3** en CC y L929, expresada como porcentaje a la mayor concentración ensayada (100 μM) y CL_{50} (μM). Los resultados son la media ± SD (n = 2 para CC y n = 3 para L929).

VATR1	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C[a]	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CC	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	52,66 ± 12,34	86,57 ± 10,77
VATR3	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CC	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	77,39 ± 1,75	55,34 ± 7,89
BZ	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CC	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	43,52 ± 2,79	> 100

[a] 100 μM para todos los ensayos. * Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al BZ, test de Kruskal-Wallis.

Ninguno de los compuestos fue tóxico sobre CC, alcanzando CL_{50} > 100 μM a los dos tiempos de incubación ensayados (24 y 48 h) sin alteraciones en la morfología y contractibilidad celular como consecuencia de dicho tratamiento. Por el contrario, el perfil de toxicidad obtenido en células L929 tras 96 h de tratamiento con **VATR1** y **VATR3**, desveló

cierta afectación en la viabilidad celular a 100 μM (CL_{50} = 86,57 ± 10,77 μM y 55,34 ± 7,89 μM, respectivamente), observándose un comportamiento similar al del BZ (*P* > 0,05).

- **Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares de las cepas Tulahuen *lacZ* e Y y frente a tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y**

A continuación se evaluó la actividad de **VATR1** y **VATR3** sobre las cepas Tulahuen (amastigotes en L929) e Y (amastigotes en CC y tripomastigotes sanguíneos). Los resultados obtenidos en estos ensayos figuran en la Tabla 11.

A pesar de que ambos obtuvieron perfiles de actividad ligeramente inferiores al del BZ en amastigotes de la cepa Tulahuen, los dos mostraron gran selectividad (IS **VATR1** = 24,32 e IS **VATR3** = 8,77). Frente a la cepa Y presentaron un comportamiento similar, observándose una importante reducción del índice endocítico (IE) a 25 μM (%IE = 99,43 ± 0,42% para **VATR1** y %IE ca. 71% para **VATR3**, Fig. 47), siendo además más selectivos (IS **VATR1** > 35,71 e IS **VATR3** > 11,08). Asimismo, **VATR1** igualó la actividad del BZ en amastigotes de ambas cepas (*P* > 0,05), no siendo así en el caso de **VATR3**. Por el contrario, ninguno fue activo en tripomastigotes sanguíneos (TS) tras 2 (CI_{50} > 250 μM) y 24 h.

Tabla 11. Actividad de **VATR1** y **VATR3** frente a amastigotes intracelulares (cepas Tulahuen C4 *lacZ* e Y) y tripomastigotes sanguíneos (cepa Y), expresada como la media de CI_{50} (μM) y la media de CI_{90} (μM) ± SD (n = 3).

VATR1	**CI_{50} (μM)[a]**	**CI_{90} (μM)[a]**	**IS[b]**	**PR_{BZ}[c]**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	3,56 ± 0,99	9,60 ± 1,17	24,32	1,00
Amastigotes cepa Y	2,80 ± 0,46	6,02 ± 0,30	> 35,71	1,07
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	202,41 ± 15,38	> 250	> 0,49	< 0,09
VATR3	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	6,31 ± 1,04	15,55 ± 4,86	8,77	0,62
Amastigotes cepa Y	9,02 ± 5,26	> 25	> 11,08	< 0,25
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	132,18 ± 7,35	240,19 ± 19,54	> 0,75	0,09
BZ	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes Tulahuen cepa C4 *lacZ*	1,66 ± 0,10	9,63 ± 0,37	> 60,24	–
Amastigotes cepa Y	1,77 ± 1,11	6,46 ±1,34	> 56,50	–
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	8,01 ± 0,81	22,75 ± 1,15	> 12,48	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). * Diferencias significativas (*P* < 0,05) con respecto al BZ, test de Kruskal-Wallis.

Los resultados de actividad *in vitro* recogidos en el apartado 3.1.1.6., dieron lugar a la publicación Fonseca-Berzal *et al*. (2015a).

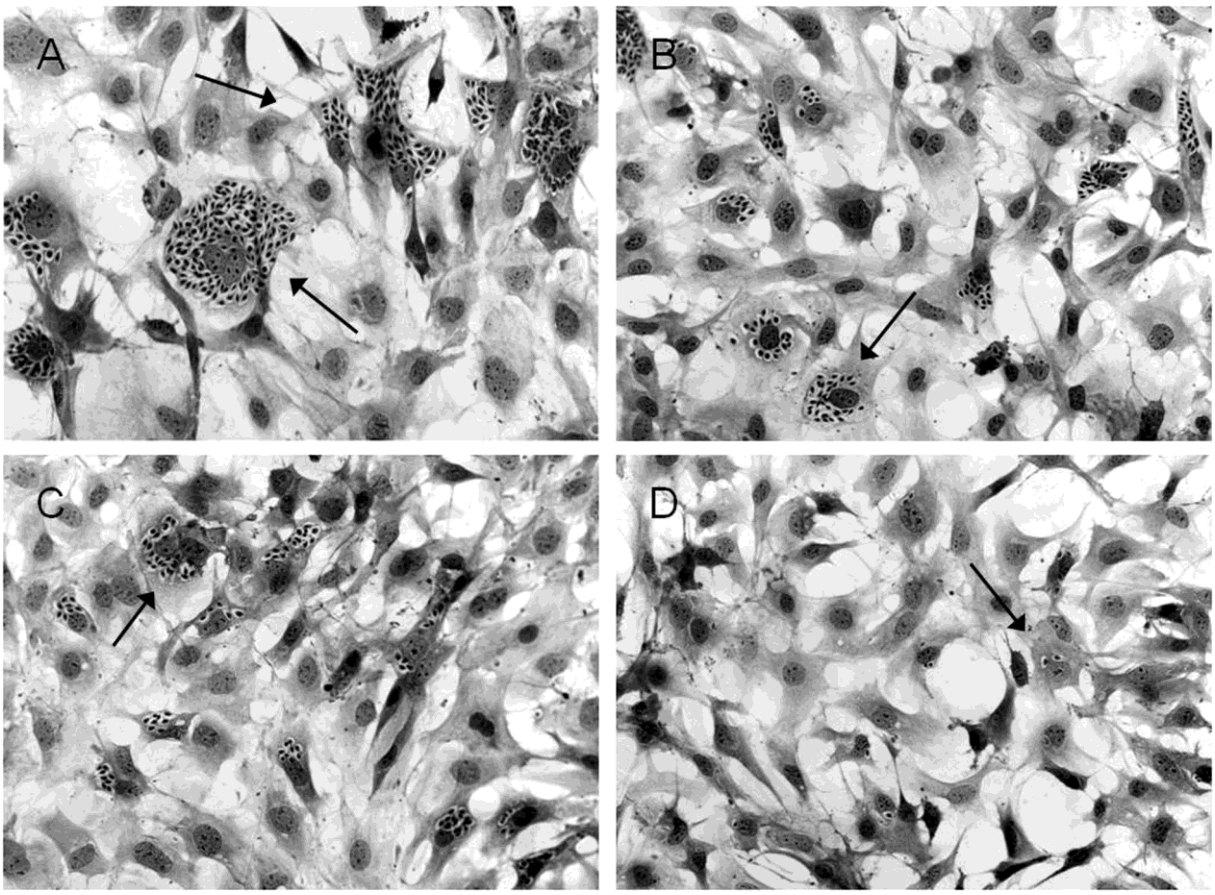


Fig. 47. Análisis mediante microscopía óptica de cultivos de CC infectados durante 24 h con *T. cruzi* cepa Y (A) y posteriormente tratados 48 h con 6,25 μM (B), 12,50 μM (C) y 25 μM (D) del derivado **VATR3**. Las flechas negras señalan algunas de las CC infectadas con amastigotes.

3.1.1.7. Microscopía electrónica de transmisión

Con el fin de iniciar estudios orientados a conocer el mecanismo de acción de los 5-nitroindazoles, se realizaron pruebas de microscopía electrónica de transmisión (MET). A pesar de ser inactivos frente a TS, éstos se eligieron por ser la forma extracelular de *T. cruzi* rutinariamente empleada en el LBC/IOC/Fiocruz para las pruebas de cribado farmacológico.

Las Fig. 48 y 49 muestran los daños ultraestructurales ocasionados en TS tras 2 y 24 h (37 ºC y 5% CO_2) de tratamiento con la CI_{50}/24 h de **VATR1** y **VATR3** (Tabla 11). Tras 2 h de incubación, los TS no tratados (Fig. 48A) mostraron una morfología típica, apreciándose el núcleo (N), retículo endoplasmático (ER) y una única mitocondria (M) con el característico kinetoplasto (K) redondeado. Por el contrario, los TS tratados con BZ inmediatamente presentaron una intensa vacuolización (Fig. 48B–C, estrella blanca). Cuando los parásitos se trataron con **VATR1** y **VATR3**, la mayor parte del N y el ADNk permanecieron inalterados (Fig. 48D–E), incluso tras 24 h de incubación (Fig. 49A, C y E). No obstante, después de 2 h de tratamiento las alteraciones más evidentes (estrellas negras) fueron la presencia de ER

dilatado (Fig. 48E) y la desorganización del aparato de Golgi (Fig. 48F), además de la separación de la membrana plasmática (Fig. 48D–E y 49A, flechas negras) y de la envoltura nuclear (Fig. 48E, recuadro flecha blanca). Algunos TS presentaron su mitocondria hinchada, reflejo de una pérdida de integridad, especialmente los tratados con **VATR3** (Fig. 49C, flechas blancas). Por otra parte, se observó como los TS tratados con ambos derivados mostraron una importante liberación de contenido citoplasmático a nivel de la bolsa flagelar, mediada por la formación de membranas (Fig. 49A y C), así como pronto se observó un gran número de vesículas intracelulares en el tratamiento con **VATR1** (Fig. 48D) y **VATR3** (Fig. 48E–F) y de perfiles de ER (doble flecha negra) rodeando la mitocondria (Fig. 49C) y el núcleo (Fig. 49E) tras periodos de incubación mayores.

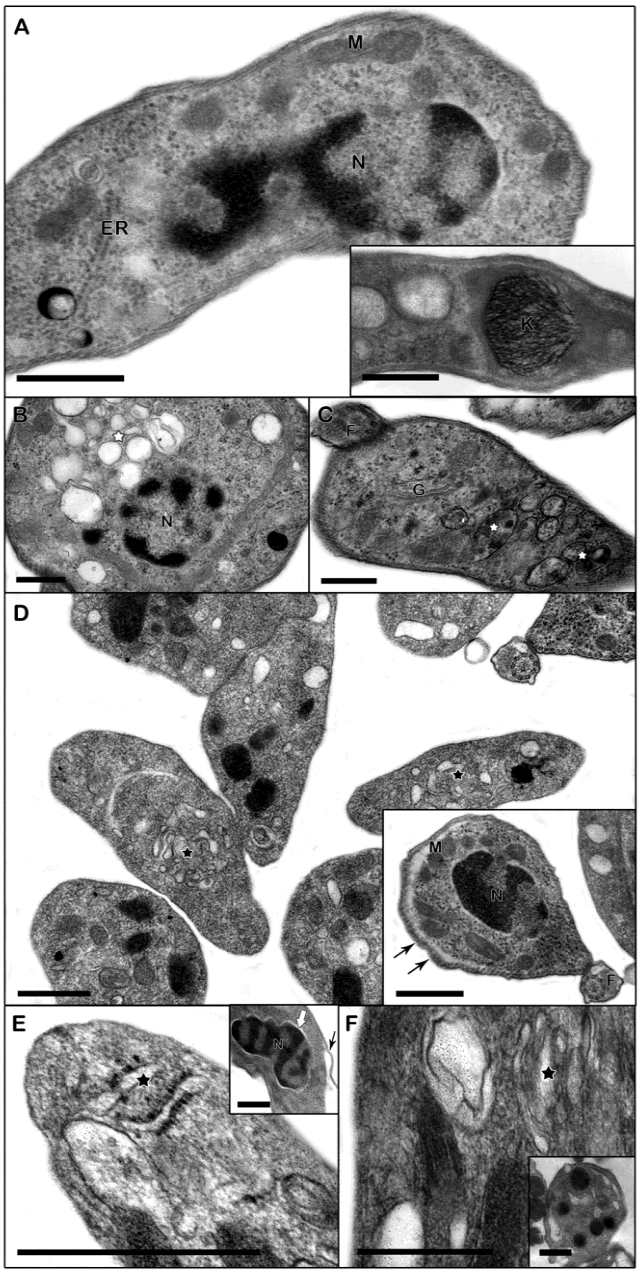


Fig. 48. Alteraciones ultraestructurales producidas en TS de *T. cruzi* cepa Y tras 2 h de tratamiento: (A) los parásitos no tratados mostraron la morfología típica de TS, (B–C) los TS tratados con BZ presentaron una intensa vacuolización (estrella blanca), (D) el tratamiento de los TS con **VATR1** provocó la separación de la membrana plasmática (flechas negras) y la aparición de vesículas intracelulares, (E–F) el tratamiento con **VATR3** mostró perfiles dilatados de ER y una desorganización del aparato de Golgi (estrellas negras) además de la separación de la membrana plasmática (flecha negra) y de la envoltura nuclear (flecha blanca).

M: mitocondria, N: núcleo, ER: retículo endoplasmático, K: kinetoplasto, F: flagelo, G: aparato de Golgi.

Barras = 0,5 µm.

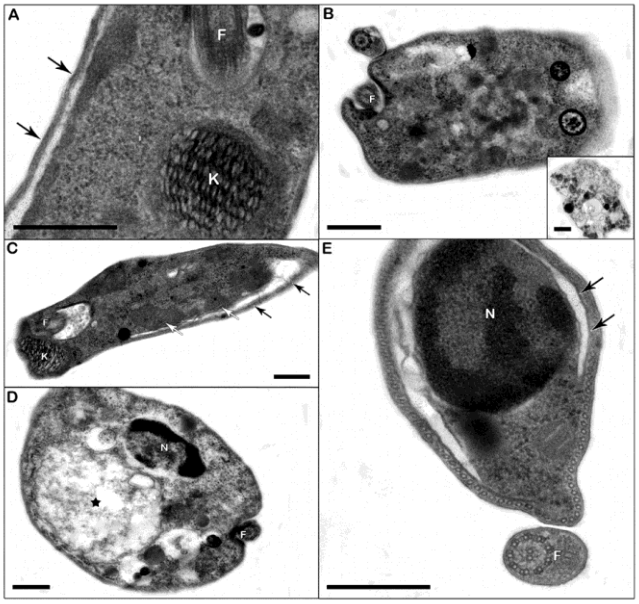


Fig. 49. Alteraciones ultraestructurales producidas en TS de *T. cruzi* cepa Y tras 24 h de tratamiento: (A–B) los TS tratados con **VATR1** presentaron una separación de la membrana plasmática (flechas negras), (C–E) los TS tratados con **VATR3** mostraron afectación a nivel de la mitocondria (doble flecha blanca) y perfiles de ER rodeando la mitocondria y el núcleo (doble flecha negra).

M: mitocondria, N: núcleo, ER: retículo endoplasmático, K: kinetoplasto, F: flagelo, G: aparato de Golgi.

Barras = 0,5 μm.

3.1.1.8. Respirometría

Con el propósito de estudiar si la mitocondria de *T. cruzi* se encuentra dentro de las posibles dianas sobre las que actúan los 5-nitroindazoles, se llevó a cabo un estudio de respirometría en el que se registró el consumo de O_2 de TS tratados con concentraciones crecientes de **VATR1** y **VATR3** durante un periodo de 2 h.

Es importante destacar que las concentraciones con las que se trataron los parásitos fueron las CI_{50} definidas en el ensayo de actividad en TS tras 24 h de tratamiento (Tabla 11). Estas concentraciones no provocan un efecto lítico sobre los TS durante las 2 h de transcurso del ensayo (CI_{50}/2 h **VATR1** y **VATR3** > 250 μM). De esta manera, cualquier efecto registrado sobre el consumo de O_2 es debido a una acción directa de los compuestos sobre la mitocondria y no a una disminución en la población de TS.

Los porcentajes de inhibición en el consumo de O_2 se recogen en la Fig. 50. En ella se observa como el tratamiento durante 20 min con **VATR1** 101 μM y con **VATR3** 66 μM (1/2 CI_{50}), no supuso una gran inhibición en el consumo de O_2 de los TS (0,50 y 5,20%, respectivamente). De nuevo estabilizado el flujo de O_2 en la cámara, se añadió 1/2 CI_{50} de los derivados, alcanzándose de esta manera los respectivos valores de CI_{50} (**VATR1** = 202 μM y **VATR3** = 132 μM). Tras completar las 2 h de tratamiento, **VATR1** inhibió el consumo de O_2 en un 19,83% (P < 0,05), mientras que **VATR3** lo hizo en un 31,79% (P < 0,05). Finalmente, el consumo de O_2 experimentó un fuerte bloqueo con la adición de antimicina A 22 μM (58,15 y 55,35% para **VATR1** y **VATR3**, respectivamente), indicando que la captación de O_2 se debe al proceso de respiración mitocondrial.

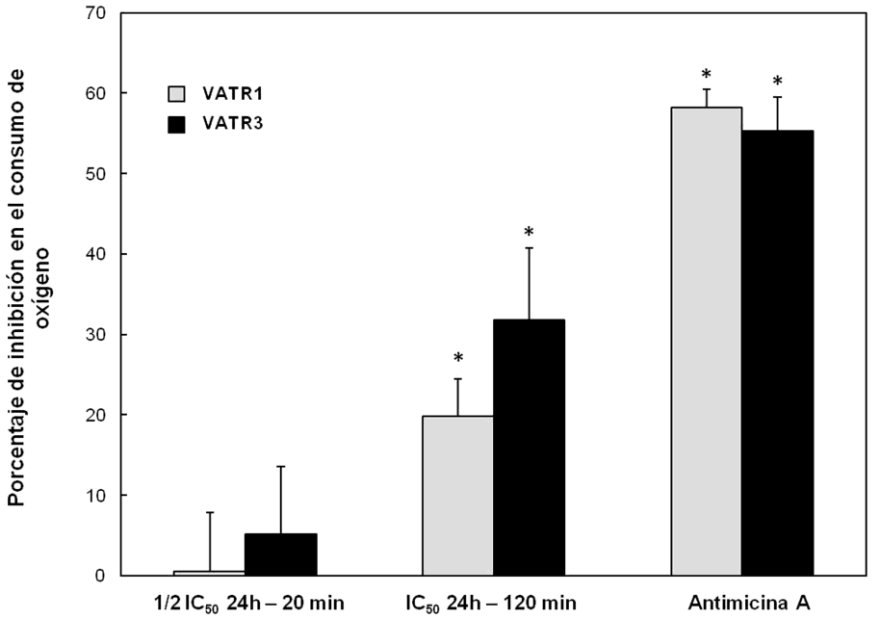


Fig. 50. Inhibición en el consumo de O_2 de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y tratados durante un periodo de 2 h con concentraciones crecientes de **VATR1** y **VATR3**. * Indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control, test U de Mann-Whitney.

3.1.1.9. Citometría de flujo

Los resultados obtenidos en el análisis de citometría de flujo realizado con el marcador TMRE se recogen en la Tabla 12 y en la Fig. 51. El tratamiento por 2 h con la CI_{50} de **VATR1** y **VATR3** produjo una mayor pérdida en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en comparación con el control, siendo ésta más evidente en la población tratada con **VATR1** ($P < 0,05$). No obstante, tanto en las muestras tratadas como sin tratar, la población afectada aumentó significativamente a las 24 h de incubación ($P < 0,05$). De esta manera, tras completar las 24 h de tratamiento, ca. 75% de la población tratada con **VATR3** presentó despolarización de la membrana mitocondrial ($P < 0,05$), observándose en casi el 100% de la tratada con **VATR1** ($P < 0,05$), similar a lo ocurrido en el control positivo de muerte celular, constituido por TS sometidos a choque térmico (2 h, 56 ºC).

Tabla 12. Porcentaje de la población de tripomastigotes sanguíneos que experimentó despolarización de la membrana mitocondrial. Los resultados se expresan como la media ± SD (n = 3).

Incubación	Control	Control +	VATR1	VATR3
2 h	22,75 ± 4,69	92,77 ± 9,44 *	59,23 ± 0,13 *	32,91 ± 9,75
24 h	42,06 ± 7,72 #	94,09 ± 5,25 *	96,34 ± 2,76 *#	72,79 ± 12,84 *#

* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control, test U de Mann-Whitney. # Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a las 2 h de incubación, test U de Mann-Whitney.

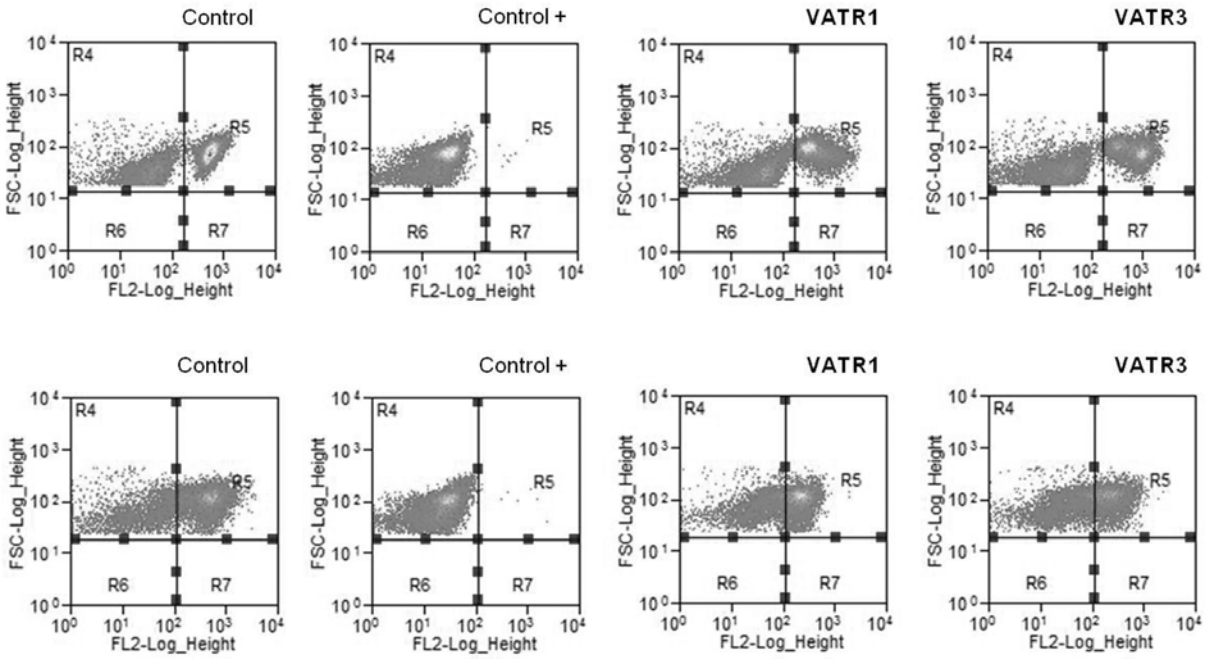


Fig. 51. Resultados del análisis de citometría de flujo realizado con el marcador TMRE en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y. De izquierda a derecha: control (sin tratamiento), control positivo (choque térmico, 2 h 56 ºC) y tratados con la CI_{50}/24 h de **VATR1** y **VATR3** durante 2 (arriba) y 24 h (abajo) a 37 ºC.

3.1.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE *T. cruzi* DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL, SERIE II

A continuación se muestran los resultados de actividad *in vitro* de los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie II, sintetizada por el Dr. Vicente J. Arán (Instituto de Química Médica, CSIC) y cuyas estructuras se encuentran detalladas en el apartado 2.1.7.2.

3.1.2.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Siguiendo nuestro esquema de trabajo, se evaluó la actividad de estas 11 moléculas sobre epimastigotes pertenecientes a la cepa CL-B5 *lacZ* y se determinó su perfil de citotoxicidad en fibroblastos L929 tras 48 h de tratamiento. La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos en este *screening* primario, donde 5 moléculas (**VATR106**–**108**, **VATR110** y **VATR114**) mejoraron la CI_{50} del BZ ($P < 0,05$). Por otra parte, tan solo 3 derivados (**VATR107**, **VATR108** y **VATR113**) resultaron más tóxicos sobre L929 que el fármaco de referencia ($P < 0,05$), lo que supuso una notable selectividad hacia epimastigotes para **VATR106**, **VATR108**, **VATR110, VATR111** y **VATR114**. Debido a que la mayor parte de las moléculas presentaron CI_{90} > 256 μM, únicamente se determinó la potencia de **VATR106**–**108** y **VATR110**, siendo sus valores de CI_{90} sustancialmente mejores ($P < 0,05$) que el del BZ (CI_{90} > 256 μM).

Tabla 13. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) de los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie II, expresados como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada (256 μM), CI_{50} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3).

Compuesto	%AE	CI_{50} (μM)[a]	CI_{90} (μM)[a]	%C_{L929}	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]	PR_{BZ}[c]
VATR106	92,83 ± 4,89	1,00 ± 0,01 *	24,58 ± 9,04 *	15,98 ± 10,92	> 256	> 256	> 10,42
VATR107	91,96 ± 1,60	8,75 ± 2,78 *	59,23 ± 5,47 *	66,42 ± 8,19	51,85 ± 6,04 *	5,93	> 4,32
VATR108	93,62 ± 3,28	7,64 ± 0,28 *	87,05 ± 17,16 *	64,44 ± 14,43	162,12 ± 26,00 *	21,22	> 2,94
VATR109	76,62 ± 1,57	26,57 ± 2,35	> 256	40,57 ± 5,17	> 256	> 9,63	–
VATR110	93,52 ± 2,74	1,76 ± 0,04 *	41,70 ± 2,84 *	7,52 ± 13,03	> 256	> 145,45	> 6,14
VATR111	63,63 ± 2,96	20,63 ± 10,18	> 256	4,97 ± 4,32	> 256	> 12,41	–
VATR112	49,36 ± 6,87	44,19 ± 12,85	> 256	23,34 ± 6,06	> 256	> 5,79	–
VATR113	88,75 ± 3,40	45,48 ± 11,09	> 256	48,66 ± 28,17	101,06 ± 17,64 *	2,22	–
VATR114	86,70 ± 4,75	7,38 ± 0,60 *	> 256	32,34 ± 19,10	> 256	> 34,69	–
VATR115	12,14 ± 10,69	> 256	> 256	43,92 ± 8,56	> 256	–	–
VATR118	11,75 ± 12,29	> 256	> 256	10,08 ± 3,47	> 256	–	–
BZ	77,35 ± 9,24	25,22 ± 1,57	> 256	10,08 ± 3,47	> 256	> 10,15	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto).* Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al BZ, test U de Mann-Whitney. Sólo se indican para aquellos compuestos que muestran un aumento de actividad, potencia o toxicidad con respecto al fármaco de referencia.

3.1.2.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares

De acuerdo con los resultados obtenidos en el *screening* primario, 5 moléculas superaron el *cut-off* de selectividad establecido por el BZ (IS >10), siendo éstas sometidas a un posterior ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares de la cepa CL-B5 *lacZ.*

Los resultados de actividad de **VATR106**, **VATR108**, **VATR110, VATR111** y **VATR114** se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Actividad frente a amastigotes de los derivados de 5-nitroindazol (serie II) seleccionados en el cribado primario, expresada como CI_{50} (μM) y CI_{90} (μM). Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3). Los índices de selectividad (IS) y potencias relativas (PR_{BZ}) también fueron calculados.

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CI_{90} (μM)[a]	IS[b]	PR_{BZ}[c]
VATR106	1,04 ± 0,15	1,63 ± 0,19	> 246,15	0,67
VATR108	5,23 ± 1,02	7,33 ± 0,06	31,00	0,15
VATR110	1,36 ± 0,11	2,05 ± 0,32	> 188,23	0,54
VATR111	3,33 ± 0,71	7,18 ± 0,14	> 76,87	0,15
VATR114	6,17 ± 0,59	ND[d]	> 41,49	–
BZ	0,57 ± 0,09	1,10 ± 0,13	> 449,12	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [d] No determinado. [b] Índice de selectividad en amastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto).* Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al BZ, test U de Mann-Whitney. Sólo se indican para aquellos compuestos que muestran un aumento de actividad o potencia con respecto al fármaco de referencia.

A este nivel del cribado, ninguno de los compuestos ensayados resultó más activo que el fármaco de referencia. Sin embargo, los 5 derivados mostraron una importante selectividad hacia la forma intracelular de *T. cruzi*, presentando todos ellos IS > 30 y destacando especialmente los derivados **VATR106** y **VATR110**, cuyos IS fueron mayores de 246,15 y 188,23, respectivamente.

3.1.3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE *T. cruzi* DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL, SERIE III

Sintetizada por el Dr. Vicente J. Arán (Instituto de Química Médica, CSIC), la serie III de derivados de 5-nitroindazol está constituida por 38 moléculas cuyas estructuras se han detallado en el apartado 2.1.7.3. En esta serie también encontramos varios compuestos con estructura de bisindazol (**VATR90** y **VATR91)** y de quinazolinona (**VATR71–74**), productos secundarios obtenidos en la síntesis de los anteriores.

3.1.3.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y amastigotes intracelulares. Pruebas de citotoxicidad inespecífica

Con respecto al ensayo de actividad frente a epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ*, 15 nitroindazolinonas (**VATR75**, **VATR77**, **VATR82**, **VATR84**, **VATR85**, **VATR87**, **VATR89**, **VATR92**, **VATR93**, **VATR98**, **VATR127**, **VATR131**, **VATR136**, **VATR138** y **VATR141**) mejoraron significativamente la actividad del BZ ($P < 0,05$). Sin embargo, diversas 5-nitroindazolinonas (**VATR86**, **VATR129**, **VATR143** y **VATR144**) y 5-nitroindazoles (**VATR76**, **VATR128**, **VATR137** y **VATR147**), así como los compuestos con estructura de bisindazol (**VATR90**–**91**) y de quinazolinona (**VATR71**–**74),** no fueron activos frente a la forma extracelular. Por otro lado, cabe mencionar que 13 derivados fueron más potentes que el BZ ($P < 0,05$), destacando **VATR75**, **VATR98** y **VATR127** (Tabla 15).

De acuerdo con nuestro criterio de selección, 14 derivados superaron el *cut-off* de selectividad hacia epimastigotes establecido por el BZ (IS > 10), siendo posteriormente evaluados frente a amastigotes intracelulares de la misma cepa. Varias indazolinonas 1,2-disustituidas (**VATR75**, **VATR85**, **VATR89**, **VATR127** y **VATR131**), mejoraron la actividad del BZ ($P < 0,05$) sobre la forma intracelular de *T. cruzi*, así como la selectividad y potencia de dicho fármaco de referencia (Tabla 16).

Tabla 15. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) de los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie III, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada (256 μM), CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3).

Compuesto	%AE	CI_{50} (μM)[a]	CI_{90} (μM)[a]	%C_{L929}	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]	PR_{BZ}[c]
VATR69	89,62 ± 4,47	26,17 ± 11,31	> 256	49,31 ± 20,04	128,89 ± 10,32 *	4,92	–
VATR71	63,32 ± 8,59	216,34 ± 14,99	> 256	6,89 ± 11,94	> 256	> 1,18	–
VATR72	10,24 ± 9,06	> 256	> 256	33,18 ± 8,72	> 256	–	–
VATR73	34,39 ± 25,22	> 256	> 256	63,95 ± 4,42	205,14 ± 17,32	< 0,80	–
VATR74	5,22 ± 4,64	> 256	> 256	19,19 ± 17,27	> 256	–	–
VATR75	96,22 ± 1,77	1,58 ± 0,06 *	13,93 ± 1,28 *	34,44 ± 5,68	> 256	> 162,02	> 18,30
VATR76	53,91 ± 3,82	> 256	> 256	30,17 ± 10,17	> 256	–	–
VATR77	93,08 ± 3,22	11,14 ± 0,59 *	82,46 ± 9,48 *	99,71 ± 0,25	78,07 ± 8,02 *	7,01	> 3,10
VATR78	86,76 ± 18,72	25,05 ± 1,75	> 256	45,89 ± 13,02	> 256	> 10,09	–
VATR82	92,75 ± 2,58	9,19 ± 1,20 *	26,27 ± 2,08 *	44,66 ± 8,23	> 256	> 27,86	> 9,74
VATR83	87,43 ± 0,83	30,98 ± 3,94	> 256	38,14 ± 14,17	> 256	> 8,26	–
VATR84	93,64 ± 1,06	13,29 ± 0,92 *	146,60 ± 18,83 *	27,48 ± 15,31	> 256	> 19,26	> 1,75
VATR85	89,16 ± 6,14	3,86 ± 0,37 *	> 256	22,04 ± 12,72	> 256	> 66,32	–
VATR86	6,42 ± 7,57	> 256	> 256	0,49 ± 0,84	> 256	–	–
VATR87	85,59 ± 2,74	2,13 ± 0,72 *	> 256	14,79 ± 6,19	> 256	> 120,19	–
VATR88	37,28 ± 22,83	> 256	> 256	25,64 ± 11,64	> 256	–	–
VATR89	91,36 ± 3,01	2,75 ± 0,09 *	124,45 ± 2,28 *	86,48 ± 18,83	160,46 ± 14,89 *	58,35	> 2,06
VATR90	10,37 ± 12,90	> 256	> 256	17,12 ± 15,41	> 256	–	–
VATR91	0,17 ± 0,24	> 256	> 256	16,86 ± 19,46	> 256	–	–
VATR92	93,93 ± 3,36	4,19 ± 0,95 *	79,00 ± 17,61 *	62,42 ± 5,23	192,36 ± 21,85 *	45,91	> 3,24
VATR93	90,06 ± 8,62	10,79 ± 4,80 *	63,49 ± 16,84 *	64,29 ± 5,22	195,27 ± 9,70 *	18,10	> 4,03
VATR94	87,04 ± 5,04	49,01 ± 14,58	> 256	63,50 ± 1,46	122,03 ± 15,98 *	2,49	–
VATR95	88,00 ± 10,95	43,59 ± 5,41	> 256	85,96 ± 11,64	86,06 ± 13,66 *	1,97	–
VATR98	98,78 ± 2,11	2,90 ± 0,37 *	13,89 ± 1,23 *	99,88 ± 0,22	25,19 ± 3,16 *	8,69	> 18,43
VATR103	62,53 ± 26,21	39,04 ± 13,42	> 256	66,65 ± 15,36	59,04 ± 4,61 *	1,51	–

Tabla 15. Continuación.

VATR126	88,60 ± 3,26	64,91 ± 8,34	> 256	41,78 ± 9,68	> 256	> 3,94	–
VATR127	96,71 ± 1,76	1,68 ± 0,36 *	11,71 ± 1,84 *	43,28 ± 10,97	> 256	> 152,38	> 21,86
VATR128	12,83 ± 6,94	> 256	> 256	47,45 ± 0,19	> 256	–	–
VATR129	8,30 ± 2,23	> 256	> 256	0,00 ± 0,00	> 256	–	–
VATR131	85,26 ± 8,35	5,43 ± 1,89 *	61,93 ± 16,27 *	12,72 ± 6,22	> 256	> 47,14	> 4,13
VATR136	95,51 ± 1,01	6,56 ± 0,87 *	46,55 ± 13,32 *	17,05 ± 10,86	> 256	> 39,02	> 5,50
VATR137	13,21 ± 1,86	> 256	> 256	27,19 ± 9,62	> 256	–	–
VATR138	98,02 ± 1,94	6,57 ± 0,27 *	43,87 ± 5,24 *	70,82 ± 4,45	170,41 ± 9,94 *	25,94	> 5,83
VATR141	90,74 ± 1,69	11,66 ± 2,13 *	113,26 ± 9,38 *	16,59 ± 6,26	> 256	> 21,95	> 2,26
VATR143	21,35 ± 19,97	> 256	> 256	37,06 ± 6,58	> 256	–	–
VATR144	24,31 ± 19,97	> 256	> 256	89,89 ± 6,57	145,52 ± 6,10 *	< 0,57	–
VATR145	83,19 ± 3,47	28,76 ± 2,67	> 256	26,37 ± 7,16	> 256	> 8,90	–
VATR147	77,73 ± 2,03	144,71 ± 9,30	> 256	41,16 ± 7,81	> 256	> 1,77	–
BZ	84,83 ± 3,70	22,73 ± 3,33	> 256	20,42 ± 4,25	> 256	> 11,26	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). * Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al BZ, test U de Mann-Whitney. Sólo se indican para aquellos compuestos que muestran un aumento de actividad, potencia o toxicidad con respecto al fármaco de referencia.

Tabla 16. Actividad frente a amastigotes de los derivados de 5-nitroindazol (serie III) seleccionados en el cribado primario, expresada como CI_{50} (μM) y CI_{90} (μM). Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3). Los índices de selectividad (IS) y potencias relativas (PR_{BZ}) también fueron calculados.

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CI_{90} (μM)[a]	IS[b]	PR_{BZ}[c]	Compuesto	CI_{50} (μM)	CI_{90} (μM)	IS	PR_{BZ}
VATR75	0,22 ± 0,06 *	0,47 ± 0,01 *	>1163,64	4,00	**VATR93**	3,02 ± 0,55	ND	64,66	–
VATR78	25,36 ± 4,50	ND[d]	> 10,09	–	**VATR127**	0,25 ± 0,12 *	0,85 ± 0,05 *	> 1024	2,21
VATR82	2,93 ± 1,68	6,85 ± 0,48	> 87,37	0,27	**VATR131**	0,25 ± 0,14 *	0,82 ± 0,06 *	> 1024	2,92
VATR84	1,50 ± 0,23	3,51 ± 0,01	> 170,67	0,53	**VATR136**	2,29 ± 0,79	6,19 ± 0,60	> 111,79	0,30
VATR85	0,54 ± 0,04 *	1,49 ± 0,54	> 474,07	1,26	**VATR138**	3,31 ± 0,52	ND	51,48	–
VATR87	1,14 ± 0,14	1,89 ± 0,14	> 224,56	0,99	**VATR141**	3,50 ± 0,83	7,10 ± 0,15	> 73,4	< 0,26
VATR89	0,47 ± 0,10 *	1,17 ± 0,42	341,40	1,61	**BZ**	0,68 ± 0,08	1,88 ± 0,07	> 376,47	–
VATR92	1,58 ± 0,60	3,70 ± 0,25	121,75	0,51					

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en amastigotes ($IS = CL_{50}/CI_{50}$). [c] Potencia relativa a BZ ($PR_{BZ} = CI_{90}$ BZ/CI_{90} compuesto). [d] No determinado. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al BZ, test U de Mann-Whitney. Sólo se indican para aquellos compuestos que muestran un aumento de actividad o potencia con respecto al fármaco de referencia.

3.1.3.2. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

Los resultados de las Tablas 15 y 16, señalan a **VATR75** como el derivado más activo de la serie III frente a la cepa CL-B5 (CI_{50} epimastigotes = 1,58 ± 0,06 μM y CI_{50} amastigotes = 0,22 ± 0,06 μM), presentando además una destacable selectividad y potencia. Dado su excelente perfil tripanocida, **VATR75** se sometió a posteriores ensayos de actividad *in vitro*, realizados durante la estancia en el LBC/IOC/Fiocruz.

- **Citotoxicidad en cultivos primarios de células cardíacas y en fibroblastos L929. Pruebas de actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de las cepas Tulahuen *lacZ* e Y y sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y**

La Tabla 17 muestra los resultados de citotoxicidad de **VATR75** sobre CC tras 24 y 48 h, así como sobre L929 a las 96 h de incubación. Asimismo, la Tabla 18 presenta su actividad sobre amastigotes intracelulares de las cepas Tulahuen C4 e Y y sobre TS de la cepa Y.

El derivado **VATR75** tampoco presentó toxicidad sobre cultivos de CC ni tras 96 h de incubación con células L929 (CL_{50} > 100 μM). Por otra parte, los resultados de actividad obtenidos en amastigotes, confirman su potencial actividad frente a otras cepas de *T. cruzi*, alcanzando valores de CI_{50} = 0,81 ± 0,29 μM (cepa Tulahuen) y CI_{50} = 0,60 ± 0,03 μM (cepa Y), siendo además más selectivo y potente que el BZ. La Fig. 52 muestra el perfil de actividad de esta molécula tras tratar durante 48 h cultivos primarios de CC infectados con *T. cruzi* cepa Y. Por el contrario, el compuesto **VATR75** no fue activo sobre TS tras 2 y 24 h de tratamiento (CI_{50} > 250 μM).

Tabla 17. Citotoxicidad (%C) de **VATR75** en CC y L929, expresada como porcentaje a la mayor concentración ensayada (100 μM) y CL_{50} (μM). Los resultados son la media ± SD (n = 2 para CC y n = 3 para L929).

VATR75	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C[a]	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CM	1,32 ± 0,36	> 100	3,95 ± 2,80	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	29,77 ± 1,03	> 100
BZ	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CM	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	43,52 ± 2,79	> 100

[a] 100 μM para todos los ensayos.

Tabla 18. Actividad de **VATR75** en amastigotes intracelulares (cepas Tulahuen C4 *lacZ* e Y) y tripomastigotes sanguíneos (cepa Y), expresada como la media de CI_{50} (μM) y la media de CI_{90} (μM) ± SD (n = 3).

VATR75	**CI_{50} (μM)[a]**	**CI_{90} (μM)[a]**	**IS[b]**	**PR_{BZ}[c]**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	0,81 ± 0,29 *	4,39 ± 1,69 *	> 123,46	2,19
Amastigotes cepa Y	0,60 ± 0,03	1,34 ± 0,27	> 166,67	4,82
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	> 250	> 250	ND[d]	< 0,09
BZ	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	1,66 ± 0,10	9,63 ± 0,37	> 60,24	–
Amastigotes cepa Y	1,77 ± 1,11	6,46 ± 1,34	> 56,50	–
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	7,71 ± 0,58	22,75 ± 1,15	> 12,97	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ / CI_{90} compuesto). [d] No determinado. * Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al BZ, test de Kruskal-Wallis.

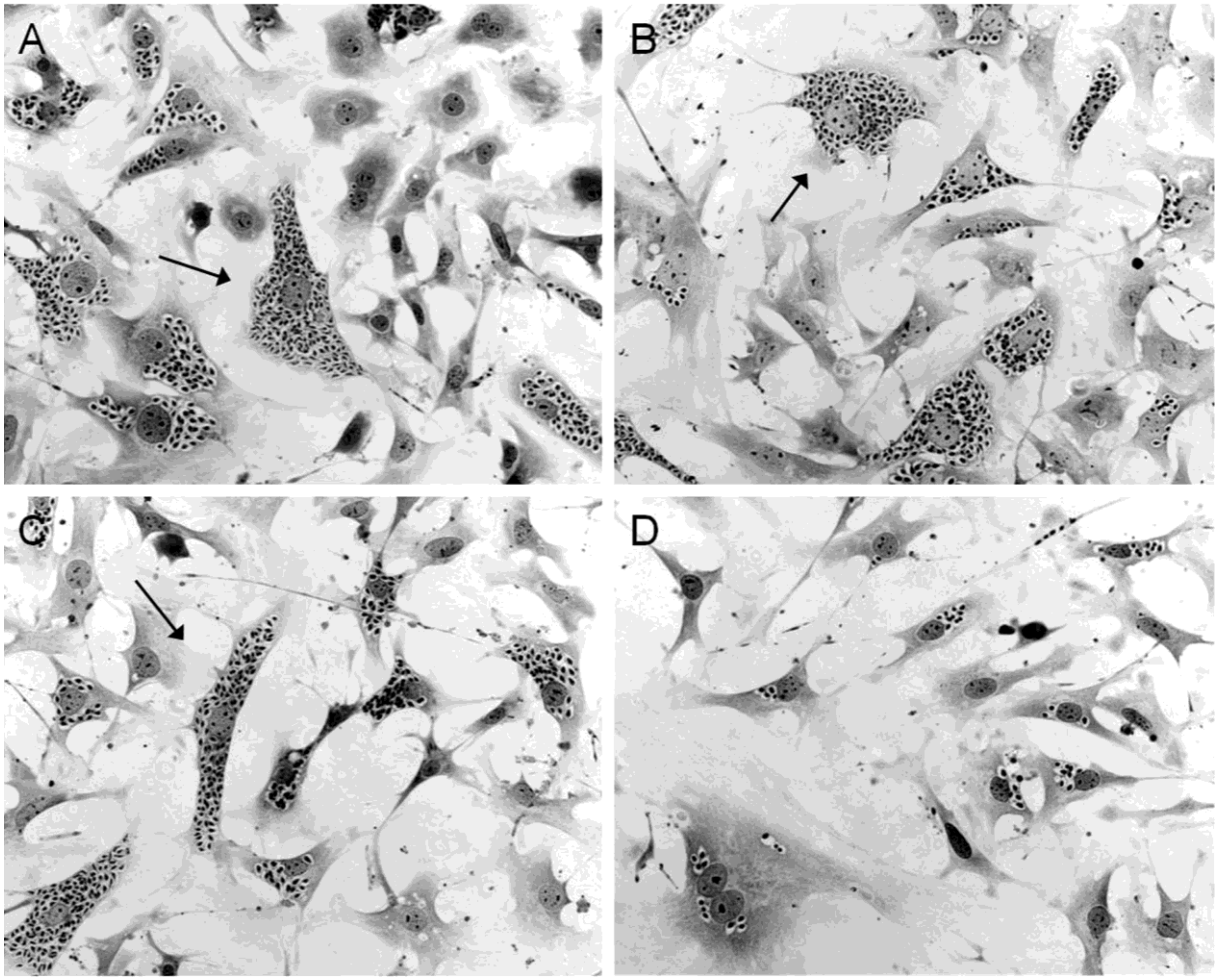


Fig. 52. Análisis mediante microscopía óptica de cultivos de CC infectados durante 24 h con *T. cruzi* Y (A) y posteriormente tratados 48 h con 0,19 μM (B), 0,39 μM (C) y 0,78 μM (D) del derivado **VATR75**. Las flechas negras señalan algunas de las CC infectadas con amastigotes.

3.1.3.3. Ensayos de toxicidad aguda *in vivo*

De acuerdo con los excelentes resultados de actividad *in vitro*, se estudió la eficacia del derivado **VATR75** en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda. Previamente, se evaluó su toxicidad aguda *in vivo* con el fin de determinar el NOAEL (*no observed adverse effect level*) de este compuesto y fijar la dosis a administrar en el ensayo de actividad.

Con respecto a los ensayos de toxicidad aguda y como se detalló en el apartado 2.1.8.8., **VATR75** fue administrado cada 2 h vía oral (p.o.) e i.p., a grupos de hembras Swiss (23–25 g) a las que se realizó el seguimiento hasta 48 h después de finalizar el tratamiento. Paralelamente y por cada vía de administración, se incluyó un grupo al que se administró únicamente el vehículo (10% DMSO en agua destilada estéril), así como un grupo control de ratones sin tratar.

Tabla 19. Toxicidad aguda – Dosis crecientes de **VATR75** (comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar 200 mg/kg) administradas vía oral (p.o.) e i.p. (0,1 mL/dosis).

VATR75	12,5 mg/kg[a]	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	NOAEL
VATR75 p.o.	NED[b]	NED	–	–	–	ND[c]
10% DMSO p.o.	NED	NED	–	–	–	–
VATR75 i.p.	NED	NED	–	–	–	ND
10% DMSO i.p.	NED	NED	–	–	–	–

[a] Se refieren a dosis acumulativas en ratón (DA). [b] Ningún efecto detectable. [c] No determinado. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en dos experimentos independientes (n = 2).

Es importante destacar que el compuesto **VATR75** sufrió problemas de solubilidad a la hora de preparar dosis mayores de 12,5 mg/kg. Por este motivo, se interrumpió su administración tras la segunda dosis, habiéndose alcanzado una DA = 25 mg/kg y resultando por tanto imposible determinar el NOAEL para este compuesto, considerando en cualquier caso que para **VATR75** éste se encuentra por encima de los 25 mg/kg (Tabla 19).

Asimismo, se estudiaron las alteraciones que pudiera producir **VATR75** sobre el peso de los ratones y de sus órganos internos (corazón, bazo, hígado y riñón), así como otras alteraciones cualitativas como su apariencia o cambios en el color de los órganos internos. También se tomaron muestras de sangre y suero de cada animal y se procedió con su análisis hematológico (Tabla 20) y bioquímico (Tabla 21), respectivamente. Todos los análisis se llevaron a cabo a partir de muestras tomadas de dos ensayos de toxicidad aguda independientes (n = 2), siendo los resultados la media ± SD.

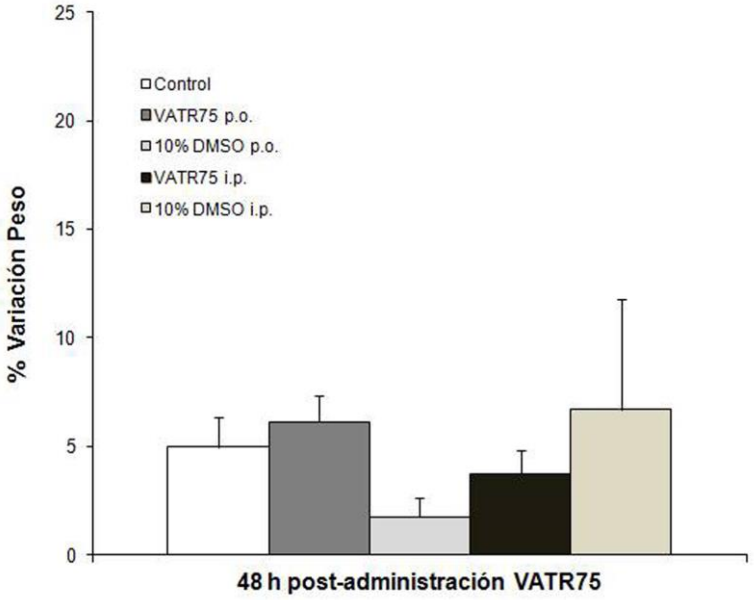


Fig. 53. Variación en el peso de ratones hembra Swiss de 23–25 g tratados p.o. e i.p. con la DA de **VATR75** (25 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2).
* Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis.

La administración de 25 mg/kg del compuesto **VATR75** no dio lugar a signos evidentes de toxicidad aguda durante las 48 h posteriores a su administración tanto p.o. como i.p. (Tabla 19), ni provocó pérdida de peso en los ratones tratados (Fig. 53).

No se observaron alteraciones en el peso y en la apariencia de los órganos internos (Fig. 54). Únicamente se apreció un ligero aumento en el peso normalizado del hígado para los grupos control de vehículo p.o. y **VATR75** i.p., relacionado con el menor incremento de peso en los ratones de ambos grupos. Los órganos extraídos durante la necropsia se conservaron en tampón Milloning-Rosman para su posterior estudio histológico.

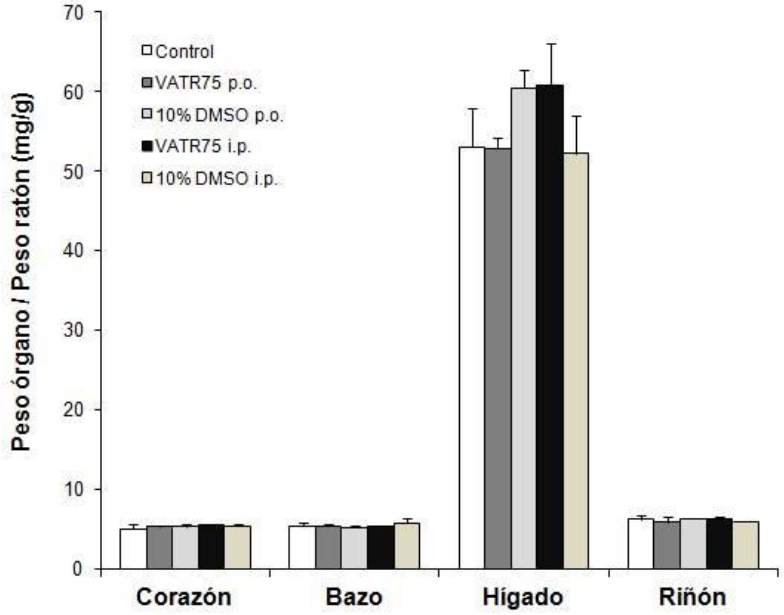


Fig. 54. Relación entre el peso de los órganos extraídos (mg) y el peso del animal (g) a las 48 h de administrar p.o. e i.p. la DA de **VATR75** (25 mg/kg). Los resultados son la media ± SD de dos experimentos (n = 2).
* Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis.

Tabla 20. Toxicidad aguda – Hemograma realizado a las 48 h de administrar **VATR75** (CECAL/Fiocruz) (n = 1, debido a una hemólisis de las muestras).

VATR75	GR (10^6/mL)	HGB (g/dL)	Hct (%)	VCM (fm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	GB ($10^3/mm^3$)	P ($10^3/mm^3$)
25 mg/kg p.o.	7,99 ± 0,55	13,10 ± 0,57	46,50 ± 2,55	58,20 ± 0,85	16,40 ± 0,42	28,20 ± 0,28	9,35 ± 2,90	1356,50 ± 210,01
Vehículo p.o.	8,49 ± 0,21	14,25 ± 0,21	49,88 ± 0,53	58,80 ± 0,85	16,80 ± 0,14	28,58 ± 0,11	11,45 ± 1,63	1328,25 ± 297,34
25 mg/kg i.p.	9,11 ± 0,59	14,75 ± 1,06	52,80 ± 4,95	57,90 ± 1,70	16,20 ± 0,14	27,95 ± 0,64	12,20 ± 0,57	1205,00 ± 48,08
Vehículo i.p.	9,12 (n = 1)	14,13 (n = 1)	52,50 (n = 1)	57,60 (n = 1)	15,70 (n = 1)	27,20 (n = 1)	10,40 (n = 1)	952,00 (n = 1)
Control	8,26 ± 0,60	13,80 ± 0,42	49,33 ± 2,88	59,70 ± 0,85	16,72 ± 0,78	27,98 ± 0,93	10,13 ± 1,51	1313,33 ± 94,28

Vehículo (10% DMSO en agua). GR: glóbulos rojos, HGB: hemoglobina, Hct: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media, GB: glóbulos blancos, P: plaquetas. * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

Tabla 21. Toxicidad aguda – Análisis bioquímico realizado a las 48 h de administrar **VATR75** (CECAL/Fiocruz).

VATR75	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	G (mg/dL)	U (mg/dL)	C (mg/dL)	Alb (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	CHO (mg/dL)	Fe (mg/dL)
25 mg/kg p.o.	152,00 ± 4,24	7,75 ± 0,35	186,75 ± 27,93	52,23 ± 4,63	0,13 ± 0,04	2,58 ± 0,32	203,00 ± 18,38	284 ± 227,69	87,25 ± 3,89	273,00 ± 8,49
Vehículo p.o.	152,00 ± 1,41	9,15 ± 0,78	226,50 ± 22,63	59,58 ± 10,85	0,10 ± 0,00	2,73 ± 0,04	716,50 ± 47,38 *	734,00 (n =1)	94,00 ± 13,44	293,50 ± 7,78
25 mg/kg i.p.	148,00 ± 2,83	8,55 ± 0,21	225,75 ± 25,10	58,40 ± 10,11	0,13 ± 0,04	2,68 ± 0,32	481,00 (n = 1)	380,00 ± 90,51	90,50 ± 12,73	265,00 ± 16,26
Vehículo i.p.	150,00 (n = 1)	10,55 (n = 1)	234,25 ± 13,08	62,53 ± 6,47	0,10 ± 0,00	2,75 ± 0,14	127,00 (n = 1)	89,00 (n = 1)	80,50 ± 0,71	308,00 ± 26,87
Control	147,00 ± 0,00	8,90 ± 2,26	212,50 ± 9,19	62,09 ± 1,93	0,10 ± 0,00	2,65 ± 0,14	427,13 ± 87,86	480,38 ± 164,58	79,88 ± 2,65	302,96 ± 10,90

Vehículo (10% DMSO en agua). Na: sodio, K: potasio, G: glucosa, U: urea, C: creatinina, AST: Asp-aminotransferasa, ALT: Ala-aminotransferasa, CHO: colesterol, Fe: hierro. * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

Como se muestra en la Tabla 20, todos los valores obtenidos en el hemograma de los animales a los que se administró el derivado **VATR75** o el vehículo, ya fuera p.o. o i.p., fueron similares a los que presentó el grupo control de animales sin tratar ($P > 0,05$). De la misma manera, los resultados derivados del análisis bioquímico (Tabla 21) no mostraron diferencias significativas con respecto a los del grupo control de animales sin tratar ($P > 0,05$). Tan sólo los niveles de aminotransferasas (AST y ALT) fueron elevados en el grupo al que se le administró vehículo p.o. ($P < 0,05$). En conjunto, todos estos resultados sugieren que el derivado **VATR75** no presenta toxicidad aguda *in vivo* y en consecuencia, se fijó en 25 mg/kg/día la dosis más alta a evaluar en el posterior ensayo de eficacia *in vivo*.

3.1.3.4. Actividad *in vivo*

Finalmente, se evaluó la actividad del derivado **VATR75** en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda en el que se ensayaron dosis de 25, 12,5 y 6,25 mg/kg/día, administradas oral e intraperitonealmente. Además, se incluyó un grupo tratado con 100 mg/kg/día de BZ (p.o.), un grupo de animales infectados sin tratar y un grupo control de animales sin infectar. En este ensayo, los ratones macho Swiss infectados fueron tratados con dos dosis de **VATR75**, administradas en el 5º y el 8º d.p.i. (días de inicio y de máxima parasitemia, respectivamente).

Durante el transcurso de la fase aguda, se controló la parasitemia de los animales hasta el 30º d.p.i. (Fig. 55 y 58), se registró diariamente la mortalidad hasta el 30º día post-tratamiento (Fig. 56 y 59) y se evaluó semanalmente el peso de los ratones (Fig. 57 y 60).

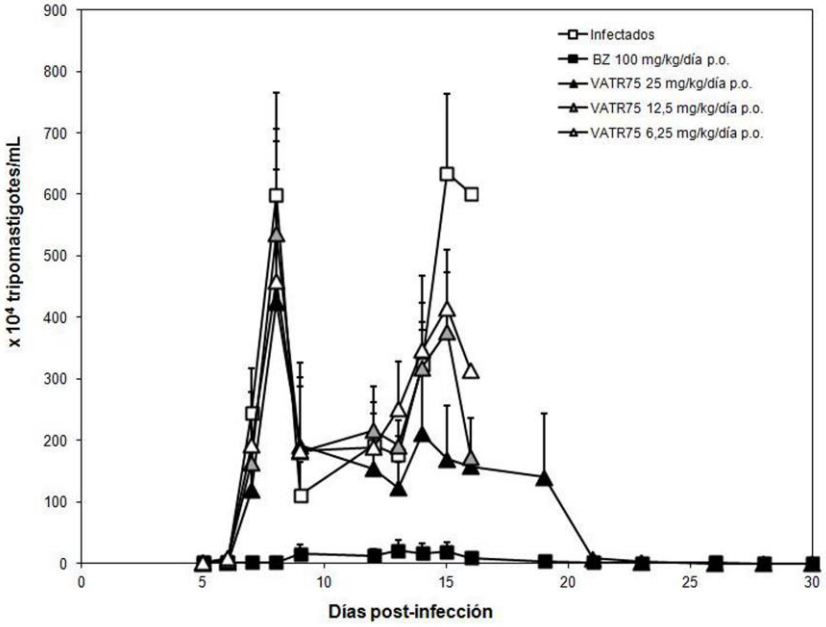


Fig. 55. Tratamiento con **VATR75** administrado p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva expresa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

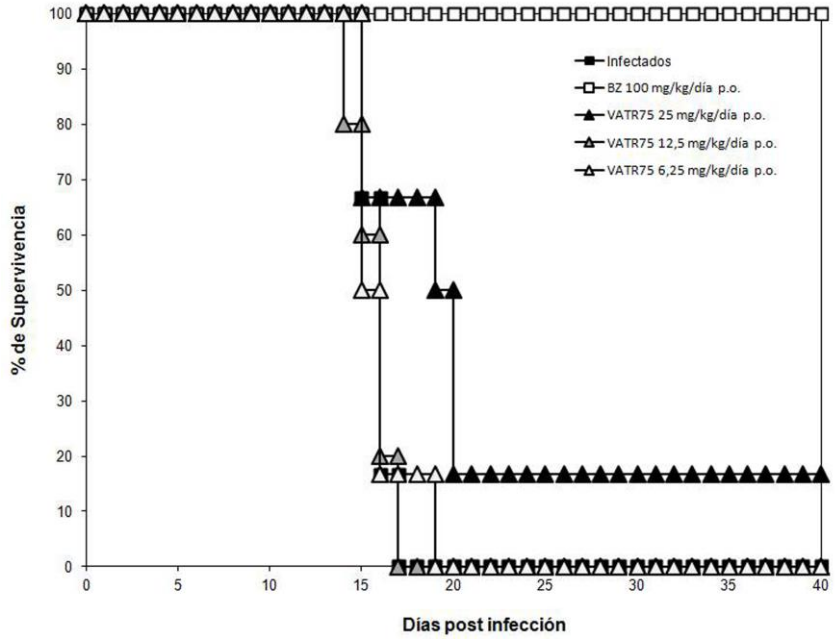


Fig. 56. Tratamiento con **VATR75** p.o**.** el 5º y 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

La administración de **VATR75** p.o. redujo la parasitemia tras la primera dosis, alcanzando el 8º d.p.i. un 30% de reducción con la dosis de 25 mg/kg/día (Fig. 55 y 61). Dicho grupo presentó una supervivencia del 16,67% al final de la fase aguda (Fig. 56). Asimismo, los grupos tratados con este derivado sufrieron una pérdida de peso a partir del 7º d.p.i., significativa en el 14º d.p.i. ($P < 0,05$). A partir del 21º d.p.i., se observó una recuperación en el peso de los animales supervivientes (n = 1 en el grupo tratado con 25 mg/kg/día y n = 6 en el grupo tratado con BZ (Fig. 57).

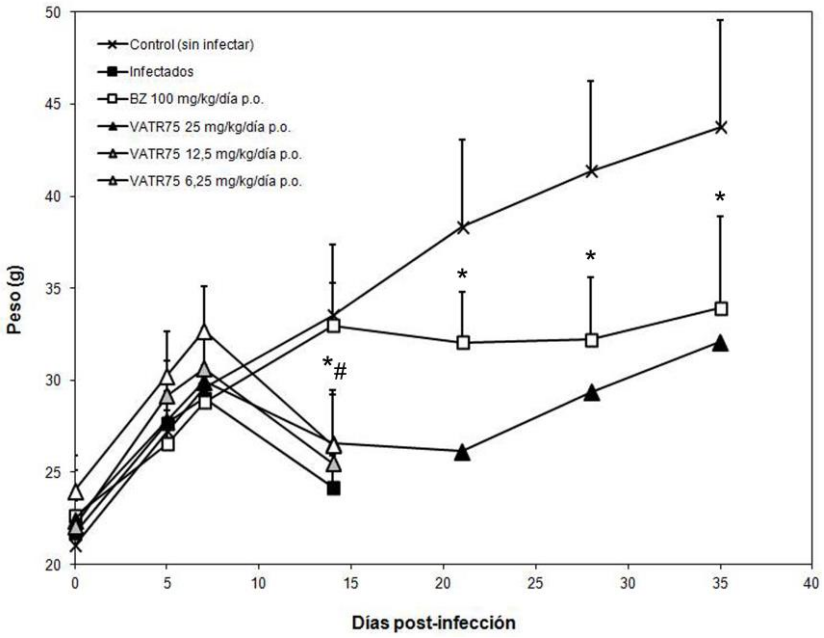


Fig. 57. Tratamiento con **VATR75** p.o. en el 5º y 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones.
* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

Con respecto al tratamiento realizado vía i.p., se observó una reducción de la parasitemia en el 8º d.p.i que fue mayor (ca. 30%) cuanto menor fue la dosis de **VATR75** administrada (Fig. 58 y 61). Sin embargo, ninguno de los animales tratados superó la fase aguda de la enfermedad (Fig. 59).

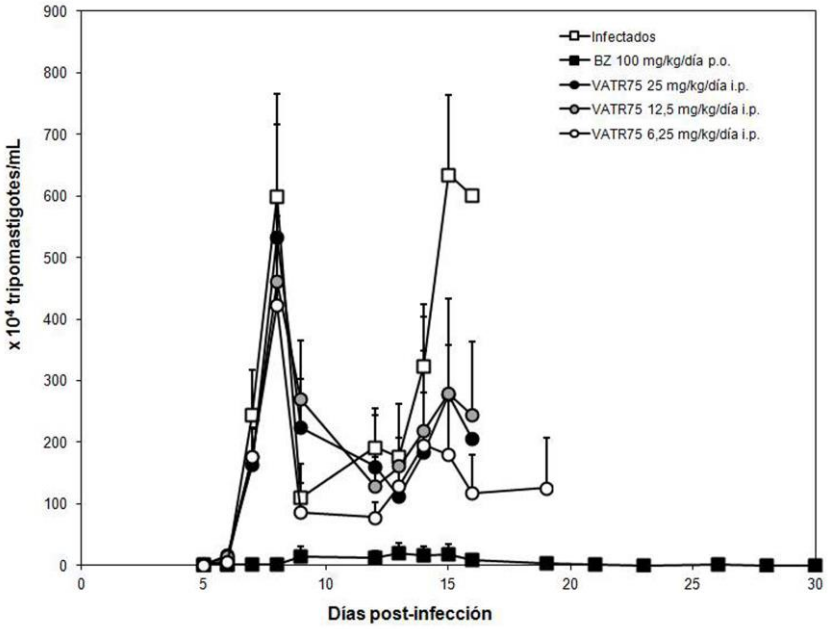


Fig. 58. Tratamiento con **VATR75** administrado vía i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

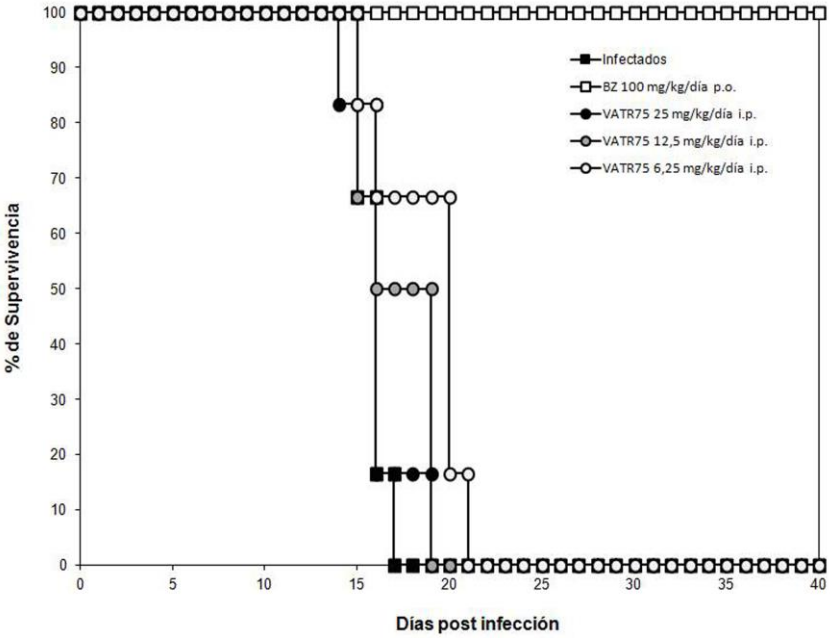


Fig. 59. Tratamiento con **VATR75** vía i.p. el 5º y 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

De manera similar a lo ocurrido con el tratamiento administrado p.o., los ratones a los que se administró el derivado **VATR75** vía i.p. sufrieron una pérdida de peso a partir del

7º d.p.i., de nuevo significativa en el 14º d.p.i. ($P < 0,05$) observándose un comportamiento semejante al del grupo de animales infectados (Fig. 60).

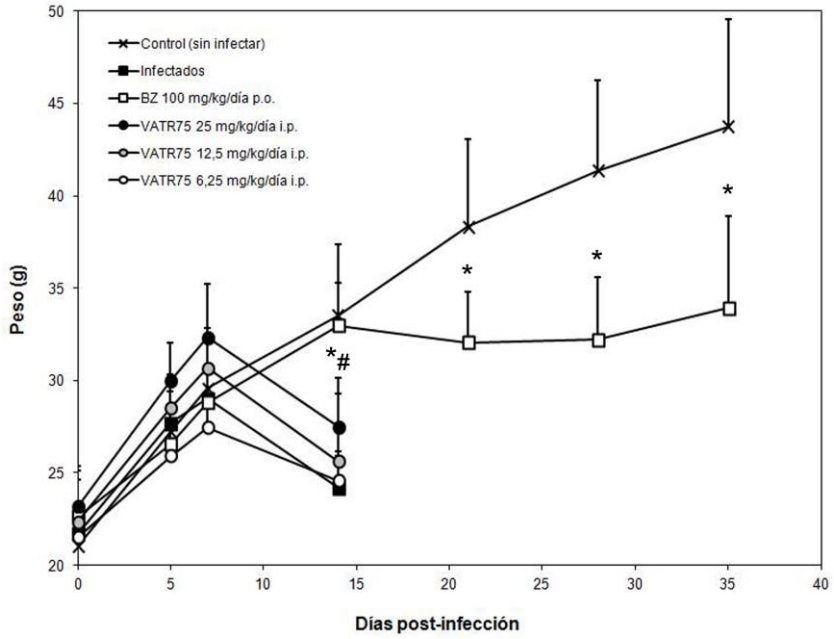


Fig. 60. Tratamiento con **VATR75** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

Finalmente, la Fig. 61 compara los resultados obtenidos con **VATR75** en el día de máxima parasitemia. Como se ha comentado anteriormente, la administración de 25 mg/kg/día p.o. y de 6,25 mg/kg/día vía i.p. produjo ca. 30% de reducción en el 8º d.p.i. Sin embargo, la eficacia de ambos tratamientos no fue significativa, a diferencia del BZ ($P < 0,05$).

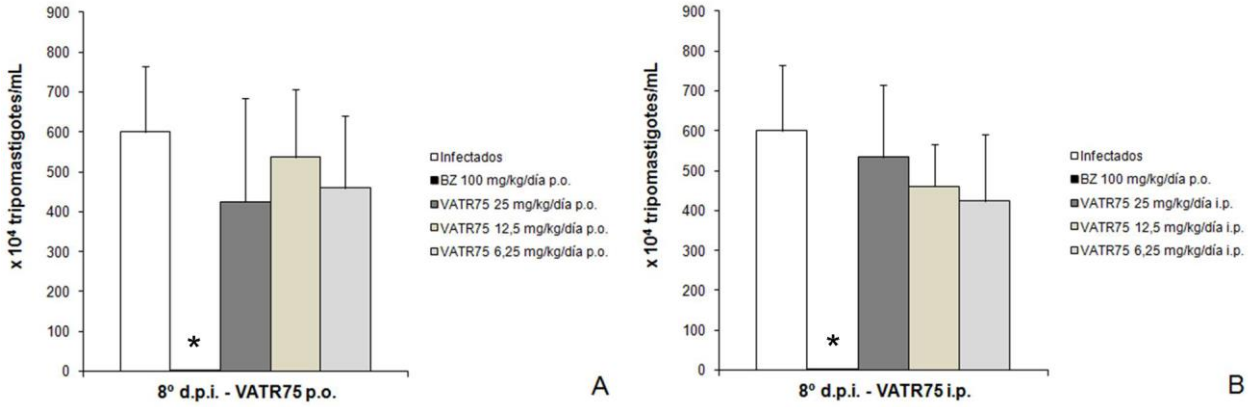


Fig. 61. Repercusión del tratamiento realizado con **VATR75** p.o. (A) e i.p. (B) sobre los niveles de parasitemia del 8º d.p.i. (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA.

3.1.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE *T. cruzi* DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL, SERIE IV

La serie IV de derivados de 5-nitroindazol está constituida por las 19 moléculas sintetizadas por el Dr. Vicente J. Arán (Instituto de Química Médica, CSIC), que se comentan en el apartado 2.1.7.4. de esta memoria.

En esta serie, encontramos 2-bencil-5-nitroindazolinonas 1-sustituidas (**VATR79–81**, **VATR99–102**, **VATR116**, **VATR120** y **VATR122**), 2-bencil-5-nitroindazoles 3-sustituidos (**VATR97**, **VATR117**, **VATR123** y **VATR130**), y 3-alquilamino-2-bencil-5-nitroindazoles (**VATR96**, **VATR104**, **VATR105**, **VATR121** y **VATR124**).

3.1.4.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Siguiendo nuestro esquema secuencial de cribado, en un primer lugar se evaluó la actividad de los derivados sobre epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ* tras 72 h de tratamiento y se determinó su perfil de citotoxicidad *in vitro* en células L929 a las 48 h de incubación.

Los resultados obtenidos en el cribado primario (Tabla 22) muestran cómo 12 de las 19 moléculas obtuvieron mejores resultados de actividad sobre epimastigotes que el BZ. Esta mejora fue significativa ($P < 0,05$) para 7 de estos derivados, todos ellos con estructura de nitroindazolinona (**VATR79**, **VATR81**, **VATR99–102** y **VATR120**), mostrando además una importante selectividad hacia epimastigotes. Los derivados **VATR99–101** y **VATR120** fueron los más activos frente a esta forma extracelular de *T. cruzi*, obteniendo CI_{50} = 0,24–0,94 μM e IS = 110,49–677,74. Cabe señalar además a **VATR81** y **VATR120** como los compuestos más potentes de la serie ($P < 0,05$), no pudiéndose por el contrario determinar el valor de CI_{90} para los derivados **VATR99**, **VATR100** y **VATR102**. De otra manera, los ftalimido-derivados **VATR116–117** y **VATR122–123**, con el grupo amino enmascarado, fueron los compuestos menos activos. Con respecto a los derivados de 3-alquilamino-5-nitroindazol, ninguno mostró actividad destacable. A excepción de **VATR121**, estos últimos compuestos además resultaron tóxicos para células L929 ($P < 0,05$), en comparación con el fármaco de referencia.

3.1.4.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares

El ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares de la cepa CL-B5 *lacZ* se realizó para 9 moléculas, de entre las cuales **VATR99**, **VATR100** y **VATR120** obtuvieron el mejor perfil de actividad ($CI_{50} < 1$ μM e IS > 342) y resultaron de 2 a 4 veces más potentes que el BZ (Tabla 23).

Tabla 22. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) de derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a la serie IV, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada (256 μM), CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3).

Compuesto	%AE	CI_{50} (μM)[a]	CI_{90} (μM)[a]	%C_{L929}	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]	PR_{BZ}[c]
VATR79	91,00 ± 1,46	10,63 ± 0,18 *	255,58 ± 0,97	17,82 ± 8,79	> 256	> 24,08	> 1
VATR80	89,70 ± 1,85	23,36 ± 5,89	> 256	4,51 ± 6,16	> 256	> 10,96	–
VATR81	96,34 ± 6,02	10,09 ± 3,55 *	24,62 ± 1,09 *	50,85 ± 3,77	250,31 ± 9,86	24,81	> 10,40
VATR96	90,36 ± 4,97	58,47 ± 2,12	210,51 ± 25,92	63,77 ± 7,33	159,29 ± 2,61 *	2,72	> 1,22
VATR97	93,62 ± 3,04	41,76 ± 6,59	192,80 ± 18,48 *	94,07 ± 7,94	126,59 ± 17,32 *	3,03	> 1,33
VATR99	96,69 ± 0,57	0,24 ± 0,12 *	ND[d]	87,80 ± 10,56	161,36 ± 22,55 *	672,33	–
VATR100	94,76 ± 5,71	0,50 ± 0,19 *	ND	53,37 ± 1,42	242,91 ± 6,23	485,82	–
VATR101	88,59 ± 2,01	0,94 ± 0,05 *	> 256	68,82 ± 13,23	103,86 ± 31,97 *	110,49	–
VATR102	91,04 ± 7,83	16,95 ± 0,79 *	ND	26,72 ± 8,06	> 256	> 15,10	–
VATR104	95,47 ± 4,50	13,43 ± 8,24	55,10 ± 17,37 *	59,27 ± 7,26	200,65 ± 27,70 *	14,94	> 4,65
VATR105	95,06 ± 4,28	31,76 ± 1,32	102,01 ± 7,75 *	95,94 ± 2,18	100,58 ± 13,70 *	3,17	> 2,51
VATR116	62,09 ± 4,15	89,73 ± 6,07	> 256	2,23 ± 3,86	> 256	> 2,85	–
VATR117	0,00 ± 0,00	> 256	> 256	3,35 ± 3,32	> 256	–	–
VATR120	98,65 ± 2,34	0,35 ± 0,00 *	7,45 ± 3,23 *	55,20 ± 7,96	237,21 ± 27,93	677,74	> 34,36
VATR121	91,31 ± 1,13	22,46 ± 1,91	81,50 ± 5,21 *	41,63 ± 9,27	> 256	> 11,40	> 3,14
VATR122	11,72 ± 10,39	> 256	> 256	6,05 ± 8,55	> 256	–	–
VATR123	0,00 ± 0,00	> 256	> 256	13,52 ± 19,07	> 256	–	–
VATR124	81,47 ± 16,15	17,55 ± 6,90	> 256	70,53 ± 14,75	113,00 ± 18,47 *	6,44	–
VATR130	98,78 ± 1,30	14,07 ± 2,67	51,00 ± 8,16 *	99,37 ± 0,15	102,32 ± 8,12 *	7,27	> 5,02
BZ	82,14 ± 5,66	26,55 ± 4,53	> 256	13,13 ± 0,83	> 256	> 9,64	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [d] No determinado. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al BZ, test U de Mann-Whitney. Sólo se indican para aquellos compuestos que muestran un aumento de actividad, potencia o toxicidad con respecto al fármaco de referencia.

Tabla 23. Actividad frente a amastigotes de los derivados de 5-nitroindazol (serie IV) seleccionados en el cribado primario, expresada como CI_{50} (μM) y CI_{90} (μM). Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± SD (n = 3). Los índices de selectividad (IS) y potencias relativas (PR_{BZ}) también fueron calculados.

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CI_{90} (μM)[a]	IS[b]	PR_{BZ}[c]	Compuesto	CI_{50} (μM)	CI_{90} (μM)	IS	PR_{BZ}
VATR79	3,93 ± 1,11	6,97 ± 0,57	> 65,14	0,27	**VATR102**	15,25 ± 2,70	27,73 ± 3,13	> 16,79	0,07
VATR81	4,72 ± 1,04	7,81 ± 0,78	53,03	0,24	**VATR104**	5,52 ± 0,04	7,65 ± 0,25	36,35	0,24
VATR99	0,25 ± 0,13 *	0,45 ± 0,01 *	645,44	4,18	**VATR120**	0,29 ± 0,03 *	0,46 ± 0,00 *	817,96	4,09
VATR100	0,71 ± 0,02	0,79 ± 0,31 *	342,13	2,38	**VATR121**	1,37 ± 0,26	ND[d]	> 186,86	–
VATR101	1,24 ± 0,17	1,82 ± 0,02	83,76	1,03	**BZ**	0,50 ± 0,03	1,88 ± 0,06	> 512	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en amastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [d] No determinado. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al BZ, test U de Mann-Whitney. Sólo se indican para aquellos compuestos que muestran un aumento de actividad o potencia con respecto al fármaco de referencia.

3.1.4.3. Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

De manera similar a como se procedió con las series anteriores, cuatro de las moléculas con actividad más prometedora (**VATR81**, **VATR99**, **VATR100** y **VATR102**) fueron seleccionadas para someterse a ensayos complementarios de actividad *in vitro*, realizados durante la estancia en el LBC/IOC/Fiocruz.

- **Citotoxicidad en cultivos primarios de células cardíacas y en fibrolastos L929**

La Tabla 24 muestra los resultados de citotoxicidad obtenidos sobre cultivos primarios de CC a las 24 y 48 h de tratamiento, así como en células L929 tras 96 h de incubación con los compuestos. Ninguno de los derivados resultó tóxico en estos ensayos (CL_{50} > 100 μM). Únicamente el derivado **VATR81** obtuvo una CL_{50} ligeramente inferior sobre células L929 tras 96 h de tratamiento (CL_{50} = 81,95 ± 14,64 μM).

Tabla 24. Citotoxicidad (%C) en CC y L929 de **VATR81**, **VATR99**, **VATR100 y VATR102**, expresada como porcentaje a la mayor concentración ensayada (100 μM) y CL_{50} (μM). Los resultados son la media ± SD (n = 2 para CC y n = 3 para L929).

VATR81	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C[a]	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CM	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,35	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	59,20 ± 5,73	81,95 ± 14,64
VATR99	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CM	0,00 ± 0,00	> 100	10,42 ± 3,37	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	43,77 ± 4,63	> 100
VATR100	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CM	0,00 ± 0 ,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	41,12 ± 3,42	> 100
VATR102	**24 h**		**48 h**		**96 h**	
	%C	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**	**%C**	**CL_{50} (μM)**
CM	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	33,00 ± 3,50	> 100

Tabla 24. Continuación.

BZ	24 h		48 h		96 h	
	%C	CL_{50} (μM)	%C	LC_{50} (μM)	%C	CL_{50} (μM)
CM	0,00 ± 0,00	> 100	0,00 ± 0,00	> 100	–	–
L929	–	–	–	–	43,52 ± 2,79	> 100

[a] 100 μM para todos los ensayos.

- **Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de las cepas Tulahuen *lacZ* e Y y sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y**

Con respecto a los ensayos de actividad *in vitro* sobre *T. cruzi* (Tabla 25), se confirmó la actividad de estos derivados en amastigotes de las cepas Tulahuen e Y, siendo **VATR99** la molécula más activa sobre la forma intracelular de ambas cepas, seguida de **VATR100**. De la misma manera que para la cepa CL-B5, **VATR102** obtuvo la menor actividad a este nivel. Por el contrario, ninguna de estas moléculas resultó activa frente a TS (CI_{50} 2 h > 250 μM).

Tabla 25. Actividad de **VATR81**, **VATR99**, **VATR100 y VATR102** en amastigotes (cepas Tulahuen C4 *lacZ* e Y) y tripomastigotes sanguíneos (Y), expresada como la media de CI_{50} (μM) y la media de CI_{90} (μM) ± SD (n = 3).

VATR81	**CI_{50} (μM)[a]**	**CI_{90} (μM)[a]**	**IS[b]**	**PR_{BZ}[c]**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 lacZ	10,44 ± 0,39	26,66 ± 5,17	7,84	0,36
Amastigotes cepa Y	5,63 ± 3,84	12,22 ± 0,03	> 17,76	0,53
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	82,09 ± 15,09	> 250	> 1,22	< 0,10
VATR99	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	0,47 ± 0,05 *	1,17 ± 0,39 *	> 212,76	8,23
Amastigotes cepa Y	0,27 ± 0,05	ND[d]	> 370,37	–
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	65,26 ± 17,57	212,97 ± 8,90	> 1,53	0,11
VATR100	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	1,25 ± 0,27	ND	> 80,00	–
Amastigotes cepa Y	0,92 ± 0,21	1,56 ± 0,06	> 108,70	4,14
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	153,58 ± 11,14	241,25 ± 10,69	> 0,65	0,09
VATR102	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	21,09 ± 3,59	> 50	> 4,74	< 0,19
Amastigotes cepa Y	> 25	ND	–	< 0,26
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	168,90 ± 4,23	> 250	> 0,59	< 0,10
BZ	**CI_{50} (μM)**	**CI_{90} (μM)**	**IS**	**PR_{BZ}**
Amastigotes cepa Tulahuen C4 *lacZ*	1,66 ± 0,10	9,63 ± 0,37	> 60,24	–

Tabla 25. Continuación.

Amastigotes cepa Y	1,77 ± 1,11	6,46 ±1,34	> 56,50	–
Tripomastigotes sanguíneos cepa Y	8,01 ± 0,81	22,75 ± 1,15	> 12,48	–

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [d] No determinado. * Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al BZ, test de Kruskal-Wallis.

Basándonos en los resultados de actividad obtenidos *in vitro*, **VATR99** y **VATR100** fueron seleccionados para posteriores ensayos de toxicidad y actividad *in vivo*.

3.1.4.4. Ensayos de toxicidad aguda *in vivo*

Los compuestos se administraron cada 2 h a grupos de ratones hembra Swiss de 23–25 g de peso, a las que se realizó el seguimiento durante las 48 h posteriores. Por cada vía de administración se incluyó un grupo control de vehículo (10% DMSO en agua destilada estéril) y un grupo control sin tratar. La excelente solubilidad de estos derivados en el vehículo, permitió su correcta administración por ambas vías hasta alcanzar una DA = 200 mg/kg. Asimismo, no se registró comportamiento anómalo en los animales como consecuencia del tratamiento, fijándose para **VATR99** y **VATR100** un NOAEL > 200 mg/kg (Tablas 26 y 27).

Tabla 26. Toxicidad aguda – Dosis crecientes de **VATR99** (comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar 200 mg/kg) administradas p.o. e i.p. (0,1 mL/dosis).

VATR99	**12,5 mg/kg[a]**	**25 mg/kg**	**50 mg/kg**	**100 mg/kg**	**200 mg/kg**	**NOAEL**
VATR99 p.o.	NED[b]	NED	NED	NED	NED	> 200 mg/kg
10% DMSO p.o.	NED	NED	NED	NED	NED	–
VATR99 i.p.	NED	NED	NED	NED	NED	> 200 mg/kg
10% DMSO i.p.	NED	NED	NED	NED	NED	–

[a] Se refieren a dosis acumulativas en el ratón (DA). [b] Ningún efecto detectable. [c] No determinado. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en dos experimentos independientes (n = 2).

Tabla 27. Toxicidad aguda – Dosis crecientes de **VATR100** (comenzando en 12,5 mg/kg hasta alcanzar 200 mg/kg) administradas p.o. e i.p. (0,1 mL/dosis).

VATR100	**12,5 mg/kg[a]**	**25 mg/kg**	**50 mg/kg**	**100 mg/kg**	**200 mg/kg**	**NOAEL**
VATR100 p.o.	NED[b]	NED	NED	NED	NED	> 200 mg/kg
10% DMSO p.o.	NED	NED	NED	NED	NED	–
VATR100 i.p.	NED	NED	NED	NED	NED	> 200 mg/kg
10% DMSO i.p.	NED	NED	NED	NED	NED	–

[a] Se refieren a dosis acumulativas en el ratón (DA). [b] Ningún efecto detectable. [c] No determinado. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en dos experimentos independientes (n = 2).

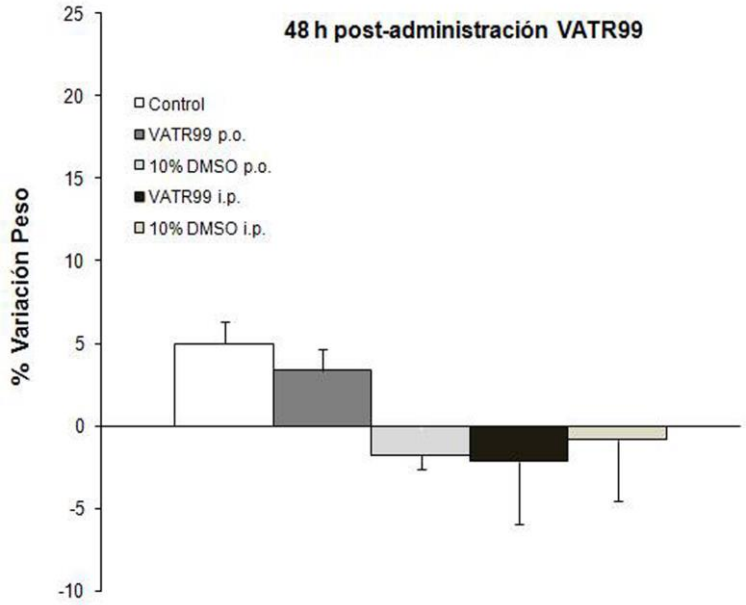


Fig. 62. Variación en el peso de ratones hembra Swiss de 23–25 g tratados p.o. e i.p. con la DA de **VATR99** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2).
* Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis.

Durante las 48 h en las que trascurre el ensayo, los animales tratados con **VATR99** sufrieron una ligera pérdida de peso con su administración vía i.p., similar a la experimentada por los grupos a los que se administró vehículo. Tal impacto no tuvo lugar cuando **VATR99** se administró vía oral (Fig. 62). Asimismo, el análisis realizado durante la necropsia no desveló anomalías en el aspecto y tamaño de los órganos internos (Fig. 63).

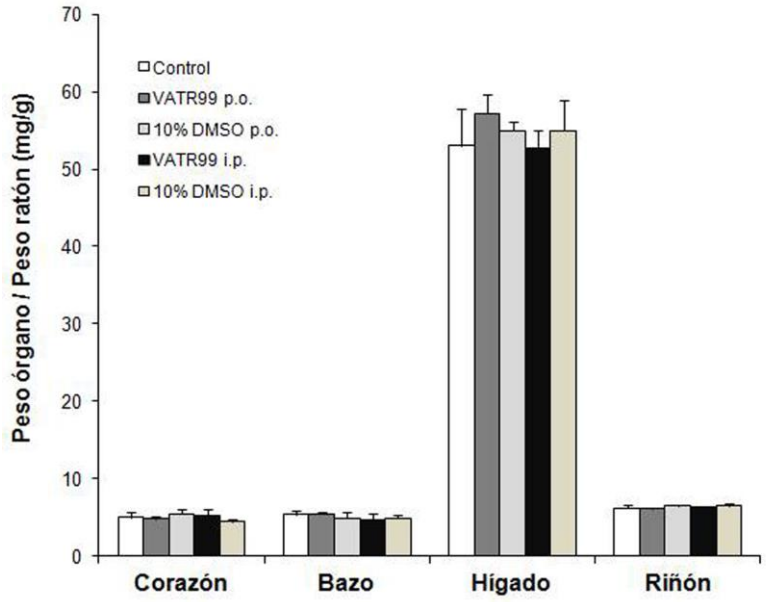


Fig. 63. Relación entre el peso de los órganos extraídos (mg) y el del animal (g) a las 48 h de administrar p.o. e i.p. la DA de **VATR99** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2).
* Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis.

Con respecto a **VATR100**, ninguno de los animales vio afectada su ganancia de peso (Fig. 64) ni se observaron alteraciones importantes en los órganos internos (Fig. 65).

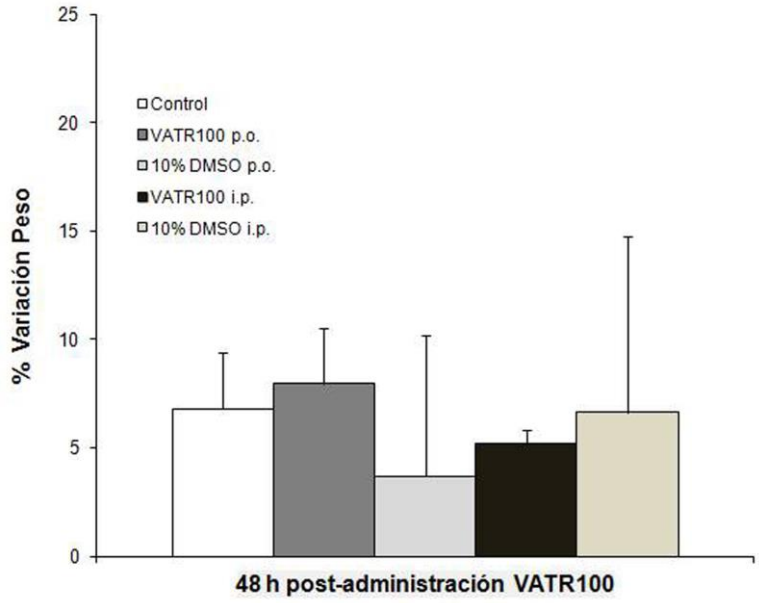


Fig. 64. Variación en el peso de ratones hembra Swiss de 23–25 g tratados p.o. e i.p. con la DA de **VATR100** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2).
* Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis.

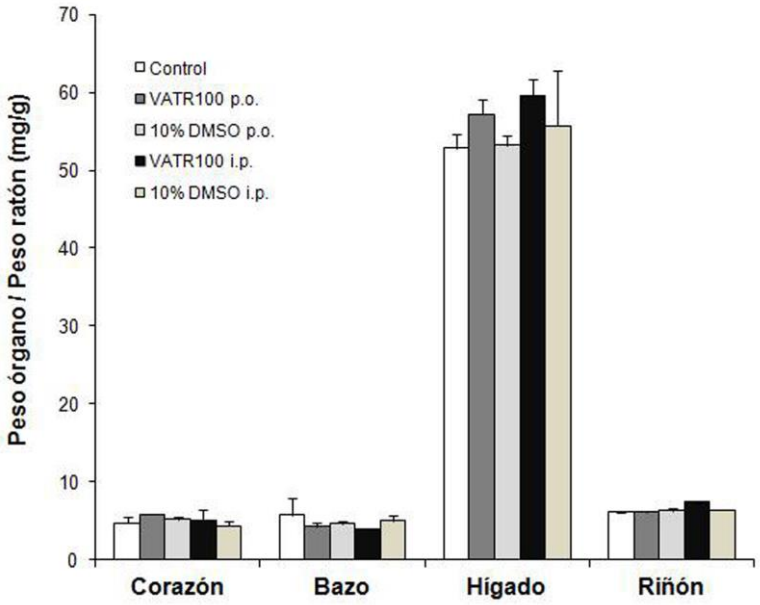


Fig. 65. Relación entre el peso de los órganos extraídos (mg) y el del animal (g) a las 48 h de administrar p.o. e i.p. la DA de **VATR100** (200 mg/kg). Los resultados son la media ± SD (n = 2).
* Diferencias significativas (*P* < 0,05), test de Kruskal-Wallis.

Los resultados del hemograma y análisis bioquímico se recogen en las Tablas 28 y 29 (**VATR99**) y en las Tablas 30 y 31 (**VATR100**). Todos los valores obtenidos en los ratones tratados con **VATR99** fueron similares a los del grupo sin tratar (*P* > 0,05). Con respecto a **VATR100**, sólo se realizó el hemograma para los grupos en los que la administración fue i.p., debido a una hemólisis de las muestras de los grupos p.o. y junto con la bioquímica, tampoco se observaron alteraciones importantes como consecuencia de su administración. El análisis conjunto de todos los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda sugiere que ambos derivados son bien tolerados tanto en su administración tanto i.p. como p.o. y en consecuencia, se procedió a evaluar su actividad en el modelo *in vivo* propuesto.

Tabla 28. Toxicidad aguda – Hemograma realizado a las 48 h de administrar **VATR99** (CECAL/Fiocruz) (n = 1, debido a una hemólisis de las muestras).

VATR99	GR (10^6/mL)	HGB (g/dL)	Hct (%)	VCM (fm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	GB ($10^3/mm^3$)	P ($10^3/mm^3$)
200 mg/kg p.o.	9,19 ± 0,48	12,45 ± 4,03	54,13 ± 0,39	59,00 ± 2,69	16,30 ± 0,28	27,60 ± 0,71	10,13 ± 0,04	1315,50 ± 221,32
Vehículo p.o.	8,68 ± 0,84	14,18 ± 1,31	50,50 ± 4,53	58,20 ± 0,42	16,35 ± 0,07	28,08 ± 0,04	11,50 ± 1,41	1113,00 ± 49,50
200 mg/kg i.p.	8,52 (n = 1)	13,85 (n = 1)	49,45 (n = 1)	58,00 (n = 1)	16,25 (n = 1)	28,00 (n = 1)	12,50 (n = 1)	1246,50 (n = 1)
Vehículo i.p.	9,02 (n = 1)	14,60 (n = 1)	52,00 (n = 1)	57,75 (n = 1)	16,20 (n = 1)	28,10 (n = 1)	11,50 (n = 1)	1304,50 (n = 1)
Control	8,26 ± 0,60	13,80 ± 0,42	49,33 ± 2,88	59,70 ± 0,85	16,72 ± 0,78	27,98 ± 0,93	10,13 ± 1,51	1313,33 ± 94,28

Vehículo (10% DMSO en agua). GR: glóbulos rojos, HGB: hemoglobina, Hct: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media, GB: glóbulos blancos, P: plaquetas. * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

Tabla 29. Toxicidad aguda – Análisis bioquímico realizado a las 48 h de administrar **VATR99** (CECAL/Fiocruz).

VATR99	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	G (mg/dL)	U (mg/dL)	C (mg/dL)	Alb (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	CHO (mg/dL)	Fe (mg/dL)
200 mg/kg p.o.	ND[a]	ND	221,00 ± 25,46	62,35 ± 2,83	0,10 ± 0,00	2,70 ± 0,14	189,50 ± 109,60	166,50 ± 152,03	90,25 ± 3,18	276,00 ± 74,95
Vehículo p.o.	ND	ND	187,25 ± 20,15	61,65 ± 4,53	0,10 ± 0,00	2,78 ± 0,18	300,00 (n = 1)	177,75 ± 76,01	95,00 ± 9,90	281,25 ± 3,89
200 mg/kg i.p.	ND	ND	223,25 ± 26,52	61,83 ± 5,69	0,10 ± 0,00	2,65 ± 0,07	327,75 ± 231,58	332,25 ± 318,55	85,00 ± 6,36	280,75 ± 1,06
Vehículo i.p.	ND	ND	224,25 ± 47,73	64,63 ± 4,14	0,10 ± 0,00	2,60 ± 0,14	175,50 (n = 1)	142,00 ± 26,16	91,50 ± 9,19	263,00 ± 27,58
Control	147,00 ± 0,00	8,90 ± 2,26	212,50 ± 9,19	62,09 ± 1,93	0,10 ± 0,00	2,65 ± 0,14	427,13 ± 87,86	480,38 ± 164,58	79,88 ± 2,65	302,96 ± 10,90

Vehículo (10% DMSO en agua). Na: sodio, K: potasio, G: glucosa, U: urea, C: creatinina, AST: Asp-aminotransferasa, ALT: Ala-aminotransferasa, CHO: colesterol, Fe: hierro. [a] No determinado. * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

Tabla 30. Toxicidad aguda – Hemograma realizado a las 48 h de administrar **VATR100** (CECAL/Fiocruz) (ND debido a una hemólisis de las muestras).

VATR100	GR (10^6/mL)	HGB (g/dL)	Hct (%)	VCM (fm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	GB ($10^3/mm^3$)	P ($10^3/mm^3$)
200 mg/kg p.o.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Vehículo p.o.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
200 mg/kg i.p.	8,54 ± 0,02	13,85 ±0,21	48,55 ± 0,49	31,90 ± 35,78	16,20 ± 0,28	28,50 ± 0,71	14,00 ± 1,41	1616,50 ± 184,55
Vehículo i.p.	8,70 ± 0,61	13,85 ± 0,64	49,05 ± 2,19	56,40 ± 1,41	15,95 ± 0,35	28,25 ± 0,07	14,70 ± 3,54	1485,50 ± 492,85
Control	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Vehículo (10% DMSO en agua). GR: glóbulos rojos, HGB: hemoglobina, Hct: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media, GB: glóbulos blancos, P: plaquetas. * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

Tabla 31. Toxicidad aguda – Análisis bioquímico realizado a las 48 h de administrar **VATR100** (CECAL/Fiocruz).

VATR100	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	G (mg/dL)	U (mg/dL)	C (mg/dL)	Alb (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	CHO (mg/dL)	Fe (mg/dL)
200 mg/kg p.o.	ND[a]	ND	250,50 ± 24,75	68,20 ± 0,00	0,10 ± 0,00	ND	ND	ND	80,00 ± 2,83	ND
Vehículo p.o.	ND	ND	198,00 ± 39,60	57,45 ± 7,28	0,10 ± 0,00	2,60 (n = 1)	ND	97,00 (n = 1)	86,00 ± 16,97	264,00 (n = 1)
200 mg/kg i.p.	ND	ND	252,50 ± 43,13	53,95 ± 3,89	0,10 ± 0,00	ND	275,00 (n = 1)	323,00 (n = 1)	79,00 ± 2,83	ND
Vehículo i.p.	ND	ND	219,00 ± 26,87	58,35 ± 10,68	0,10 ± 0,00	2,50 (n = 1)	ND	109,00 (n = 1)	82,00 ± 8,49	272,00 (n = 1)
Control	ND	ND	221,00 ± 1,41	61,55 ± 7,42	0,10 ± 0,00	2,60 ± 0,14	423,50 ± 214,25	395,00 ± 240,42	76,00 ± 8,49	327,00 ± 12,73

Vehículo (10% DMSO en agua). Na: sodio, K: potasio, G: glucosa, U: urea, C: creatinina, AST: Asp-aminotransferasa, ALT: Ala-aminotransferasa, CHO: colesterol, Fe: hierro. [a] No determinado. * Diferencias significativas ($P < 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

3.1.4.5. Actividad *in vivo*

Se evaluó la actividad de **VATR99** y **VATR100** mediante un ensayo preliminar en el que se administraron a grupos de ratones macho Swiss (n = 6) dosis de 50, 25 y 12,5 mg/kg/día oral e intraperitonealmente, en el 5º y el 8º d.p.i. Asimismo, se incluyó un grupo tratado con 100 mg/kg/día de BZ (p.o.), un grupo de animales infectados sin tratar y otro control de animales sin infectar.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con **VATR99** (Fig. 66–72).

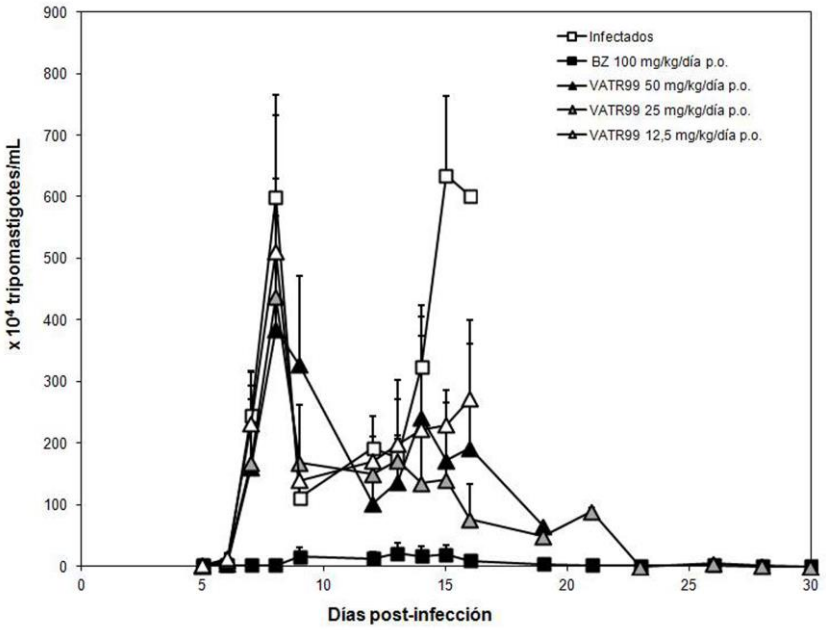


Fig. 66. Tratamiento con **VATR99** administrado p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

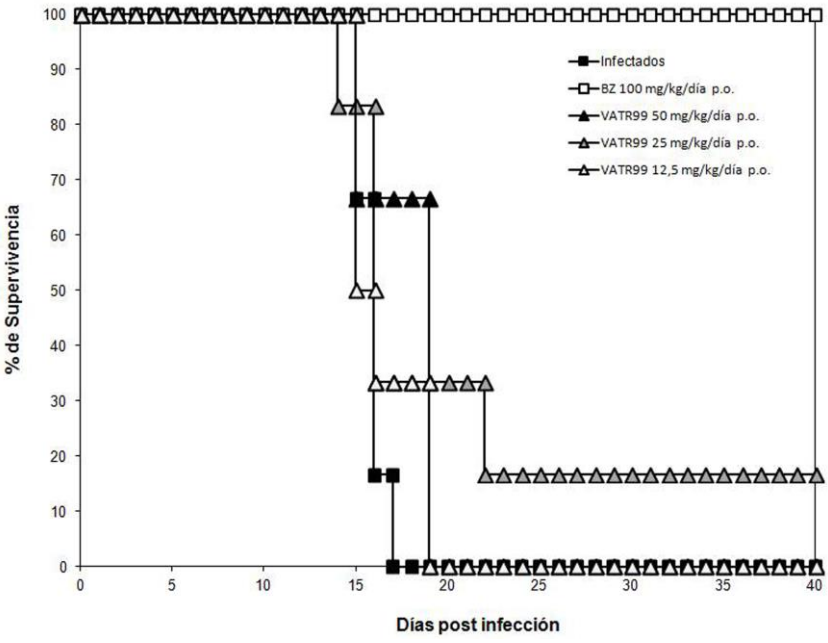


Fig. 67. Tratamiento con **VATR99** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

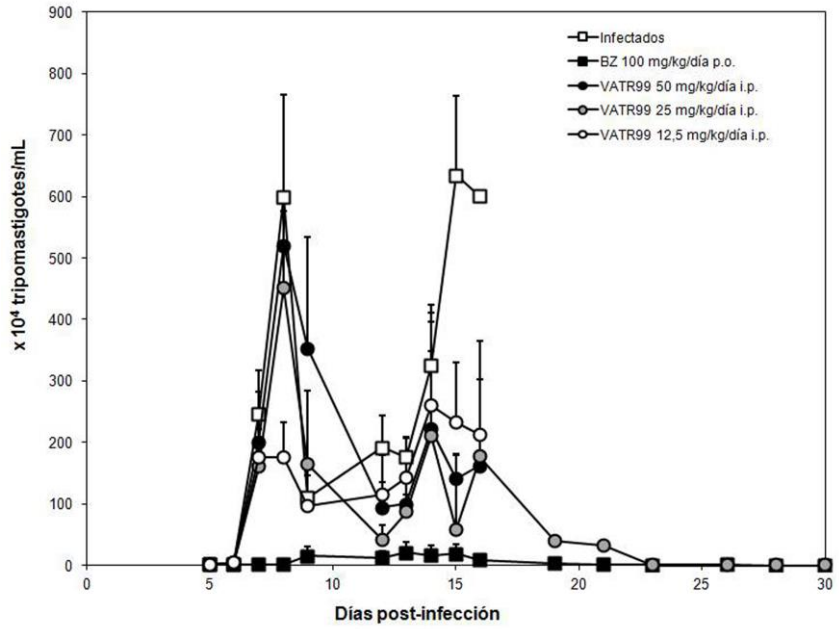


Fig. 68. Tratamiento con **VATR99** administrado i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

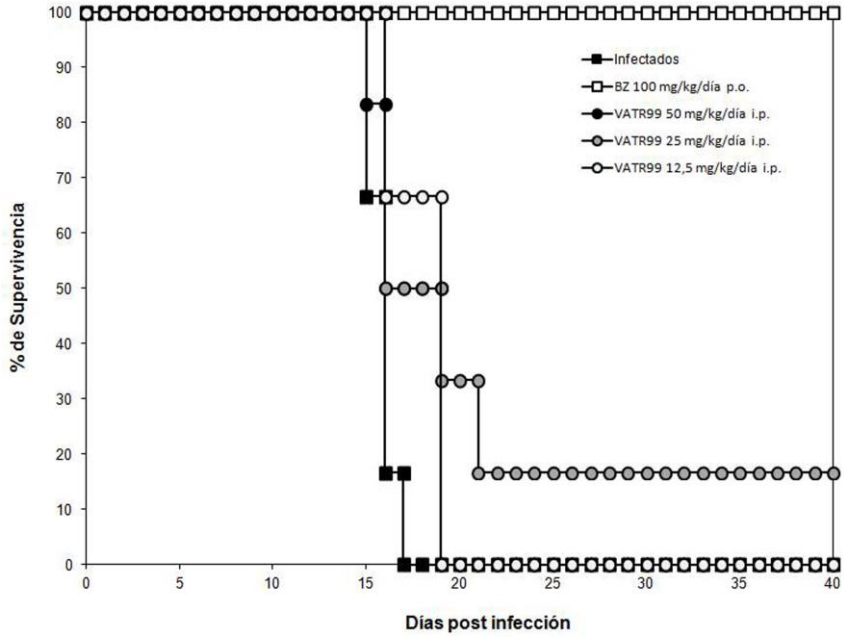


Fig. 69. Tratamiento con **VATR99** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

El tratamiento con dos dosis de **VATR99** vía oral (Fig. 66) supuso una reducción de la parasitemia en el 8º d.p.i. directamente proporcional a la dosis administrada (35,69, 26,76 y 14,79% para 50, 25 y 12,5 mg/kg/día, respectivamente). Sin embargo, cuando éste tuvo lugar intraperitonealmente (Fig. 68), se observó una reducción de la parasitemia inversamente proporcional a la dosis administrada (13,09, 24,65 y 70,79% para 50, 25 y 12,5 mg/kg/día, respectivamente). Con respecto a la supervivencia, ésta fue del 16,67% para

los grupos tratados con 25 mg/kg/día por ambas vías (Fig. 67 y 69). Asimismo, se observó una pérdida de peso a partir del 7º d.p.i., manteniéndose constante hasta el 35º d.p.i. en el grupo tratado con 25 mg/kg/día por vía oral (Fig. 70), no siendo así en el tratado vía i.p. (Fig. 71). Cabe destacar que en el 14º d.p.i., el peso de todos los grupos tratados con **VATR99** por ambas vías, así como el del grupo sin tratar, fue significativamente menor ($P < 0,05$) al registrado para el grupo de animales sin infectar.

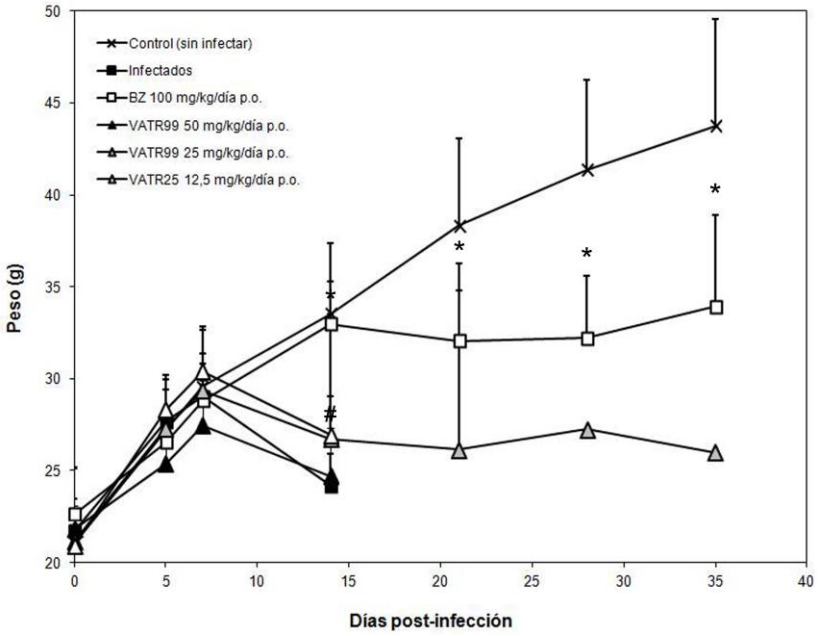


Fig. 70. Tratamiento con **VATR99** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones.
* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

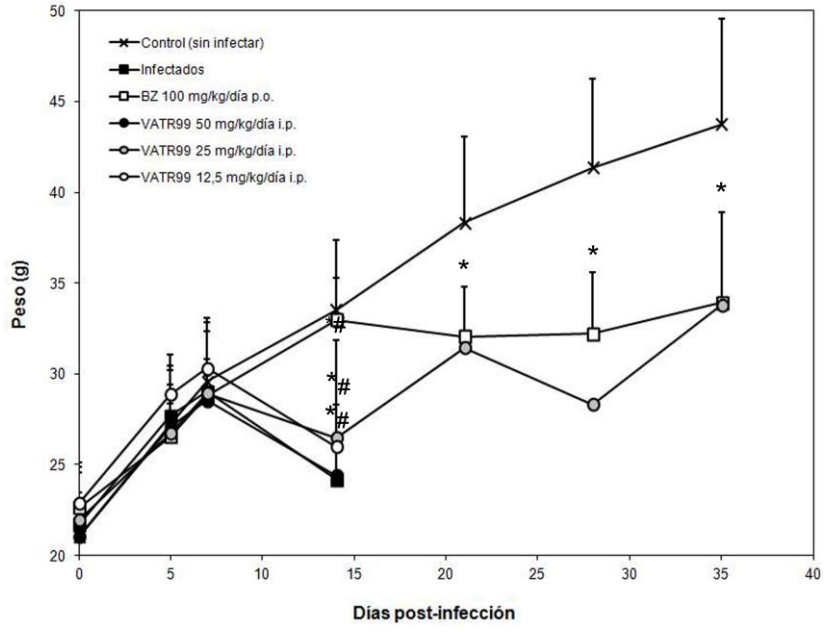


Fig. 71. Tratamiento con **VATR99** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones.
* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

Como se ha comentado anteriormente, analizando la eficacia de **VATR99** el día de máxima parasitemia (Fig. 72) se aprecia como el tratamiento con 12,5 mg/kg/día vía i.p. redujo significativamente el número de tripomastigotes en sangre ($P < 0,05$). A la vista de estos resultados, se seleccionó la dosis de 12,5 mg/kg/día para ser administrada vía i.p. en un posterior ensayo de actividad *in vivo* aplicando pautas de tratamiento más largas.

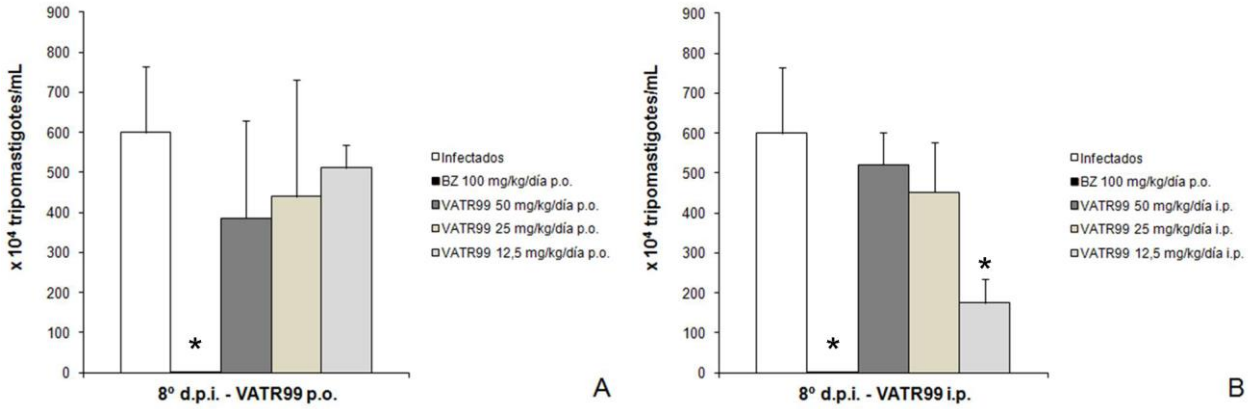


Fig. 72. Repercusión del tratamiento realizado con **VATR99** p.o. (A) e i.p. (B) sobre los niveles de parasitemia del 8º d.p.i. (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA.

De manera similar se procedió con el derivado **VATR100**, cuyos resultados de actividad *in vivo* se muestran a continuación (Fig. 73–79).

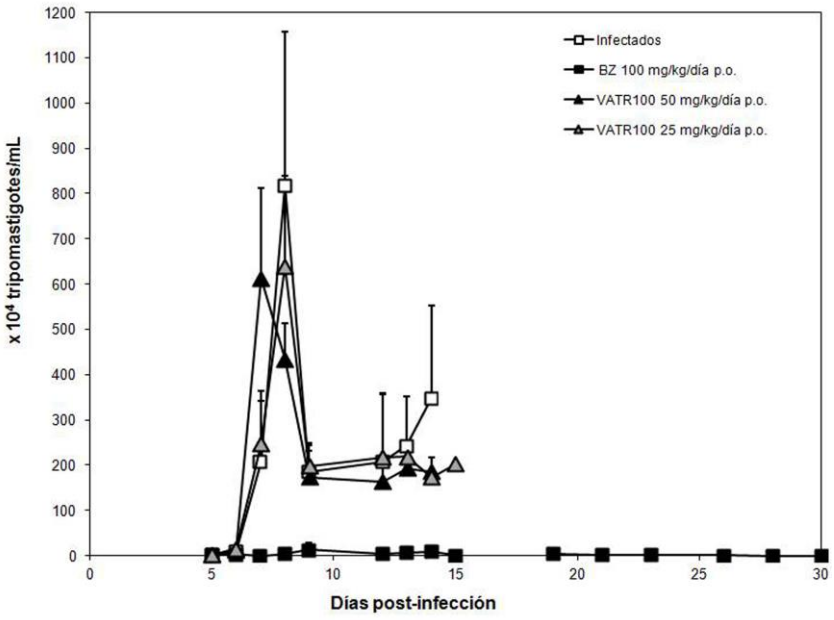


Fig. 73. Tratamiento con **VATR100** p.o. en el 5º y en el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva indica el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

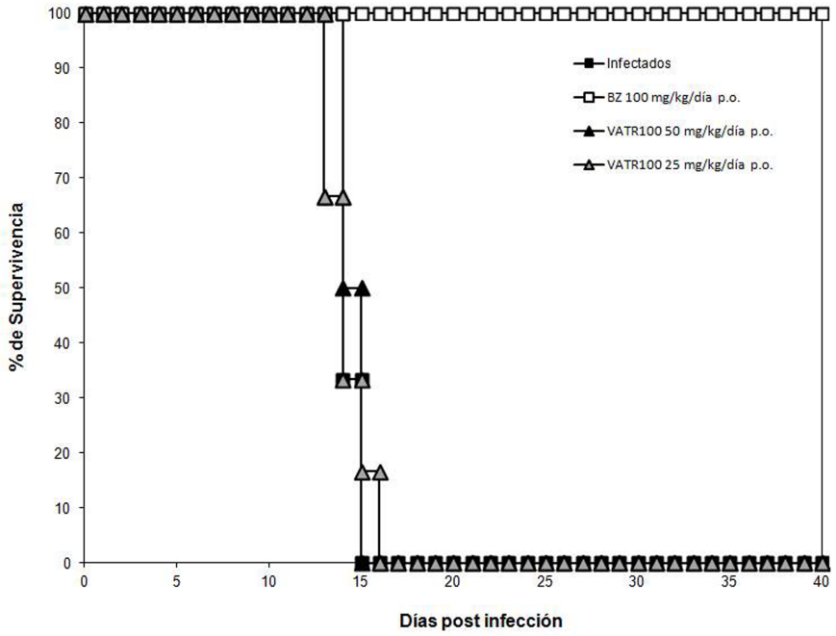


Fig. 74. Tratamiento con **VATR100** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

La administración oral de **VATR100** supuso una reducción del 22% en la parasitemia del 8º d.p.i. con dosis de 25 mg/kg/día y del 47% con dosis de 50 mg/kg/día (Fig. 73 y 79). Sin embargo, el tratamiento realizado vía i.p. disminuyó un 19,49% (50 mg/kg/día) y un 17,19% (25 mg/kg/día) la parasitemia del 8º d.p.i., no teniendo ninguna repercusión con dosis de 12,5 mg/kg/día (Fig. 75 y 79). En ambos casos, todos los animales murieron antes del 16º d.p.i. (Fig. 74 y 76).

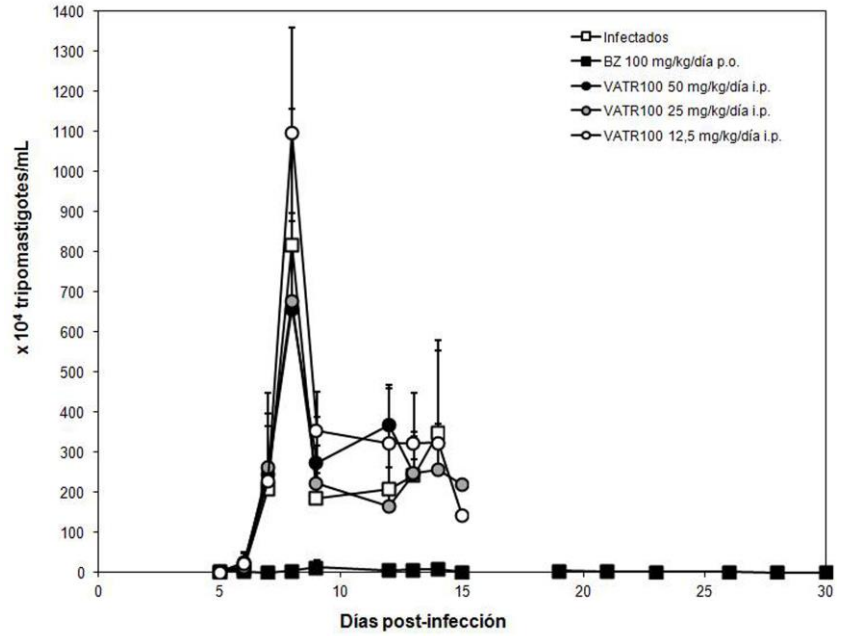


Fig. 75. Tratamiento con **VATR100** i.p. en el 5º y en el 8º d.p.i.: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva indica el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

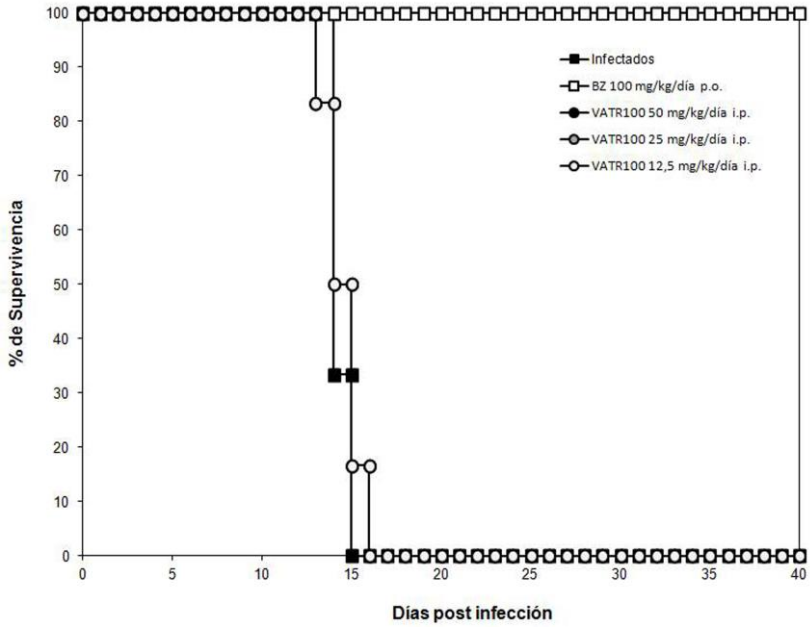


Fig. 76. Tratamiento con **VATR100** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

Todos los animales tratados con el derivado **VATR100**, ya fuera oral (Fig. 77) o intraperitonealmente (Fig. 78), experimentaron una pérdida de peso a partir del 7º d.p.i. que fue significativa en el 14º d.p.i ($P < 0,05$), similar a la sufrida por los animales infectados.

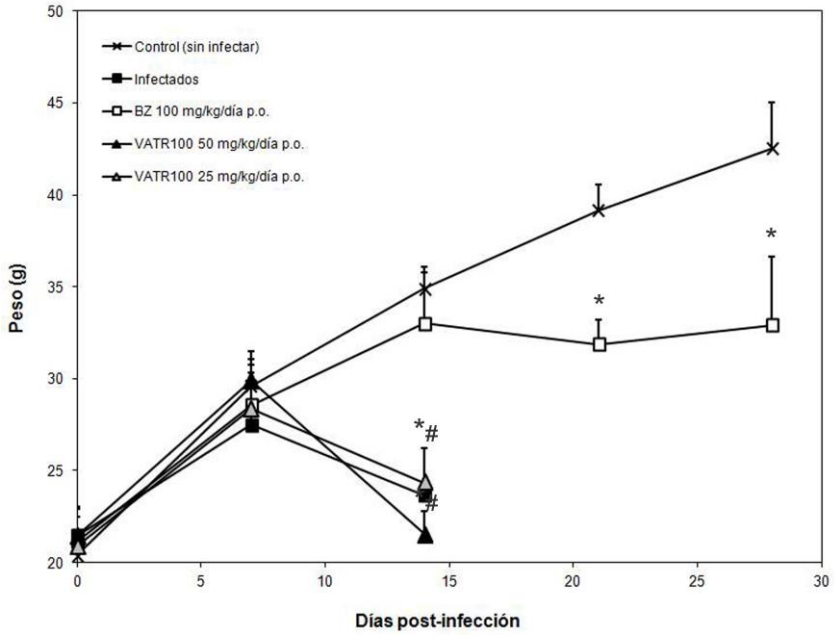


Fig. 77. Tratamiento con **VATR100** p.o. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones.
* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

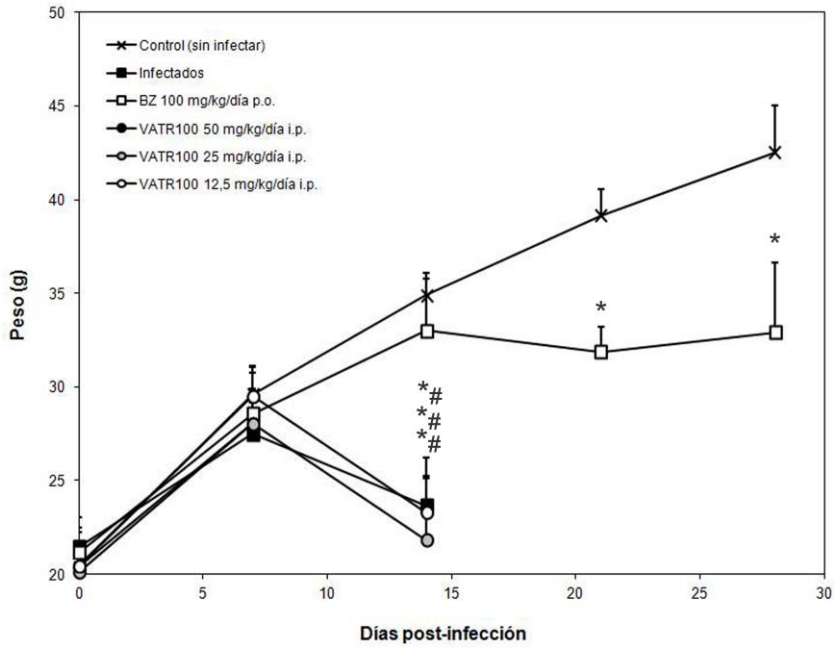


Fig. 78. Tratamiento con **VATR100** i.p. en el 5º y el 8º d.p.i.: variación en el peso de los ratones.
* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

Por tanto, realizando un análisis de la eficacia que presentó **VATR100** el día de máxima parasitemia (Fig. 79) se observa como el tratamiento con 50 mg/kg/día vía oral disminuyó el número de tripomastigotes en sangre ca. 50%. Sin embargo, esta reducción no fue significativa, a diferencia de la producida por el tratamiento con BZ ($P < 0,05$).

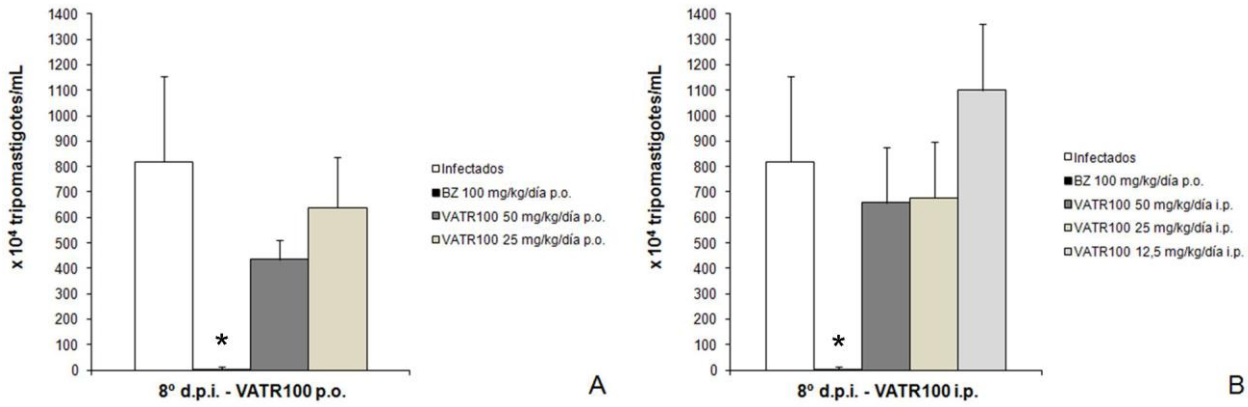


Fig. 79. Repercusión del tratamiento realizado con **VATR100** p.o. (A) e i.p. (B) sobre los niveles de parasitemia del 8º d.p.i. (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control, ANOVA.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la dosis de 50 mg/kg/día y su administración p.o. para su evaluación en un posterior ensayo de actividad *in vivo* aplicando pautas de tratamiento más largas.

Finalmente, se evaluó la actividad *in vivo* de ambos derivados, administrando las dosis seleccionadas y aplicando las siguientes pautas de tratamiento:

- **VATR99:** dosis de 12,5 mg/kg/día durante 10 días consecutivos administradas vía i.p. cada 24 h.
- **VATR99:** dosis de 12,5 mg/kg/día durante 10 días consecutivos administradas vía i.p. cada 12 h.
- **VATR100:** dosis de 50 mg/kg/día durante 10 días consecutivos administradas vía oral cada 24 h.
- **VATR100:** dosis de 50 mg/kg/día durante 10 días consecutivos administradas vía oral cada 12 h.

Asimismo, se incluyó un grupo de animales infectados sin tratar y un grupo tratado con 100 mg/kg/día de BZ p.o. cada 24 h durante 10 días consecutivos.

El tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. dio lugar a un mejor resultado cuando se administró cada 24 h, alcanzándose un 27,20% de reducción en el 8º d.p.i., frente al 4,83% obtenido con su administración cada 12 h. No obstante, el grupo tratado cada 24 h presentó un segundo pico de parasitemia el 14º d.p.i., encontrándose parásitos en sangre hasta prácticamente el final de la fase aguda. Este hecho no tuvo lugar con el tratamiento administrado cada 12 h, donde la parasitemia no fue detectable a partir del 19º d.p.i. (Fig. 80 y 86). Asimismo, ambos tratamientos aumentaron la supervivencia de los animales en un 16,67% (Fig. 81). Sin embargo, como muestra la Fig. 82 ninguno evitó la pérdida de peso sufrida a partir del 7º d.p.i. ($P < 0,05$).

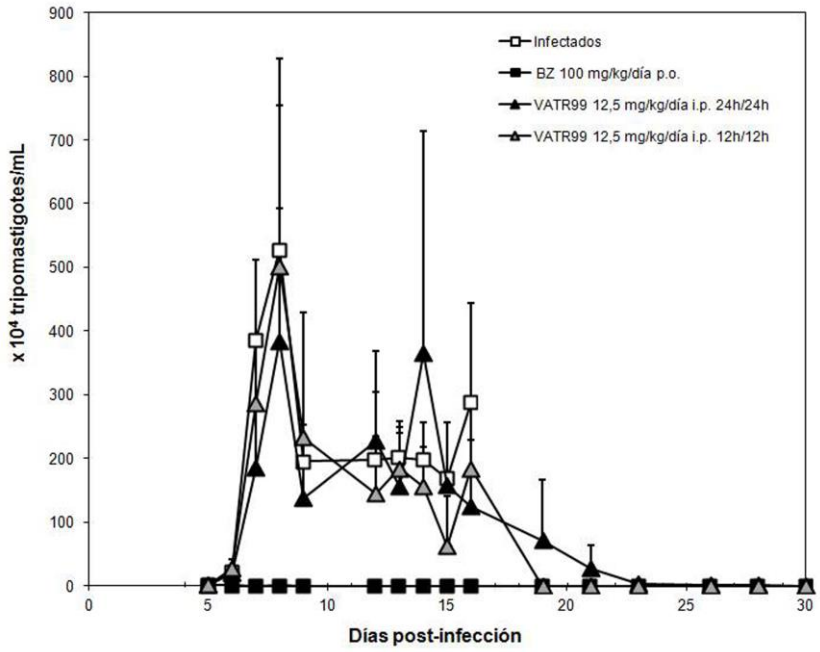


Fig. 80. Tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. durante 10 días consecutivos: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

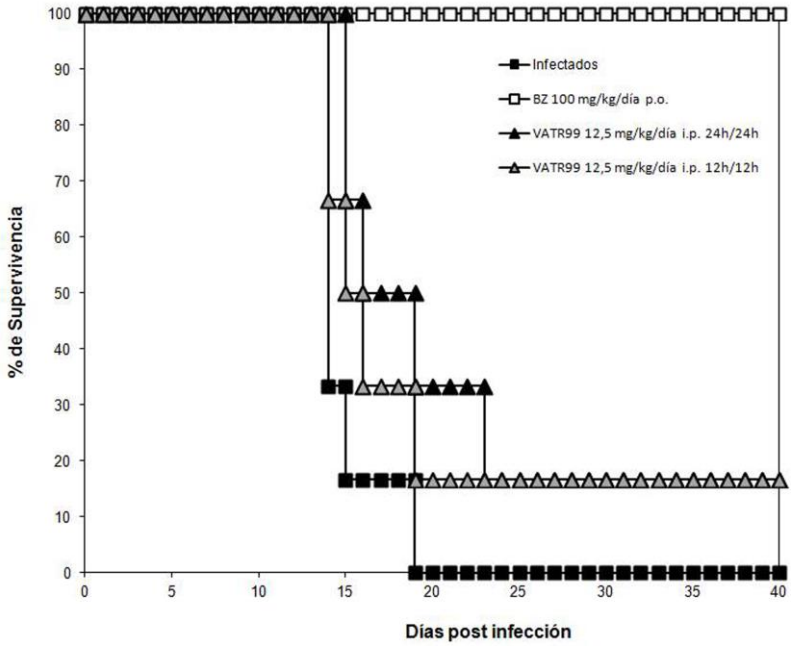


Fig. 81. Tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. durante 10 días consecutivos: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

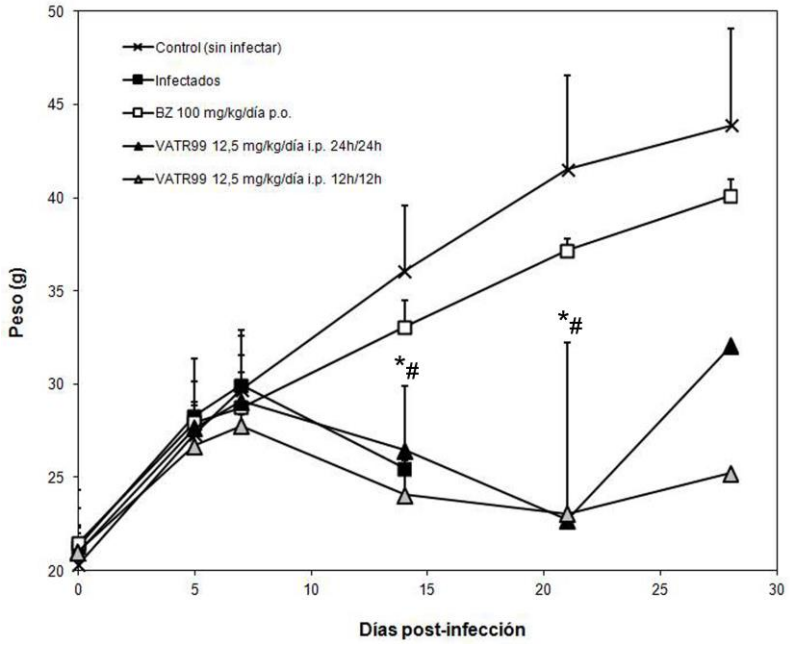


Fig. 82. Tratamiento con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** vía i.p. durante 10 días consecutivos: variación de peso durante la fase aguda.
* Diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ (P < 0,05) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

Con respecto al tratamiento realizado con **VATR100** vía oral en dosis de 50 mg/kg/día, el mayor porcentaje de reducción se obtuvo con su administración cada 12 h, siendo éste del 25,71% el día de máxima parasitemia (8º d.p.i.). Por el contrario, el tratamiento llevado a cabo con este derivado cada 24 h no resultó efectivo, siendo las parasitemias del 8º y del 14º d.p.i. muy superiores a la que presentó el grupo de animales infectados (Fig. 83 y 87). En consecuencia y como refleja la Fig. 84, ninguno de los animales

tratados cada 24 h superó la fase aguda de la enfermedad, muriendo todos el 16º d.p.i. Sin embargo, el tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** administrados cada 12 h p.o. aumentó la supervivencia de los animales infectados en un 66,67%, aunque como muestra la Fig. 85 no proporcionó protección frente a la pérdida de peso experimentada como consecuencia de la infección ($P < 0,05$).

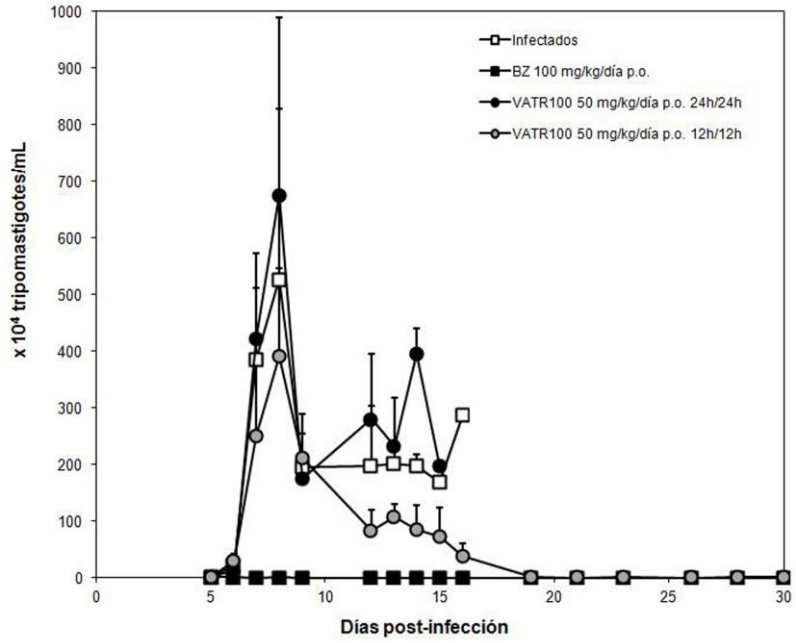


Fig. 83. Tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o. durante 10 días consecutivos: curvas de parasitemia en machos Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (n = 6). Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SD.

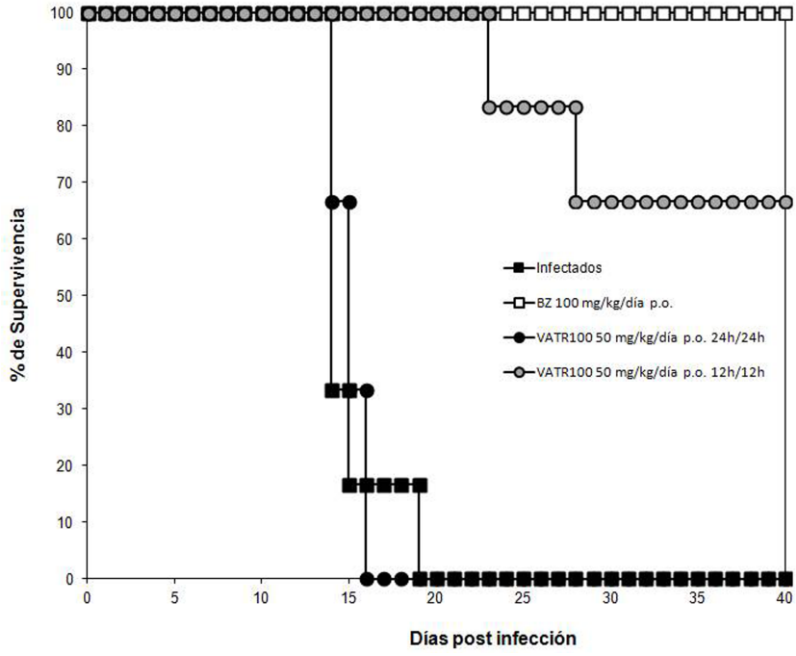


Fig. 84. Tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o. durante 10 días consecutivos: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

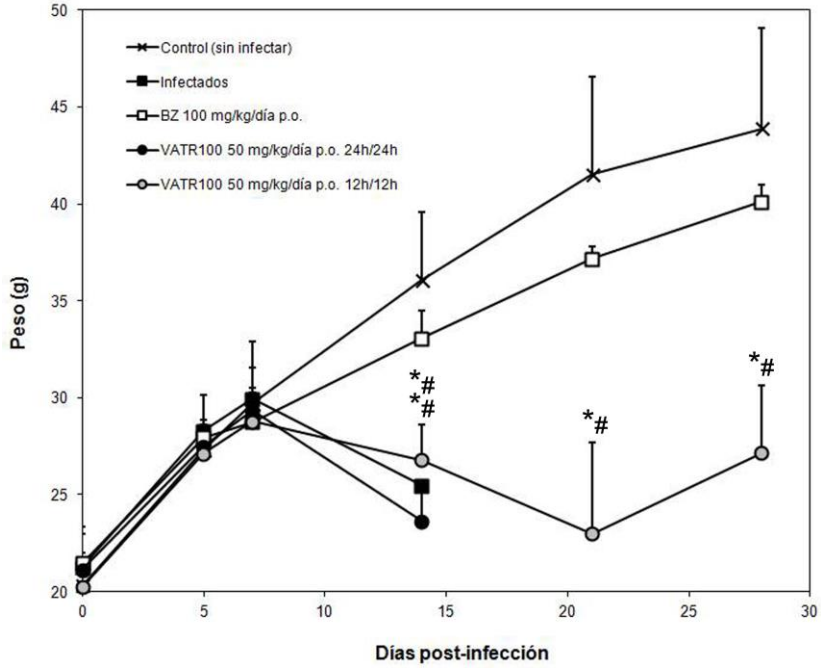


Fig. 85. Tratamiento con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o. durante 10 días consecutivos: variación de peso durante la fase aguda.
* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y # ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento con **VATR99** en dosis de 12,5 mg/kg/día i.p. redujo la parasitemia del 8º d.p.i. en su administración cada 24 h (Fig. 86A). Debido a que el tratamiento de 10 días se prolongó hasta el 15º d.p.i., se realizó un análisis de la parasitemia el 14º d.p.i., sobre la que el tratamiento cada 24 h no tuvo ningún efecto, siendo éste mínimo con la administración cada 12 h (Fig. 86B).

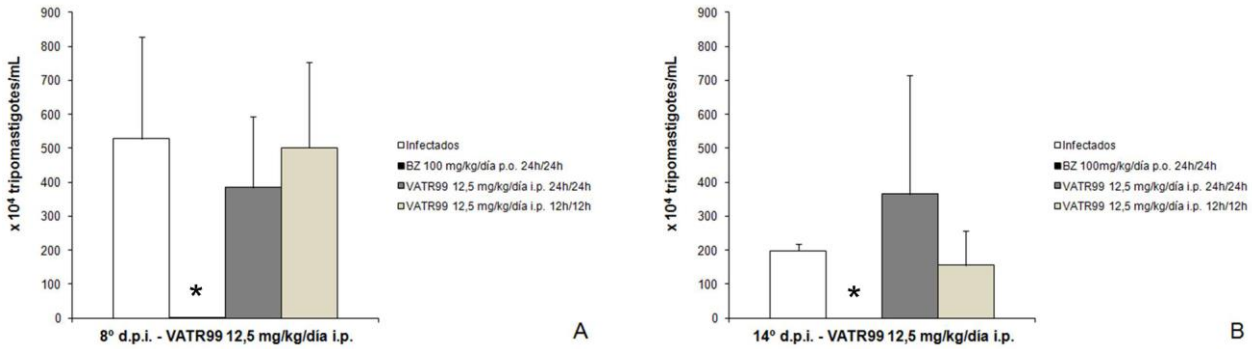


Fig. 86. Repercusión del tratamiento realizado durante 10 días consecutivos con 12,5 mg/kg/día de **VATR99** i.p., sobre los niveles de parasitemia del 8º (A) y del 14º d.p.i. (B) (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA.

Con respecto al tratamiento con **VATR100** en dosis de 50 mg/kg/día p.o., su administración cada 12 h obtuvo mejores porcentajes de reducción en las parasitemias del 8º y del 14º d.p.i. Sin embargo y a diferencia del tratamiento con BZ, no fueron significativos en ningún caso (Fig. 87).

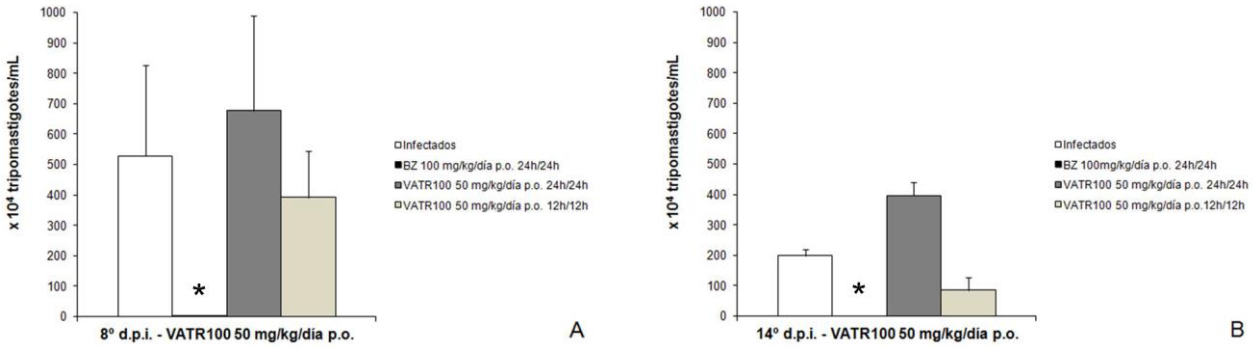


Fig. 87. Repercusión del tratamiento realizado durante 10 días consecutivos con 50 mg/kg/día de **VATR100** p.o., sobre los niveles de parasitemia del 8º (A) y del 14º d.p.i. (B) (media ± SD). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección, ANOVA.

Los animales que superaron la fase aguda fueron eutanasiados 30 días después de finalizar el tratamiento (45º d.p.i.) y se procedió con su necropsia. Los resultados de este análisis se recogen en las Fig. 88 y 89.

Los animales tratados con **VATR100** presentaron diferencias en su peso con respecto al grupo control de animales sin infectar ($P < 0,05$) y al grupo tratado con BZ ($P < 0,05$). El tamaño del bazo en los animales de este grupo aumentó con respecto al de los animales sanos ($P < 0,05$), siendo similar al que presentó el grupo tratado con BZ. Por el contrario, no hubo diferencias en el tamaño del corazón, hígado y riñón ($P > 0,05$). Es importante mencionar que este análisis no se realizó para los animales tratados con **VATR99**, debido a que sólo sobrevivió un ratón de cada grupo experimental (n = 1).

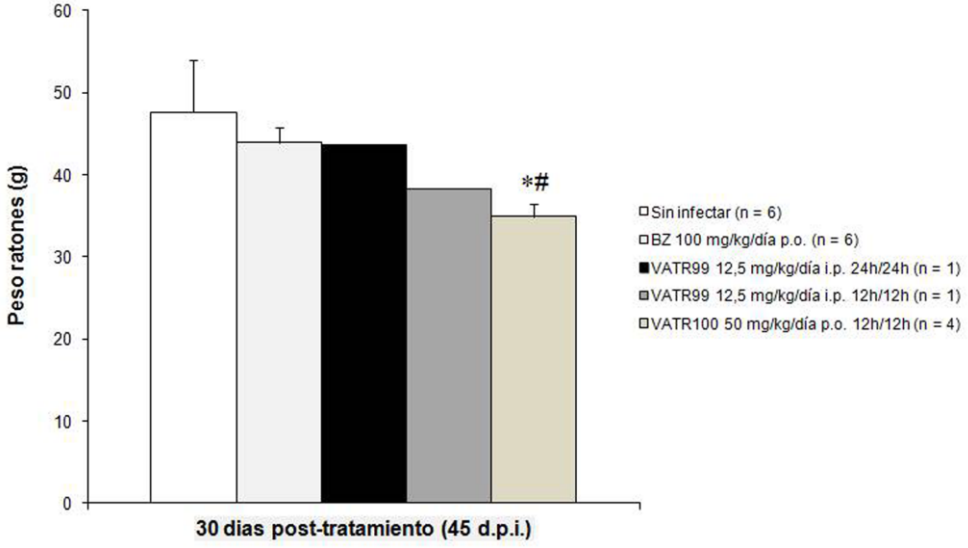


Fig. 88. Peso de los ratones supervivientes a la fase aguda registrado el 30º día post-tratamiento (45º d.p.i.). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

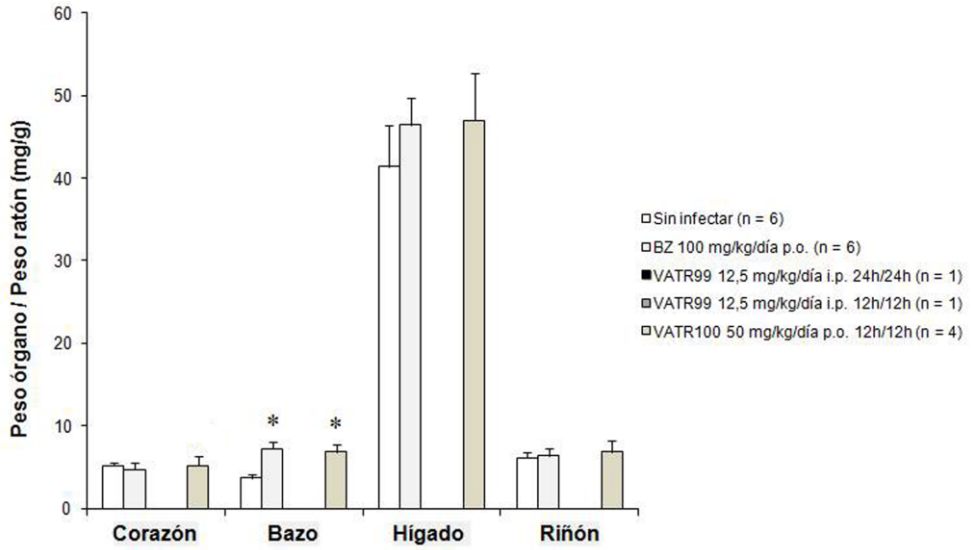


Fig. 89. Relación entre el peso de los órganos (mg) y el del animal (g) en el 30º día post-tratamiento (45º d.p.i.). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de animales sin infectar y $^{\#}$ ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con BZ, ANOVA.

3.1.4.6. Citometría de flujo

Finalmente, se analizó el efecto ejercido por los derivados **VATR81**, **VATR99** y **VATR100** sobre el PMM de *T. cruzi*, tras el tratamiento de TS con las respectivas CI_{50}/24 h, previamente definidas en el ensayo de actividad *in vitro* (Tabla 25).

Los resultados obtenidos en presencia del marcador TMRE se muestran en la Tabla 32 y en la Fig. 90. De los tres derivados evaluados, **VATR81** presentó un perfil similar al del control, no observándose ningún efecto sobre el PMM como consecuencia del tratamiento ($P > 0,05$). Por el contrario, a las 2 h de tratamiento, **VATR99** y **VATR100** ya provocaron la despolarización de la membrana mitocondrial en un importante porcentaje de la población ($P < 0,05$), observándose este efecto en prácticamente el 100% de los parásitos una vez transcurridas las 24 h de tratamiento con ambos derivados ($P < 0,05$). Asimismo, se aprecia como el porcentaje de TS con pérdida de PMM aumenta de manera significativa con el tiempo ($P < 0,05$).

Tabla 32. Porcentaje de la población de tripomastigotes sanguíneos que experimentó despolarización de la membrana mitocondrial. Los resultados se expresan como la media ± SD (n = 3).

Incubación	Control	Control +	VATR81	VATR99	VATR100
2 h	22,75 ± 4,69	92,77 ± 9,44 *	24,31 ± 4,89	58,72 ± 4,47 *	55,69 ± 1,10 *
24 h	42,06 ± 7,72 $^{\#}$	94,09 ± 5,25 *	58,18 ± 11,50 $^{\#}$	98,13 ± 0,14 *$^{\#}$	99,04 ± 0,37 *$^{\#}$

* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control, test U de Mann-Whitney. $^{\#}$ Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a las 2 h de incubación, test U de Mann-Whitney.

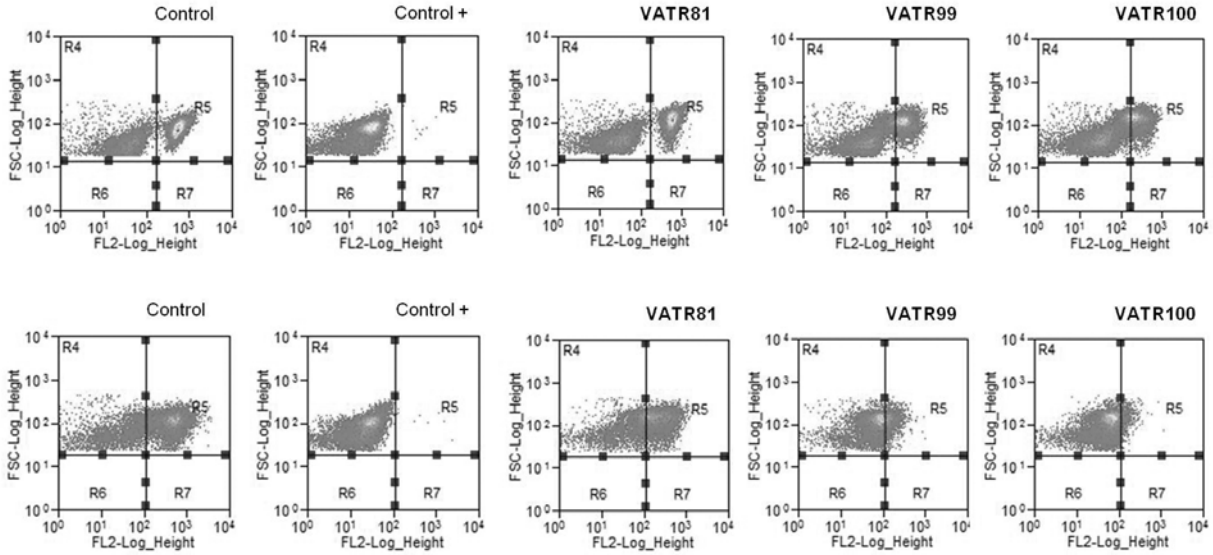


Fig. 90. Resultados del análisis de citometría de flujo realizado con el marcador TMRE en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y. De izquierda a derecha: control (sin tratamiento), control positivo (choque térmico, 2 h 56 ºC) y tratados con la CI_{50}/24 h de **VATR81**, **VATR99** y **VATR100** durante 2 (arriba) y 24 h (abajo) a 37 ºC.

3.1.5. EVALUACIÓN DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE DOS SERIES DE 2,4-DIARIL-1,2,3,4-TETRAHIDROQUINOLINAS DE SÍNTESIS

Se evaluó la actividad anti-*T. cruzi* de un grupo de moléculas de síntesis constituido por 22 derivados de tetrahidroquinolina, distribuidos a su vez en las series **AR** y **DM** (Fig. 24 y 25, respectivamente) y sintetizados por el grupo de investigación del Dr. Vladimir V. Kouznetsov, del Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga, Colombia.

Los resultados de actividad *in vitro* que se exponen a continuación se encuentran publicados en Fonseca-Berzal *et al*. (2013).

3.1.5.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

De acuerdo con el modelo de *screening* secuencial *in vitro* propuesto, se realizó un cribado primario en el que se determinó la actividad de todos los compuestos sobre epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ*, así como su citotoxicidad inespecífica en cultivos de fibroblastos murinos L929.

A continuación se muestran los resultados de actividad frente a epimastigotes y de citotoxicidad inespecífica obtenidos por las series **AR** (Tabla 33) y **DM** (Tabla 34).

Tabla 33. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) de la serie **AR**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente.

Compuesto	%AE[a,b]	CI_{50} (μM)[c]	CI_{90} (μM)[c]	%C_{L929}[a,b]	CL_{50} (μM)[c]	IS[d]	PR_{BZ}[e]
AR39	95,98	5,94	10,34	43,05	> 256	> 43,09	> 24,75
AR40	95,85	3,60	10,53	0,00	> 256	> 71,11	> 24,31
AR41	53,99	< 8	> 32	0,00	> 256	> 32	–
AR42	76,03	< 8	> 32	ND	16,03	> 2	–
AR43	88,62	7,86	> 32	11,72	ND	–	–
AR44	87,22	ND[f]	> 32	ND	28,44	–	–
AR45	78,69	< 8	> 32	ND	27,60	> 3,45	–
AR45F2	83,67	< 8	> 32	8,43	ND	–	–
AR46	97,06	< 8	15,68	85,85	9,56	> 1,19	> 16,32
AR47	79,95	< 8	> 32	66,33	ND	–	–
AR89	14,08	ND	ND	42,15	ND	–	–
AR91	88,64	7,67	9,74	25,02	> 256	> 33,37	> 26,28
AR92	100	6,39	7,67	ND	23,58	3,69	> 33,37
BZ	66,24	27,12	> 256	17,38	> 256	> 9,44	–

[a] 32 μM para pruebas en epimastigotes, 256 μM para citotoxicidad inespecífica. [b] Cada concentración se evaluó por triplicado, siendo la SD inferior al 10%. [c] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [d] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [e] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [f] No determinado por problemas de solubilidad.

Todas las tetrahidroquinolinas pertenecientes a la serie **AR** (Tabla 33) alcanzaron porcentajes de inhibición en epimastigotes superiores al 50% a la mayor concentración ensayada (32 μM), a excepción de **AR89**, único derivado sin actividad destacable a este nivel. Es importante mencionar que muchas de estas moléculas presentaron problemas de solubilidad precipitando en el medio de cultivo, motivo por el que su actividad en epimastigotes no fue ensayada a concentraciones superiores a 32 μM. Sin embargo, 11 derivados **AR** mejoraron el valor de CI_{50} obtenido con el fármaco de referencia BZ, no pudiéndose calcular en el caso de **AR44** y **AR89**. Por otra parte, cabe destacar la ausencia de toxicidad que **AR39**, **AR40**, **AR41** y **AR91** presentaron sobre fibroblastos L929, siendo muy selectivas para epimastigotes (IS > 30). Con respecto a los valores de CI_{90}, **AR39**, **AR40**, **AR46**, **AR91** y **AR92** fueron más potentes que el BZ sobre formas epimastigotes.

Con respecto a la serie **DM** (Tabla 34), **DM15** fue la única molécula cuyo valor de CI_{50} en epimastigotes no pudo estimarse. Sin embargo, de manera general esta serie resultó con mayor citotoxicidad sobre L929 (CL_{50} en torno a 10 μM), siendo de esta manera **DM15** el único derivado seleccionado para un posterior ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares (IS epimastigotes > 58,45).

Tabla 34. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) de la serie **DM**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente.

Compuesto	%AE[a,b]	CI_{50} (μM)[c]	CI_{90} (μM)[c]	%C_{L929}[a,b]	CL_{50} (μM)[c]	IS[d]	PR_{BZ}[e]
DM1	86,78	< 8	> 32	84,75	< 8	–	–
DM5	86,23	< 8	> 32	84,12	13,04	> 1,63	–
DM6	95,56	8,29	14,99	86,23	7,75	0,93	> 17,08
DM7	99,73	< 8	23,22	85,46	14,36	> 1,79	> 11,02
DM8	98,70	< 8	13,90	86,90	< 8	–	> 18,41
DM9	98,75	< 8	15,58	85,83	12,75	> 1,59	> 16,43
DM12	92,82	< 8	28,88	87,71	< 8	–	> 8,86
DM13	82,19	ND[f]	> 32	ND	15,90	–	–
DM15	66,81	4,38	> 32	48,76	> 256	> 58,45	–
BZ	66,24	27,12	> 256	17,38	> 256	> 9,44	–

[a] 32 μM para pruebas en epimastigotes, 256 μM para citotoxicidad inespecífica. [b] Cada concentración de evaluó por triplicado, siendo la SD inferior al 10%. [c] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [d] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [e] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [f] No determinado por problemas de solubilidad.

3.1.5.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares

La actividad en amastigotes intracelulares se evaluó únicamente para los compuestos que en el cribado primario fueron al menos tan selectivos como el BZ (IS > 10). De acuerdo con este criterio, tan sólo 5 (**AR39**, **AR40**, **AR41**, **AR91** y **DM15**) de las 22 moléculas iniciales fueron ensayadas en aquellas concentraciones que resultaron con gran actividad sobre formas epimastigotes y ausencia de citotoxicidad inespecífica (Rolón *et al*., 2006b) (Tabla 35).

Tabla 35. Actividad frente a amastigotes de los compuestos seleccionados en el cribado primario, expresada como porcentaje de inhibición (%AA) y CI_{50} (μM).

Comp.	32[a,b]	16	8	4	2	1	0,5	CI_{50}[c]	CI_{90}[c]	IS[d]	PR_{BZ}[e]
AR39	100	99,12	52,51	–	–	–	–	7,10	14,45	> 36,05	0,47
AR40	63,72	47,35	58,64	19,11	–	–	–	7,13	> 32	> 35,90	< 0,21
AR41	–	60,71	58,12	–	–	–	–	< 8	> 16	> 32	< 0,42
AR91	100	100	100	46,33	25,86	–	–	4,27	7,25	> 59,90	0,94
DM15	–	–	51,50	33,77	–	–	–	7,66	> 8	27,80	< 0,85
BZ	100	100	96,63	74,71	64,37	55,64	41,64	0,80	6,79	> 320	–

[a] Concentraciones (μM) seleccionadas de acuerdo con los criterios establecidos en Rolón *et al*. (2006b). [b] Cada concentración se evaluó por triplicado, siendo la SD inferior al 10%. [c] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (μM). [d] Índice de selectividad en amastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [e] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto).

Los 5 derivados alcanzaron valores de CI_{50} < 8 μM, siendo además muy selectivos para amastigotes. Sin embargo, ninguno superó en selectividad y potencia al fármaco de referencia, mostrando únicamente **AR91** una potencia similar a la del BZ frente a la forma replicativa de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado (PR_{BZ} = 0,94).

3.1.6. ACTIVIDAD *in vitro* FRENTE A *T. cruzi* DE DOS SERIES DE SÍNTESIS DERIVADAS DE 7-CLORO-4-AMINO(OXI)QUINOLINA

Los 22 derivados de 7-cloro-4-amino(oxi)quinolina (Fig. 26 y 27) evaluados en este trabajo fueron sintetizados por el equipo del Dr. Vladimir V. Kouznetsov (Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga, Colombia) y sus resultados de actividad tripanocida se encuentran publicados en Fonseca-Berzal *et al*. (2014a).

En función de sus estructuras químicas, los compuestos se dividieron en dos grupos: **Grupo 1**, formado por 4-bencilamino-7-cloroquinolinas (compuestos **1**–**4**) y conjugados de 7-cloroquinolina–1,3-tiazolidin-4-ona (compuestos **5**–**16**), y el **Grupo 2** constituido por 4-ariloxi-7-cloroquinolinas (compuestos **17**–**22**).

3.1.6.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Respecto a las moléculas pertenecientes al **Grupo 1** (Tabla 36), las quinolinas **3**, **7** y **12** obtuvieron los mejores perfiles de actividad sobre epimastigotes, alcanzando valores de CI_{50} < 2 μM y selectividad destacable: IS **3** = 39,33, IS **7** = 63,52 e IS **12** > 14,06. Por lo general, estos compuestos fueron más potentes que el BZ y el NX frente a la forma extracelular de *T. cruzi*, no pudiéndose determinar la PR_{BZ} para los derivados **10**, **13**, **14** y **15**.

Tabla 36. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) del **Grupo 1**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente.

Comp.	%AE[a,b]	CI_{50} (μM)[c]	CI_{90} (μM)[c]	%C_{L929}[a,b]	CL_{50} (μM)[c]	IS[d]	PR_{BZ}[e]	PR_{NX}[f]
1	95,08	6,55	7,63	71,43	24,28	3,71	> 33,55	7,33
2	96,73	5,93	7,42	89,20	14,81	2,50	> 34,50	7,53
3	99,37	1,09	9,71	69,39	42,78	39,33	> 26,36	5,76
4	100	6,76	12,93	89,76	7,90	1,17	> 19,80	4,32
5	96,39	7,38	7,77	82,06	16,49	2,24	> 32,95	7,19
6	97,77	7,15	7,94	85,59	23,55	3,29	> 32,24	7,04
7	99,83	1,90	15,78	74,50	120,65	63,52	> 16,10	3,54
8	99,77	< 8	15,31	74,87	41,53	> 5,19	> 16,72	3,65
9	96,34	ND[g]	114,84	68,19	178,49	ND	> 2,23	0,49
10	84,35	6,84	> 256	ND	19,49	2,85	–	< 0,22

Tabla 36. Continuación.

11	89,14	7,02	7,55	92,41	11,18	1,59	> 33,91	7,40
12	91,13	< 1	6,21	89,85	14,06	> 14,06	> 41,22	9,00
13	87,34	> 32	> 256	60,55	215,54	< 6,74	–	< 0,22
14	54,29	235,89	> 256	ND	ND	ND	–	< 0,22
15	ND	69,66	> 128	9,00	>256	> 3,67	–	< 0,44
16	93,07	4,34	11,61	88,80	24,46	5,63	> 22,05	4,81
BZ	66,24	27,12	> 256	17,38	> 256	> 9,44	–	–
NX	100	3,61	55,90	26,83	> 256	> 70,91	–	–

[a] 256 μM para ambos experimentos. [b] Cada concentración se evaluó por triplicado, siendo la SD inferior al 10%. [c] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [d] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [e] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [f] Potencia relativa a NX (PR_{NX} = CI_{90} NX/CI_{90} compuesto). [g] No determinado por problemas de solubilidad.

En la Tabla 37 se recogen los resultados obtenidos en el cribado primario de las 4-ariloxi-7-cloroquinolinas (**Grupo 2**). Estas moléculas mostraron menor selectividad y potencia en epimastigotes, no seleccionándose ninguna para su posterior ensayo en amastigotes.

Tabla 37. Actividad frente a epimastigotes (%AE) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (%C_{L929}) del **Grupo 2**, expresadas como porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada, CI_{50} (μM), CI_{90} (μM) y CL_{50} (μM), respectivamente.

Comp.	%AE[a,b]	CI_{50} (μM)[c]	CI_{90} (μM)[c]	%C_{L929}[a,b]	CL_{50} (μM)[c]	IS[d]	PR_{BZ}[e]	PR_{NX}[f]
17	57,83	ND[g]	> 256	63,05	218,20	ND	–	< 0,22
18	94,40	113,22	241,07	86,23	153,57	1,36	> 1,06	0,23
19	97,28	13,18	25,94	87,44	25,65	1,95	> 9,87	2,15
20	96,92	12,50	38,69	88,09	26,74	2,14	> 6,62	1,45
21	99,22	2,94	7,57	ND	12,00	4,08	> 33,82	7,38
22	89,95	6,17	> 256	ND	ND	ND	–	< 0,22
BZ	66,24	27,12	> 256	17,38	> 256	> 9,44	–	–
NX	100	3,61	55,90	26,83	> 256	> 70,91	–	–

[a] 256 μM para ambos experimentos. [b] Cada concentración de evaluó por triplicado, siendo la SD inferior al 10%. [c] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [d] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [e] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [f] Potencia relativa a NX (PR_{NX} = CI_{90} NX/CI_{90} compuesto). [g] No determinado por problemas de solubilidad.

3.1.6.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares

De acuerdo con los resultados anteriores, de las 22 moléculas que iniciaron el estudio, tan sólo un compuesto con estructura de 4-bencilamino-7-cloroquinolina (derivado **3**) y dos

conjugados de 7-cloroquinolina–1,3-tiazolidin-4-ona (derivados **7** y **12**) fueron ensayados frente a amastigotes intracelulares (Tabla 38).

Tabla 38. Actividad frente a amastigotes de los compuestos seleccionados en el cribado primario, expresada como porcentaje de inhibición (%AA) y CI_{50} (μM).

Comp.	32[a,b]	16	8	4	2	1	0,5	CI_{50}[c]	CI_{90}[d]	IS[e]	PR_{BZ}[f]	PR_{NX}[g]
3	–	–	–	41,93	28,89	–	–	5,34	ND	8,01	ND	ND
7	–	100	38,67	29,95	–	–	–	9,48	14,70	12,73	0,46	< 0,03
12	–	–	–	33,15	26,65	20,24	–	6,61	ND	2,13	ND	ND
BZ	100	100	96,63	74,71	64,37	55,64	41,64	0,80	6,79	> 320	–	–
NX	100	100	100	100	100	100	96,54	< 0,50	< 0,50	> 512	–	–

[a] Concentraciones (μM) seleccionadas de acuerdo con los criterios establecidos en Rolón *et al*. (2006b). [b] Cada concentración se evaluó por triplicado, siendo la SD inferior al 10%. [c] Extrapolada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (μM). [d] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (μM). [e] Índice de selectividad en amastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [f] Potencia relativa a BZ (PR_{BZ} = CI_{90} BZ/CI_{90} compuesto). [g] Potencia relativa a NX (PR_{NX} = CI_{90} NX/CI_{90} compuesto).

Como muestra la Tabla 38, el derivado **3** fue el más activo (CI_{50} = 5,34 μM), siendo el **7** más selectivo hacia la forma intracelular de *T. cruzi* (IS = 12,73) debido a su menor toxicidad sobre la célula hospedadora (CL_{50} = 120,65 μM). Sin embargo, ninguna de estas tres moléculas mejoró la actividad del BZ (CI_{50} = 0,80 μM e IS > 320) y del NX (CI_{50} < 0,50 μM e IS > 512) en amastigotes.

3.1.7. ACTIVIDAD TRIPANOCIDA *in vitro* DE UNA SERIE DE DERIVADOS DE 2,2-DIÓXIDO DE 4-AMINOIMIDAZO[4,5-*c*][1,2,6]TIADIAZINA

Se evaluó la actividad *in vitro* de una serie formada por 14 derivados de 2,2-dióxido de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina (serie **DIT**), sintetizada por el equipo del Dr. Juan A. Páez, del Instituto de Química Médica del CSIC. Sus estructuras químicas se encuentran detalladas en la Fig. 28.

3.1.7.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el cribado farmacológico primario de la serie **DIT**: ensayos de actividad frente a epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ* (Tabla 39) y pruebas de citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (Tabla 40).

Tabla 39. Perfil de actividad tripanocida frente a epimastigotes, expresado como la media del porcentaje de inhibición (%AE) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada.

Comp.	256 μM	128 μM	64 μM	32 μM	16 μM	8 μM
DIT1q	11,15 ± 5,53	7,61 ± 10,42	3,01 ± 4,25	3,11 ± 4,40	2,41 ± 3,42	6,17 ± 2,59
DIT5j	60,11 ± 11,98	19,80 ± 8,73	14,64 ± 9,58	1,98 ± 0,90	0,65 ± 0,92	0,33 ± 0,46
DIT6c	87,52 ± 2,58	50,90 ± 4,45	23,29 ± 3,80	5,73 ± 8,10	4,56 ± 6,45	4,99 ± 7,05
DIT7r	24,85 ± 0,95	23,91 ± 8,57	16,87 ± 16,97	13,59 ± 12,64	12,07 ± 13,76	12,68 ± 8,63
DIT8m	2,63 ± 3,72	6,98 ± 7,29	1,01 ± 1,43	8,37 ± 9,33	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DIT12e	3,95 ± 5,58	3,54 ± 5,00	3,26 ± 2,89	2,11 ± 2,98	0,55 ± 0,78	1,05 ± 1,48
DIT12o	0,47 ± 0,66	30,25 ± 7,20	5,62 ± 7,94	2,23 ± 3,15	0,94 ± 1,33	0,06 ± 0,08
DIT16l	1,94 ± 2,74	7,16 ± 4,22	5,82 ± 1,69	16,29 ± 1,51	3,30 ± 4,66	3,96 ± 5,61
DIT21d	12,39 ± 3,01	25,53 ± 6,75	13,44 ± 10,95	0,76 ± 1,07	1,88 ± 2,66	2,38 ± 3,37
DIT22r	38,25 ± 7,05	11,47 ± 16,22	3,70 ± 5,24	3,86 ± 5,46	3,58 ± 5,06	0,00 ± 0,00
DIT23m	0,00 ± 0,00	13,08 ± 13,28	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,16	2,41 ± 3,41	1,29 ± 1,83
DIT24c	5,46 ± 7,72	5,61 ± 7,94	0,21 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DIT27s	3,69 ± 5,21	1,29 ± 1,82	2,53 ± 5,38	2,30 ± 3,26	0,76 ± 1,07	0,00 ± 0,00
DIT28d	39,02 ± 5,19	11,95 ± 11,73	4,19 ± 1,16	6,75 ± 2,04	2,42 ± 2,13	2,83 ± 3,65
BZ	80,91 ± 3,05	78,19 ± 3,37	67,47 ± 5,49	66,09 ± 7,91	40,07 ± 4,91	24,12 ± 7,83

Tabla 40. Perfil de citotoxicidad en fibroblastos L929, expresado como la media del porcentaje de citotoxicidad (%C) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada.

Comp.	256 μM	128 μM	64 μM	32 μM	16 μM	8 μM
DIT1q	86,12 ± 5,87	80,40 ± 9,33	11,33 ± 5,86	2,90 ± 4,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DIT5j	88,01 ± 3,15	88,54 ± 3,07	88,82 ± 3,25	76,32 ± 11,85	20,37 ± 4,34	8,40 ± 11,88
DIT6c	4,10 ± 5,79	9,42 ± 13,32	17,16 ± 1,46	6,52 ± 9,20	10,08 ± 6,01	10,03 ± 14,18
DIT7r	88,54 ± 3,57	88,60 ± 3,44	26,54 ± 7,74	16,30 ± 3,96	0,00 ± 0,00	5,94 ± 8,39
DIT8m	88,79 ± 2,75	88,85 ± 2,39	41,22 ± 18,89	13,14 ± 3,36	9,71 ± 13,45	0,71 ± 1,00
DIT12e	72,36 ± 12,54	41,26 ± 4,14	34,71 ± 4,12	11,88 ± 3,95	2,25 ± 3,18	4,51 ± 6,38
DIT12o	87,57 ± 4,92	87,52 ± 4,86	87,82 ± 4,20	19,30 ± 4,93	4,58 ± 5,91	0,00 ± 0,00
DIT16l	87,33 ± 6,02	5,26 ± 5,33	3,79 ± 5,36	11,12 ± 1,50	0,00 ± 0,00	3,05 ± 4,32
DIT21d	88,88 ± 3,08	88,35 ± 3,52	0,00 ± 0,00	7,76 ± 1,77	0,05 ± 0,07	0,00 ± 0,00
DIT22r	89,43 ± 2,21	89,20 ± 1,94	26,28 ± 7,03	12,67 ± 17,92	2,04 ± 2,88	0,00 ± 0,00
DIT23m	86,77 ± 5,24	87,62 ± 4,80	15,36 ± 0,82	1,99 ± 2,82	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DIT24c	94,22 ± 7,68	95,29 ± 6,88	91,72 ± 2,44	8,26 ± 7,23	19,01 ± 5,79	0,07 ± 0,09
DIT27s	83,25 ± 8,65	73,90 ± 21,75	24,70 ± 3,73	8,39 ± 11,86	4,26 ± 6,03	5,54 ± 7,83
DIT28d	88,04 ± 3,99	88,27 ± 3,93	88,63 ± 3,74	88,15 ± 4,06	39,66 ± 20,43	14,24 ± 2,12
BZ	12,83 ± 13,30	14,01 ± 10,35	10,04 ± 1,92	0,00 ± 0,00	1,02 ± 1,45	2,57 ± 3,64

De los 14 compuestos pertenecientes a esta serie, ninguno resultó activo frente a epimastigotes, presentando además una elevada citotoxicidad en células L929 tras 48 h de incubación. Únicamente el derivado **DIT6c** resultó inocuo para esta línea celular (CL_{50} > 256

μM), pero su limitada actividad (CI_{50} = 123,88 ± 3,38 μM) derivó en una baja selectividad (IS > 2). De acuerdo con la baja selectividad que mostraron estos derivados en comparación con el BZ (Tabla 41), ninguno fue posteriormente evaluado sobre amastigotes intracelulares. Tampoco se estimaron las CI_{90} ni las PR_{BZ} para esta serie química.

Dada la escasa actividad tripanocida, así como la citotoxicidad que mostró la serie **DIT,** ambos ensayos *in vitro* se realizaron únicamente por duplicado (n = 2).

Tabla 41. Resultados de actividad en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica (CL_{50}) e índices de selectividad (IS) obtenidos por la serie **DIT**.

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]
DIT1q	> 256	95,59 ± 6,04	< 0,37
DIT5j	225,32 ± 35,57	23,82 ± 1,17	< 0,10
DIT6c	123,88 ± 3,38	> 256	> 2,06
DIT7r	> 256	87,98 ± 6,32	< 0,34
DIT8m	> 256	77,58 ± 7,42	< 0,30
DIT12e	> 256	164,67 ± 2,64	< 0,64
DIT12o	ND[c]	46,31 ± 0,40	ND
DIT16l	> 256	197,82 ± 8,90	< 0,77
DIT21d	> 256	100,25 ± 1,44	< 0,39
DIT22r	> 256	87,86 ± 3,75	< 0,34
DIT23m	> 256	94,74 ± 2,42	< 0,37
DIT24c	> 256	47,95 ± 0,92	< 0,19
DIT27s	> 256	100,23 ± 18,12	< 0,39
DIT28d	> 256	19,36 ± 3,40	< 0,07
BZ	22,46 ± 3,99	> 256	> 11,40

[a] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes ($IS = CL_{50}/CI_{50}$). [c] No determinado por problemas de solubilidad.

3.1.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA *in vitro* DE UNA SERIE DE QUELANTES HETEROCÍCLICOS

Los 22 compuestos evaluados pertenecen a una serie sintetizada por el Dr. Oluyomi S. Adeyemi de la Universidad de Landmark (Omu-Aran, Nigeria). Sus estructuras químicas han sido previamente detalladas en la Fig. 29.

3.1.8.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

En la Tabla 42 se muestran los resultados de actividad obtenidos en epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ*. Los resultados de citotoxicidad en fibroblastos L929 figuran en la Tabla 43.

Tabla 42. Perfil de actividad tripanocida frente a epimastigotes, expresado como la media del porcentaje de inhibición (%AE) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada.

Comp.	256 μM	128 μM	64 μM	32 μM	16 μM	8 μM
1	89,38 ± 5,05	89,68 ± 9,42	92,72 ± 5,83	93,75 ± 5,59	94,31 ± 5,06	66,10 ± 3,19
4	86,17 ± 2,24	79,76 ± 1,99	79,29 ± 0,10	74,60 ± 0,13	54,66 ± 23,32	43,40 ± 10,86
5	81,66 ± 1,60	80,86 ± 0,90	75,02 ± 0,94	68,62 ± 9,72	60,56 ± 9,13	30,54 ± 5,08
6	94,11 ± 3,45	84,73 ± 0,97	80,93 ± 2,64	79,36 ± 2,08	78,19 ± 3,23	72,44 ± 9,34
7	87,23 ± 0,45	79,13 ± 3,21	83,84 ± 1,74	72,21 ± 3,52	28,03 ± 5,91	14,64 ± 10,38
10	67,30 ± 10,11	85,35 ± 0,36	84,10 ± 7,01	55,65 ± 10,84	33,04 ± 14,09	9,87 ± 13,96
12	87,31 ± 2,31	82,53 ± 1,62	81,45 ± 1,87	80,51 ± 1,06	70,66 ± 5,57	22,96 ± 0,52
13	89,55 ± 1,37	88,67 ± 0,95	90,00 ± 6,30	84,30 ± 1,03	66,21 ± 6,39	37,98 ± 13,49
14	69,11 ± 7,79	32,21 ± 8,07	20,13 ± 13,36	40,07 ± 26,42	32,30 ± 24,16	29,01 ± 16,00
15	94,98 ± 0,86	92,20 ± 3,51	87,69 ± 5,61	51,07 ± 19,69	30,71 ± 20,27	16,40 ± 22,10
16	94,92 ± 5,67	84,78 ± 1,04	42,46 ± 2,84	25,23 ± 10,94	11,04 ± 4,83	8,69 ± 4,08
17	81,94 ± 11,08	68,32 ± 8,29	55,64 ± 10,17	38,06 ± 6,64	13,95 ± 8,85	17,88 ± 7,77
18	84,51 ± 0,62	83,08 ± 0,42	87,22 ± 0,47	63,76 ± 3,88	22,54 ± 2,91	4,41 ± 6,24
19	74,99 ± 10,12	74,61 ± 14,00	79,78 ± 15,48	54,04 ± 5,40	12,49 ± 17,67	2,65 ± 3,75
20	89,67 ± 8,32	80,82 ± 9,26	73,01 ± 17,53	57,03 ± 8,51	26,22 ± 7,08	14,05 ± 19,87
21	71,91 ± 18,95	70,62 ± 22,29	80,06 ± 15,45	55,33 ± 21,82	15,43 ± 11,78	3,76 ± 5,32
22	84,62 ± 4,67	87,08 ± 2,00	87,12 ± 0,03	79,94 ± 1,30	55,26 ± 1,46	33,14 ± 4,03
24	84,02 ± 2,97	83,29 ± 4,39	83,49 ± 2,84	79,89 ± 8,58	47,82 ± 15,20	24,62 ± 19,20
25	9,04 ± 10,97	14,56 ± 5,51	14,68 ± 3,65	20,70 ± 0,25	16,83 ± 14,60	12,18 ± 9,17
27	97,72 ± 3,22	89,41 ± 12,30	64,07 ± 30,04	43,96 ± 43,18	32,30 ± 38,07	25,87 ± 32,16
28	73,39 ± 24,81	73,57 ± 33,26	74,10 ± 34,10	77,10 ± 22,19	48,43 ± 18,59	38,71 ± 8,28
29	82,99 ± 4,06	77,13 ± 0,08	54,63 ± 10,43	30,33 ± 4,71	12,99 ± 2,21	4,31 ± 6,09
BZ	86,19 ± 0,48	81,47 ± 0,53	74,02 ± 2,58	56,12 ± 7,86	29,63 ± 6,35	10,48 ± 14,83

De las 22 moléculas evaluadas, 15 mostraron un perfil de actividad frente a epimastigotes similar al del BZ, obteniendo 6 de ellas CI_{50} ca. 30 μM y mejorando este valor 9 moléculas. Sin embargo, únicamente los compuestos **1** y **6** mantuvieron una actividad destacable a la menor concentración ensayada (%AE = 66,10 ± 3,19% y 72,44 ± 9,34%, respectivamente), alcanzando valores de CI_{50} < 8 μM (Tabla 41).

Tabla 43. Perfil de citotoxicidad en fibroblastos L929, expresado como la media del porcentaje de citotoxicidad (%C) ± SD (n = 2) para cada concentración ensayada.

Comp.	256 μM	128 μM	64 μM	32 μM	16 μM	8 μM
1	79,61 ± 6,62	99,85 ± 0,02	97,96 ± 2,51	83,70 ± 17,40	26,40 ± 1,42	8,63 ± 8,16
4	98,95 ± 0,05	90,89 ± 4,38	77,33 ± 4,04	72,96 ± 0,96	65,32 ± 3,67	45,82 ± 2,94
5	80,98 ± 6,72	76,76 ± 0,96	73,15 ± 0,59	72,34 ± 4,84	66,19 ± 0,14	66,76 ± 3,84
6	100 ± 0,03	99,74 ± 0,04	92,96 ± 9,31	86,30 ± 15,20	73,45 ± 13,38	59,79 ± 6,53
7	88,24 ± 8,80	93,92 ± 0,04	59,83 ± 8,80	18,52 ± 18,23	7,76 ± 10,98	0,00 ± 0,00
10	99,36 ± 0,08	99,36 ± 0,02	99,63 ± 0,46	96,57 ± 0,32	65,96 ± 7,27	72,52 ± 18,50

Tabla 43. Continuación.

12	23,88 ± 6,51	29,67 ± 1,68	52,56 ± 1,66	54,59 ± 5,44	10,52 ± 1,01	5,66 ± 4,52
13	65,16 ± 6,65	63,15 ± 10,96	59,17 ± 11,91	43,54 ± 10,94	18,57 ± 5,66	1,23 ± 1,74
14	88,63 ± 9,50	62,85 ± 5,72	41,83 ± 6,07	22,09 ± 4,25	14,56 ± 1,74	7,60 ± 2,62
15	96,75 ± 3,52	96,70 ± 1,33	78,34 ± 23,74	35,53 ± 3,09	25,74 ± 0,10	21,32 ± 7,45
16	100 ± 0,38	99,96 ± 0,43	99,64 ± 0,80	40,81 ± 8,89	18,82 ± 0,94	4,38 ± 6,08
17	91,33 ± 7,85	84,30 ± 6,48	75,56 ± 2,13	22,90 ± 1,27	9,98 ± 10,83	4,79 ± 2,55
18	95,06 ± 4,35	70,28 ± 12,03	62,84 ± 17,58	23,26 ± 7,64	6,15 ± 3,46	4,97 ± 0,32
19	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	81,85 ± 6,87	17,61 ± 8,29
20	100 ± 0,00	100 ± 0,02	100 ± 0,00	100 ± 0,38	45,58 ± 10,80	1,70 ± 2,40
21	98,23 ± 1,01	98,63 ± 1,22	95,18 ± 1,65	40,09 ± 8,78	15,71 ± 22,21	1,78 ± 1,32
22	100 ± 0,41	100 ± 0,29	99,91 ± 0,50	69,86 ± 9,14	26,96 ± 3,15	9,47 ± 1,93
24	100 ± 0,01	100 ± 0,06	100 ± 0,13	70,20 ± 22,04	33,90 ± 5,61	9,16 ± 11,12
25	3,68 ± 4,04	7,14 ± 9,99	18,85 ± 26,66	10,66 ± 15,07	9,91 ± 12,96	7,12 ± 1,37
27	99,74 ± 0,37	58,16 ± 12,80	15,36 ± 4,01	7,32 ± 6,33	3,29 ± 4,66	6,55 ± 9,27
28	99,58 ± 0,17	95,99 ± 1,99	75,43 ± 14,84	44,66 ± 5,55	36,94 ± 14,74	14,14 ± 0,33
29	99,70 ± 0,43	99,73 ± 0,39	89,34 ± 0,66	49,69 ± 0,59	30,85 ± 2,66	24,32 ± 7,25
BZ	13,16 ± 0,11	11,06 ± 2,02	2,29 ± 0,12	–	–	–

Con respecto a la citotoxicidad, esta fue elevada en células L929 tras 48 h de incubación. Este hecho resultó en una baja selectividad de estos compuestos hacia *T. cruzi* (Tabla 44), que en ningún caso supero la del BZ (IS > 9,42).

Tabla 44. Resultados de actividad en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica (CL_{50}) e índices de selectividad (IS) obtenidos por los quelantes heterocíclicos.

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]
1	< 8	28,04 ± 3,59	> 3,51
4	12,56 ± 9,07	9,74 ± 1,27	0,77
5	13,48 ± 1,24	< 8	< 0,60
6	< 8	< 8	–
7	30,03 ± 3,05	57,15 ± 2,33	1,90
10	29,47 ± 13,33	< 8	< 0,27
12	12,57 ± 0,50	30,46 ± 1,75	2,42
13	10,74 ± 1,89	48,69 ± 8,96	4,53
14	189,60 ± 27,52	93,23 ± 13,39	0,49
15	31,34 ± 13,15	42,48 ± 8,50	1,35
16	75,32 ± 3,81	35,30 ± 1,99	0,47
17	64,61 ± 5,94	46,81 ± 2,61	0,72
18	26,57 ± 1,53	55,12 ± 11,98	2,07
19	39,01 ± 14,93	14,57 ± 1,43	0,37
20	31,69 ± 15,77	18,88 ± 1,11	0,60
21	31,35 ± 9,56	36,72 ± 3,43	1,17

Tabla 44. Continuación.

22	14,05 ± 0,75	24,55 ± 1,74	1,75
24	17,71 ± 6,46	23,97 ± 5,98	1,35
25	ND[c]	ND	–
27	ND	135,43 ± 29,55	–
28	15,30 ± 2,99	36,66 ± 10,46	2,40
29	57,29 ± 6,54	32,35 ± 0,47	0,56
BZ	27,17 ± 1,48	> 256	> 9,42

[a] Estimada a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [c] No determinado por problemas de solubilidad.

De acuerdo con los resultados anteriores, ningún compuesto se evaluó frente a amastigotes intracelulares. De la misma manera, para esta serie química tampoco se estimaron los valores de CI_{90} ni las PR_{BZ}.

Dada la escasa actividad y la considerable citotoxicidad que por lo general mostraron los quelantes heterocíclicos que forman parte de esta serie química, ambas pruebas *in vitro* se realizaron únicamente por duplicado (n = 2).

3.1.9. EVALUACIÓN DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE UNA SERIE DE CROMENOAZOLDIONAS DE SÍNTESIS

Los 7 derivados de quinona sintetizados por el equipo de la Dra. Nadine Jagerovic del Instituto de Química Médica del CSIC, y cuyas estructuras se recogen en la Fig. 30, fueron evaluados *in vitro* frente a epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ*, habiéndose estudiado además su perfil de toxicidad frente a células L929.

3.1.9.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Los perfiles de actividad tripanocida y de citotoxicidad inespecífica se muestran respectivamente en las Fig. 91 y 92, mientras que los resultados del cribado primario se recogen en la Tabla 45. Es importante destacar que en este ensayo, la citotoxicidad de los compuestos se determinó tras 72 h de tratamiento, mismo tiempo de incubación de las pruebas en epimastigotes.

Los derivados **PM199**, **PM401** y **PM203** obtuvieron mejor valor de CI_{50} que el BZ. No obstante, la mayor citotoxicidad de éstos dio lugar a una menor selectividad hacia epimastigotes. Únicamente **PM357** y **PM402** no ejercieron efecto tóxico sobre células L929, no pudiéndose determinar la CL_{50} del compuesto **PM52** (Tabla 45).

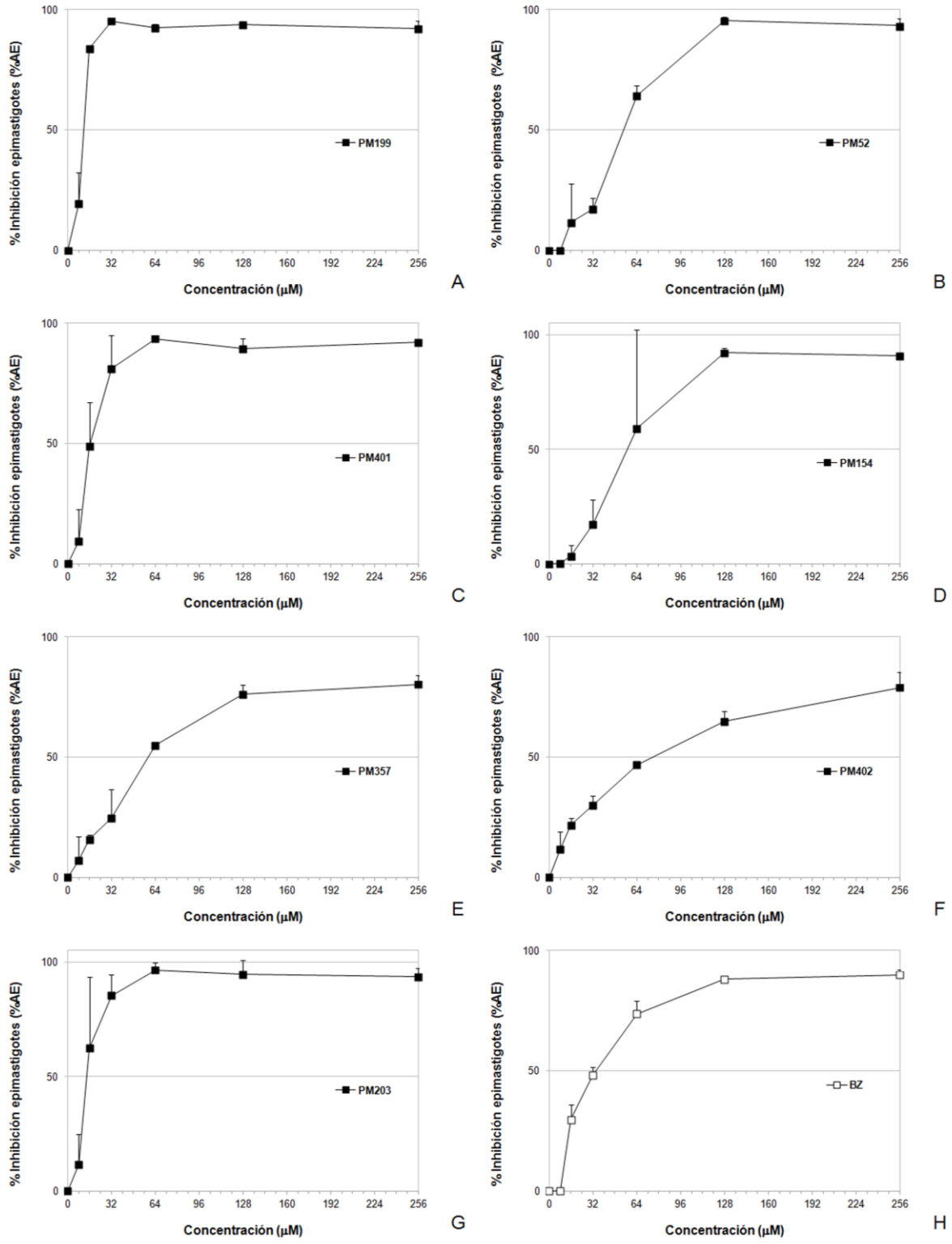


Fig. 91. Perfil de actividad *in vitro* de los compuestos **PM199** (A), **PM52** (B), **PM401** (C), **PM154** (D), **PM357** (E), **PM402** (F) y BZ (H) sobre epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ.* Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de dos experimentos independientes (n = 2).

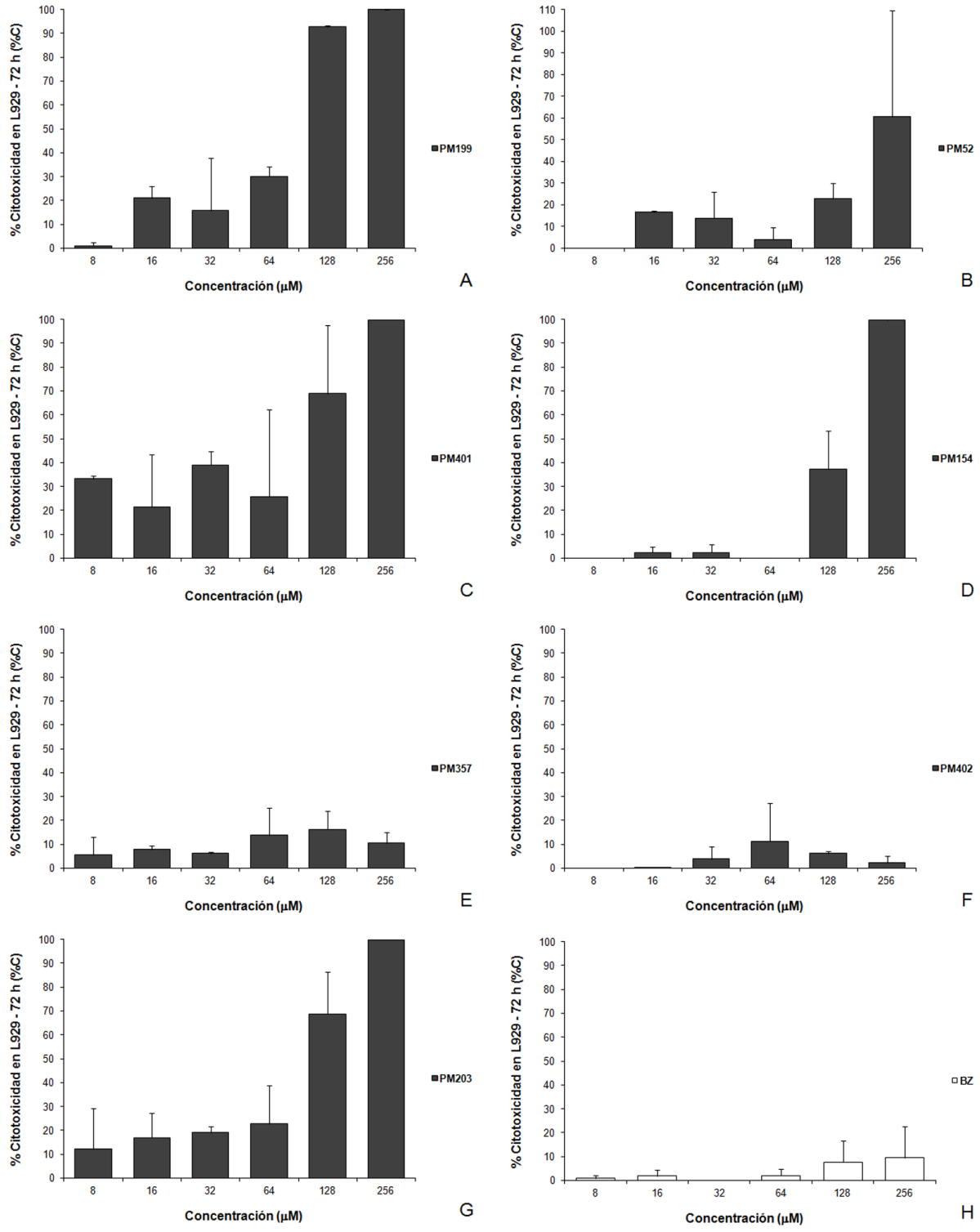


Fig. 92. Perfil de citotoxicidad inespecífica de los compuestos **PM199** (A), **PM52** (B), **PM401** (C), **PM154** (D), **PM357** (E), **PM402** (F) y BZ (H) sobre cultivos de fibroblastos L929. Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de dos experimentos independientes (n = 2).

Tabla 45. Resultados de actividad en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica (CL_{50}) e índices de selectividad (IS) obtenidos por las cromenoazoldionas.

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]
PM199	14,45 ± 1,90	84,26 ± 2,77	5,83
PM52	54,22 ± 2,70	ND[c]	–
PM401	16,01 ± 9,06	84,36 ± 41,69	5,27
PM154	60,65 ± 25,31	157,58 ± 10,31	2,60
PM357	58,49 ± 1,14	> 256	> 4,37
PM402	82,33 ± 8,53	> 256	> 3,11
PM203	14,84 ± 4,49	104,67 ± 7,36	7,03
BZ	36,47 ± 4,43	> 256	> 7,02

[a] Estimada a partir de la curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes (IS = CL_{50}/CI_{50}). [b] No determinado.

De acuerdo con estos resultados, ningún compuesto de la serie **PM** fue ensayado frente a amastigotes intracelulares. Tampoco se estimaron los valores de CI_{90} ni las PR_{BZ} para esta serie.

La escasa actividad y elevada citotoxicidad que mostró esta serie química, supuso que estas pruebas *in vitro* sólo se realizaran por duplicado (n = 2).

3.1.10. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *in vitro* FRENTE A *T. cruzi* DEL ALQUIL-FOSFOLÍPIDO EDELFOSINA

La edelfosina utilizada en los ensayos fue proporcionada por el Dr. Faustino Mollinedo, del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-USAL, Salamanca). Siguiendo sus indicaciones, la solución stock se realizó en agua destilada y se calentó 45 min a 50 ºC para favorecer la disolución del compuesto. Posteriormente, se filtró con membrana de 0,22 μM y se conservó a 4 ºC hasta la realización de las pruebas.

3.1.10.1. Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Los resultados en epimastigotes (Fig. 93A) muestran una importante actividad de la edelfosina a la mayor concentración ensayada (%AE a 20 μM = 82,35 ± 4,87%), siendo muy superior a la obtenida habitualmente con el BZ (%AE a 20 μM ca. 45%).

Conjuntamente, se evaluó la citotoxicidad de este compuesto. Debido a la incapacidad de las células L929 para incorporar edelfosina (Gajate *et al.*, 2000), se eligió la línea celular J774 como hospedadora de *T. cruzi* y en consecuencia, se determinó su

citotoxicidad en macrófagos J774. Como muestra la Fig. 93B, los resultados obtenidos señalan la ausencia de citotoxicidad a todas las concentraciones ensayadas.

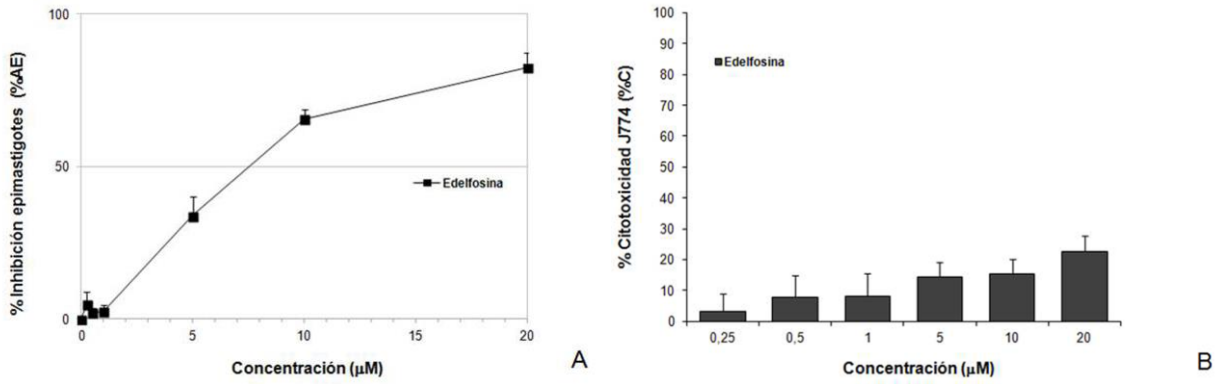


Fig. 93. Perfil de actividad *in vitro* de la edelfosina frente a epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ* (A) y citotoxicidad inespecífica sobre cultivos de macrófagos J774 (B). Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes (n = 3).

A pesar de que la edelfosina mejoró considerablemente la actividad del BZ (CI_{50} ca. 30 μM) frente a epimastigotes, no se pudo precisar con exactitud su selectividad hacia la forma extracelular de *T. cruzi* por ser 20 μM la mayor concentración evaluada (Tabla 46).

Tabla 46. Actividad de la edelfosina en epimastigotes (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica en J774 (CL_{50}) e índice de selectividad (IS). Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n = 3).

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]
Edelfosina	7,51 ± 0,74	> 20	> 2,66

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en epimastigotes ($IS = CL_{50}/CI_{50}$).

3.1.10.2. Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares

La Fig. 94 presenta la curva dosis-respuesta de cultivos de macrófagos J774 infectados con *T. cruzi* y tratados con edelfosina. En esta ocasión, la forma intracelular fue más susceptible a la acción de la edelfosina que los epimastigotes (Fig. 93A) y a 20 μM superó la actividad obtenida frente a la forma extracelular (%AA = 96,87 ± 1,74%). Por el contrario, no mejoró la actividad que habitualmente muestra el BZ en nuestro modelo de cribado (CI_{50} < 1 μM). Asimismo, en la Tabla 47 se recogen los resultados de actividad relativos al ensayo frente a amastigotes intracelulares.

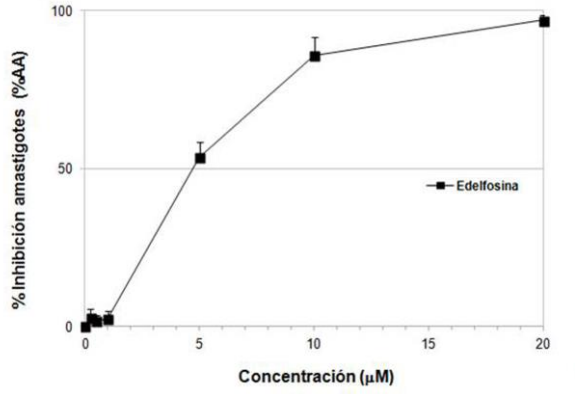


Fig. 94. Actividad *in vitro* de la edelfosina sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cepa CL-B5 *lacZ* en macrófagos J774. Los resultados expresan la media ± SD de los valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes (n = 3).

Tabla 47. Actividad de la edelfosina en amastigotes intracelulares (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica en J774 (CL_{50}) e índice de selectividad (IS). Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n = 3).

Compuesto	CI_{50} (μM)[a]	CL_{50} (μM)[a]	IS[b]
Edelfosina	4,76 ± 0,35	> 20	> 4,20

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. [b] Índice de selectividad en amastigotes ($IS = CL_{50}/CI_{50}$).

3.2. Formulaciones de compuestos antichagásicos

3.2.1. EVALUACIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS DE BENZNIDAZOL SOBRE *T. cruzi*

Se llevó a cabo el desarrollo, caracterización fisicoquímica y evaluación biológica en *T. cruzi* de dispersiones sólidas (DS) de BZ en desoxicolato sódico (NaDC) o hidroxipropilcelulosa de bajo peso molecular (L-HPC), con el fin de mejorar la solubilidad acuosa del fármaco de referencia y en consecuencia, su actividad tripanocida.

La preparación y caracterización fisicoquímica de las DS, así como los resultados de su evaluación biológica en modelos *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi*, ha sido recientemente publicada por nuestro equipo (Palmeiro-Roldán *et al*., 2014; Fonseca-Berzal *et al*., 2015b).

A continuación se presentan los resultados de velocidad de disolución y actividad tripanocida obtenidos con las distintas formulaciones.

3.2.1.1. Ensayo de velocidad de disolución *in vitro*

La Fig. 95A. recoge los perfiles de disolución del BZ materia prima, el BZ recristalizado (R-BZ) y las mezclas físicas (MF) de BZ:NaDC en las proporciones MF-1:3 y MF-1:10.

Como se aprecia en los resultados, el BZ materia prima mostró un perfil rápido, alcanzando a los 60 min un porcentaje de disolución del 90,04 ± 3,81%. Sin embargo, al comienzo del ensayo éste fue más rápido para el R-BZ, observándose a los 30 min diferencias significativas (P < 0,05) entre el BZ materia prima (70,82 ± 2,88%) y el R-BZ (91,65 ± 4,20%). Por el contrario, después de 60 min ambos obtuvieron porcentajes de disolución similares: 90,04 ± 3,81% (BZ materia prima) y 92,94 ± 5,05% (R-BZ). Con respecto a las MF, sus perfiles de disolución fueron mucho más lentos, con valores inferiores al 5% a los 60 min y presentando una menor velocidad con el aumento de la proporción de NaDC.

Los perfiles de disolución obtenidos por las DS-1:0,8, DS-1:1,5, DS-1:3, DS-1:6 y DS-1:10 (BZ:NaDC) se recogen en la Fig. 95B. En esta ocasión, el incremento de NaDC en las formulaciones supuso una disminución en su velocidad de disolución. Sin embargo, todas ellas dieron lugar a perfiles más rápidos que las MF-1:3 y MF-1:10 (Fig. 95A). Con respecto a las DS, durante los primeros 30 min no existieron diferencias entre los porcentajes de disolución obtenidos por aquellas con ratios de BZ:NaDC comprendidos entre 1:0,8–1:6. Sin embargo, transcurridas las 2 h del ensayo los perfiles fueron muy diferentes, de modo que la DS con la menor proporción de NaDC (DS-1:0,8) obtuvo el mejor resultado con un 52,54 ± 4,86% de BZ disuelto. En un segundo grupo, las DS-1:1,5 y DS-1:3 mostraron porcentajes de disolución menores (30,04 ± 5,76% y 29,27 ± 1,14%, respectivamente). En un tercer grupo, la DS-1:6 obtuvo un valor de 18,63 ± 1,86% y finalmente, la DS con la mayor proporción de NaDC (DS-1:10) presentó un perfil similar al de la correspondiente MF-1:10 (4,88 ± 0,27% y 4,59 ± 0,98%, respectivamente).

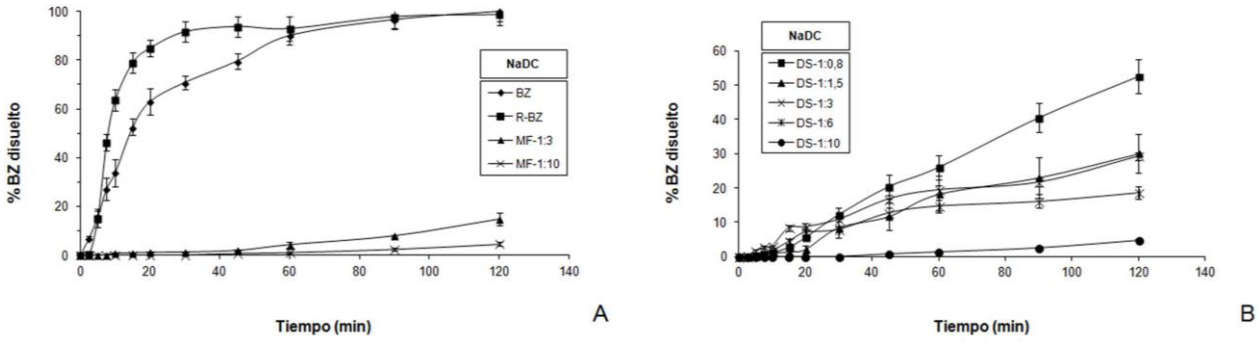


Fig. 95. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: BZ materia prima (BZ), BZ recristalizado (R-BZ), MF-1:3 y MF-1:10 en NaDC (A). DS-1:0,8, DS-1:1,5, DS-1:3, DS-1:6 y DS-1:10 en NaDC (B). Cada punto representa la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

Con respecto al uso de L-HPC, la Fig. 96 muestra los perfiles de disolución de la MF-1:3 y la DS-1:3, así como su comparación con los del BZ materia prima y el R-BZ. De acuerdo con estos resultados, la MF-1:3 presentó un perfil de disolución similar al del BZ materia prima, habiéndose liberado aproximadamente un 72% de principio activo a los 30 min y más

del 90% a los 90 min. La DS en L-HPC mostró el perfil más rápido durante los 30 min iniciales del ensayo, siendo éste significativamente mejor que el del R-BZ ($P < 0,05$).

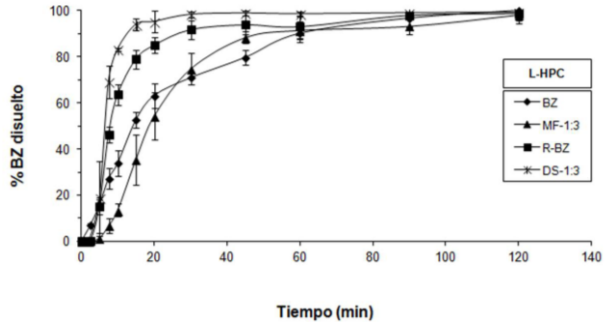


Fig. 96. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: BZ materia prima (BZ), BZ recristalizado (R-BZ), MF-1:3 y DS-1:3 en L-HPC. Cada punto muestra la media ± SD de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

3.2.1.2. Actividad frente a epimastigotes

En la Tabla 48 se recogen los resultados de actividad frente a epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ* obtenidos por las distintas formulaciones de BZ, expresados para cada una como el porcentaje de inhibición (%AE) a la mayor concentración evaluada (256 μM) y CI_{50}.

Tabla 48. Actividad de las DS de BZ sobre epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ.* Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

Dispersiones sólidas BZ:NaDC	Actividad tripanocida frente a epimastigotes	
	%AE 256 μM	CI_{50} (μM)
R-BZ	72,41 ± 9,44	54,30 ± 2,16
BZ:NaDC DS-1:0,8	74,79 ± 10,50	53,31 ± 9,28
BZ:NaDC DS-1:1,5	84,97 ± 15,49	40,09 ± 4,35
BZ:NaDC DS-1:3	91,91 ± 9,30	33,92 ± 6,41
BZ:NaDC DS-1:6	93,14 ± 5,96	28,94 ± 9,41 *
BZ:NaDC DS-1:10	91,85 ± 8,77	20,41 ± 9,64 *
BZ materia prima	72,84 ± 2,09	52,95 ± 2,22

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AE). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al BZ materia prima, test de Kruskal-Wallis.

Las formulaciones menos activas (BZ materia prima, R-BZ y DS-1:0,8) presentaron una actividad similar, encontrándose completamente disueltas durante su incubación con el parásito. Sin embargo, el incremento en la proporción de NaDC aumentó progresivamente su actividad, alcanzando las formulaciones con los mayores ratios de BZ:NaDC (DS-1:6 y DS-1:10) valores de CI_{50} significativamente mejores que el obtenido por el BZ materia prima ($P < 0,05$).

3.2.1.3. Citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929

No se registró ningún efecto tóxico cuando el surfactante se incorporó a las formulaciones en baja cantidad (BZ:NaDC ≤ 1:3). Por el contrario, las DS-1:6 y DS-1:10 ejercieron una importante toxicidad sobre células L929 en comparación con el BZ materia prima ($P < 0,05$).

Tabla 49. Citotoxicidad de las DS de BZ sobre fibroblastos L929. Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

Dispersiones sólidas BZ:NaDC	Citotoxicidad inespecífica en células L929	
	%C 256 μM	CL_{50} (μM)
R-BZ	0,00 ± 8,11	> 256
BZ:NaDC DS-1:0,8	4,08 ± 7,06	> 256
BZ:NaDC DS-1:1,5	4,03 ± 6,47	> 256
BZ:NaDC DS-1:3	84,84 ± 2,72	183,87 ± 12,30
BZ:NaDC DS-1:6	88,92 ± 3,48	76,82 ± 9,84 *
BZ:NaDC DS-1:10	89,42 ± 0,82	68,05 ± 0,91 *
BZ materia prima	25,44 ± 9,46	> 256
BZ:L-HPC DS-1:3	2,07 ± 3,59	> 256

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %C). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al BZ materia prima, test de Kruskal-Wallis.

3.2.1.4. Actividad frente a amastigotes intracelulares

La actividad obtenida por las diferentes formulaciones sobre amastigotes se expresa como el porcentaje de inhibición (%AA) a la mayor concentración ensayada (256 μM) y CI_{50} (Tabla 50).

Tabla 50. Actividad de las DS de BZ sobre amastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ.* Los resultados se expresan como la media ± SD de los datos obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

Dispersiones sólidas BZ:NaDC	Actividad tripanocida frente a amastigotes intracelulares		
	%AA 256 μM	CI_{90} (μM)	CI_{50} (μM)
R-BZ	100 ± 2,93	4,20 ± 1,23	1,57 ± 0,29
BZ:NaDC DS-1:0,8	100 ± 7,71	3,88 ± 2,62	1,50 ± 0,84
BZ:NaDC DS-1:1,5	ND[b]	3,84 ± 2,42	1,44 ± 0,39
BZ:NaDC DS-1:3	ND	0,98 ± 0,13	0,40 ± 0,05
BZ:NaDC DS-1:6	ND	4,66 ± 2,49	1,48 ± 1,24
BZ:NaDC DS-1:10	ND	4,30 ± 1,42	0,85 ± 0,67
BZ materia prima	100 ± 8,36	3,92 ± 1,07	1,80 ± 0,66

[a] Estimadas a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada *versus* %AA). [b] No determinado (concentración tóxica para la célula hospedadora). * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al BZ materia prima, test de Kruskal-Wallis.

Cabe mencionar que la actividad de varias DS no pudo determinarse a 256 μM (ND) debido a la citotoxicidad que se detectó sobre la célula hospedadora en el transcurso del ensayo, habiéndose calculado por tanto los valores de CI_{90}.

Todas las DS mostraron una actividad similar a la del BZ materia prima ($P > 0,05$), alcanzándose el mejor valor de CI_{50} con la DS-1:3. Igualmente, todas las DS resultaron más activas sobre amastigotes intracelulares (Tabla 50) que en epimastigotes (Tabla 48).

3.2.1.5. Actividad *in vivo*

Las DS ensayadas *in vivo* se seleccionaron de acuerdo con los resultados de actividad *in vitro*, en base a los cuales la DS-1:3 se consideró como la formulación más prometedora. Se diseñó además una nueva formulación aplicando el ratio 1:3 en la que se reemplazó el NaDC por L-HPC, debido a la excelente solubilidad que los derivados de celulosa muestran en una gran variedad de solventes y su ausencia de citotoxicidad (Tabla 49). En este ensayo también se evaluó la DS-1:6 y se incluyó el BZ materia prima como fármaco de referencia.

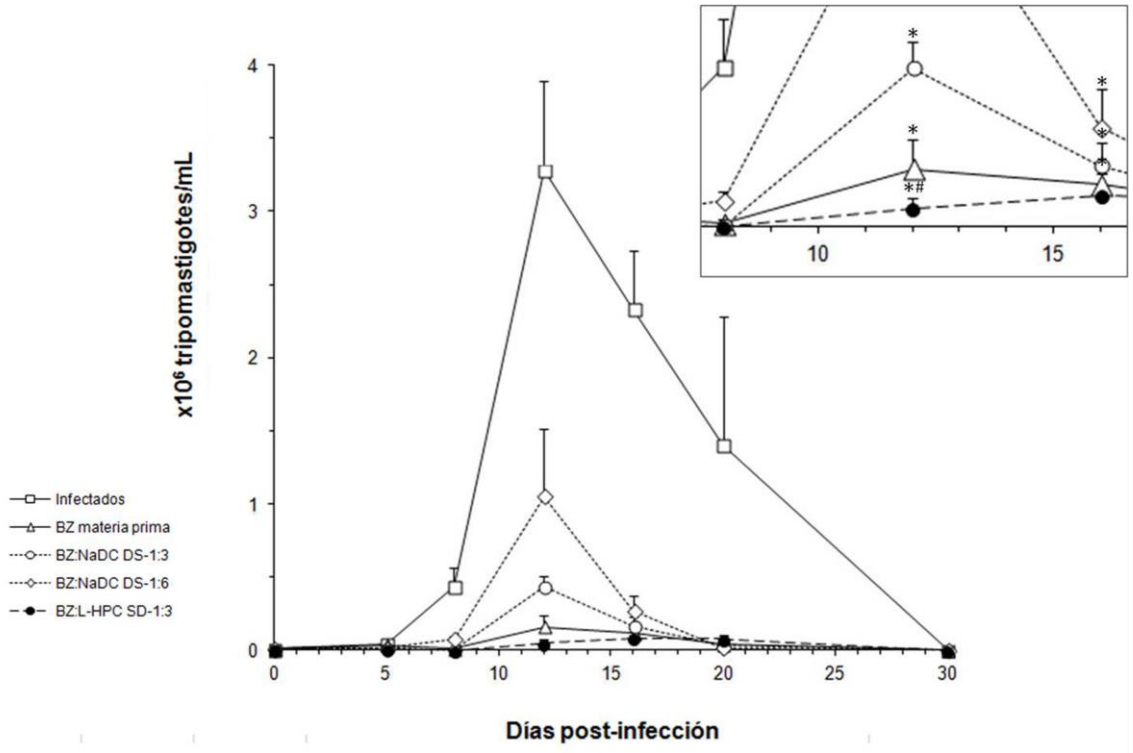


Fig. 97. DS de BZ: curvas de parasitemia en hembras NMRI de 25 ± 2 g de peso infectadas con *T. cruzi* cepa Y, tratadas durante 5 días consecutivos con 25 mg/kg/día p.o. de las distintas formulaciones de BZ. Animales con parasitemia positiva el 5º d.p.i.: n = 10 en los grupos tratados con DS-1:3 (NaDC y L-HPC) y DS-1:6, n = 9 en los grupos control de infección y BZ materia prima. Cada punto de la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SEM. * Diferencias significativas con respecto al grupo control de infección ($P < 0,05$), ANOVA. # Diferencias significativas entre la DS-1:3 (BZ:NaDC) y su homólogo con L-HPC ($P < 0,05$), ANOVA.

Como muestra la Fig. 97, a la dosis administrada (25 mg/kg/día p.o. durante 5 días consecutivos desde el 5º d.p.i.), ninguno de los tratamientos, incluido el realizado con el BZ materia prima, dio lugar a la completa eliminación de la parasitemia durante la fase aguda. No obstante, se alcanzaron importantes reducciones en los niveles del 12º d.p.i. ($P < 0,05$) tanto en los grupos tratados con las DS-1:3 en NaDC o en L-HPC como con el BZ materia prima, así como en todos los grupos experimentales en el 16º d.p.i. ($P < 0,05$). Expresando la actividad de las DS como %AUPC, el tratamiento realizado con la DS-1:3 en NaDC produjo una reducción de la parasitemia del 91,93%. Asimismo, los resultados obtenidos *in vivo* confirman una pérdida de actividad para la DS-1:6 (%AUPC = 83,14%), previamente observada en el ensayo frente a amastigotes (Tabla 50). Respecto a la sustitución del NaDC por L-HPC, se apreció un ligero aumento en la actividad cuando se utilizó L-HPC (%AUPC = 96,65%), igualando los resultados del BZ materia prima (%AUPC = 95,27%). Por su parte, la DS en L-HPC mejoró significativamente la reducción obtenida por la DS-1:3 en NaDC en el 12º d.p.i. ($P < 0,05$).

La supervivencia de los ratones se siguió diariamente hasta el 30º día post-tratamiento (40º d.p.i.). Ninguno de los animales que fueron tratados con las distintas DS o con el BZ materia prima murió durante la fase aguda de la infección. Por el contrario, el grupo control de animales infectados presentó una supervivencia del 44,44% (Fig. 98).

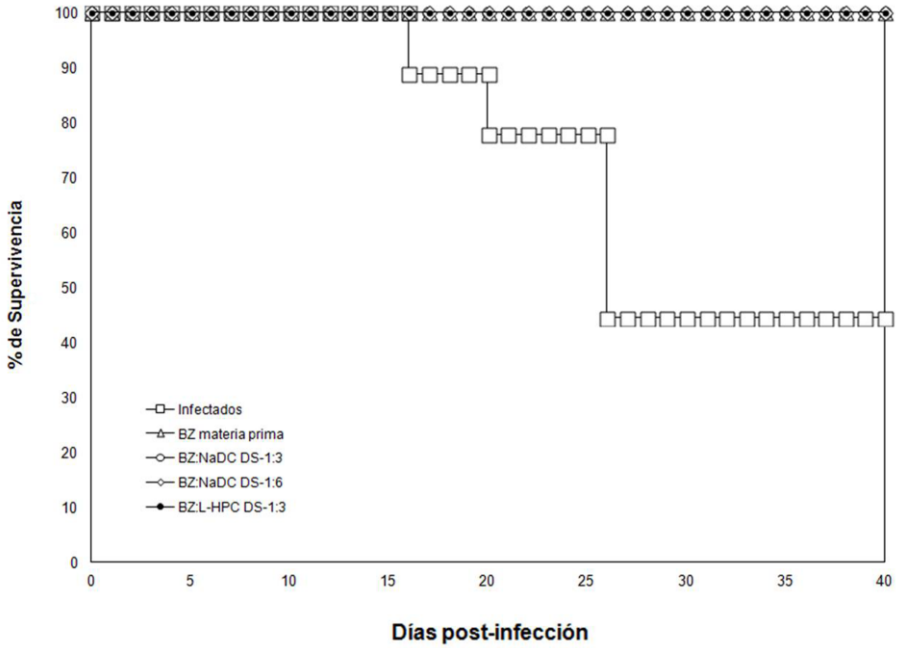


Fig. 98. DS de BZ: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

Finalmente, es importante mencionar que durante el transcurso del experimento no se percibieron signos aparentes de toxicidad aguda tales como pérdida de peso, pérdida de pelo o diarrea, sugiriendo que estas formulaciones son bien toleradas en ratón a la posología establecida.

3.2.2. EVALUACIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL SOBRE *T. cruzi*

Una vez comprobado que la L-HPC resulta mejor excipiente para la elaboración de las DS, se siguió el mismo procedimiento para la obtención de DS de algunos de los derivados de 5-nitroindazol anteriormente ensayados y con limitada solubilidad acuosa, a fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas y potenciar su perfil de actividad *in vivo*.

De esta manera, se elaboraron DS del derivado 2-bencil-1-propil-5-nitroindazolinona (**VATR1**) y del derivado 2-bencil-1-butil-5-nitroindazolinona (**VATR3**), ambos pertenecientes a la serie I de derivados de 5-nitroindazol y cuyas actividades *in vitro* e *in vivo* se exponen en el apartado 3.1.1. de esta memoria.

3.2.2.1. Dispersiones sólidas del derivado de 5-nitroindazol VATR1: 2-bencil-1-propil-5-nitroindazolinona

- **Ensayo de velocidad de disolución *in vitro***

A continuación se muestran los perfiles de disolución obtenidos por las distintas formulaciones de **VATR1**, así como el de la materia prima (Fig. 99).

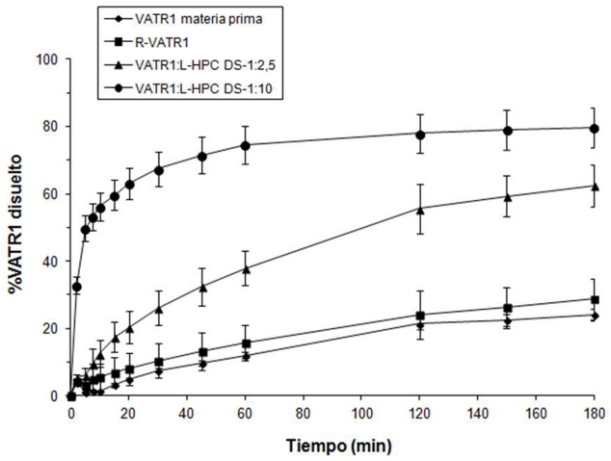


Fig. 99. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: materia prima, **VATR1** recristalizado (R-**VATR1**), DS-1:2,5 y DS-1:10 en L-HPC. Cada punto indica la media ± SD de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el derivado **VATR1** mostró un bajo porcentaje de disolución, no superándose el 24% una vez concluido el ensayo (180 min). El perfil del R-**VATR1** presentó un comportamiento similar, siendo el porcentaje de compuesto disuelto a las 3 h ligeramente superior (28,69 ± 6,09%). No obstante, la solubilidad de este derivado aumentó de manera considerable en presencia de L-HPC, de modo que a los 60 min fue tres veces superior para la DS-1:2,5 (37,92 ± 1,10%) y seis veces para la DS-1:10 (74,68 ± 5,60%) en comparación con la que mostró la materia prima (11,93 ± 0,89%). Sin embargo,

como se aprecia en la Fig. 99, entre los 120–180 min tanto las distintas formulaciones como la materia prima mantuvieron una velocidad de disolución constante. Finalmente, la cantidad de **VATR1** liberado a las 3 h fue del 62,40 ± 0,50% a partir de la DS-1:2,5 y del 79,75 ± 5,98% a partir de la DS-1:10, contrastando ambos frente al %**VATR1** < 30% que se disolvió en el derivado recristalizado y en la materia prima.

- **Actividad *in vivo***

Debido a que el derivado **VATR1** fue previamente evaluado en diversos modelos *in vitro* obteniendo resultados de actividad destacables, y en el modelo murino de infección aguda alcanzó un 52% de reducción en la parasitemia tras administrar 5 dosis consecutivas de 100 mg/kg/día (apartado 3.1.1.), las DS de este derivado se ensayaron directamente en el modelo *in vivo* de rutina (Romanha *et al*., 2010).

Las DS de **VATR1** se administraron oralmente a grupos de ratones NMRI, en dosis de 12,5 mg/kg/día durante 5 días consecutivos a partir del 5º d.p.i. En el ensayo se incluyó un grupo de ratones infectados tratados con el vehículo (carboximetilcelulosa sódica al 2%), además de un grupo tratado con BZ y otro con **VATR1** materia prima a la misma posología.

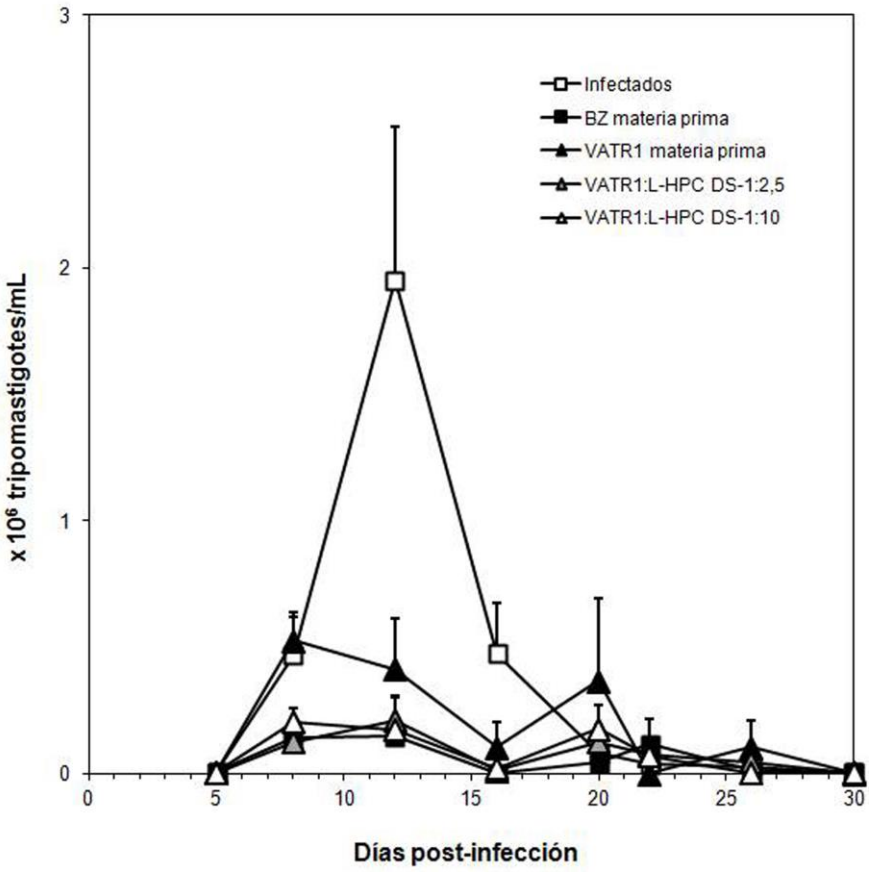


Fig. 100. DS de **VATR1**: curvas de parasitemia en machos NMRI de 33 ± 2 g de peso infectados con *T. cruzi* cepa Y, tratados por 5 días consecutivos con 12,5 mg/kg/día p.o. de las DS de **VATR1** en L-HPC. N = 9 en los grupos control de infección, BZ y **VATR1** materia prima; n = 10 en los tratados con las DS. Cada punto en la curva representa el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SEM.
* Diferencias significativas *(P < 0,05)* con respecto al grupo control de infección y $^{\#}$ *(P < 0,05)* entre **VATR1** y las DS, ANOVA.

Como se muestra en la Fig. 100, todos los tratamientos realizados redujeron de manera global la parasitemia del grupo control de infección. Expresando los resultados como %AUPC, ambas formulaciones obtuvieron perfiles de actividad similares y ligeramente inferiores al del fármaco de referencia: %AUPC = 82,25% (DS-1:2,5), 81,05% (DS-1:10) y 86,01% (BZ). Sin embargo, las dos formulaciones potenciaron considerablemente la actividad mostrada por **VATR1** materia prima, cuyo %AUPC fue del 53,80%.

En relación a los resultados obtenidos el día de máxima parasitemia, alcanzado esta ocasión el 12º d.p.i., todos los tratamientos dieron lugar a importantes reducciones: 78,88% (**VATR1** materia prima), 89,24% (DS-1:2,5), 91,22% (DS-1:10) y 92,43% (BZ). No obstante, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas en las parasitemias de los diferentes grupos de tratamiento con respecto a los niveles del control ($P > 0,05$), y tampoco entre el grupo tratado con **VATR1** materia prima y las diferentes DS ($P > 0,05$).

Con respecto a la supervivencia de los animales (Fig. 101), el grupo tratado con BZ fue el único que superó la fase aguda de la infección, mostrando un 100% de supervivencia a pesar de la baja dosis de fármaco administrada (12,5 mg/kg/día). Caso contrario fue el de los grupos tratados con **VATR1**, cuyos porcentajes de supervivencia fueron inferiores al del control de infección (%S = 77,78%), ya fuera en su administración como materia prima (%S = 66,67%) o en forma de DS (%S = 70 y 60% para las DS-1:2,5 y DS-1:10, respectivamente).

Estos resultados sugieren que para el derivado **VATR1**, la dosis de 12,5 mg/kg/día administrada durante 5 días consecutivos no proporciona suficiente protección frente a la mortalidad asociada a la fase aguda de la infección murina.

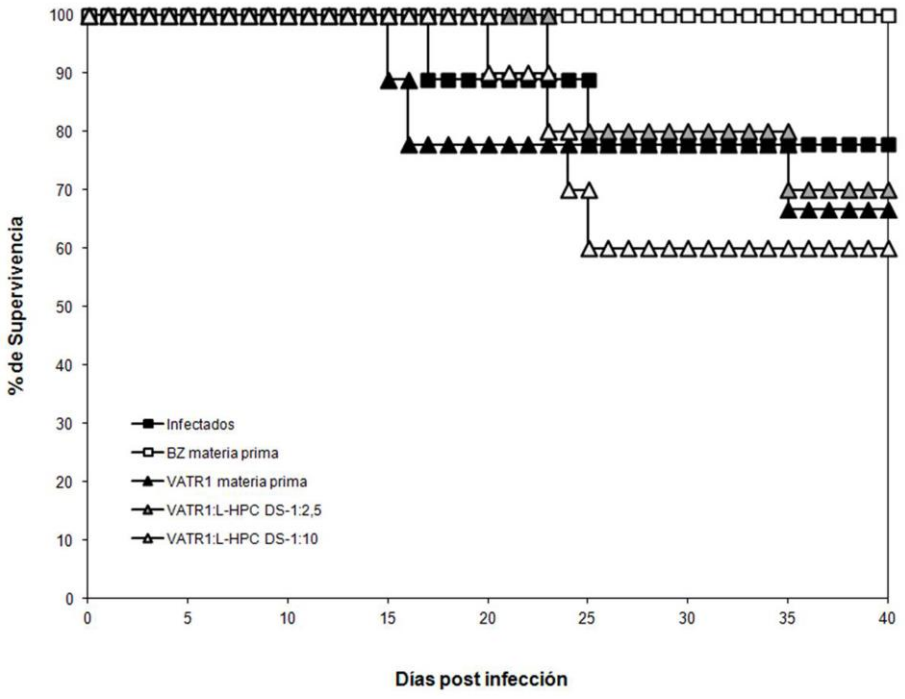


Fig. 101. DS de **VATR1**: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

3.2.2.2. Dispersiones sólidas del derivado de 5-nitroindazol VATR3: 2-bencil-1-butil-5-nitroindazolinona

- **Ensayo de velocidad de disolución *in vitro***

Los perfiles de disolución obtenidos por **VATR3** y por las distintas formulaciones de este derivado en L-HPC se presentan en la Fig. 102. La menor solubilidad acuosa de este derivado supuso la incorporación de una mayor cantidad de excipiente en el desarrollo de las mismas (DS-1:5, DS-1:10 y DS-1:20).

De manera similar a lo ocurrido con el anterior derivado, durante el transcurso del ensayo **VATR3** materia prima y R-**VATR3** mostraron bajos porcentajes de disolución, siendo similar la cantidad de compuesto liberado a los 180 min (%**VATR3** disuelto ca. 25%). Sin embargo, durante las primeras 2 h, la velocidad de disolución fue ligeramente superior en el caso de **VATR3** materia prima.

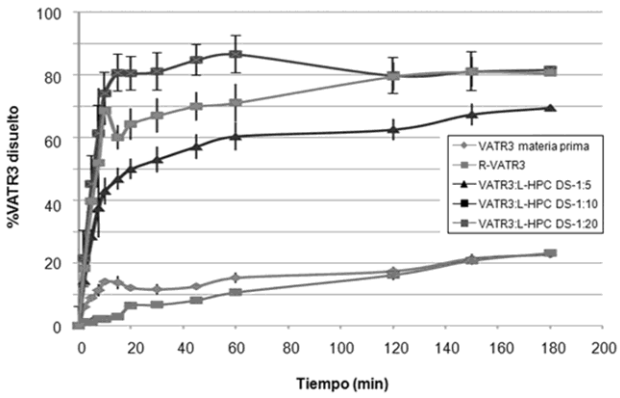


Fig. 102. Perfiles de disolución a 37 ºC en HCl 0,1 N: materia prima, **VATR3** recristalizado (R-**VATR3**), DS-1:5, DS-1:10 y DS-1:20 en L-HPC. Cada punto representa la media ± SD de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3).

Por el contrario, todas las DS de **VATR3** en L-HPC presentaron perfiles de disolución mucho más rápidos. De esta manera, una vez transcurridas las 3 h del ensayo, la cantidad de **VATR3** disuelto fue aproximadamente del 70% para la DS-1:5 y del 80% para las DS-1:10 y DS-1:20. Comparando los perfiles de la DS-1:5 y la DS-1:10, se aprecia como el incremento en la proporción de L-HPC mejoró notablemente la velocidad de disolución del compuesto. No obstante, las DS-1:10 y DS-1:20 mostraron una cinética similar al inicio del ensayo, liberando más del 70% a los 10 min. Sin embargo, ésta se ralentizó en el caso de la DS-1:20, de modo que su perfil se solapó con el de la DS-1:10 a partir de los 120 min.

- **Actividad *in vivo***

Con respecto a los ensayos biológicos, se procedió de manera similar con el derivado **VATR3**. Este compuesto fue previamente evaluado en diversos modelos *in vitro* mostrando resultados de actividad prometedores, y condujo a un 77% de reducción en la parasitemia

del modelo murino propuesto por Romanha *et al*. (2010) tras administrar 5 dosis consecutivas de 100 mg/kg/día (apartado 3.1.1.).

Las DS de **VATR3** se administraron a grupos de ratones NMRI siguiendo el esquema de tratamiento anteriormente descrito para el derivado **VATR1**: 12,5 mg/kg/día durante 5 días consecutivos comenzando el 5º d.p.i. En esta ocasión, se seleccionó nuevamente la DS-1:10 de acuerdo con su perfil de disolución *in vitro*. Debido a que la cantidad de **VATR3** liberado a partir de las DS-1:5, DS-1:10 y DS-1:20 fue similar una vez finalizado el ensayo, presuponiéndose por tanto una actividad *in vivo* semejante para todas las formulaciones, se preparó una nueva DS con menor proporción de L-HPC (DS-1:2,5) a fin de establecer una mejor comparación de su eficacia en el modelo murino.

Como se observa en el grupo control de infección, las parasitemias que en esta ocasión mostraron los animales fueron considerablemente inferiores a las obtenidas en otros ensayos anteriores. Sin embargo, se observa una importante reducción en los niveles de parasitemia de todos los grupos experimentales como consecuencia de los diferentes tratamientos administrados (Fig. 103).

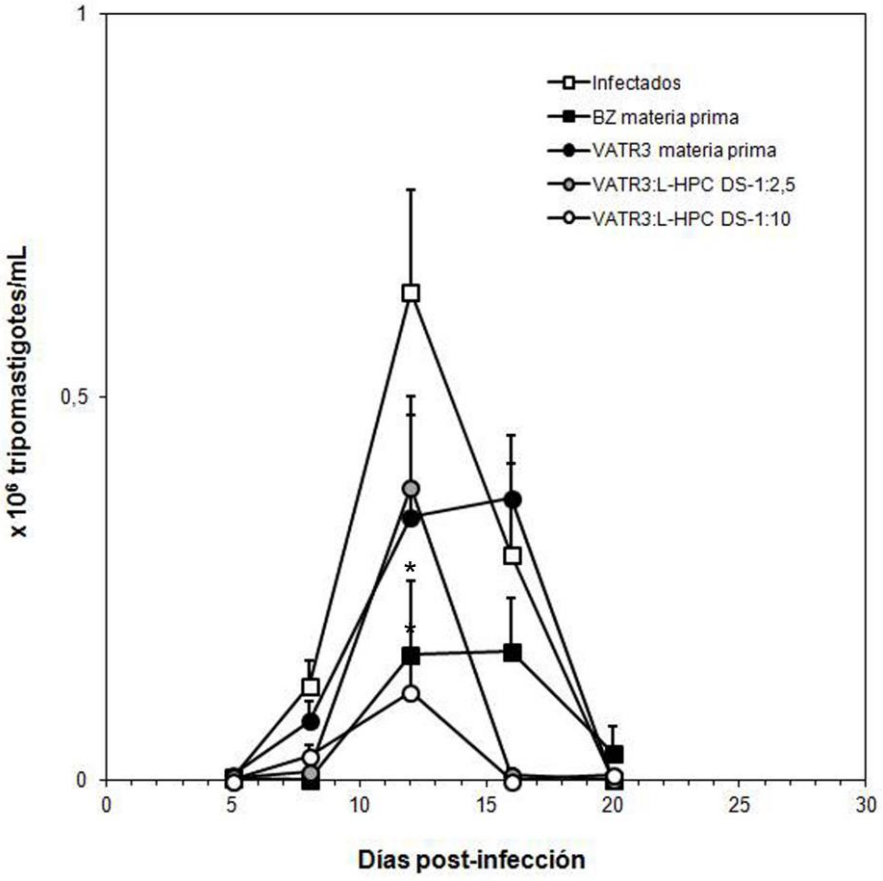


Fig. 103. DS de **VATR3**: curvas de parasitemia en machos NMRI de 33 ± 2 g de peso infectados con *T. cruzi* cepa Y, tratados por 5 días consecutivos con 12,5 mg/kg/día p.o. de las DS de **VATR3** en L-HPC. N = 10 para todos los grupos. Cada punto en la curva muestra el valor medio de parasitemia para cada grupo ± SEM.
* Diferencias significativas *(P < 0,05)* con respecto al grupo control de infección y $^{\#}$ *(P < 0,05)* entre **VATR3** y las DS, ANOVA.

De acuerdo con las curvas de parasitemia, se aprecia claramente como el aumento del contenido de L-HPC en las formulaciones trajo una mejora progresiva en el perfil de

actividad del compuesto **VATR3**. De esta manera, los %AUPC obtenidos fueron de 24,51, 61,12 y 85,42% para **VATR3** materia prima, DS-1:2,5 y DS-1:10, respectivamente.

Centrándonos en los resultados del 12º d.p.i., el cual fue el día de máxima parasitemia en este estudio, se obtuvieron niveles de parasitemia similares en los grupos tratados con **VATR3** materia prima y con la DS-1:2,5 ($P > 0,05$), alcanzando porcentajes de reducción del 46,15 y 40,11%, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento realizado con la DS-1:10 supuso una importante disminución en los niveles de parasitemia con respecto al grupo control de infección ($P < 0,05$), siendo el porcentaje de reducción alcanzado por esta formulación (81,87%) superior al obtenido esta vez por el BZ (74,18%).

Como se muestra a continuación en la Fig. 104, la supervivencia de los animales se siguió diariamente hasta el 40º d.p.i.

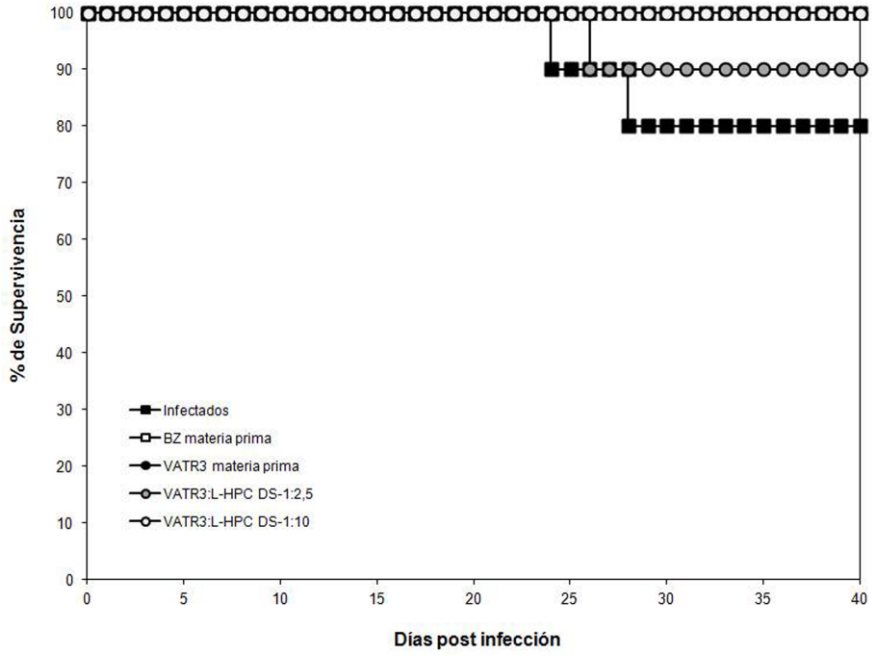


Fig. 104. DS de **VATR3**: supervivencia de los ratones durante la fase aguda.

En esta ocasión, la supervivencia que se registró en el grupo control de infección (%S = 80%) fue menor que la que presentaron los diferentes grupos de tratamiento. De todos ellos, únicamente el grupo tratado con la DS-1:2,5 mostró una supervivencia inferior al 100%, siendo ésta del 90%.

Finalmente, cabe mencionar que durante el transcurso de este experimento no se percibieron signos evidentes de toxicidad aguda, tales como pérdida de peso, pérdida de pelo o diarrea, sugiriendo que tanto el derivado **VATR3** como sus dispersiones sólidas en L-HPC son bien tolerados en ratón a la posología establecida.

3.3. Modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida

3.3.1. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS QSAR/ADL DE PREDICCIÓN

3.3.1.1. Diseño de las series de entrenamiento y predicción

Las correspondientes series de entrenamiento (SE) y predicción (SP) se obtuvieron mediante análisis de conglomerados (*k*-medias) a partir de la base de datos (BD) inicialmente formada por 1.308 compuestos, 759 activos y 549 inactivos. En este análisis además se retiraron un total de 71 compuestos, de entre los cuales 20 estaban repetidos, 3 presentaban errores en sus estructuras y 48 fueron eliminados para equiparar el número de moléculas entre los diferentes *clusters*. De esta manera, la SE quedó finalmente constituida por un total de 929 moléculas, de las cuales 527 son activas y 402 inactivas, mientras que la SP presentó un total de 308 moléculas, 177 activas y 131 inactivas (Tabla 51 y Fig. 105).

Tabla 51. Distribución de las moléculas activas e inactivas que constituyen la base de datos confeccionada en las correspondientes SE y SP.

Base de datos	Eliminadas[a]	SE	SP	Total
Activos	55	527	177	**759**
Inactivos	16	402	131	**549**
Total	**71**	**929**	**308**	**1308**

[a] Eliminadas de la BD por ser moléculas repetidas (20), detectar algún error en sus estructuras (3) o equiparar el número de moléculas en los *clusters* (48).

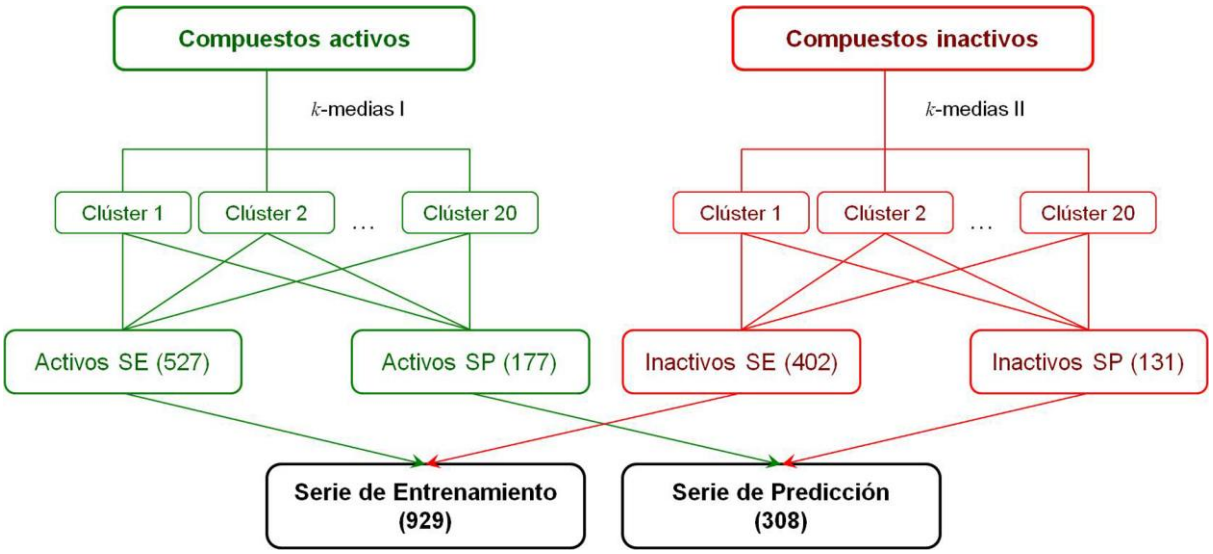


Fig. 105. SE y SP diseñadas mediante análisis de conglomerados (*k*-medias). Fuente: esquema adaptado a los resultados obtenidos a partir del propuesto por Montero-Torres *et al*. (2005).

3.3.1.2. Obtención de los modelos QSAR/ADL

A partir de los descriptores moleculares (DM) calculados con el software TOMOCOMD-CARDD y aplicando la técnica del análisis discriminante lineal (ADL), se obtuvieron los 45 modelos de clasificación QSAR/ADL basados en relaciones entre átomos de índice lineal, no estocásticos (NS), estocásticos (SS), doble estocásticos (dS) y de probabilidad mutua (PM). En la Tabla 52 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para cada uno de los modelos y en ella se hace referencia a los DM (índices) sobre los que se construyó cada modelo individual.

A juzgar por los resultados estadísticos obtenidos con la SE, el mejor modelo de predicción fue el número **45** (**Gral IL**) el cual presentó una Q = 92,03% y una RFA = 8,71%. Estos valores se fijaron como el umbral a superar por los distintos sistemas multiclasificadores (SMC) creados en el ensamble, a favor de una optimización en la capacidad de predicción de los clasificadores individuales (modelos).

La clasificación obtenida por cada uno de los 45 modelos para cada compuesto de la BD expresada como $\Delta P\%$ se recoge en el Anexo suplementario 2, incluido en el CD que se adjunta a la presente memoria.

3.3.1.3. Validación de los modelos de predicción

- **Validación externa**

De acuerdo con los parámetros estadísticos obtenidos para la SE (Tabla 52), los 45 modelos QSAR/ADL muestran una buena calidad. No obstante, es necesario confirmar su capacidad de predicción mediante evaluación de la SP.

Los parámetros estadísticos obtenidos por los 45 modelos en la evaluación de la SP (Tabla 52) son un reflejo de los resultados del proceso de validación externa y por tanto, confirman la calidad y el poder de predicción de los modelos.

- **Validación interna**

Con respecto a la validación interna, ésta se realizó únicamente para los modelos que integraron finalmente los correspondientes SMC. Por este motivo, los resultados obtenidos en los procedimientos de *validación cruzada* y *aleatorización de la variable respuesta* se expondrán más adelante en esta memoria, una vez se hayan presentado los modelos que forman parte de cada SMC.

Tabla 52. Parámetros estadísticos obtenidos para cada uno de los 45 modelos de clasificación QSAR/ADL basados en relaciones de átomos.

Modelo	Índices	SE						SP						λ Wilks	D^2	F
		C	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Prec*	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Prec*			
1	**ILNS-MA**	0,76	88,05	91,46	83,58	16,42	87,96	0,72	86,04	87,01	84,73	15,27	88,51	0,46	4,79	(7,921) = 154,99
2	**ILNS-P**	0,76	88,16	91,46	83,83	16,17	88,12	0,73	86,69	88,14	84,73	15,27	88,64	0,47	4,66	(5,923) = 211,74
3	**ILNS-E**	0,73	86,65	86,91	86,32	13,68	89,28	0,64	82,14	81,36	83,21	16,79	86,75	0,50	4,07	(8,920) = 115,05
4	**ILNS-VdW**	0,79	89,56	92,98	85,07	14,93	89,09	0,78	88,96	89,27	88,55	11,45	91,33	0,44	5,13	(6,922) = 194,10
5	**ILNS-LogP**	0,69	84,61	85,39	83,58	16,42	87,21	0,63	81,82	81,36	82,44	17,56	86,23	0,55	3,30	(7,921) = 106,83
6	**ILNS-C**	0,74	87,30	87,10	87,56	12,44	90,18	0,73	86,36	84,18	89,31	10,69	91,41	0,44	5,17	(5,923) = 234,60
7	**ILNS-H**	0,80	89,99	93,17	85,82	14,18	89,60	0,72	86,36	87,57	84,73	15,27	88,57	0,43	5,39	(7,921) = 174,41
8	**ILNS-PSA**	0,76	88,37	90,51	85,57	14,43	89,16	0,66	83,44	84,18	82,44	17,56	86,63	0,46	4,70	(9,919) = 118,04
9	**ILNS-R**	0,75	87,94	89,75	85,57	14,43	89,08	0,77	88,64	88,14	89,31	10,69	91,76	0,47	4,53	(4,924) = 257,66
10	**ILNS-S**	0,67	83,75	83,68	83,83	16,17	87,15	0,67	83,12	80,23	87,02	12,98	89,31	0,66	2,06	(4,924) = 116,99
11	**ILNS-Gral**	0,84	91,93	93,36	90,05	9,95	92,48	0,77	88,96	89,83	87,79	12,21	90,86	0,38	6,67	(8,920) = 188,63
12	**ILSS-MA**	0,78	89,34	91,27	86,82	13,18	90,07	0,73	86,69	87,57	85,50	14,50	89,08	0,42	5,52	(6,922) = 208,75
13	**ILSS-P**	0,75	87,62	89,94	84,58	15,42	88,43	0,71	86,04	87,57	83,97	16,03	88,07	0,47	4,58	(7,921) = 148,22
14	**ILSS-E**	0,78	89,34	90,51	87,81	12,19	90,68	0,74	87,34	87,57	87,02	12,98	90,12	0,43	5,30	(5,923) = 240,53
15	**ILSS-VdW**	0,79	89,67	89,94	89,30	10,70	91,68	0,71	85,71	85,31	86,26	13,74	89,35	0,43	5,42	(5,923) = 246,21
16	**ILSS-LogP**	0,67	83,75	84,63	82,59	17,41	86,43	0,63	81,49	78,53	85,50	14,50	87,97	0,55	3,26	(8,920) = 92,36
17	**ILSS-C**	0,76	88,27	88,43	88,06	11,94	90,66	0,75	87,34	85,31	90,08	9,92	92,07	0,43	5,49	(7,921) = 177,65
18	**ILSS-H**	0,73	86,54	86,34	86,82	13,18	89,57	0,68	84,42	84,18	84,73	15,27	88,17	0,48	4,37	(6,922) = 165,27
19	**ILSS-PSA**	0,77	88,81	90,51	86,57	13,43	89,83	0,70	85,06	85,31	84,73	15,27	88,30	0,47	4,58	(9,919) = 115,05
20	**ILSS-R**	0,75	87,62	89,37	85,32	14,68	88,87	0,73	86,69	86,44	87,02	12,98	90,00	0,47	4,54	(5,923) = 206,05
21	**ILSS-S**	0,69	84,61	84,25	85,07	14,93	88,10	0,69	84,74	83,05	87,02	12,98	89,63	0,58	2,94	(7,921) = 95,31
22	**ILSS-Gral**	0,83	91,71	92,41	90,80	9,20	92,94	0,80	89,94	88,70	91,60	8,40	93,45	0,34	7,89	(9,919) = 198,26
23	**ILdS-MA**	0,74	87,19	91,84	81,09	18,91	86,43	0,74	87,34	89,83	83,97	16,03	88,33	0,48	4,48	(5,923) = 203,52
24	**ILdS-P**	0,73	86,98	90,51	82,34	17,66	87,04	0,67	84,09	87,01	80,15	19,85	85,56	0,49	4,26	(7,921) = 137,99
25	**ILdS-E**	0,74	87,19	91,84	81,09	18,91	86,43	0,69	84,74	88,14	80,15	19,85	85,71	0,46	4,76	(7,921) = 154,04
26	**ILdS-VdW**	0,76	88,16	92,79	82,09	17,91	87,17	0,70	85,39	90,40	78,63	21,37	85,11	0,47	4,51	(5,923) = 204,84

Tabla 52. Continuación.

27	**ILdS-LogP**	0,70	85,04	91,65	76,37	23,63	83,56	0,67	83,77	88,70	77,10	22,90	83,96	0,57	3,10	(5,923) = 140,68
28	**ILdS-C**	0,72	86,44	87,86	84,58	15,42	88,19	0,70	85,39	85,31	85,50	14,50	88,82	0,49	4,19	(5,923) = 190,21
29	**ILdS-H**	0,78	89,24	90,51	87,56	12,44	90,51	0,72	86,36	88,14	83,97	16,03	88,14	0,41	5,90	(8,920) = 166,85
30	**ILdS-PSA**	0,76	88,05	91,27	83,83	16,17	88,10	0,64	82,47	87,57	75,57	24,43	82,89	0,49	4,30	(6,922) = 162,54
31	**ILdS-R**	0,76	88,37	91,84	83,83	16,17	88,16	0,70	85,39	88,14	81,68	18,32	86,67	0,47	4,51	(5,923) = 204,78
32	**ILdS-S**	0,63	81,81	88,43	73,63	26,87	81,18	0,63	82,14	88,14	67,94	25,95	82,11	0,72	1,59	(9,919) = 39,81
33	**ILdS-Gral**	0,80	90,31	93,17	86,57	13,43	90,09	0,74	87,34	87,57	87,02	12,98	90,12	0,34	7,81	(10,918) = 176,40
34	**ILPM-MA**	0,67	83,42	93,55	70,15	29,85	80,42	0,60	80,52	89,27	68,70	31,30	79,40	0,63	2,43	(7,921) = 78,64
35	**ILPM-P**	0,70	85,47	91,84	77,11	22,89	84,03	0,74	87,34	90,96	82,44	17,56	87,50	0,50	4,09	(9,919) = 102,83
36	**ILPM-E**	0,65	82,99	89,37	74,63	25,37	82,20	0,65	82,79	87,57	76,34	23,66	83,33	0,57	3,05	(7,921) = 98,71
37	**ILPM-VdW**	0,67	83,64	92,22	72,39	27,61	81,41	0,63	82,14	89,27	72,52	27,48	81,44	0,56	3,21	(8,920) = 90,85
38	**ILPM-LogP**	0,65	82,78	90,51	72,64	27,36	81,26	0,67	84,09	88,14	78,63	21,37	84,78	0,59	2,80	(8,920) = 79,13
39	**ILPM-C**	0,71	85,68	90,13	79,85	20,15	85,43	0,69	84,74	88,14	80,15	19,85	85,71	0,55	3,27	(7,921) = 105,92
40	**ILPM-H**	0,68	83,85	94,31	70,15	29,85	80,55	0,68	84,42	92,09	74,05	25,95	82,74	0,58	3,00	(10,918) = 67,66
41	**ILPM-PSA**	0,73	86,87	90,70	81,84	18,16	86,75	0,67	84,09	87,57	79,39	20,61	85,16	0,54	3,46	(6,922) = 130,92
42	**ILPM-R**	0,63	81,92	89,75	71,64	28,36	80,58	0,57	79,22	84,75	71,76	28,24	80,21	0,65	2,24	(10,918) = 50,51
43	**ILPM-S**	0,68	84,07	94,12	70,90	29,10	80,91	0,61	81,17	90,40	68,70	31,30	79,60	0,68	1,95	(10,918) = 44,11
44	**ILPM-Gral**	0,79	89,67	89,75	89,55	10,45	91,84	0,73	86,36	84,18	89,31	10,69	91,41	0,41	5,89	(10,918) = 132,96
45	**IL-Gral**	0,84	92,03	92,60	91,29	8,71	93,31	0,80	89,94	89,27	90,84	9,16	92,94	0,32	8,69	(7,921) = 281,27

SE: serie de entrenamiento, SP: serie de predicción, C: coeficiente de correlación de Matthews, Q: exactitud, S: sensibilidad, E: especificidad, RFA: razón de falsa alarma, $Prec$: precisión, IL: índice lineal, NS: no estocástico, SS: estocástico, dS : doble estocástico, PM: probabilidad mutua, MA: masa atómica, P: polarizabilidad, E: electronegatividad, VdW: volumen de van der Waals, LogP: coeficiente de reparto, C: carga, H: dureza, PSA: área de superficie polar, R: refractividad, S: blandura.

3.3.1.4. Evaluación de la diversidad de los modelos de predicción

La diversidad en la comparación por pares de todos los modelos se exploró aplicando las medidas de desacuerdo, doble fallo, diferencia, correlación y Q-estadístico, con dimensiones 2, 3, 4, y 5. Los resultados ofrecidos por el programa DASDE para cada medida de diversidad se muestran en la Tabla 53, y a partir de éstos se seleccionaron de manera automática los modelos de predicción para a continuación proceder con su ensamble. De los 45 modelos QSAR/ADL, el programa seleccionó los 16 que se indican a continuación como los más diversos: **2**, **6**, **8**, **10**, **11**, **13**, **21**, **22**, **28**, **29**, **30**, **32**, **39**, **42**, **44** y **45**.

Tabla 53. Modelos de predicción seleccionados por el programa DASDE en base a los resultados de diversidad calculados por el programa.

Media	Dimensión	Modelos	Diversidad (%)
Desacuerdo	2	10_32	24,43
	3	10_32_42	21,24
	4	10_28_32_42	20,11
	5	10_21_28_32_42	12,85
Doble fallo	2	22_42	4,41
		8_21	4,41
		42_45	4,41
	3	8_21_39	4,88
	4	2_29_39_44	5,17
		8_11_21_39	5,17
	5	8_10_13_22_39	5,32
		2_11_29_39_44	5,32
Diferencia	2	10_32	19,81
	3	6_10_32	15,21
	4	10_28_32_42	13,83
		6_10_32_42	13,83
	5	10_21_28_32_42	12,85
Correlación	2	10_32	12,82
	3	6_10_32	22,09
	4	6_10_32_42	26,43
	5	8_10_21_32_39	27,73
Q-estadístico	2	10_32	37,59
	3	6_10_32	58,45
	4	10_28_32_42	64,28
	5	10_21_30_32_42	67,51

3.3.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA MULTICLASIFICADOR

3.3.2.1. Sistema multiclasificador 1

- **Combinación de los modelos QSAR/ADL: ensamble**

Finalmente, a partir de los 16 modelos seleccionados en el apartado 3.3.1.4. se procedió con el ensamble. Este procedimiento se llevó a cabo aplicando las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M), en combinaciones de 2 hasta 5 modelos, cuyos resultados estadísticos obtenidos para la SE se muestran en la Tabla 54.

Tabla 54. Valores estadísticos obtenidos para la SE en el ensamble de los modelos de predicción seleccionados por el programa DASDE, aplicando las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M).

Regla	Modelos	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
Voto	11_39_45_V	0,85	92,47	93,74	90,80	9,20	93,03
	10_11_22_39_45_V	0,85	92,79	93,93	91,29	8,71	93,40
Promedio	22_45_A	0,84	92,14	92,79	91,29	8,71	93,32
	10_22_29_A	0,85	92,47	92,98	91,79	8,21	93,69
	10_21_29_45_A	0,84	92,36	92,98	91,54	8,46	93,51
	10_11_21_29_45_A	0,85	92,57	93,74	91,04	8,96	93,21
Máximo	22_45_X	0,84	92,14	92,79	91,29	8,71	93,32
	8_22_28_X	0,84	92,03	92,98	90,80	9,20	92,98
	21_22_32_45_X	0,84	92,25	92,98	91,29	8,71	93,33
	6_21_22_32_45_X	0,85	92,47	93,17	91,54	8,46	93,52
Mínimo	11_45_N	0,84	92,03	93,17	90,55	9,45	92,82
	11_22_45_N	0,83	91,71	92,98	90,05	9,95	92,45
	11_22_29_45_N	0,80	89,99	91,27	88,31	11,69	91,10
	8_11_22_30_45_N	0,77	88,70	91,08	85,57	14,43	89,22
Mediana	22_45_M	0,84	92,14	92,79	91,29	8,71	93,32
	11_39_45_M	0,85	92,47	93,74	90,80	9,20	93,03
	2_11_22_29_M	0,85	92,47	93,74	90,80	9,20	93,03
	10_11_22_39_45_M	0,85	92,79	93,93	91,29	8,71	93,40

C: coeficiente de correlación de Matthews, *Q:* exactitud, *S*: sensibilidad, *E*: especificidad, *RFA*: razón de falsa alarma.

La Fig. 106 recoge los resultados de *Q* y *RFA* para la SE, obtenidos con la mejor combinación de modelos por cada regla de ensamble. A excepción de la combinación de los modelos **11** y **45** aplicando la regla del mínimo, todas superaron el umbral establecido por el

modelo **45** (*Q* = 92,03% y *RFA* = 8,71%), presente en cuatro de las cinco mejores combinaciones. No obstante, el mejor SMC resultó de los modelos **10**, **22** y **29** aplicando la regla del promedio, con valores de *Q* y *RFA* de 92,47 y 8,21%, respectivamente.

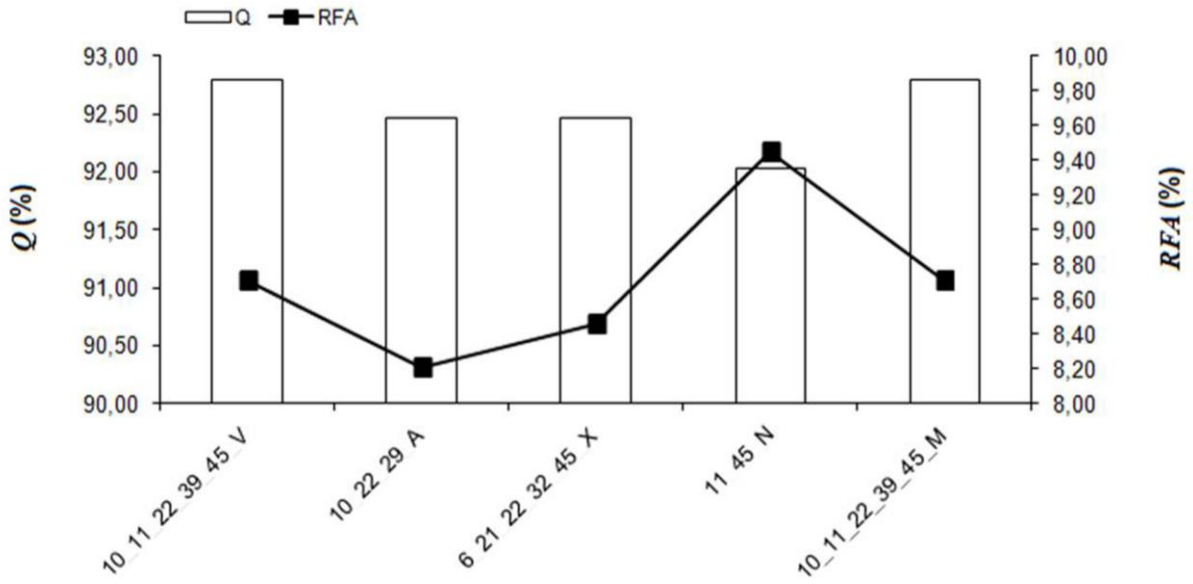


Fig. 106. Mejor combinación de modelos (ensamble) obtenida de acuerdo con las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M), en base a los valores de *Q* y *RFA* obtenidos para la SE.

Por tanto, en función de los resultados obtenidos en el ensamble y siguiendo siempre el principio de parsimonia, se seleccionó el SMC originado a partir de los modelos **10** (**ILNS-S**), **22** (**ILSS-Gral**) y **29** (**ILdS-H**). Estos tres modelos individuales posteriormente se sometieron al correspondiente proceso de validación interna. Las ecuaciones **10**, **22** y **29** que se muestran a continuación, hacen referencia a los tres modelos individuales que constituyen el primer SMC seleccionado, denominado de aquí en adelante como **SMC1**.

SMC1

$$\textit{Clasif}\ \mathbf{(10)} = -1{,}10 + 1{,}47 \times 10^{-4}\ {}^{S}\mathbf{f}_{9L}{}^{H}(x_G) + 3{,}62 \times 10^{-6}\ {}^{S}\mathbf{f}_{12L}{}^{H}(x_G) + 1{,}09 \times 10^{-5}\ {}^{S}\mathbf{f}_{13L}(x_G) - 3{,}20 \times 10^{-6}\ {}^{S}\mathbf{f}_{14L}(x_G)$$

$$\textit{Clasif}\ \mathbf{(22)} = -7{,}01 + 6{,}15 \times 10^{-1}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) + 3{,}21 \times 10^{-2}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{5L}{}^{H}(x_C) - 5{,}32 \times 10^{-1}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 2{,}04 \times 10^{-1}\ {}^{Vs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 3{,}66 \times 10^{-1}\ {}^{As}\mathbf{f}_{0}(x) + 4{,}78\ {}^{Cs}\mathbf{f}_{3L}(x_P) - 2{,}95 \times 10^{-2}\ {}^{PSAs}\mathbf{f}_{2}{}^{H}(x) + 6{,}32 \times 10^{-2}\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{13}{}^{H}(x) - 1{,}79\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P)$$

$$\textit{Clasif}\ \mathbf{(29)} = -6{,}28 + 4{,}04 \times 10^{-1}\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{5}{}^{H}(x) + 6{,}10\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 7{,}28\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 7{,}52\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{3L}{}^{H}(x_P) - 85{,}04\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{6L}{}^{H}(x_P) + 79{,}35\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{8L}{}^{H}(x_P) - 16{,}90\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{4L}(x_C) + 16{,}12\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{14L}(x_C)$$

- **Validación externa**

Como se ha comentado anteriormente, los procedimientos de validación externa se efectuaron para los 45 modelos individuales demostrando la calidad de predicción de los mismos (Tabla 52). No obstante, como muestra la Tabla 55, la validación externa del **SMC1** también se llevó a cabo confirmándose la calidad del **SMC1**.

Tabla 55. Parámetros estadísticos obtenidos para la SP en la validación externa del **SMC1**.

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
SMC1 10_22_29	0,79	89,29	87,57	91,60	8,40	93,37

C: coeficiente de correlación de Matthews, *Q*: exactitud, *S*: sensibilidad, *E*: especificidad, *RFA*: razón de falsa alarma.

- **Validación interna**

A continuación se llevaron a cabo los procedimientos de validación interna a través de los cuales se exploró la robustez de los tres modelos individuales que constituyen el **SMC1**: modelos **10**, **22** y **29**.

– *Validación cruzada*

El ejercicio de *validación cruzada* se realizó dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera de la SE. Las Fig. 107 (modelo **10**), 109 (modelo **22**) y 111 (modelo **29**) señalan que tanto la *Q* como la *RFA* no sufrieron grandes alteraciones con respecto a los valores que adquirieron para la SE del correspondiente modelo original (Tabla 52). Estos resultados confirman que en la BD no hay un grupo específico de moléculas que ejerza mayor influencia sobre la construcción del modelo.

– *Aleatorización de la variable respuesta*

Con respecto a la *aleatorización de la variable respuesta (intercambio de la Y)*, ésta se llevó a cabo sobre el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE. Los resultados obtenidos para los modelos **10**, **22** y **29** se reflejan respectivamente en las Fig. 108, 110 y 112, apoyando igualmente su estabilidad y descartándose un ajuste casual en los valores originales de la *Q*.

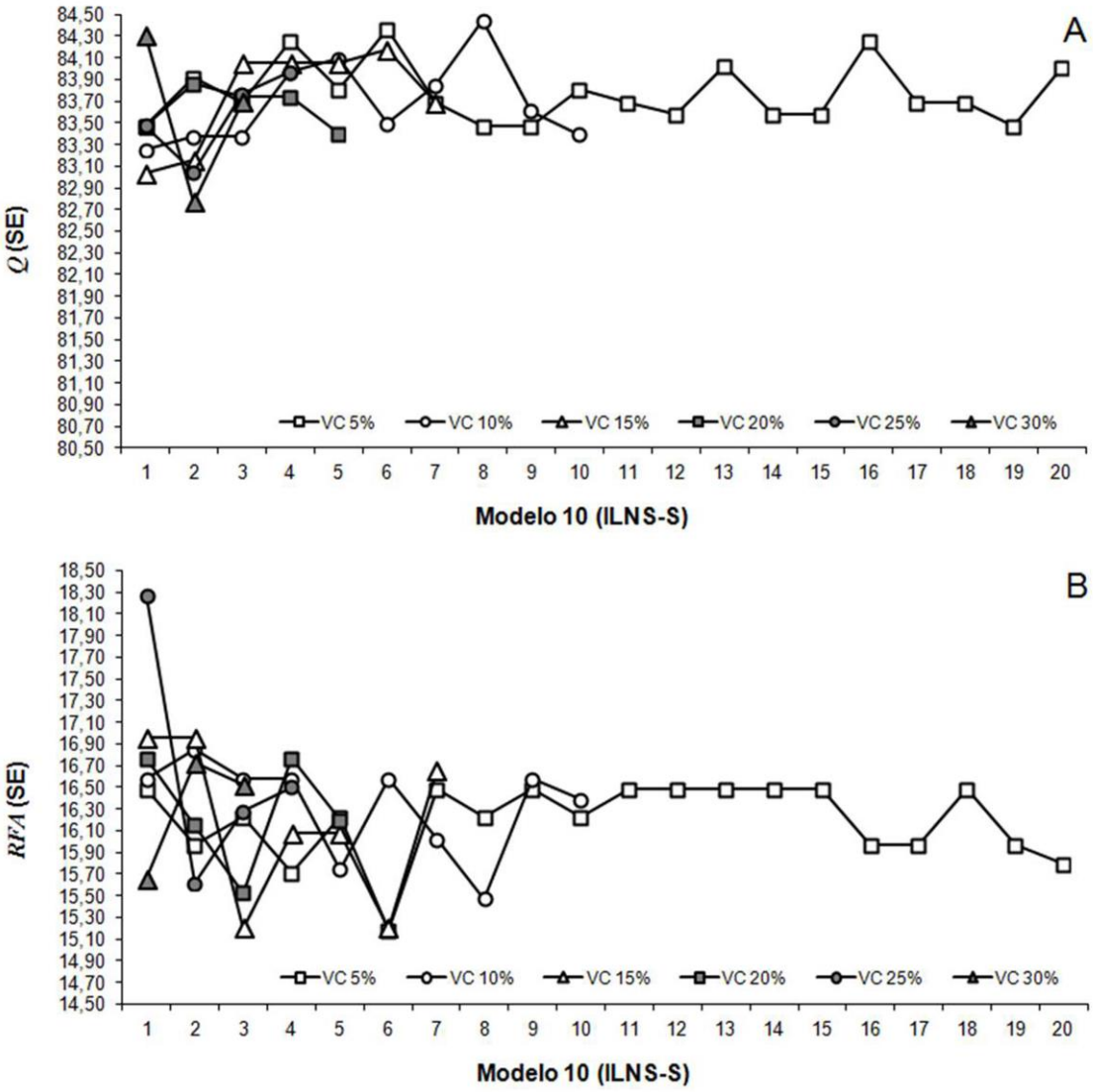


Fig. 107. *Validación cruzada* del modelo **10** (**ILNS-S**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la *Q* (A) y la *RFA* (B).

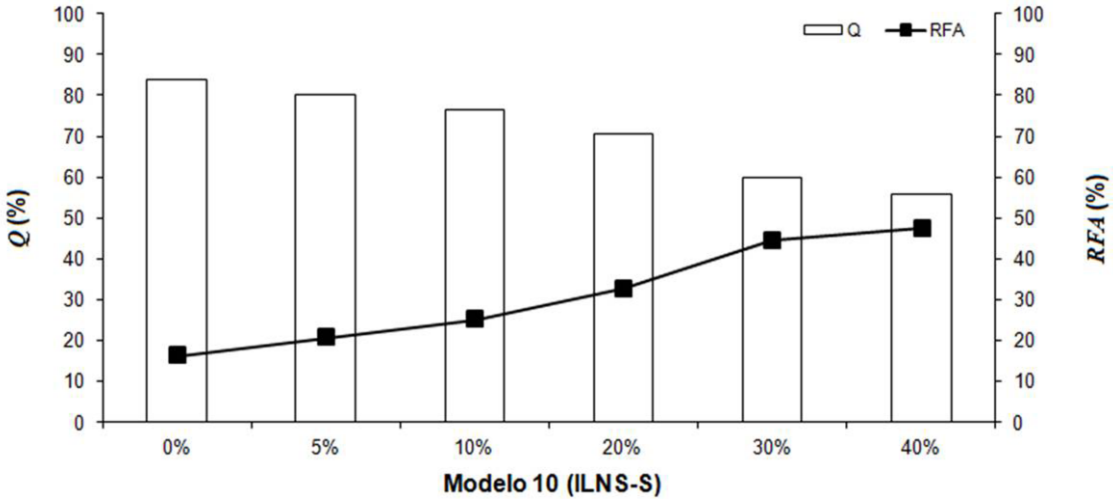


Fig. 108. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **10** (**ILNS-S**).

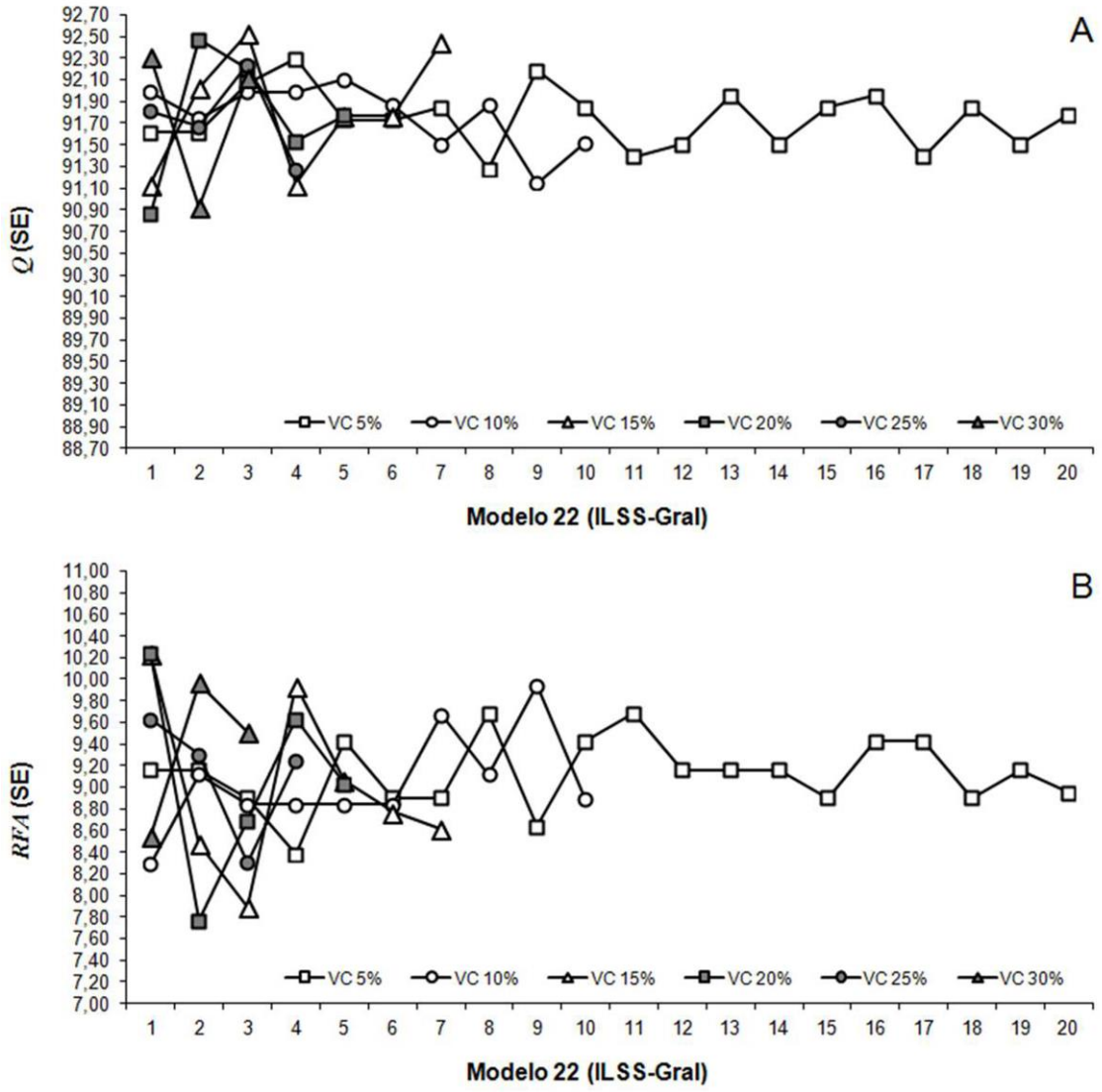


Fig. 109. *Validación cruzada* del modelo **22** (**ILSS-Gral**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la *Q* (A) y la *RFA* (B).

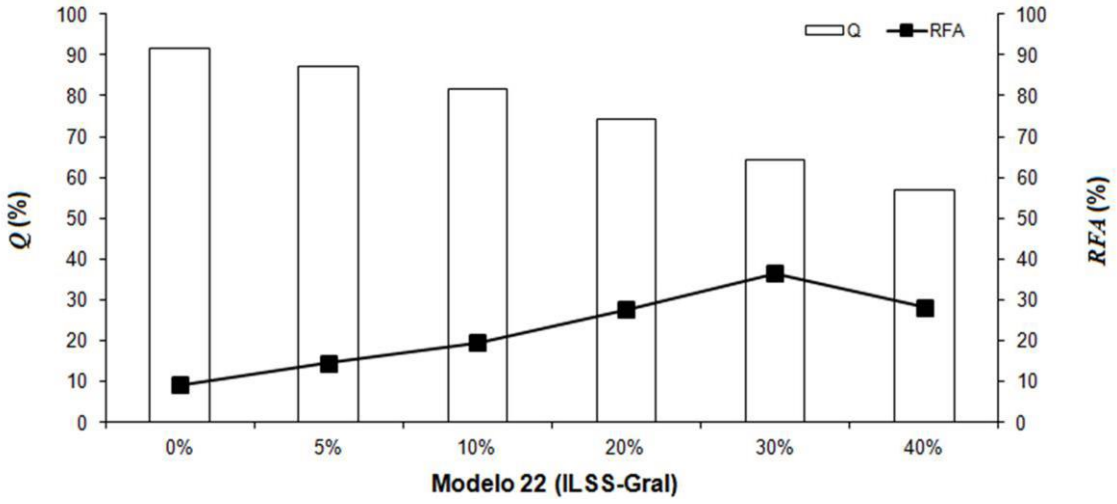


Fig. 110. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **22** (**ILSS-Gral**).

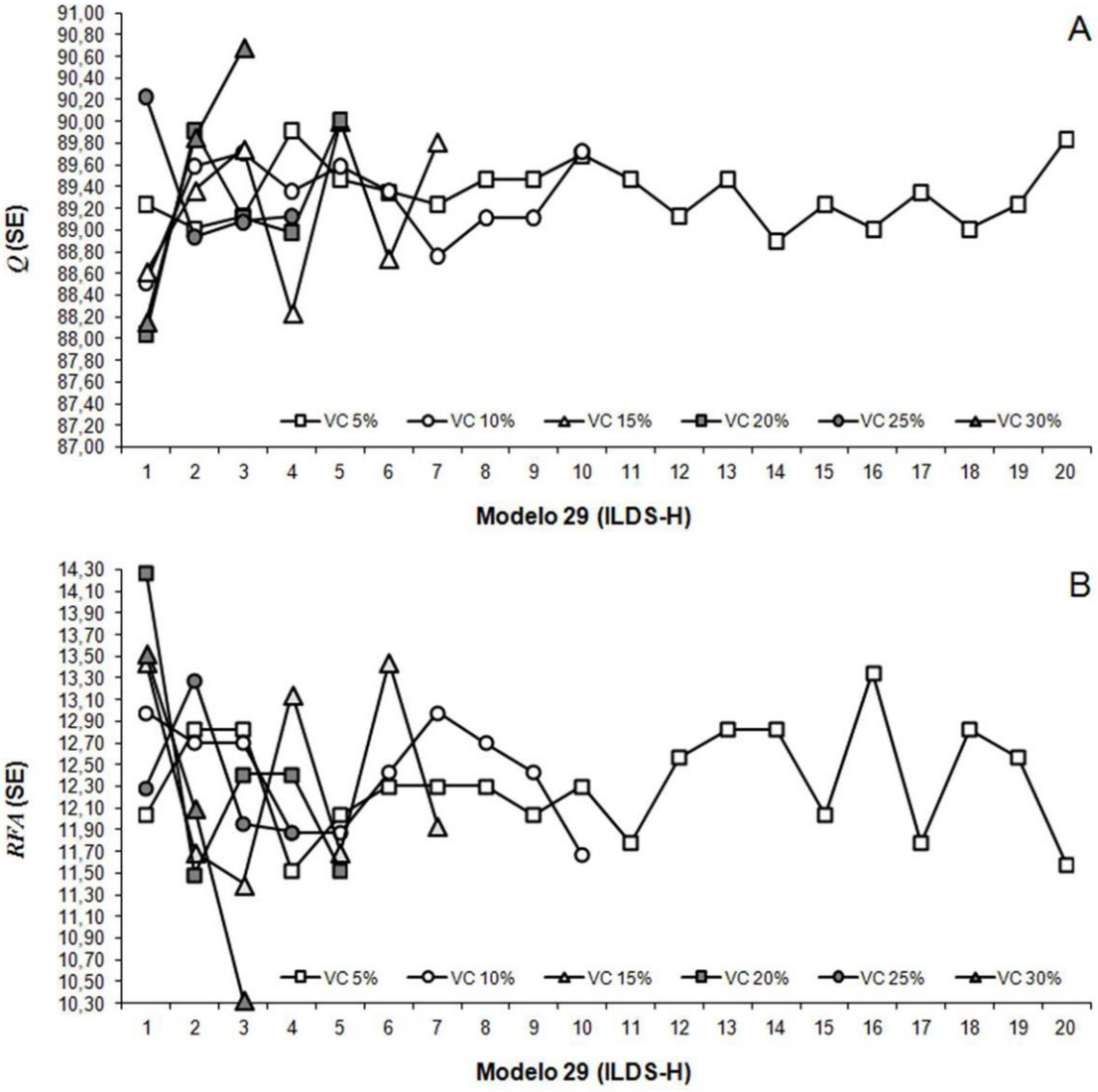


Fig. 111. *Validación cruzada* del modelo **29** (**ILdS-H**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la *Q* (A) y la *RFA* (B).

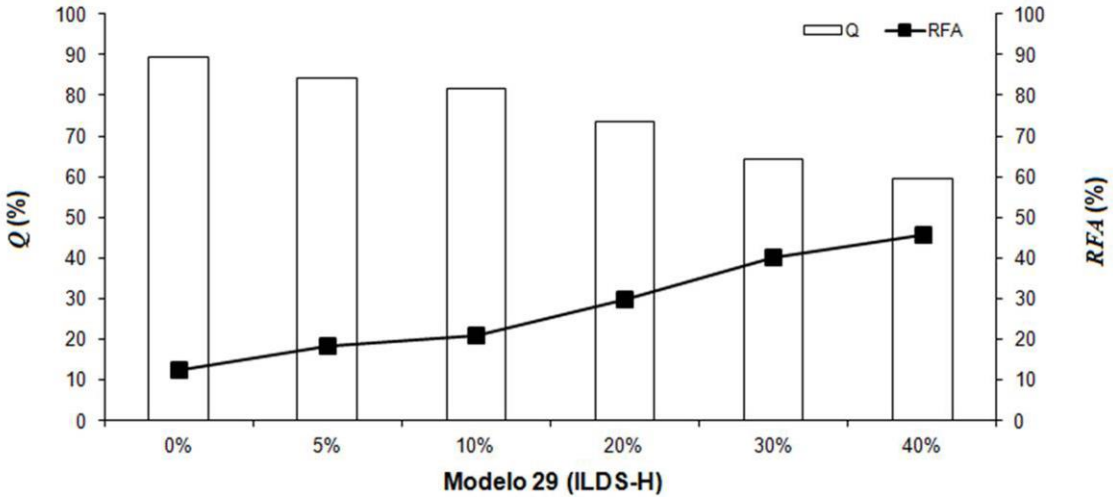


Fig. 112. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **29** (**ILdS-H**).

- **Cribado virtual de las series de síntesis**

– *Derivados de 5-nitroindazol*

Dentro de este grupo se encuentran los derivados de 5-nitroindazol pertenecientes a las series II, III y IV. Los compuestos de la denominada como serie I no fueron evaluados *in silico* debido a que forman parte de la BD y por tanto, de las SE y SP. De la misma manera, aquellos derivados de 5-nitroindazol cuyas estructuras se presentan en forma de sales tampoco se sometieron al CV.

A continuación se presentan los resultados obtenidos por cada uno de los tres modelos individuales y el **SMC1** (Tabla 56).

Tabla 56. CV de los derivados de 5-nitroindazol realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Serie	Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 10[c]	Δ*P*% 22	Δ*P*% 29	SMC1	*In silico*[d]			
								10	22	29	SMC1
II	**VATR106**	> 256	A	24,58	-98,90	-85,03	-53,11	A	I	I	I
	VATR107	5,93	I	44,72	-97,91	-88,33	-47,18	A	I	I	I
	VATR108	21,22	A	-49,94	-99,63	-95,82	-81,80	I	I	I	I
	VATR109	> 9,63	I	-49,94	-99,63	-99,15	-82,91	I	I	I	I
	VATR110	> 145,45	A	22,94	-98,48	-62,03	-45,85	A	I	I	I
	VATR111	> 12,41	A	43,31	-97,12	-81,78	-45,20	A	I	I	I
	VATR112	> 5,79	I	-49,94	-99,49	-89,24	-79,56	I	I	I	I
	VATR113	2,22	I	-49,94	-99,49	-98,48	-82,64	I	I	I	I
	VATR114	> 34,69	A	-49,94	-95,23	-74,41	-73,19	I	I	I	I
	VATR115	–	I	-49,94	-91,54	-96,63	-79,37	I	I	I	I
	VATR118	–	I	-49,94	-89,98	-0,04	-46,65	I	I	I	I
III	**VATR69**	4,92	I	-49,94	-99,37	-29,95	-59,75	I	I	I	I
	VATR71	> 1,18	I	-49,94	-99,42	-91,27	-80,21	I	I	I	I
	VATR72	–	I	-49,94	-99,65	-92,17	-80,58	I	I	I	I
	VATR73	< 0,80	I	-49,94	-97,71	-46,06	-64,57	I	I	I	I
	VATR74	–	I	-49,94	-99,09	-91,45	-80,16	I	I	I	I
	VATR75	> 162,02	A	-49,94	-99,54	9,62	-46,62	I	I	A	I
	VATR76	–	I	-49,94	-99,58	17,55	-43,99	I	I	A	I
	VATR77	7,01	I	-49,94	-98,75	20,71	-42,66	I	I	A	I
	VATR78	> 10,09	A	-49,94	-98,99	60,61	-29,44	I	I	A	I
	VATR82	> 27,86	A	-49,94	-99,11	-71,01	-73,35	I	I	I	I
	VATR83	> 8,26	I	-49,94	-99,23	-60,41	-69,86	I	I	I	I
	VATR84	> 19,26	A	-49,94	-98,98	12,72	-45,40	I	I	A	I
	VATR85	> 66,32	A	-49,94	-97,91	19,85	-42,67	I	I	A	I
	VATR86	–	I	-49,94	-99,10	-49,97	-66,34	I	I	I	I
	VATR87	> 120,19	A	-57,48	-99,14	-41,29	-65,97	I	I	I	I
	VATR88	–	I	-70,16	-99,26	-50,58	-73,33	I	I	I	I

Tabla 56. Continuación.

	VATR89	58,35	A	-49,94	-99,19	-56,15	-68,43	I	I	I	I
	VATR90	–	I	-49,94	-86,84	73,33	-21,15	I	I	A	I
	VATR91	–	I	-49,94	-84,05	73,23	-20,25	I	I	A	I
	VATR92	45,91	A	-49,94	-98,63	-93,78	-80,78	I	I	I	I
	VATR93	18,10	A	-49,94	-98,87	-95,87	-81,56	I	I	I	I
	VATR94	2,49	I	-49,94	-99,46	-68,30	-72,57	I	I	I	I
	VATR95	1,97	I	-49,94	-98,86	-87,40	-78,73	I	I	I	I
	VATR98	8,69	I	-65,18	-98,69	-67,31	-77,06	I	I	I	I
	VATR103	1,51	I	-93,26	-98,88	-14,23	-68,79	I	I	I	I
	VATR126	> 3,94	I	-49,94	-99,41	-28,66	-59,34	I	I	I	I
	VATR127	> 152,38	A	-49,94	-99,29	-58,86	-69,36	I	I	I	I
	VATR128	–	I	-49,94	-99,26	-76,03	-75,08	I	I	I	I
	VATR129	–	I	-49,94	-99,35	-64,78	-71,36	I	I	I	I
	VATR131	> 47,14	A	-49,94	-99,36	-41,64	-63,65	I	I	I	I
	VATR136	> 39,02	A	-49,94	-99,29	-55,11	-68,11	I	I	I	I
	VATR137	–	I	-49,94	-99,43	-18,78	-56,05	I	I	I	I
	VATR138	25,94	A	-49,94	-99,01	-43,97	-64,31	I	I	I	I
	VATR141	> 21,95	A	-49,94	-99,66	-86,98	-78,86	I	I	I	I
	VATR143	–	I	-49,94	-99,41	-83,82	-77,72	I	I	I	I
	VATR144	< 0,57	I	-49,94	-96,47	-60,30	-68,90	I	I	I	I
	VATR145	> 8,90	I	-49,94	-95,70	-98,14	-81,26	I	I	I	I
	VATR147	> 1,77	I	-49,94	-99,52	-49,00	-66,15	I	I	I	I
	VATR79	> 24,08	A	-49,94	-98,36	-12,50	-53,60	I	I	I	I
	VATR80	> 10,96	A	-49,94	-97,67	36,72	-36,96	I	I	A	I
	VATR81	24,81	A	-49,94	-96,72	52,62	-31,35	I	I	A	I
	VATR96	2,72	I	-49,94	-99,52	-75,22	-74,89	I	I	I	I
	VATR104	14,94	A	-49,94	-99,70	-24,42	-58,02	I	I	I	I
	VATR105	3,17	I	-49,94	-99,28	-28,60	-59,27	I	I	I	I
IV	**VATR116**	> 2,85	I	-49,94	-98,36	-18,65	-55,65	I	I	I	I
	VATR117	–	I	-49,94	-98,68	-0,38	-49,67	I	I	I	I
	VATR121	> 11,40	A	-49,94	-99,79	-75,11	-74,95	I	I	I	I
	VATR122	–	I	-49,94	-97,54	8,38	-46,36	I	I	A	I
	VATR123	–	I	-49,94	-97,89	40,81	-35,67	I	I	A	I
	VATR124	6,44	I	-49,94	-99,83	-57,30	-69,02	I	I	I	I
	VATR130	7,27	I	-49,94	-99,51	18,99	-43,49	I	I	A	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el **SMC1** (promedio) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

El CV de los 5-nitroindazoles alcanzó una *Q* del 59,58–64,52% para los tres modelos individuales y el **SMC1**. No obstante, la práctica totalidad de estos derivados fueron clasificados como inactivos por los modelos individuales, mientras que el **SMC1** los clasificó a todos como inactivos. Los resultados *in silico* de esta serie difirieron de los obtenidos previamente *in vitro*, ya que 24 de los 62 compuestos fueron activos frente a epimastigotes.

De esta manera, el valor de sensibilidad más alto se obtuvo con el modelo **29** (S = 25,00%), siendo el modelo **10** el de mayor precisión con un 75,00%. Con respecto a los compuestos inactivos, tanto el modelo **22** como el **SMC1** obtuvieron una *RFA* del 0,00% al no clasificar erróneamente ningún compuesto inactivo como activo, siendo este valor aceptable para los modelos **10** y **29** (*RFA* = 2,63 y 18,42%, respectivamente).

– *Derivados de tetrahidroquinolina*

En este grupo se sitúan las tetrahidroquinolinas pertenecientes a las series **AR** y **DM**, cuyos resultados obtenidos en el CV por los modelos **10**, **22**, **29** y el correspondiente **SMC1** se muestran en la Tabla 57.

Tabla 57. CV de las tetrahidroquinolinas realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Serie	Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 10[c]	Δ*P*% 22	Δ*P*% 29	SMC1	*In silico*[d]			
								10	22	29	SMC1
AR	**AR39**	> 43,09	A	-49,94	-4,42	5,24	-16,37	I	I	A	I
	AR40	> 71,11	A	-49,94	-14,19	98,06	11,31	I	I	A	A
	AR41	> 32	A	-49,94	-7,25	-39,61	-32,27	I	I	I	I
	AR42	> 2	I	-49,94	-74,45	1,62	-40,92	I	I	A	I
	AR43	–	I	-49,94	-78,67	-17,59	-48,73	I	I	I	I
	AR44	–	I	-49,94	-80,16	-66,59	-65,56	I	I	I	I
	AR45	> 3,45	I	-49,94	-73,90	-2,20	-42,01	I	I	I	I
	AR45F2	–	I	-49,94	-59,29	-51,35	-53,53	I	I	I	I
	AR46	> 1,19	I	-49,94	-64,89	-52,31	-55,71	I	I	I	I
	AR47	–	I	-49,94	-7,16	-16,27	-24,46	I	I	I	I
	AR89	–	I	-49,94	-12,21	-49,09	-37,08	I	I	I	I
	AR91	> 33,37	A	36,01	11,45	-28,16	6,43	A	A	I	A
	AR92	3,69	I	-49,94	-87,55	-76,25	-71,24	I	I	I	I
DM	**DM1**	–	I	-49,94	-32,56	-65,32	-49,27	I	I	I	I
	DM5	> 1,63	I	-49,94	-74,27	-87,77	-70,66	I	I	I	I
	DM6	0,93	I	-49,94	-91,78	-92,37	-78,03	I	I	I	I
	DM7	> 1,79	I	-49,94	-78,81	-88,85	-72,53	I	I	I	I
	DM8	–	I	-49,94	-82,64	-96,31	-76,30	I	I	I	I
	DM9	> 1,59	I	-49,94	-97,48	-87,84	-78,42	I	I	I	I
	DM12	–	I	-49,94	-98,28	-93,05	-80,42	I	I	I	I
	DM13	–	I	-49,94	-94,51	-94,85	-79,76	I	I	I	I
	DM15	> 58,45	A	-49,94	-78,67	-17,59	-48,73	I	I	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el **SMC1** (promedio) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

Con respecto a los derivados de tetrahidroquinolina, todos los sistemas obtuvieron una elevada *Q*, comprendida esta vez entre el 68,18–77,27%. Como se aprecia en la Tabla 57, la predicción realizada por los modelos **10** y **22** fue similar, mientras que el modelo **29** obtuvo los mejores valores estadísticos: Q = 77,27%, S = 40,00%, E = 88,24%, RFA = 11,76% y $Prec$ = 50,00%. El **SMC1** no mejoró la clasificación obtenida por el modelo **29** para las moléculas de las series **AR** y **DM**.

– *Derivados de cloroquina*

Se llevó a cabo el CV de 21 de los 22 derivados de cloroquina, no incluyéndose el compuesto **4** por ser estructuralmente similar al **3**. A diferencia de lo ocurrido con las dos series anteriores, los derivados de cloroquina fueron en su mayoría clasificados como activos por los modelos y el **SMC1**, a excepción de la predicción realizada por el modelo **10** (Tabla 58).

Tabla 58. CV de los derivados de cloroquina realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Serie	Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 10[c]	Δ*P*% 22	Δ*P*% 29	SMC1	*In silico*[d]			
								10	22	29	SMC1
Grupo 1	**1**	3,71	I	-10,87	-59,91	60,30	-3,49	I	I	A	I
	2	2,50	I	-10,61	-57,43	2,35	-21,89	I	I	A	I
	3	39,33	A	-9,19	-10,93	12,97	-2,38	I	I	A	I
	5	2,24	I	-7,66	-18,84	77,07	16,86	I	I	A	A
	6	3,29	I	-6,59	42,51	89,70	41,87	I	A	A	A
	7	63,52	A	-6,35	23,42	25,56	14,21	I	A	A	A
	8	> 5,19	I	-3,04	40,46	83,04	40,16	I	A	A	A
	9	–	I	-6,05	11,62	44,43	16,66	I	A	A	A
	10	2,85	I	-6,69	-3,82	79,05	22,85	I	I	A	A
	11	1,59	I	-7,32	27,53	88,24	36,15	I	A	A	A
	12	> 14,06	A	-4,41	43,97	92,87	44,14	I	A	A	A
	13	< 6,74	I	-6,59	3,59	59,30	18,77	I	A	A	A
	14	–	I	-3,42	22,26	81,53	33,46	I	A	A	A
	15	> 3,67	I	-6,68	38,00	84,75	38,69	I	A	A	A
	16	5,63	I	-6,60	4,35	37,37	11,70	I	A	A	A
Grupo 2	**17**	–	I	-17,97	-24,36	21,93	-6,80	I	I	A	I
	18	1,36	I	-19,27	-32,08	47,18	-1,39	I	I	A	I
	19	1,95	I	-19,17	-29,29	2,91	-15,18	I	I	A	I
	20	2,14	I	-19,30	-29,65	8,44	-13,50	I	I	A	I
	21	4,08	I	-18,83	44,44	-62,34	-12,24	I	A	I	I
	22	–	I	-18,96	44,84	73,73	33,20	I	A	A	A

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el **SMC1** (promedio) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

A propósito de los tres derivados activos *in vitro* (compuestos **3**, **7** y **12**), 2/3 fueron clasificados correctamente por los modelos **22** y el **SMC1**, mientras que 3/3 lo fueron por el modelo **29** (S = 66,67 y 100%, respectivamente). Por el contrario, de los 18 compuestos inactivos, 10 (modelo **22**), 17 (modelo **29**) y 11 (**SMC1**) fueron clasificados erróneamente como activos, lo que se tradujo en valores elevados de RFA (55,56, 94,44 y 61,11%, respectivamente) y una pobre precisión (16,67, 15,00 y 15,38%, respectivamente).

– *Derivados de tiadiazina*

En este grupo se encuentran los 14 derivados de la serie **DIT**, cuyos resultados de actividad predichos por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** figuran en la Tabla 59.

Tabla 59. CV de los derivados de tiadiazina realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 10[c]	Δ*P*% 22	Δ*P*% 29	SMC1	*In silico*[d]			
							10	22	29	SMC1
DIT1q	< 0,37	I	-49,94	-99,37	-69,36	-72,89	I	I	I	I
DIT5j	< 0,10	I	-49,94	-96,04	31,30	-38,23	I	I	A	I
DIT6c	> 2,06	I	-49,94	-99,30	14,25	-45,00	I	I	A	I
DIT7r	< 0,34	I	-10,93	-99,22	-77,99	-62,71	I	I	I	I
DIT8m	< 0,30	I	-49,94	-95,67	-78,88	-74,83	I	I	I	I
DIT12e	< 0,64	I	-18,21	-89,51	37,81	-23,30	I	I	A	I
DIT12o	–	I	-22,09	-90,70	86,97	-8,61	I	I	A	I
DIT16l	< 0,77	I	16,71	-92,07	-65,81	-47,05	A	I	I	I
DIT21d	< 0,39	I	-49,94	-96,40	-32,26	-59,53	I	I	I	I
DIT22r	< 0,34	I	-8,55	-98,80	-62,64	-56,66	I	I	I	I
DIT23m	< 0,37	I	-3,58	-93,04	-73,32	-56,65	I	I	I	I
DIT24c	< 0,19	I	-10,89	-94,27	-50,88	-52,01	I	I	I	I
DIT27s	< 0,39	I	2,07	-98,12	-86,86	-60,97	A	I	I	I
DIT28d	< 0,07	I	-5,86	-79,10	-41,63	-42,20	I	I	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el **SMC1** (promedio) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

Con respecto a la serie **DIT**, es importante destacar que ninguno de los 14 derivados fue activo *in vitro* y en consecuencia, el número de casos verdaderos positivos (VP) y falsos negativos (FN) obtenidos en el CV fue igual a 0, siendo por tanto imposible determinar los valores estadísticos de C y S, viéndose afectado también el cálculo de la precisión. De esta manera y haciendo alusión únicamente a los compuestos inactivos, el modelo **22** y el **SMC1** presentan el mismo perfil de predicción con valores de Q del 100% y valores de RFA del 0,00%, seguidos por el modelo **10** (Q = 85,71% y RFA = 14,29%) y finalmente por el modelo **29** (Q = 71,43% y RFA = 28,57%).

– *Quelantes heterocíclicos*

A continuación se muestran los resultados del CV para las 22 moléculas que forman esta serie, obtenidos con los modelos individuales **10**, **22**, y **29** así como con el **SMC1** (Tabla 60).

Tabla 60. CV de los quelantes heterocíclicos realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** que constituyen. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Compuesto	IS [a]	Obs. [b]	Δ*P*% 10 [c]	Δ*P*% 22	Δ*P*% 29	SMC1	*In silico* [d]			
							10	22	29	SMC1
1	> 3,51	I	-49,94	-14,03	98,95	11,66	I	I	A	A
4	0,77	I	-49,94	49,57	99,99	33,21	I	A	A	A
5	< 0,60	I	-49,94	-54,99	95,55	-3,13	I	I	A	I
6	–	I	-49,94	-8,10	99,75	13,90	I	I	A	A
7	1,90	I	-49,94	-80,63	58,20	-24,12	I	I	A	I
10	< 0,27	I	-49,94	-99,78	-81,37	-77,03	I	I	I	I
12	2,42	I	-49,94	-99,64	-99,99	-83,19	I	I	I	I
13	4,53	I	-49,94	-99,92	-99,99	-83,28	I	I	I	I
14	0,49	I	-49,94	-99,99	-99,99	-83,31	I	I	I	I
15	1,35	I	-49,94	-99,69	-88,84	-79,49	I	I	I	I
16	0,47	I	-49,94	-41,85	-25,20	-39,00	I	I	I	I
17	0,72	I	-49,94	-87,53	23,28	-38,06	I	I	A	I
18	2,07	I	-49,94	-98,02	98,83	-16,38	I	I	A	I
19	0,37	I	-49,94	-87,17	41,45	-31,88	I	I	A	I
20	0,60	I	-49,94	-98,15	58,67	-29,81	I	I	A	I
21	1,17	I	-21,21	-94,02	85,88	-9,78	I	I	A	I
22	1,75	I	-49,94	-81,26	63,85	-22,45	I	I	A	I
24	1,35	I	-49,94	-99,75	62,09	-29,20	I	I	A	I
25	–	I	-49,94	-96,70	-12,85	-53,16	I	I	I	I
27	–	I	-49,94	-70,16	95,41	-8,23	I	I	A	I
28	2,40	I	-49,94	-99,55	96,09	-17,80	I	I	A	I
29	0,56	I	-49,94	21,50	97,75	23,10	I	A	A	A

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el **SMC1** (promedio) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

De manera similar a lo ocurrido con la serie anterior, ninguno de los 22 derivados fue activo *in vitro*, siendo el número de casos VP y FN obtenidos en el CV igual a 0 e imposible determinar los valores de C y S. El modelo **10** obtuvo valores de Q y RFA del 100% y 0,00%, respectivamente. En el otro extremo se encuentra el modelo **29**, con un elevado número de FP que bajó la Q a 31,82% y situó el valor de RFA en un 68,18%. En esta ocasión el **SMC1** únicamente mejoró los resultados del modelo **29**, obteniendo Q = 81,82% y RFA = 18,18%.

– *Cromenoazoldionas*

La Tabla 61 recoge los resultados del CV realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1** para la serie química constituida por 7 moléculas con estructura de cromenoazoldiona.

Tabla 61. CV de las cromenoazoldionas realizado por los modelos **10**, **22**, **29** y el **SMC1**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 10[c]	Δ*P*% 22	Δ*P*% 29	SMC1	*In silico*[d]			
							10	22	29	SMC1
PM199	5,83	I	-49,94	49,36	67,26	22,23	I	A	A	A
PM52	–	I	-49,94	23,76	-71,98	-32,72	I	A	I	I
PM401	5,27	I	-49,94	65,16	-69,99	-18,26	I	A	I	I
PM154	2,60	I	-49,94	77,86	-21,47	2,15	I	A	I	A
PM357	> 4,37	I	-49,94	88,86	57,38	32,10	I	A	A	A
PM402	> 3,11	I	-49,94	24,10	-72,92	-32,92	I	A	A	A
PM203	7,03	I	-49,94	65,23	-69,72	-18,14	I	A	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el **SMC1** (promedio) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

En esta ocasión tampoco pudieron determinarse los valores de C y S debido a que ninguna de las 7 moléculas mostró actividad *in vitro* y por tanto el número de casos VP y FN predicho por los modelos fue igual a 0. La mejor predicción se obtuvo con el modelo **10** (Q = 100% y RFA = 0,00%), seguida del modelo **29** (Q =71,43% y RFA = 28,57%) y del modelo **22** (Q = 0,00% y RFA = 100%). El **SMC1** únicamente mejoró los resultados del modelo **22**, ya que la elevada tasa de casos FP afectó considerablemente a su calidad (Q = 57,14% y RFA = 42,86%).

– *Resultados estadísticos del CV realizado por el **SMC1***

La Tabla 62 recoge los resultados estadísticos globales del CV de las 148 moléculas que constituyen los seis grupos expuestos anteriormente.

Tabla 62. Parámetros estadísticos derivados de la clasificación obtenida por los modelos individuales **10**, **22**, **29** y por su ensamble (**SMC1**) en el CV de las 148 moléculas evaluadas.

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
10	0,09	77,03	9,38	95,69	4,31	37,50
22	-0,13	65,54	6,25	81,90	18,10	8,70
29	-0,05	54,05	34,38	59,48	40,52	18,97
SMC1 10_22_29	-0,09	66,89	9,38	82,76	17,24	13,04

C: coeficiente de correlación de Matthews, *Q:* exactitud, *S*: sensibilidad, *E*: especificidad, *RFA*: razón de falsa alarma.

En términos generales y como se ha venido comentando en los resultados obtenidos con cada grupo de moléculas evaluadas *in silico*, en esta ocasión el **SMC1** no mejoró la predicción realizada por los tres modelos individuales que lo constituyen (modelos **10**, **22** y **29**).

3.3.2.2. Sistemas multiclasificadores 2 y 3

- **Combinación de los modelos QSAR/ADL: ensamble**

De manera similar a como se procedió con el **SMC1**, a partir de los 16 modelos QSAR/ADL seleccionados por DASDE como los más diversos (apartado 3.3.1.4.) se realizaron nuevos ensambles con el propósito de buscar nuevas combinaciones de modelos que mejorasen los resultados del CV obtenidos por el **SMC1**. Como requisito para esta nueva combinación, se estableció que el SMC estuviera constituido por tres modelos individuales. Asimismo, de acuerdo con la clasificación obtenida por el modelo **10** ($\Delta P\%$ 10) para las diferentes moléculas, éste fue retirado del proceso de ensamble para evitar cualquier posibilidad de interferencia de sus resultados de predicción sobre la clasificación final del SMC.

Tabla 63. Valores estadísticos obtenidos para la SE en el ensamble de los modelos de predicción seleccionados por el programa DASDE, aplicando las reglas de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M).

Regla	Modelos	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
Voto	21_22_29_V	0,84	92,14	92,41	91,79	8,21	93,65
Promedio	2_6_29_A	0,84	92,14	93,55	90,30	9,70	92,67
	22_29_36_A	0,84	92,03	93,36	90,30	9,70	92,66
	22_39_45_A	0,84	92,14	92,98	91,04	8,96	93,16
	11_22_45_A	0,84	92,25	92,98	91,29	8,71	93,33
	29_36_45_A	0,84	92,36	94,31	89,80	10,20	92,38
	21_29_45_A	0,84	92,25	92,41	92,04	7,96	93,83
Máximo	22_29_45_X	0,84	91,93	93,17	90,30	9,70	92,64
Mínimo	11_22_29_N	0,80	90,20	91,46	88,56	11,44	91,29
Mediana	21_22_29_M	0,84	92,14	92,41	91,79	8,21	93,65

C: coeficiente de correlación de Matthews, *Q:* exactitud, *S*: sensibilidad, *E*: especificidad, *RFA*: razón de falsa alarma.

La Fig. 113 recoge los resultados de *Q* y *RFA* para la SE, obtenidos con la mejor combinación por cada regla de ensamble, de acuerdo con los cuales se seleccionaron las combinaciones de los modelos **21**, **22** y **29** por la regla del voto mayoritario (*Q* = 92,14% y *RFA* = 8,21%) y de los modelos **21**, **29** y **45** por la regla del promedio (*Q* = 92,25% y *RFA* =

7,96%). Ambas superaron los valores de corte establecidos por el modelo **45** (Q = 92,03% y RFA = 8,71%).

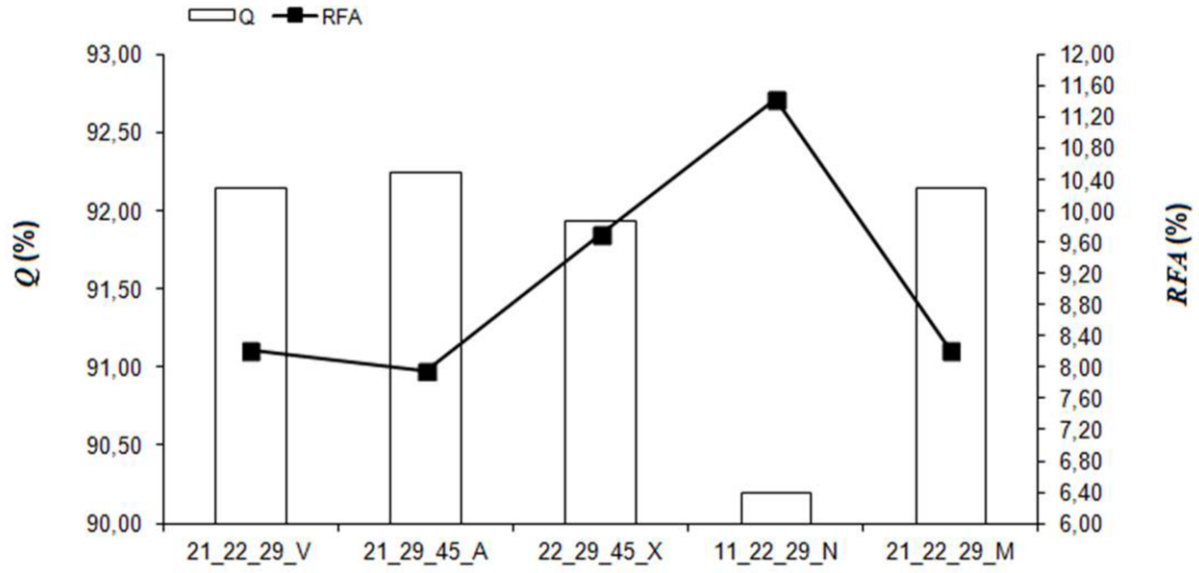


Fig. 113. Mejor combinación de modelos (ensamble) obtenida de acuerdo con las reglas de voto (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M), en base a los valores de Q y RFA obtenidos para la SE.

De acuerdo con el nuevo ensamble, se seleccionaron los SMC construidos con los modelos **21** (**ILSS-S**), **22** (**ILSS-Gral**) y **29** (**ILDS-H**) y los modelos **22** (**ILSS-Gral**), **29** (**ILdS-H**) y **45** (**IL-Gral**). A continuación se muestran las ecuaciones de los modelos que constituyen ambos SMC, los cuales de aquí en adelante se denominarán como **SMC2** y **SMC3**, respectivamente.

SMC2

$$Clasif\ (\mathbf{21}) = -2{,}26 + 2{,}75 \times 10^{-1}\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 2{,}61 \times 10^{-1}\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{4L}{}^{H}(x_P) - 3{,}19 \times 10^{-2}\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_X) + 2{,}56 \times 10^{-1}\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{2L}(x_C) - 2{,}09 \times 10^{-1}\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{9L}(x_C) - 9{,}44\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{7L}(x_G) + 9{,}91\ {}^{Ss}\mathbf{f}_{9L}(x_G)$$

$$Clasif\ (\mathbf{22}) = -7{,}01 + 6{,}15 \times 10^{-1}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) + 3{,}21 \times 10^{-2}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{5L}{}^{H}(x_C) - 5{,}32 \times 10^{-1}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 2{,}04 \times 10^{-1}\ {}^{Vs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 3{,}66 \times 10^{-1}\ {}^{As}\mathbf{f}_{0}(x) + 4{,}78\ {}^{Cs}\mathbf{f}_{3L}(x_P) - 2{,}95 \times 10^{-2}\ {}^{PSAs}\mathbf{f}_{2}{}^{H}(x) + 6{,}32 \times 10^{-2}\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{13}{}^{H}(x) - 1{,}79\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P)$$

$$Clasif\ (\mathbf{29}) = -6{,}28 + 4{,}04 \times 10^{-1}\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{5}{}^{H}(x) + 6{,}10\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 7{,}28\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 7{,}52\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{3L}{}^{H}(x_P) - 85{,}04\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{6L}{}^{H}(x_P) + 79{,}35\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{8L}{}^{H}(x_P) - 16{,}90\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{4L}(x_C) + 16{,}12\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{14L}(x_C)$$

SMC3

$$Clasif\ \mathbf{(22)} = -7{,}01 + 6{,}15 \times 10^{-1}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) + 3{,}21 \times 10^{-2}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{5L}{}^{H}(x_C) - 5{,}32 \times 10^{-1}\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 2{,}04 \times 10^{-1}\ {}^{Vs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 3{,}66 \times 10^{-1}\ {}^{As}\mathbf{f}_{0}(x) + 4{,}78\ {}^{Cs}\mathbf{f}_{3L}(x_P) - 2{,}95 \times 10^{-2}\ {}^{PSAs}\mathbf{f}_{2}{}^{H}(x) + 6{,}32 \times 10^{-2}\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{13}{}^{H}(x) - 1{,}79\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P)$$

$$Clasif\ \mathbf{(29)} = -6{,}28 + 4{,}04 \times 10^{-1}\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{5}{}^{H}(x) + 6{,}10\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 7{,}28\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 7{,}52\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{3L}{}^{H}(x_P) - 85{,}04\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{6L}{}^{H}(x_P) + 79{,}35\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{8L}{}^{H}(x_P) - 16{,}90\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{4L}(x_C) + 16{,}12\ {}^{Hds}\mathbf{f}_{14L}(x_C)$$

$$Clasif\ \mathbf{(45)} = -6{,}97 + 3{,}56 \times 10^{-3}\ {}^{P}\mathbf{f}_{3L}{}^{H}(x_C) - 7{,}58 \times 10^{-2}\ {}^{P}\mathbf{f}_{2L}{}^{H}(x_P) + 3{,}32 \times 10^{-3}\ {}^{C}\mathbf{f}_{8L}{}^{H}(x_G) + 1{,}37\ {}^{Ps}\mathbf{f}_{0L}{}^{H}(x_P) + 2{,}59 \times 10^{-1}\ {}^{Vs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 2{,}23\ {}^{Rs}\mathbf{f}_{1L}{}^{H}(x_P) - 7{,}08 \times 10^{-2}\ {}^{Pds}\mathbf{f}_{3}(x)$$

- **Validación externa**

A continuación se muestran los resultados de la validación externa para los **SMC2** y **SMC3** (Tabla 64). Los valores estadísticos obtenidos apoyan la calidad de ambos sistemas.

Tabla 64. Parámetros estadísticos obtenidos para la SP en la validación externa de los **SMC2** y **SMC3.**

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
SMC2 21_22_29	0,79	89,29	87,57	91,60	8,40	93,37
SMC3 21_29_45	0,78	89,29	88,14	90,84	9,16	92,86

C: coeficiente de correlación de Matthews, *Q*: exactitud, *S*: sensibilidad, *E*: especificidad, *RFA*: razón de falsa alarma.

- **Validación interna**

Los procedimientos de validación interna se efectuaron únicamente para los modelos **21** y **45** de manera similar a como se procedió con los modelos **10**, **22** y **29** (apartado 3.3.2.1.).

– *Validación cruzada*

Como muestra el ejercicio de *validación cruzada* del modelo **21** (Fig. 114) y del modelo 45 (Fig. 116), los parámetros *Q* y *RFA* de la SE no sufrieron grandes alteraciones con respecto a los de los respectivos modelos originales (Tabla 52), sugiriendo de esta manera que en la BD no existe un grupo de moléculas que ejerza mayor influencia sobre los mismos.

– *Aleatorización de la variable respuesta*

Los resultados obtenidos en el *intercambio de la Y* (Fig. 115 y 117) apoyaron la estabilidad de los modelos **21** y **45**, descartando un ajuste casual en los valores originales de *Q* y *RFA*.

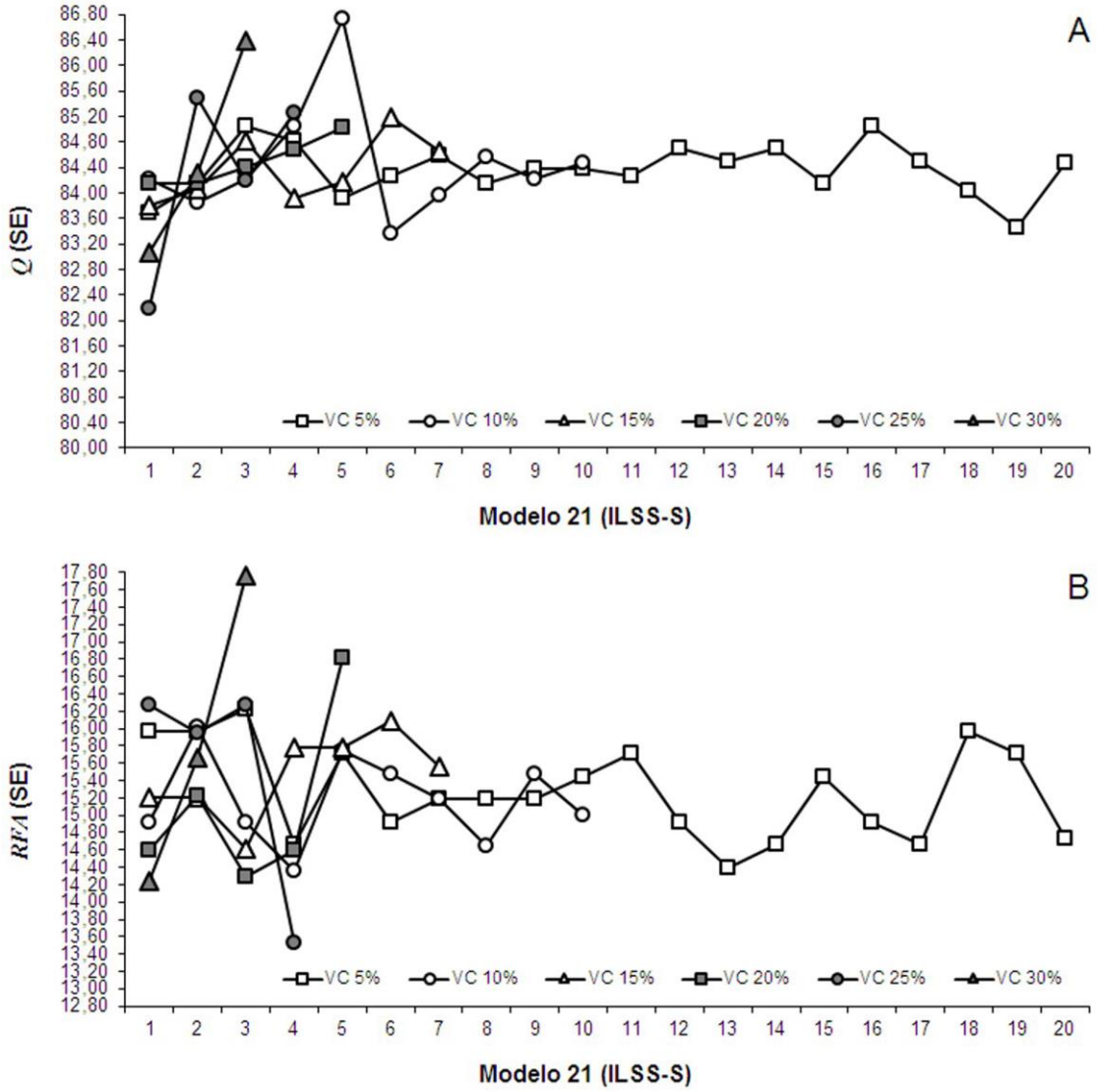


Fig. 114. *Validación cruzada* del modelo **21** (**ILSS-S**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la Q (A) y la RFA (B).

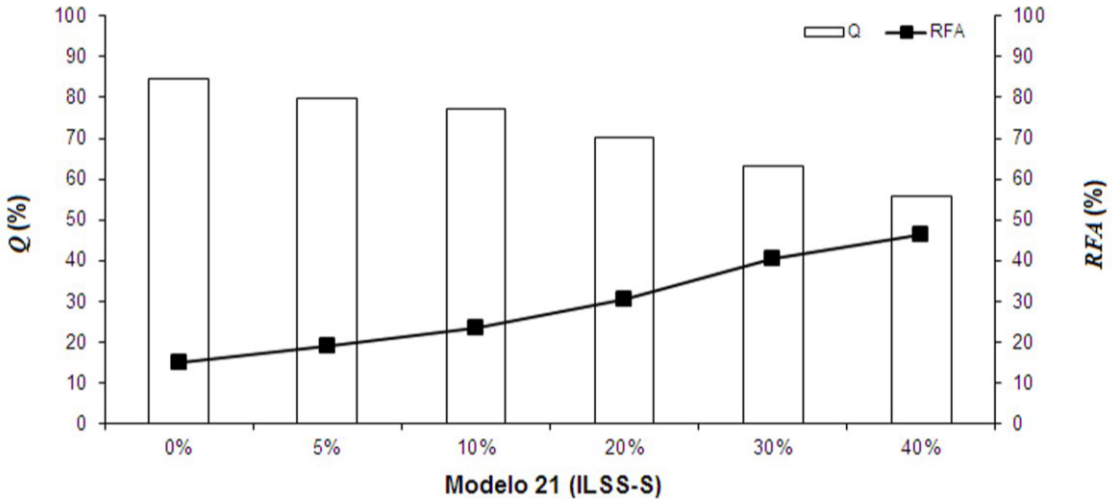


Fig. 115. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **21** (**ILSS-S**).

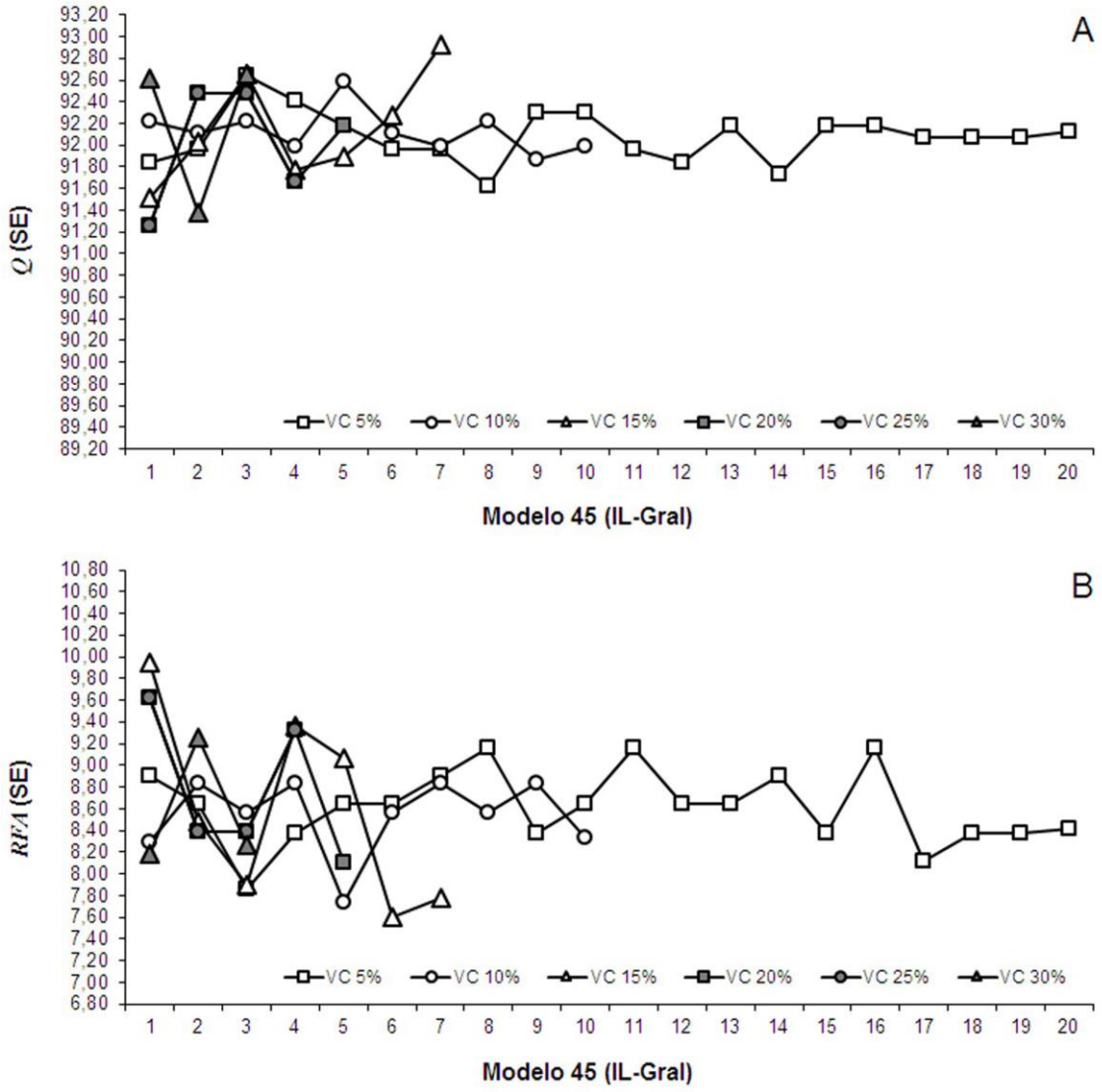


Fig. 116. *Validación cruzada* del modelo **45** (**IL-Gral**) dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los compuestos fuera: resultados relativos a la *Q* (A) y la *RFA* (B).

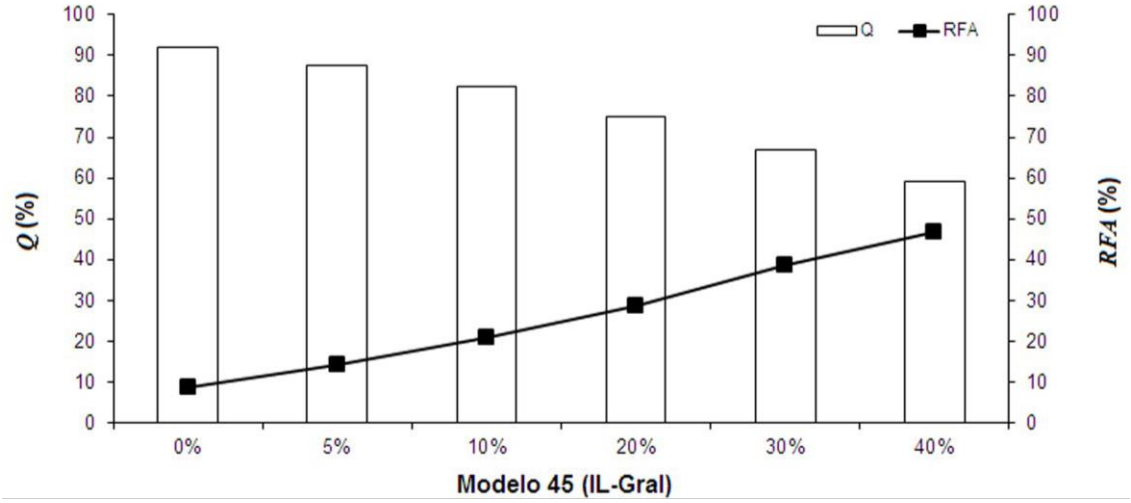


Fig. 117. *Intercambio de la Y* realizado en el 5, 10, 20, 30 y 40% de la SE del modelo **45** (**IL-Gral**).

- **Cribado virtual de las series de síntesis**

– *Derivados de 5-nitroindazol*

A continuación se presentan los resultados del CV obtenidos por los modelos **21** y **45**, así como por los correspondientes SMC que integran (Tabla 65). Es importante indicar que por cuestiones prácticas, los resultados de los otros dos modelos que forman parte de los nuevos SMC (modelos **22** y **29**) y que también constituyen el **SMC1**, no se han incluido esta vez en las Tablas, debiéndose acudir a los resultados expuestos en el apartado 3.3.2.1. para su consulta.

Tabla 65. CV de los derivados de 5-nitroindazol realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Serie	Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 21[c]	SMC2	Δ*P*% 45	SMC3	*In silico*[d]			
								21	SMC2	45	SMC3
	VATR106	> 256	A	-30,58	-1	-99,41	-71,67	I	I	I	I
	VATR107	5,93	I	-28,01	-1	-99,26	-71,87	I	I	I	I
	VATR108	21,22	A	-64,02	-1	-99,83	-86,56	I	I	I	I
	VATR109	> 9,63	I	-80,26	-1	-99,81	-93,07	I	I	I	I
	VATR110	> 145,45	A	-44,69	-1	-99,33	-68,68	I	I	I	I
II	**VATR111**	> 12,41	A	-43,23	-1	-99,15	-74,72	I	I	I	I
	VATR112	> 5,79	I	-72,82	-1	-99,81	-87,29	I	I	I	I
	VATR113	2,22	I	-85,35	-1	-99,79	-94,54	I	I	I	I
	VATR114	> 34,69	A	-64,03	-1	-98,92	-79,12	I	I	I	I
	VATR115	–	I	-74,37	-1	-95,11	-88,70	I	I	I	I
	VATR118	–	I	-55,31	-1	-96,70	-50,68	I	I	I	I
	VATR69	4,92	I	-79,35	-1	-99,83	-69,71	I	I	I	I
	VATR71	> 1,18	I	-76,49	-1	-99,80	-89,19	I	I	I	I
	VATR72	–	I	-84,33	-1	-99,81	-92,10	I	I	I	I
	VATR73	< 0,80	I	99,31	-1	-99,53	-15,42	A	I	I	I
	VATR74	–	I	-77,31	-1	-99,55	-89,44	I	I	I	I
	VATR75	> 162,02	A	-79,40	-1	-99,81	-56,53	I	I	I	I
	VATR76	–	I	-77,06	-1	-99,47	-53,00	I	I	I	I
	VATR77	7,01	I	-78,89	-1	-99,59	-52,59	I	I	I	I
III	**VATR78**	> 10,09	A	-75,47	-1	-98,94	-37,93	I	I	I	I
	VATR82	> 27,86	A	-78,78	-1	-99,75	-83,18	I	I	I	I
	VATR83	> 8,26	I	-81,08	-1	-99,66	-80,38	I	I	I	I
	VATR84	> 19,26	A	-77,02	-1	-99,61	-54,64	I	I	I	I
	VATR85	> 66,32	A	-72,95	-1	-99,50	-50,87	I	I	I	I
	VATR86	–	I	-80,94	-1	-99,68	-76,86	I	I	I	I
	VATR87	> 120,19	A	-74,28	-1	-99,80	-71,79	I	I	I	I
	VATR88	–	I	-70,62	-1	-99,47	-73,56	I	I	I	I
	VATR89	58,35	A	-78,33	-1	-99,65	-78,05	I	I	I	I

Tabla 65. Continuación.

	VATR90	–	I	-72,32	-1	-63,81	-20,94	I	I	I	I
	VATR91	–	I	-72,76	-1	-83,88	-27,80	I	I	I	I
	VATR92	45,91	A	-43,85	-1	-99,48	-79,03	I	I	I	I
	VATR93	18,10	A	-68,72	-1	-99,08	-87,89	I	I	I	I
	VATR94	2,49	I	-87,50	-1	-99,83	-85,21	I	I	I	I
	VATR95	1,97	I	0,99	-1	-99,51	-61,97	A	I	I	I
	VATR98	8,69	I	-62,77	-1	-99,71	-76,60	I	I	I	I
	VATR103	1,51	I	-96,50	-1	-99,23	-69,99	I	I	I	I
	VATR126	> 3,94	I	-72,20	-1	-99,27	-66,71	I	I	I	I
	VATR127	> 152,38	A	-74,77	-1	-99,73	-77,78	I	I	I	I
III	**VATR128**	–	I	-62,55	-1	-99,33	-79,30	I	I	I	I
	VATR129	–	I	-78,86	-1	-99,77	-81,14	I	I	I	I
	VATR131	> 47,14	A	-80,72	-1	-99,80	-74,05	I	I	I	I
	VATR136	> 39,02	A	-76,73	-1	-99,79	-77,21	I	I	I	I
	VATR137	–	I	-87,94	-1	-99,42	-68,71	I	I	I	I
	VATR138	25,94	A	-71,32	-1	-99,65	-71,65	I	I	I	I
	VATR141	> 21,95	A	-80,09	-1	-99,73	-88,94	I	I	I	I
	VATR143	–	I	-80,49	-1	-99,74	-88,02	I	I	I	I
	VATR144	< 0,57	I	-39,22	-1	-98,96	-66,16	I	I	I	I
	VATR145	> 8,90	I	-87,99	-1	-99,90	-95,35	I	I	I	I
	VATR147	> 1,77	I	-83,50	-1	-99,53	-77,34	I	I	I	I
	VATR79	> 24,08	A	-69,53	-1	-99,69	-60,57	I	I	I	I
	VATR80	> 10,96	A	-66,50	-1	-99,26	-43,01	I	I	I	I
	VATR81	24,81	A	-59,87	-1	-98,96	-35,41	I	I	I	I
	VATR96	2,72	I	95,62	-1	-99,51	-26,37	A	I	I	I
	VATR104	14,94	A	-69,26	-1	-99,65	-64,44	I	I	I	I
	VATR105	3,17	I	-62,12	-1	-99,29	-63,34	I	I	I	I
IV	**VATR116**	> 2,85	I	-71,14	-1	-99,85	-63,21	I	I	I	I
	VATR117	–	I	-68,01	-1	-99,60	-56,00	I	I	I	I
	VATR121	> 11,40	A	-60,53	-1	-99,75	-78,46	I	I	I	I
	VATR122	–	I	-68,16	-1	-99,78	-53,19	I	I	I	I
	VATR123	–	I	-68,20	-1	-99,45	-42,28	I	I	I	I
	VATR124	6,44	I	-86,40	-1	-99,77	-81,16	I	I	I	I
	VATR130	7,27	I	-72,16	-1	-99,22	-50,80	I	I	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el correspondiente SMC (**SMC2**: voto mayoritario **21_22_29**, **SMC3**: promedio **21_29_45**). [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

De los 62 derivados únicamente 3 fueron clasificados como activos, siendo éstos sin embargo FP predichos por el modelo **21**. El **SMC2** equiparó los resultados del modelo **22** (Tabla 56) y mejoró la predicción de los otros que lo integran (modelos **21** y **29**), alcanzando una Q = 61,29% y una RFA = 0,00% por la ausencia de FP. Estos mismos resultados se

lograron con el modelo **45** y el **SMC3**. Sin embargo, ningún sistema superó la S del modelo **29** (S = 25,00%) al no clasificar correctamente ninguno de los 5-nitroindazoles activos.

– *Derivados de tetrahidroquinolina*

En el CV de las tetrahidroquinolinas, el modelo **21** y el **SMC2** obtuvieron una Q = 68,18%, mejorando el **SMC2** únicamente el valor de RFA obtenido en el modelo individual (17,65% y 11,76%, respectivamente) e igualando al modelo **22** (Tabla 66). Como ocurrió con el **SMC1**, el comportamiento del modelo **29** (Tabla 57) fue mejor que el del **SMC2**. La predicción de **SMC3** (Tabla 66), fue idéntica a la del modelo **45** (Q = 72,73%, S = 20,00%, E = 88,24%, RFA = 11,76% y $Prec$ = 33,33%) y tampoco mejoró los resultados del modelo **29** (Tabla 57).

Tabla 66. CV de los derivados de tetrahidroquinolina realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Serie	Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 21[c]	SMC2	Δ*P*% 45	SMC3	*In silico*[d]			
								21	SMC2	45	SMC3
AR	**AR39**	> 43,09	A	-41,30	-1	-2,66	-12,91	I	I	I	I
	AR40	> 71,11	A	-67,50	-1	4,36	11,64	I	I	A	A
	AR41	> 32	A	-36,97	-1	-20,45	-32,35	I	I	I	I
	AR42	> 2	I	-56,97	-1	-50,08	-35,14	I	I	I	I
	AR43	–	I	22,72	1	33,39	25,43	A	A	A	A
	AR44	–	I	-66,35	-1	-58,01	-47,32	I	I	I	I
	AR45	> 3,45	I	-90,31	-1	-59,52	-72,14	I	I	I	I
	AR45F2	–	I	-54,91	-1	-49,18	-35,43	I	I	I	I
	AR46	> 1,19	I	-59,20	-1	-50,79	-53,78	I	I	I	I
	AR47	–	I	-69,87	-1	-55,67	-59,28	I	I	I	I
	AR89	–	I	4,55	-1	-2,10	-4,61	A	I	I	I
	AR91	> 33,37	A	12,51	-1	-20,02	-18,87	A	I	I	I
	AR92	3,69	I	56,33	1	34,45	20,87	A	A	A	A
DM	**DM1**	–	I	-87,46	-1	-80,54	-81,42	I	I	I	I
	DM5	> 1,63	I	-75,61	-1	-44,28	-61,73	I	I	I	I
	DM6	0,93	I	-74,51	-1	-67,83	-76,71	I	I	I	I
	DM7	> 1,79	I	-89,29	-1	-90,69	-90,78	I	I	I	I
	DM8	–	I	-89,10	-1	-79,27	-85,74	I	I	I	I
	DM9	> 1,59	I	-79,06	-1	-84,01	-86,46	I	I	I	I
	DM12	–	I	-88,08	-1	-91,61	-89,18	I	I	I	I
	DM13	–	I	-93,23	-1	-94,14	-93,48	I	I	I	I
	DM15	> 58,45	A	-77,92	-1	-85,53	-86,10	I	I	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el correspondiente SMC (**SMC2**: voto mayoritario **21_22_29**, **SMC3**: promedio **21_29_45**) [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

– *Derivados de cloroquina*

Los resultados del CV de los derivados de cloroquina a través de los modelos **21** y **45**, así como por los **SMC2** y **SMC3** se recogen en la Tabla 67.

Tabla 67. CV de los derivados de cloroquina realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Serie	Comp.	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 21[c]	SMC2	Δ*P*% 45	SMC3	*In silico*[d]			
								21	SMC2	45	SMC3
Grupo 1	**1**	3,71	I	-40,72	-1	-48,12	-9,51	I	I	I	I
	2	2,50	I	-52,67	-1	-58,87	-36,39	I	I	I	I
	3	39,33	A	-28,39	-1	-5,55	-6,99	I	I	I	I
	5	2,24	I	-23,48	-1	-18,24	11,78	I	I	I	A
	6	3,29	I	-19,90	1	-15,53	18,09	I	A	I	A
	7	63,52	A	-51,91	1	-36,39	-20,91	I	A	I	I
	8	> 5,19	I	-37,78	1	-22,55	7,57	I	A	I	A
	9	–	I	-70,86	1	-56,85	-27,76	I	A	I	I
	10	2,85	I	-40,00	-1	-64,30	-8,41	I	I	I	I
	11	1,59	I	-15,65	1	2,35	24,98	I	A	A	A
	12	> 14,06	A	-3,79	1	17,36	35,48	I	A	A	A
	13	< 6,74	I	-56,40	1	-54,20	-17,10	I	A	I	I
	14	–	I	-42,46	1	-42,61	-1,18	I	A	I	I
	15	> 3,67	I	-37,69	1	-29,08	5,99	I	A	I	I
	16	5,63	I	-57,03	1	-53,95	-24,54	I	A	I	I
Grupo 2	**17**	–	I	-16,77	-1	-51,22	-15,35	I	I	I	I
	18	1,36	I	-19,14	-1	-54,29	-8,75	I	I	I	I
	19	1,95	I	-33,37	-1	-64,43	-31,63	I	I	I	I
	20	2,14	I	-33,10	-1	-64,30	-29,65	I	I	I	I
	21	4,08	I	-25,08	-1	29,00	-19,47	I	I	A	I
	22	–	I	-19,26	1	17,90	24,12	I	A	A	A

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el correspondiente SMC (**SMC2**: voto mayoritario **21_22_29**, **SMC3**: promedio **21_29_45**). [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

De los tres derivados de cloroquina activos *in vitro*, el modelo **21** clasificó de manera correcta 0/3, el **SMC2** 1/3, el modelo **45** 1/3 y el **SMC3** 1/3, todos ellos con S inferiores a la obtenida por el modelo **29** (S = 100%). De otra manera, todos mejoraron los valores de Q y RFA de dicho modelo (19,05% y 94,44%, respectivamente), presente en ambos **SMC2** y **SMC3**. No obstante, en términos generales y de acuerdo con los parámetros estadísticos obtenidos, el modelo **45** fue el mejor para el CV de los compuestos derivados de cloroquina: Q = 76,19%, S = 33,33%, E = 83,33%, RFA = 16,67% y $Prec$ = 25,00%.

– *Derivados de tiadiazina*

Como se comentó anteriormente, ninguno de los 14 derivados que forman parte de la serie **DIT** fue activo *in vitro* y por tanto no fue posible determinar los valores de C y S. Como se muestra en la Tabla 68, tanto los modelos como los dos SMC clasificaron a todos los compuestos como inactivos, de modo que en todos ellos los parámetros Q y RFA tomaron valores del 100% y 0,00%, respectivamente. Un comportamiento semejante fue observado previamente en el CV de la serie **DIT** con el modelo **22** y el **SMC1** (Tabla 59).

Tabla 68. CV de los derivados de tiadiazina realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 21[c]	SMC2	Δ*P*% 45	SMC3	*In silico*[d]			
							21	SMC2	45	SMC3
DIT1q	< 0,37	I	-77,60	-1	-99,44	-82,13	I	I	I	I
DIT5j	< 0,10	I	-78,82	-1	-97,64	-48,39	I	I	I	I
DIT6c	> 2,06	I	-75,54	-1	-99,65	-53,65	I	I	I	I
DIT7r	< 0,34	I	-55,02	-1	-98,89	-77,30	I	I	I	I
DIT8m	< 0,30	I	-86,61	-1	-99,07	-88,19	I	I	I	I
DIT12e	< 0,64	I	-36,11	-1	-92,30	-30,20	I	I	I	I
DIT12o	–	I	-54,53	-1	-97,00	-21,52	I	I	I	I
DIT16l	< 0,77	I	-29,80	-1	-89,48	-61,70	I	I	I	I
DIT21d	< 0,39	I	-57,78	-1	-96,28	-62,10	I	I	I	I
DIT22r	< 0,34	I	-56,57	-1	-98,36	-72,52	I	I	I	I
DIT23m	< 0,37	I	-52,90	-1	-97,22	-74,48	I	I	I	I
DIT24c	< 0,19	I	-53,98	-1	-98,21	-67,69	I	I	I	I
DIT27s	< 0,39	I	-62,82	-1	-98,06	-82,58	I	I	I	I
DIT28d	< 0,07	I	-19,29	-1	-90,91	-50,61	I	I	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el correspondiente SMC (**SMC2**: voto mayoritario **21_22_29**, **SMC3**: promedio **21_29_45**). [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

– *Quelantes heterocíclicos*

De manera similar, ninguno de los quelantes fue activo *in vitro*, siendo el número de casos VP y FN obtenidos en el CV igual a 0 e imposible determinar los valores de C y S. Por este motivo y puesto que tanto el modelo **21** como el modelo **45** clasificaron a las 22 moléculas como inactivas, ambos obtuvieron nuevamente Q = 100% y RFA = 0,00%. El perfil de predicción de **SMC2** y **SMC3** fue idéntico (Q = 90,91% y RFA = 9,09%), difiriendo en una de las dos moléculas clasificadas como activas por cada uno (Tabla 69). En el CV de esta serie, ambos SMC potenciaron la predicción realizada por el modelo **29**, el cual había mostrado previamente una elevada tasa de FP (Tabla 60).

Tabla 69. CV de los quelantes heterocíclicos realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 21[c]	SMC2	Δ*P*% 45	SMC3	*In silico*[d]			
							21	SMC2	45	SMC3
1	> 3,51	I	-20,18	-1	-0,56	26,07	I	I	I	A
4	0,77	I	-53,17	1	-35,87	3,65	I	A	I	A
5	< 0,60	I	-78,40	-1	-73,80	-18,88	I	I	I	I
6	–	I	-67,57	-1	-55,05	-7,62	I	I	I	I
7	1,90	I	-54,40	-1	-80,81	-25,67	I	I	I	I
10	< 0,27	I	-95,41	-1	-99,78	-92,18	I	I	I	I
12	2,42	I	-92,47	-1	-98,65	-97,04	I	I	I	I
13	4,53	I	-94,76	-1	-99,85	-98,20	I	I	I	I
14	0,49	I	-96,75	-1	-99,92	-98,89	I	I	I	I
15	1,35	I	-90,54	-1	-99,43	-92,94	I	I	I	I
16	0,47	I	-40,90	-1	-6,82	-24,31	I	I	I	I
17	0,72	I	-36,02	-1	-88,02	-33,58	I	I	I	I
18	2,07	I	-35,68	-1	-98,99	-11,95	I	I	I	I
19	0,37	I	-58,90	-1	-88,14	-35,19	I	I	I	I
20	0,60	I	-57,49	-1	-99,15	-32,66	I	I	I	I
21	1,17	I	-3,63	-1	-95,72	-4,49	I	I	I	I
22	1,75	I	-55,92	-1	-81,89	-24,65	I	I	I	I
24	1,35	I	-80,25	-1	-99,96	-39,37	I	I	I	I
25	–	I	-76,55	-1	-98,31	-62,57	I	I	I	I
27	–	I	-39,66	-1	-65,51	-3,25	I	I	I	I
28	2,40	I	-72,59	-1	-99,92	-25,47	I	I	I	I
29	0,56	I	-78,17	1	-22,70	-1,04	I	A	I	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el correspondiente SMC (**SMC2**: voto mayoritario **21_22_29**, **SMC3**: promedio **21_29_45**). [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

– *Cromenoazoldionas*

Los resultados obtenidos en el CV de las cromenoazoldionas se recogen en la Tabla 70. En esta ocasión tampoco pudieron determinarse los parámetros C y S de acuerdo con la ausencia de actividad que estas moléculas presentaron *in vitro*.

El elevado número de casos FP en relación con el tamaño de la serie, hizo que salvo los modelos **10** y **21**, todos adquirieran valores elevados de *RFA* llegándose a alcanzar el 100% en el modelo **45**, como ya ocurrió con el modelo **22** (Tabla 61). A pesar de que ambos SMC mejoraron la *RFA* de estos modelos, tanto el **SMC2** como el **SMC3** mostraron un considerable número de casos FP que derivó en valores de *RFA* del 28,57% para el **SMC2** y del 42,86% para el **SMC3**.

Tabla 70. CV de las cromenoazoldionas realizado por los modelos **21** y **SMC2** y **45** y **SMC3**. IS y Obs. hacen referencia a los resultados de actividad *in vitro* sobre epimastigotes.

Compuesto	IS[a]	Obs.[b]	Δ*P*% 21[c]	SMC2	Δ*P*% 45	SMC3	*In silico*[d]			
							21	SMC2	45	SMC3
PM199	5,83	I	-64,96	1	74,58	25,63	I	A	A	A
PM52	–	I	-70,23	-1	67,15	-25,02	I	I	A	I
PM401	5,27	I	-67,90	-1	92,17	-15,24	I	I	A	I
PM154	2,60	I	-59,79	-1	93,26	4,00	I	I	A	A
PM357	> 4,37	I	-73,81	1	96,26	26,61	I	A	A	A
PM402	> 3,11	I	-71,42	-1	68,79	-25,18	I	I	A	I
PM203	7,03	I	-69,22	-1	92,62	-15,44	I	I	A	I

[a] Índice de selectividad en epimastigotes. [b] Actividad *in vitro*: A (activo), I (inactivo). [C] Clasificación obtenida por cada modelo individual y el correspondiente SMC (**SMC2**: voto mayoritario **21_22_29**, **SMC3**: promedio **21_29_45**). [d] Actividad *in silico*: A (activo), I (inactivo).

– *Resultados estadísticos del CV realizado por los **SMC2** y **SMC3***

La Tabla 71 recoge los resultados estadísticos globales del CV de las 148 moléculas que constituyen los seis grupos expuestos anteriormente. De acuerdo con estos parámetros, la calidad del **SMC2** mostró un perfil similar al obtenido por los modelos **21** y **22** y mejoró considerablemente los valores de *E* y *RFA* del modelo **29**. El mismo efecto ejerció el **SMC3** sobre la calidad del modelo **29**. No obstante, los resultados obtenidos con este SMC fueron equiparables a los de los modelos **21** y **45**.

Tabla 71. Parámetros estadísticos derivados de la clasificación obtenida por los modelos individuales **21**, **22**, **29** y **45** así como por los SMC que integran (**SMC2** y **SMC3**) en el CV de las 148 moléculas.

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
21	-0,04	75,00	3,13	94,83	5,17	14,29
22	-0,13	65,54	6,25	81,90	18,10	8,70
29	-0,05	54,05	34,38	59,48	40,52	18,97
45	-0,06	71,72	6,25	89,66	10,34	14,29
SMC2 21_22_29	-0,09	69,59	6,25	87,07	12,93	11,76
SMC3 21_29_45	-0,07	70,95	6,25	88,79	11,21	13,33

C: coeficiente de correlación de Matthews. *Q*: exactitud. *S*: sensibilidad. *E*: especificidad. *RFA*: razón de falsa alarma.

3.3.3. EXPLORACIÓN DEL DOMINIO DE APLICACIÓN

Con el propósito de conocer las posibles causas de los resultados obtenidos en el CV, se exploraron diferentes aspectos relacionados con el dominio de aplicación (DAp) de los

sistemas clasificadores. Puesto que los resultados obtenidos con los **SMC2** y **SMC3** no supusieron una mejora con respecto a los del primer SMC, estos análisis se efectuaron únicamente para el **SMC1**.

3.3.3.1. Dominio de aplicación

Mediante el programa Ambit se llevó a cabo un estudio del DAp del **SMC1** a partir de los DM que lo constituyen. Este análisis, confirmó que todos los compuestos se encontraban dentro del DAp de dicho sistema.

3.3.3.2. Análisis de conglomerados

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el análisis de conglomerados de tipo *k*-medias realizado para evaluar la variedad estructural de las 527 moléculas que constituyen la SE y la representatividad en la misma de las 148 moléculas sometidas al CV.

Tabla 72. Análisis de conglomerados efectuado para la SE de activas y las 148 moléculas del CV a partir de las variables que constituyen el **SMC1**.

Cluster	SE[a]	CV[b]	5-NI[c]	THQ[d]	CQ[e]	Tiadiazinas	Quelantes	Cromenoazoldionas
1	44	3	0	0	3	0	0	0
2	34	8	0	2	6	0	0	0
3	26	28	5	20	2	1	0	0
4	64	4	0	0	0	4	0	0
5	44	0	0	0	0	0	0	0
6	19	6	5	0	0	1	0	0
7	6	48	47	0	0	1	0	0
8	10	0	0	0	0	0	0	0
9	51	0	0	0	0	0	0	0
10	48	0	0	0	0	0	0	0
11	14	6	0	0	1	5	0	0
12	25	5	1	0	0	0	4	0
13	43	9	0	0	9	0	0	0
14	3	23	4	0	0	1	18	0
15	7	7	0	0	0	0	0	7
16	5	0	0	0	0	0	0	0
17	34	0	0	0	0	0	0	0
18	41	0	0	0	0	0	0	0
19	8	1	0	0	0	1	0	0
20	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	527	148	62	22	21	14	22	7

[a] SE de activas. [b] Moléculas del CV. [c] 5-Nitroindazoles. [d] Tetrahidroquinolinas. [e] Derivados de cloroquina.

La Tabla 72 muestra una distribución bastante equilibrada de las 527 moléculas activas de la SE en 20 *clusters*, la cual contrasta de forma llamativa con la distribución que presentan las 148 moléculas del CV. De acuerdo con estos resultados, las moléculas evaluadas *in silico* quedaron agrupadas en 12 de estos *clusters*, destacando entre ellos los número 3, 7 y 14, en los que se concentraron el 66,89% de las mismas. Por el contrario, estos tres *clusters* supusieron únicamente el 6,64% de las moléculas que forman la SE de activas. Estos resultados apuntaron hacia una limitada representatividad de las moléculas evaluadas *in silico* en la SE de moléculas activas sobre la que fueron construidos los modelos de predicción QSAR/ADL.

3.3.3.3. Análisis de componentes principales

Como segundo ejercicio, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) del **SMC1** mediante el que se redujo la dimensionalidad del sistema de 21 variables a 3 factores o componentes principales (CP1, CP2 y CP3) que explicaron el 84,83% de la variabilidad del sistema. Las Fig. 118 y 119 muestran los *score plots* obtenidos de la representación gráfica de CP1 frente a CP2 y CP3, respectivamente. Ambas gráficas fueron seleccionadas debido a que las proyecciones CP1–CP2 y CP1–CP3 mostraron un porcentaje similar de varianza acumulada para el **SMC1** (68,11 y 66,21%, respectivamente).

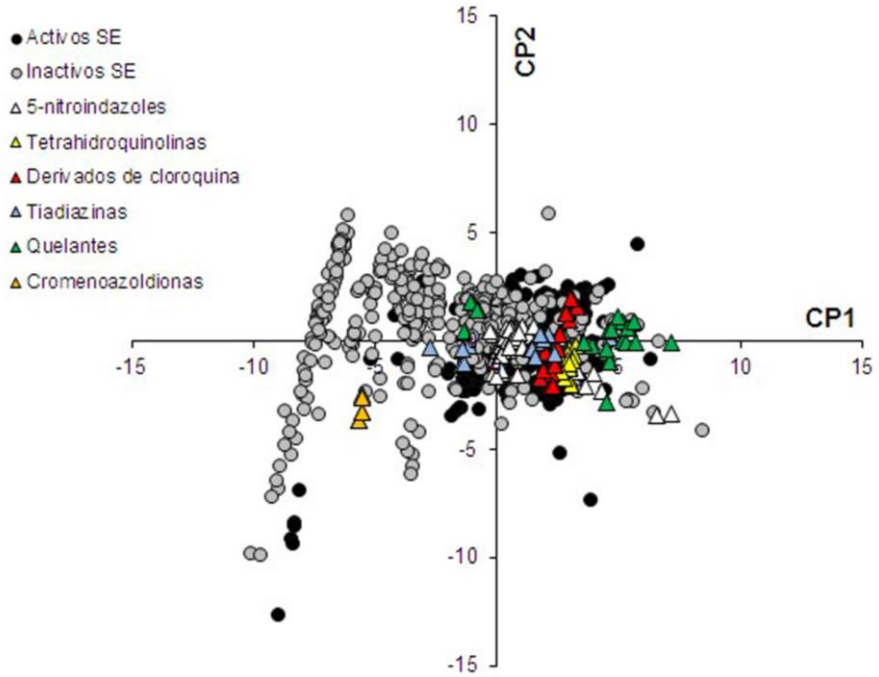


Fig. 118. Análisis de componentes principales para el **SMC1**: *score plot* CP1–CP2.

El análisis CP1–CP2 (Fig. 118) muestra un claro solapamiento del conjunto de activos e inactivos que constituyen la SE, así como una tendencia de los compuestos

sometidos al CV a agruparse en la región en la que distribuye la SE de inactivos. Estableciendo una relación de estos resultados con los obtenidos en el CV con el **SMC1** (apartado 3.3.2.1.), la predicción realizada por dicho sistema mostró una clara tendencia hacia la clasificación de los compuestos como inactivos, excepto para el grupo de derivados de cloroquina, los cuales fueron clasificados predominantemente como activos. Como se aprecia en la Fig. 118, los derivados de cloroquina fueron los únicos compuestos que formaron un *cluster* bien definido dentro del espacio ocupado por la SE de activos.

Los resultados del análisis CP1–CP3 (Fig. 119) muestran de una forma más clara el solapamiento entre las SE de activos e inactivos, así como la mayor predisposición de las moléculas de síntesis a ocupar el espacio de inactivas.

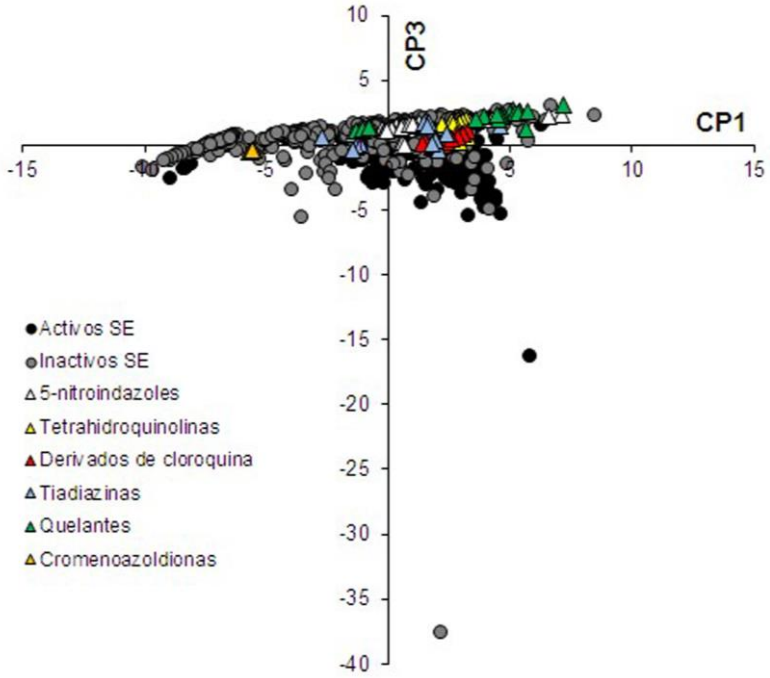


Fig. 119. Análisis de componentes principales para el **SMC1**: *score plot* CP1–CP3.

Asimismo, ambos análisis mostraron determinados compuestos de la SE separados de la nube central, apuntando hacia un comportamiento distinto de los mismos con respecto al de la mayoría.

DISCUSIÓN

"Mucha gente pequeña,
en lugares pequeños,
haciendo cosas pequeñas,
puede cambiar el mundo"

- Eduardo Galeano -

4. DISCUSIÓN

4.1. Cribado farmacológico de moléculas de síntesis

La utilización de cepas transgénicas de *Trypanosoma cruzi* se ha convertido en una práctica habitual en el campo de la quimioterapia experimental (Bot *et al*., 2010; Canavaci *et al*., 2010; Romanha *et al*., 2010; Andriani *et al*., 2011; Kessler *et al*., 2013; Villalta *et al*., 2013; Henriques *et al*., 2014; Lewis *et al*., 2014, 2015; Vieira *et al*., 2014; Miranda *et al*., 2015) facilitando la metodología en la identificación de potenciales agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Rodríguez y Tarleton, 2012). Este hecho, junto con la posibilidad de reproducir *in vitro* el ciclo biológico completo del parásito, permite la realización de ensayos de actividad sobre sus dos formas replicativas: epimastigotes y amastigotes. Mientras que el primero supone un excelente modelo debido a su sencillo mantenimiento y relativa sensibilidad a los fármacos (Martínez-Díaz *et al*., 2000), el segundo es estrictamente necesario en el cribado farmacológico de potenciales antichagásicos, por ser la forma clínicamente relevante de *T. cruzi.*

El modelo de *screening* fenotípico aplicado permite identificar compuestos cuya actividad reside sobre múltiples proteínas o rutas bioquímicas del parásito, mediante la exposición del organismo completo a la acción de los mismos (Sykes y Averi, 2013). La existencia de una forma *epimastigote-like* como intermediaria en el ciclo intracelular de *T. cruzi*, bioquímica y morfológicamente similar a la forma epimastigote del vector (Faucher *et al*., 1995; Almeida-de-Faria *et al*., 1999; Tyler y Engman, 2001), justifica la realización de pruebas farmacológicas sobre la forma no infectiva del parásito. Sin embargo, la sensibilidad que habitualmente muestran las formas extracelulares (epimastigotes y tripomastigotes) a la acción de los fármacos, es en ocasiones superior a la de la forma intracelular. De esta manera, resulta imprescindible realizar un posterior ensayo de actividad sobre amastigotes intracelulares con el fin de descartar cualquier falso positivo encontrado en el cribado farmacológico primario (Martínez-Díaz *et al*., 2000; Muelas *et al*., 2001).

4.1.1. ACTIVIDAD FRENTE A *T. cruzi* DE LA SERIE I DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL

Debido a la variedad de propiedades biológicas y farmacológicas que presentan, los indazoles han despertado un gran interés en la investigación de nuevos fármacos. De esta manera, se han propuesto como una estructura idónea para el tratamiento experimental de enfermedades cardiovasculares o del cáncer, así como se han descrito sus propiedades antimicrobianas, entre otras (Gaikwad *et al*., 2015). Con respecto a las últimas, el potencial

que presentan estas moléculas y en concreto los nitroindazoles como punto de partida para el desarrollo de agentes antichagásicos, ha sido ampliamente estudiado en la última década (Arán *et al*., 2005; Montero-Torres *et al*., 2005; Gerpe *et al*., 2006; Boiani *et al*., 2009; Rodríguez *et al*., 2009a, b; Folch-Cano *et al*., 2010; Vega *et al*., 2012; Mura *et al*., 2013; Muro *et al*., 2014; Fonseca-Berzal *et al*., 2014b, 2015a, 2016).

Continuando con los hallazgos de Montero-Torres *et al*. (2005), donde los derivados de 5-nitroindazol **3s** y **4s** (1-bencil-2-metil- y 2-bencil-1-metil-5-nitroindazolin-3-ona, respectivamente) (Fig.120) presentaron una interesante actividad tripanocida, se preparó una serie de análogos de ambos compuestos con diversos sustituyentes en las posiciones N-1 y N-2 del anillo de indazol (Vega *et al*., 2012).

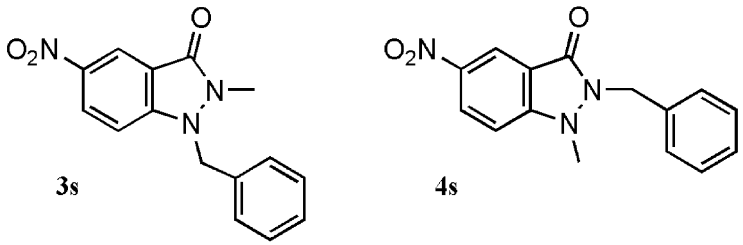


Fig. 120. Compuestos cabeza de serie: 1-bencil-2-metil- (**3s**) y 2-bencil-1-metil-5-nitroindazolin-3-ona (**4s**). Fuente: Montero-Torres *et al*. (2005).

De acuerdo con su estructura química, la serie I de derivados de 5-nitroindazol se subdividió en 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituídas (serie IA, **VATR1**–**16**), así como en 5-nitroindazoles 2,3- (serie IB, **VATR17**–**29**, **VATR34** y **VATR35**) o 1,3-disustituídos (serie IC, **VATR30**–**32**). El derivado **VATR33**, análogo de **4s** sin grupo NO_2 en la posición 5 del anillo de indazol, también se incluyó en el estudio.

• Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Es importante mencionar que en el cribado farmacológico de esta primera serie, las pruebas en epimastigotes no se realizaron siguiendo las especificaciones detalladas en el apartado 2.1.8.6. de esta memoria, sino que se siguió el protocolo estandarizado por Vega *et al*. (2005). De acuerdo con el mismo, se distribuyeron 1×10^5 epimastigotes/mL en 200 μL, necesitándose 6 h de incubación con el sustrato CPRG para su revelado.

Con respecto a la actividad en epimastigotes de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ*, generalmente ésta fue mayor para las 5-nitroindazolinonas (serie IA, Tabla 6) que para los respectivos 5-nitroindazoles (series IB y IC, Tabla 7). Centrándonos en los compuestos más activos (serie IA), el bencilo resultó el mejor sustituyente en N-2 (**VATR1**–**5**). Esta actividad se vio afectada con la eliminación del grupo metileno del bencilo, como se aprecia en los 2-fenil derivados

VATR12, **VATR13** y **VATR14** en comparación con el compuesto **4s** (Montero-Torres *et al*., 2005), **VATR1** y **VATR2**, respectivamente. Sin embargo, la introducción en N-2 de grupos de tipo 2-naftilmetilo (**VATR6**–**8**), fenetilo (**VATR15**) o metilo (**VATR9**–**11** y **VATR16**) supuso una pérdida de actividad para estos compuestos. Es importante destacar para esta serie el efecto causado por la posición relativa de los sustituyentes introducidos en N-1 y N-2, siendo el 2-fenil-1-metil derivado (**VATR12**) mucho más activo que su isómero **VATR16**. Tal impacto ya se observó con las 5-nitroindazolinonas **3s** y **4s**, mostrando una mayor actividad el 2-bencil-1-metil derivado **4s** (Montero-Torres *et al*., 2005).

En el caso de la serie IC y en contraposición a lo ocurrido (Tabla 7), se presuponía un buen perfil de actividad tripanocida para los 5-nitroindazoles 1,3-disustituídos **VATR30**–**32** en base a los resultados previamente mostrados por diversos compuestos análogos (Arán *et al*., 2005; Rodríguez *et al*., 2009a).

Al igual que ocurre en los fármacos de referencia (Raether y Hänel, 2003; Wilkinson y Kelly, 2009), la presencia del grupo NO_2 adquiere gran importancia en la formulación de estos derivados como potenciales agentes antichagásicos (Aguilera-Venegas *et al*., 2013), resultando inactivos aquellos que carecen del mismo, como **VATR33**. A pesar de que no se conoce cuál es el mecanismo de acción desencadenado por estas moléculas en *T. cruzi*, estudios previos realizados con varias 5-nitroindazolinonas (serie IA) y 5-nitroindazoles (serie IB), relativos a su reducción electroquímica y enzimática en presencia de fracciones microsomales (Folch-Cano *et al*., 2010), proponen una posible inducción de estrés oxidativo en el parásito en la que el NO_2 jugaría un papel importante. De hecho, la producción de radicales libres en presencia del sistema microsomal de *T. cruzi*, fue menor para el compuesto **3s** que para **4s** (Folch-Cano *et al*., 2010). En el caso de los compuestos derivados del prototipo **4s**, la producción de radicales libres fue mayor en presencia de la fracción microsomal de *T. cruzi* que de las fracciones microsomales de células de mamífero, siendo los niveles obtenidos con **3s** en ambos sistemas prácticamente similares (Folch-Cano *et al*., 2010). Estos resultados se correlacionan con la actividad biológica de ambos compuestos cabeza de serie (Montero-Torres *et al*., 2005) y la mayor selectividad que por lo general muestran las 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituídas con grupos aromáticos en N-2.

• Microscopía electrónica de barrido

En los parásitos, las membranas plasmáticas presentan en muchas ocasiones alteraciones en su estructura ocasionadas como respuesta a la acción de los fármacos. Estos cambios morfológicos pueden estudiarse mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Los miembros de la familia Trypanosomatidae presentan una superficie celular bastante firme, debido a la estabilidad que le proporcionan los microtúbulos subpeliculares dispuestos bajo la membrana plasmática. Ambos componentes se encuentran fuertemente

asociados a través de filamentos cortos, siendo tal asociación responsable de la rigidez celular y de la resistencia a la disrupción mecánica que presentan los tripanosomátidos (de Souza, 2002). Asimismo, es característica de esta familia la presencia de un flagelo emergente desde una región conocida con el nombre de bolsa flagelar. Esta invaginación, consistente en una depresión de la membrana plasmática y carente de microtúbulos subpeliculares, es la región donde se establece un contacto directo entre las membranas que revisten el cuerpo celular y el flagelo (de Souza, 2002). En el caso de los epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, se distingue a este nivel el citostoma, involucrado en los procesos de endocitosis (de Souza, 2009).

Debido a que los epimastigotes son la forma extracelular empleada en nuestro laboratorio para la selección de agentes anti-*T. cruzi* y de acuerdo con los resultados obtenidos por **VATR1** y **VATR3**, las primeras aproximaciones de MEB se realizaron sobre epimastigotes tras realizar el ensayo *in vitro* propuesto en el apartado 2.1.8.6.

Los epimastigotes tratados con la CI_{50} de los fármacos de referencia (Fig. 42C–D) mostraron importantes deformaciones en su cuerpo celular, presentando una forma redondeada y gran retracción en la superficie del mismo, más pronunciada en el caso del tratamiento realizado con nifurtimox (NX). En estos parásitos, se observó además un flagelo bastante alargado, adquiriendo apariencia rígida en los epimastigotes tratados con NX. Alteraciones similares fueron previamente observadas en aislados de *T. cruzi* tratados con la correspondiente CI_{50} del benznidazol (BZ) (D. Misael, comunicación personal). Igualmente, diversos agentes tripanocidas provocan este tipo de retracciones en la superficie celular de los epimastigotes (Campos *et al*., 2010; Fernandes *et al*., 2012; Veiga-Santos *et al*., 2013), las cuales podrían ser indicadores de una pérdida de citoplasma o una desorganización en su citoesqueleto (Vannier-Santos y de Castro, 2009).

Este tipo de alteraciones no se observaron en los epimastigotes tratados con la CI_{50} de **VATR1** y **VATR3** (Fig. 42E–H). Sin embargo, fue común la aparición de poros de pequeño tamaño en su membrana plasmática. De acuerdo con Vannier-Santos y de Castro (2009), la ocurrencia de discontinuidades en la superficie celular del parásito podría ser ocasionada como consecuencia de un estrés oxidativo inducido por los compuestos.

La membrana plasmática de los epimastigotes tratados con **VATR1** y **VATR3** también presentó numerosas protuberancias *(blebs)*, tanto a nivel del cuerpo celular como del flagelo (Fig. 42E–H). Se ha demostrado que varios estímulos provocan la activación de la DAPK *(death-associated protein kinase)*, molécula que interviene en la formación de estas estructuras y que se encuentra involucrada en diferentes tipos de muerte celular, como la autofagia o la apoptosis (Bovellan *et al*., 2010). Diversos compuestos, naturales y de síntesis, desencadenan la formación de estos *blebs* en la membrana plasmática de los epimastigotes de *T. cruzi* (Braga *et al*., 2004; Menna-Barreto *et al*., 2009a; Campos *et al*., 2010; Veiga-

Santos *et al*., 2013), pudiendo incluso evolucionar hasta su total desprendimiento (Braga *et al*., 2004; Menna-Barreto *et al*., 2009a). Así, la aparición de *blebs* de pequeño tamaño y desprovistos de citoplasma son sugestivos de procesos de autofagia (Vannier-Santos y de Castro, 2009). En el caso de *blebs* de mayor tamaño, con contenido citoplasmático y semejantes a cuerpos apoptóticos (Vannier-Santos y de Castro, 2009), cabría contemplar la inducción de mecanismos de apoptosis.

Ninguno de estos daños se observó en los parásitos sin tratar (Fig. 42A–B). En los controles, los epimastigotes preservaron su morfología típica, apreciándose claramente su cuerpo celular alargado y el flagelo emergiendo lateralmente hacia la mitad del mismo.

- **Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares**

En base a los resultados obtenidos en el cribado primario, se seleccionaron 12 de estos derivados para una posterior evaluación de su actividad frente a amastigotes de *T. cruzi*. En este contexto resulta importante mencionar que no se han encontrado en la literatura datos de actividad en amastigotes para otros derivados de 5-nitroindazol previos a la publicación de estos resultados en Fonseca-Berzal *et al*. (2014b) y al trabajo de Muro *et al*. (2014).

En términos generales, los resultados en amastigotes (Tabla 8) se correlacionaron con los obtenidos en epimastigotes (Tablas 6 y 7), destacando las 5-nitroindazolinonas frente a los 3-alcoxi-5-nitroindazoles. Nuevamente, los derivados con grupos bencilo en N-2 mostraron el mejor perfil de actividad tripanocida (**VATR1**, **VATR2** y **VATR3**), cayendo considerablemente con la introducción del radical fenilo en dicha posición (**VATR34** y **VATR35**). En este contexto es importante destacar los resultados obtenidos con **VATR1**, **VATR2** y **VATR3**, los cuales suprimieron por completo la proliferación intracelular de *T. cruzi* a la concentración de 8 μM, siendo sus CI_{50} similares a las del NX y el BZ (Tabla 9).

Con excepción de **VATR4**, **VATR7** y **VATR14**, estos compuestos mostraron una interesante inhibición en la proliferación de amastigotes. La actividad de estos tres derivados no pudo determinarse a este nivel debido a su toxicidad sobre la célula hospedadora, no detectada previamente en el ensayo de citotoxicidad. El mayor tiempo de exposición a los compuestos requerido en el ensayo de actividad (7 días *versus* 24 h) o la diferente naturaleza de las líneas celulares empleadas en ambos ensayos (fibroblastos L929 *versus* macrófagos J774), podrían ser la causa de tales diferencias (Rolón *et al*., 2006b). Este hecho confirma la importancia de utilizar el mismo tipo de células en todas las etapas del cribado farmacológico (Muelas *et al*., 2001, 2002; Muelas-Serrano *et al*., 2002; da Silva *et al*., 2007; Soeiro *et al*., 2013; de Araújo *et al*., 2014). Por otra parte, la capacidad que presenta *T. cruzi* para invadir gran variedad de células, tanto fagocíticas como no fagocíticas, ha permitido el uso de diferentes células de mamífero como hospedadoras, siendo los macrófagos J774 una de las líneas celulares tradicionalmente empleada para las infecciones *in vitro* (Martínez-Díaz

et al., 2001; Chen *et al*., 2010). Sin embargo, a pesar de la gran susceptibilidad que los macrófagos muestran a la infección por *T. cruzi*, el proceso de fagocitosis podría verse afectado como consecuencia de la tripsinización, así como una activación de los mismos inhibiría considerablemente la replicación intracelular del parásito (McCabe *et al*., 1984). Basándonos en estas premisas, para los experimentos posteriores y salvo excepciones justificadas, se seleccionó la línea de fibroblastos L929 como la utilizada de rutina en los ensayos de actividad frente a amastigotes, así como en las pruebas de citotoxicidad inespecífica.

• Actividad *in vivo*

En vista de la excelente actividad *in vitro* de **VATR1** y **VATR3**, se evaluó su eficacia como tratamiento experimental en un modelo murino de Chagas agudo (Romanha *et al*., 2010), obteniéndose resultados prometedores tras la administración de 100 mg/kg/día durante 5 días consecutivos. Pese a que ninguno mejoró la resultados obtenidos con el BZ, ambos derivados redujeron la parasitemia en un 52% (**VATR1**) y un 77% (**VATR3**) una vez concluido el tratamiento (Fig. 45), superando todos los ratones la fase aguda de la infección (Fig. 46).

• Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

Un punto importante a considerar en la investigación de candidatos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, reside en la selección de diversas cepas de *T. cruzi* para la realización de los ensayos de actividad (Zingales *et al*., 2014). La diferente actividad que el BZ y el NX muestran frente a las numerosas cepas del parásito, es uno de los aspectos sobre los que recaen las limitaciones del tratamiento actual (Urbina, 2015). A pesar de que no se ha demostrado una evidente correlación entre la variabilidad genética de *T. cruzi* y su presumible respuesta a los fármacos (Moraes *et al*., 2014), las pruebas de actividad farmacológica deben orientarse hacia parásitos de los DTU frecuentemente asociados a la enfermedad en humanos: DTU TcI, TcII, TcV y TcVI (Zingales *et al*., 2014).

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre la cepa CL Brener (DTU TcVI) y conforme a la actividad mostrada por varios derivados de 5-nitroindazol en diferentes cepas de *T. cruzi* (Aguilera-Venegas *et al*., 2013), se exploró la actividad de **VATR1** y **VATR3** sobre las cepas Tulahuen (DTU TcVI) e Y (DTU TcII).

Citotoxicidad en cultivos primarios de células cardíacas y en células L929

A pesar de que ambos compuestos no fueron tóxicos para macrófagos J774 tras 24 h de tratamiento (Tabla 9), resulta importante corroborar la ausencia de citotoxicidad sobre aquellas células que actuarán como hospedadoras. Aunque en el ciclo biológico de *T. cruzi*

los macrófagos inmediatamente establecen contacto con el parásito, tanto las células cardíacas (CC) como los fibroblastos se prefieren como modelo experimental debido a que son células más estrictamente involucradas en la patología de la enfermedad (Teixeira *et al*., 2006a). Asimismo, la importancia que el tejido cardíaco adquiere en la infección y en los procesos inflamatorios de la enfermedad, apoya la utilización de CC en este tipo de ensayos, con el fin de excluir compuestos con características cardiotóxicas (da Silva *et al*., 2007).

Ninguno de los dos derivados fue tóxico para CC, pero concentraciones elevadas de ambos indujeron una pérdida de viabilidad en fibroblastos L929, habiéndose observado un comportamiento similar con el BZ (Tabla 10). Estas diferencias en la sensibilidad a los compuestos podrían deberse a la distinta naturaleza de las células empleadas (cultivos primarios y línea celular continua, respectivamente) (Duran-Rehbein *et al*., 2014) o a los diferentes ensayos de citotoxicidad aplicados (Prestoblue® *versus* resazurina).

Actividad *in vitro* frente a las cepas Tulahuen *lacZ* e Y

La variación en el contenido de glutatión (GSH) entre las cepas de *T. cruzi*, ya sea libre o conjugado como tripanotión [$T(SH)_2$], se ha propuesto como explicación a su diferente respuesta al tratamiento con BZ y NX (Repetto *et al*., 1996) debido a la intervención que estos tioles reducidos tienen en los mecanismos de detoxificación de radicales libres en el parásito (Irigoín *et al*., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que tales diferencias no son relevantes entre epimastigotes de las cepas Tulahuen, CL e Y (Moncada *et al*., 1989), presumiéndose una respuesta similar ante el tratamiento con estos compuestos. En esta línea, la ausencia de una aparente asociación entre la susceptibilidad que muestran los epimastigotes a los fármacos de referencia y su pertenencia a un determinado DTU, ha sido previamente publicada (Boiani *et al*., 2006; Moreno *et al*., 2010; Zingales *et al*., 2014).

Recientemente, se han detectado diferencias significativas ($P < 0,05$) en la actividad de los derivados **VATR1** y **VATR3** frente a epimastigotes de las cepas CL Brener e Y: **VATR1** CI_{50} = 0,93 μM (CL-B5) y 3,55 μM (Y), **VATR3** CI_{50} = 1,17 μM (CL-B5) y 7,92 μM (Y) (Fonseca-Berzal *et al*., 2015a). De hecho, la cepa Y se encuentra clasificada como "cepa de resistencia moderada a los nitroderivados" (Romanha *et al*., 2010), al contrario que la cepa CL Brener (Le-Senne *et al*., 2002). Sin embargo, tales diferencias no existieron al comparar el perfil de actividad del BZ, cuyos valores de CI_{50} fueron próximos a 30 μM para ambas cepas (Fonseca-Berzal *et al*., 2015a).

Por el contrario, los dos derivados presentaron un comportamiento similar en las pruebas de actividad sobre amastigotes de las cepas CL Brener, Tulahuen e Y (Tablas 9 y 11). De acuerdo con los criterios propuestos por DNDi (Don e Ioset, 2014), compuestos que alcanzan valores de CI_{50} inferiores a 10 μM en sus ensayos de actividad frente a amastigotes de los DTU TcII y TcVI, son identificados como potenciales *hits* para la quimioterapia de la

enfermedad de Chagas. Los derivados **VATR1** y **VATR3** cumplieron este requisito, tanto para cepas del DTU TcII (Y), como del DTU TcVI (CL Brener y Tulahuen). Ambos resultaron además 10 veces más activos sobre la cepa Y que tóxicos para CC (Don e Ioset, 2014).

Estas dos 5-nitroindazolinonas mostraron además una interesante actividad *in vitro* frente a *Trypanosoma brucei* (Arán *et al*., 2012), sugiriéndose una acción específica de estos nitroheterociclos para tripanosomátidos causantes de infección en humanos. No obstante, su actividad sobre tripomastigotes sanguíneos (TS) de *T. brucei* (Arán *et al*., 2012) y *T. cruzi* (Tabla 11) fue muy inferior a la obtenida frente a las formas replicativas de *T. cruzi*. Debido a que periodos prolongados de incubación en ausencia de componentes sanguíneos afectan considerablemente a la integridad y viabilidad de los TS de *T. cruzi*, el tiempo máximo de tratamiento establecido para las pruebas *in vitro* fue de 24 h, siendo éste inferior al requerido por las pruebas de actividad sobre epimastigotes (72 h para la cepa CL-B5) o amastigotes intracelulares (2, 4 o 7 días dependiendo de la cepa utilizada). De esta manera, es posible que 24 h de tratamiento no sea tiempo suficiente para que **VATR1** y **VATR3** provoquen la muerte del parásito. Otra hipótesis plantea que ambos derivados estén actuando de forma diferente sobre distintas dianas celulares en las formas proliferativas (epimastigotes y amastigotes) y no proliferativas (TS) de *T. cruzi*. De otra manera, trabajos previos realizados con diversas series de derivados de 5-nitroindazol señalan una importante actividad de estos compuestos frente a tripomastigotes (Boiani *et al*., 2009; Rodríguez *et al*., 2009b) o un perfil similar sobre las tres formas de *T. cruzi* (Muro *et al*., 2014). Diferencias relativas a la estructura de los compuestos (5-nitroindazoles 1,3-disustituidos *versus* 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas), cepa del parásito o condiciones de los ensayos podrían explicar este diferente comportamiento. No obstante, los resultados *in vitro* (Tabla 11) se correlacionaron con los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* (Fig. 45), siendo en ambos modelos **VATR3** el derivado más activo frente a TS.

Con respecto al perfil mostrado por el BZ en la cepa Y, éste podría una vez más estar relacionado con la variación en la concentración de tioles existente entre las formas de *T. cruzi* pertenecientes a una misma cepa (Maya *et al*., 1997). De esta manera, cuanto mayor es el contenido de tioles reducidos (epimastigotes > tripomastigotes > amastigotes), menos susceptibilidad presenta el parásito a dicho fármaco de referencia (CI_{50} epimastigotes > tripomastigotes > amastigotes).

• Microscopía electrónica de transmisión

El estudio de los daños ultraestructurales desencadenados en el parásito por los diferentes tratamientos a través de microscopía electrónica de transmisión (MET), es un método muy utilizado en el campo de la quimioterapia experimental. En función del compartimento afectado, diferentes enzimas o rutas metabólicas pueden estar implicadas como dianas

farmacológicas. El grado de afectación de los mismos contribuye a la elucidación del mecanismo de acción de los fármacos estudiados (Vannier-Santos y de Castro, 2009).

El tratamiento con **VATR1** y **VATR3** realizado *in vitro* sobre TS de *T. cruzi*, originó principalmente una intensa vacuolización en el parásito, la dilatación del retículo endoplasmático y la aparición de cuerpos multivesiculares. Nuestro estudio también reveló perfiles de retículo endoplasmático rodeando diversos orgánulos citoplasmáticos, como el núcleo y la mitocondria (Fig. 48 y 49). Este tipo de alteraciones son indicativas de procesos de autofagia, muerte celular programada de tipo II (Vannier-Santos y de Castro, 2009).

Los procesos de muerte celular programada (PCD) – apoptosis (PCD de tipo I), autofagia (PCD de tipo II) y necrosis (PCD de tipo III) – están perfectamente caracterizados en los eucariotas superiores y son cruciales en la homeostasis de los mismos. Concretamente, la autofagia interviene en el mantenimiento del balance metabólico a través del reciclado de componentes citoplasmáticos, conduciendo su desregulación a la muerte celular (Menna-Barreto *et al*., 2009b). La autofagia ha sido descrita en varios protozoos parásitos, entre ellos los pertenecientes al orden Kinetoplastida, interviniendo a lo largo de su ciclos biológicos (Brennand *et al*., 2011), pero también como consecuencia de la acción de fármacos (Menna-Barreto *et al*., 2009b). En *T. cruzi*, la autofagia se ha propuesto como mecanismo de acción para diversos compuestos naturales (Luize *et al*., 2006; da Silva *et al*., 2013; Veiga-Santos *et al*., 2013) o de síntesis. Centrándonos en estos últimos y en su acción sobre TS, las naftofuranquinonas (Fernandes *et al*., 2012) y los imidazoles (da Silva *et al*., 2014) son algunos de los prototipos que desencadenan tal acción.

- **Respirometría**

Debido a su singularidad, la mitocondria de los tripanosomátidos supone una de las dianas más recurridas en el diseño de fármacos antiparasitarios. Las alteraciones producidas en este orgánulo varían con el tiempo de tratamiento y los compuestos empleados. Sin embargo, es importante considerar que los daños producidos a nivel de la mitocondria pueden surgir bien como un efecto directo del fármaco sobre la misma, bien como una alteración secundaria consecuencia de una pérdida de viabilidad celular por interferencia del fármaco con otros componentes celulares o rutas metabólicas (Menna-Barreto y de Castro, 2014). En este contexto, los xenobióticos pueden interaccionar con la cadena de transporte electrónico mitocondrial incrementando la formación de anión-radicales superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a través de dos mecanismos distintos. Algunos compuestos estimulan el estrés oxidativo produciendo un bloqueo en el transporte de electrones y en consecuencia, aumentan el nivel de reducción de los transportadores localizados en el lugar de inhibición (inhibidores redox). Otros compuestos susceptibles de ciclaje redox, aceptan un electrón de un transportador y

lo transfieren al O_2, estimulando de esta manera la formación de $O_2^{\bullet -}$ sin inhibición de la cadena respiratoria (Turrens, 2003).

Es bien sabido que en la mayoría de los eucariotas la cadena de transporte electrónico está constituida por cuatro complejos enzimáticos que se encuentran integrados en la membrana interna de la mitocondria: NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), succinato-ubiquinona oxidorreductasa (complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (complejo III) y citocromo oxidasa (complejo IV), participando la ubiquinona y el citocromo c en el transporte de electrones (Fig. 121). Los complejos I, III y IV actúan como bombas de protones, generándose un gradiente electroquímico que conduce a la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa mitocondrial o complejo V (Menna-Barreto y de Castro, 2014).

T. cruzi posee una cadena de transporte electrónico con gran funcionalidad de los complejos II–V, pero a diferencia de otros eucariotas, el complejo I tiene una funcionalidad limitada (Paes *et al*., 2011). Concretamente, los tripomastigotes presentan gran actividad a nivel de los complejos II–III, siendo baja para el complejo IV. Este hecho se correlaciona con la mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de las formas sanguíneas en comparación con la detectada en epimastigotes (Gonçalves *et al*., 2011).

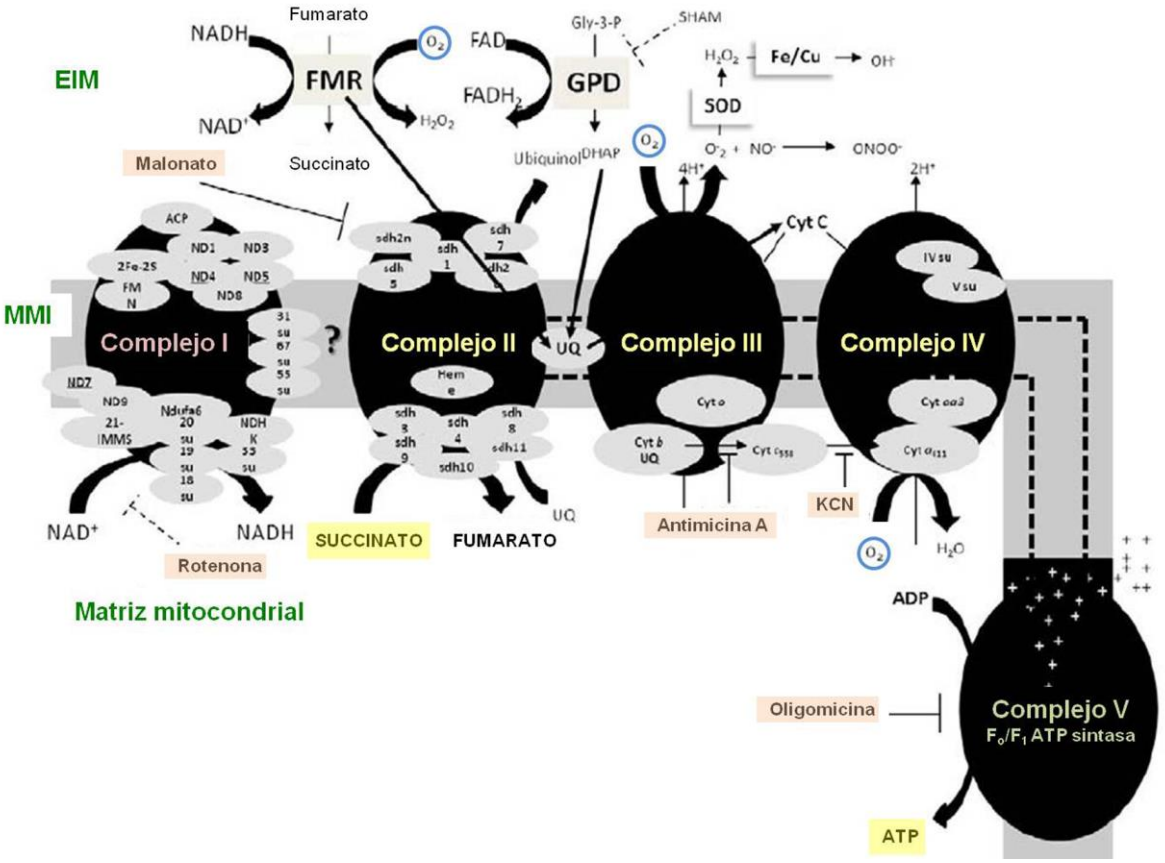


Fig. 121. Representación esquemática de la cadena de transporte electrónico en *T. cruzi*. EIM: espacio intermembrana, MMI: membrana mitocondrial interna. En rojo: inhibidores de la respiración mitocondrial. Fuente: adaptación de la figura propuesta por Paes *et al*. (2011).

Volviendo a la quimioterapia, compuestos como las quinonas o el NX, capaces de reaccionar con O_2, parecen actuar induciendo estrés oxidativo en *T. cruzi* (Pinto y de Castro, 2009, Wilkinson y Kelly, 2009). Estos compuestos susceptibles de ciclaje redox provocan un aumento de ROS en el parásito, que junto con las limitadas defensas antioxidantes de *T. cruzi* conduce a una muerte selectiva del parásito (Turrens, 2004). A propósito de las 5-nitroindazolinonas, el potencial que muestran los derivados de 2-bencil-5-nitroindazol para inducir de manera selectiva estrés oxidativo en el parásito, ha sido previamente introducido en este apartado. Estudios realizados mediante voltametría cíclica y de resonancia de espín electrónico (Folch-Cano *et al*., 2010) han mostrado la generación de anión-radicales nitro ($R\text{-}NO_2^{\bullet -}$) a partir de estas moléculas y su posterior reoxidación a la estructura original en presencia de agentes oxidantes, favorecida por la deslocalización electrónica que tiene lugar en el anillo de 5-nitroindazol (ciclo redox).

Un comportamiento similar se ha propuesto como uno de los mecanismos de acción del NX (Fig. 13). En una reacción catalizada por enzimas nitro-reductasas de tipo II (NTR-II), el NX experimenta una reducción captando 1 electrón y generando el correspondiente $R\text{-}NO_2^{\bullet -}$. En presencia de O_2, el $R\text{-}NO_2^{\bullet -}$ recupera su estructura original de nitrofurano, promoviendo al mismo tiempo la producción de $O_2^{\bullet -}$ en el parásito (Wilkinson y Kelly, 2009).

En el presente trabajo, se exploró una posible afectación de la mitocondria de *T. cruzi* inducida por el tratamiento con **VATR1** y **VATR3**. La capacidad de estos compuestos para actuar como inhibidores redox o sufrir ciclaje redox fue analizada frente a TS mediante monitorización del consumo de O_2. Tratándose de los primeros, éstos provocarían una reducción en el consumo de O_2, mientras que los segundos conducirían a un aumento del mismo insensible a KCN (Boiani *et al*., 2010) o a antimicina A, ambos inhibidores de la respiración mitocondrial a nivel de los complejos IV y III, respectivamente (Fig. 121).

De acuerdo con los resultados obtenidos, **VATR1** redujo el consumo de oxígeno ca. 20%, mientras que **VATR3** lo hizo en torno al 32% (Fig. 50). Estos hechos se correlacionan con los daños ultraestructurales observados mediante MET, donde se apreció cierta pérdida de integridad en la mitocondria de ciertos TS tratados con **VATR3** (Fig. 49).

A pesar del potencial redox que presentan los derivados de 5-nitroindazol, **VATR1** y **VATR3** no estarían captando electrones del O_2 a las concentraciones ensayadas. De ser así, esta reacción conduciría a un aumento en el consumo de O_2 insensible a la adición de antimicina A (Fig. 50), similar al que produce el NX en presencia de KCN (Maya *et al*., 2003). La menor capacidad que muestran estos nitroderivados para ser reducidos en comparación con la del fármaco de referencia mencionado (Folch-Cano *et al*., 2010) o el requerimiento de mayores concentraciones de compuesto para reaccionar con O_2 (Boiani *et al*., 2010) podrían ser la causa de las diferencias registradas entre el comportamiento de estos 5-nitroindazoles y del NX. De esta manera, es más probable que los derivados **VATR1** y **VATR3** estén

inhibiendo la respiración mitocondrial en *T. cruzi* como consecuencia de su interacción con la cadena de transporte electrónico, habiéndose observado un comportamiento similar en otros 5-nitroindazoles (Rodríguez *et al*., 2009a). No obstante, es conveniente realizar ensayos complementarios dirigidos a medir la actividad NADH-citocromo c oxidorreductasa (complejos I–III) o citocromo c oxidasa (complejo IV) con el fin de conocer a qué nivel específico de la cadena de transporte electrónico actúan (Menna-Barreto *et al*., 2009c).

En base a la inestabilidad que presenta el $R\text{-}NO_2^{\bullet-}$ en ciertas moléculas y su rápida dismutación a especies nitroso (R-NO), se ha propuesto que el megazol y otros 5-nitroimidazoles, cicladores redox de carácter débil e inhibidores de la respiración en *T. cruzi*, actúan por interacción con las reservas de $T(SH)_2$ y GSH en el parásito (Maya *et al*., 2003). El perfil mostrado por **VATR1** y **VATR3** en el estudio de respirometría junto con su reactividad hacia los tioles (Folch-Cano *et al*., 2010), muestra cierta similitud entre el comportamiento de dichos 5-nitroimidazoles y los derivados de 5-nitroindazol. Sin embargo, la mayor estabilidad del $R\text{-}NO_2^{\bullet-}$ en nuestras moléculas (Folch-Cano *et al*., 2010) en comparación con la que presenta en los 5-nitroimidazoles (Maya *et al*., 2003) sugiere distintos mecanismos de interacción con los tioles. Mientras que el megazol y sus derivados actuarían a través de la formación de metabolitos electrófilos (Maya *et al*., 2003), los derivados de 5-nitroindazol lo harían en una reacción mediada por $R\text{-}NO_2^{\bullet-}$ actuando el GSH como agente oxidante (Folch-Cano *et al*., 2010). Llegados a este punto resulta imprescindible recordar la importacia del GSH como precursor en la biosíntesis del $T(SH)_2$ y por tanto, en los mecanismos antioxidantes de defensa de *T. cruzi* (Irigoín *et al*., 2008).

En condiciones fisiológicas, la respiración mitocondrial genera ROS, tales como H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$. Sin embargo, cualquier alteración en este proceso metabólico como su inhibición, aumenta las concentraciones basales de ROS (Turrens, 2003). Además de ser la fuente principal de ROS, la mitocondria es especialmente susceptible a su acción y en consecuencia, una mitocondria disfuncional presenta la capacidad de hidrolizar ATP y acelerar la producción de ROS. La eliminación de este orgánulo es por tanto esencial en la protección de la célula y fundamentalmente ocurre mediante un proceso selectivo de autofagia conocido como mitofagia (Kim *et al*., 2007). De acuerdo con los resultados obtenidos de manera conjunta en las pruebas de MET y respirometría, *T. cruzi* podría estar experimentando un proceso de mitofagia en respuesta al daño mitocondrial inducido por los 5-nitroindazoles, cuya desregulación conduce a procesos de muerte celular (Kim *et al*., 2007).

- **Citometría de flujo**

Finalmente, debido a los hallazgos en las pruebas de MET y respirometría donde se aprecian cambios morfológicos y funcionales a nivel de la mitocondria como consecuencia del tratamiento de TS con **VATR1** y **VATR3**, se estudiaron posibles alteraciones en el potencial

de membrana mitocondrial (PMM) del parásito. Para ello se utilizó el marcador fluorescente TMRE debido a que los derivados de rodamina se acumulan en la mitocondria activa, permitiendo de esta manera detectar una despolarización de la misma (Menna-Barreto *et al*. 2009c; Fernandes *et al*., 2012).

El PMM es el gradiente electroquímico de protones generado transmembrana a partir de los complejos I, III y IV de la cadena de transporte electrónico durante la fosforilación oxidativa. Este gradiente de protones es a su vez responsable de la síntesis de ATP por la ATP sintasa, por lo que resulta crítico en el mantenimiento de una mitocondria funcional y su medida refleja alteraciones producidas a nivel de este orgánulo y el estado energético general de la célula (Abdel-Razaq *et al*., 2011; Menna-Barreto y de Castro, 2014).

Consistente con los resultados de las pruebas de MET y respirometría, el análisis realizado mediante citometría de flujo señaló una pérdida del PMM derivada del tratamiento con **VATR1** y **VATR3**, afectando respectivamente a ca. 100 y 75% de la población (Tabla 12 y Fig. 51). Asimismo, cabe mencionar los valores registrados en los TS sin tratar, los cuales corresponden al porcentaje de parásitos que muestran despolarización de la membrana mitocondrial con anterioridad a la incubación con los compuestos (da Silva *et al*., 2008). Los resultados obtenidos en presencia del marcador TMRE sugieren una interferencia de los derivados **VATR1** y **VATR3** con el gradiente de potencial electroquímico de la membrana mitocondrial de *T. cruzi* (da Silva *et al*., 2008).

4.1.2. ACTIVIDAD FRENTE A *T. cruzi* DE LA SERIE II DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL

La serie II de derivados de 5-nitroindazol se diseñó en base a la actividad mostrada por las 2-bencil-5-nitroindazolinas de la serie I con grupos propilo e isopropilo en N-1 (**VATR1** y **VATR2**, respectivamente). La constituyen derivados de 2-bencil-5-nitroindazol soportando en la posición *orto* del bencilo electroatractores, tales como halógenos (F o Br) o el grupo ciano (CN), o electrodonadores como el grupo metilo (CH_3). En el derivado **VATR114** el grupo bencilo fue reemplazado por un grupo Π-deficiente como el 2-picolilo, con objeto de estudiar su comportamiento biológico. El indazol **VATR115** y la quinazolinona **VATR118**, obtenidos como subproductos en la preparación de **VATR114**, también fueron ensayados.

- **Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el *screening* primario (Tabla 13), los derivados más activos fueron aquellos con sustituyente F en la posición C-2 del anillo de benceno, siendo también éstos los más selectivos de la serie II. En comparación con sus homólogos no

halogenados, el derivado **VATR106** equiparó la actividad de **VATR1** (CI_{50} = 1 y 0,93 μM, respectivamente) mientras que **VATR110** mejoró ligeramente la mostrada por **VATR2** (CI_{50} = 1,76 y 2,39 μM, respectivamente). Con relación a su citotoxicidad inespecífica, ésta no se vio afectada con la inserción del átomo de F (CL_{50} > 256 μM en los respectivos ensayos).

La introducción de halógenos en las moléculas es una técnica muy utilizada en la investigación en Química Médica, estando los compuestos fluorados a la cabeza de los prototipos halogenados. La mayor electronegatividad del átomo de F, junto con su menor radio atómico y su baja polarizabilidad, permite modificar las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, lo que en muchos casos conduce a la optimización de sus propiedades farmacológicas (Hernandes *et al*., 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una correlación entre la electronegatividad del sustituyente introducido en el grupo bencilo (F > Br > CN > CH_3) y la actividad de las moléculas sobre epimastigotes (**VATR106** > **VATR107** ≈ **VATR108** > **VATR109** y **VATR110** > **VATR111** > **VATR112** ≈ **VATR113**).

Con respecto a la toxicidad de los halógenos, ésta tiende a disminuir hacia los átomos más pesados, siendo F y Cl los más tóxicos del grupo. No obstante, Hernandes *et al*. (2010) exponen que no hay evidencias claras para establecer que la presencia de halógenos sea responsable *per se* del potencial tóxico de los compuestos halogenados. De acuerdo con esta afirmación y como se aprecia en los resultados de citotoxicidad inespecífica, este tipo de sustituyentes no influye de manera evidente sobre el perfil de toxicidad de los derivados de 5-nitroindazol, citando como ejemplo que **VATR107** (derivado con Br) registró una mayor citotoxicidad que **VATR106** (derivado con F).

A propósito de los compuestos con grupo picolilo en sustitución del bencilo y como ocurre con la serie I de derivados de 5-nitroindazol, el derivado con estructura de nitroindazolinona **VATR114** (CI_{50} = 7,38 μM) fue considerablemente más activo que el respectivo 3-alcoxiindazol **VATR115** (CI_{50} > 256 μM), apoyándose de esta manera la mayor selectividad de las 5-nitroindazolinonas hacia *T. cruzi*.

• Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares

La introducción de halógenos también supone una mejora en la permeabilidad de membrana de las moléculas (Hernandes *et al*., 2010). Este hecho resulta especialmente relevante en su actividad sobre amastigotes intracelulares, debido a la interferencia que la membrana plasmática de la célula hospedadora puede ejercer sobre su selectividad (Romero y Morilla, 2010; Bahia *et al*., 2014a). Los resultados del cribado primario se confirmaron en los ensayos frente al parásito intracelular (Tabla 14), donde los compuestos fluorados **VATR106** y **VATR110** mostraron la mayor actividad de entre los 5 derivados seleccionados para ser ensayados a este nivel, seguidos del derivado con Br (**VATR111**) y por último del derivado con grupo CN (**VATR108**) y el derivado **VATR114** con grupo picolilo en lugar de bencilo.

4.1.3. ACTIVIDAD FRENTE A *T. cruzi* DE LA SERIE III DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL

La serie III de derivados de 5-nitroindazol y productos relacionados (quinazolinas) se sintetizó de acuerdo con los resultados de actividad obtenidos con las series anteriores, constituidas por derivados de 5-nitroindazol soportando sustituyentes alquílicos simples (metilo, propilo, isopropilo, butilo y pentilo) bien en posición N-1 del anillo de indazolinona, bien en posición 3-O del indazol (Vega *et al*., 2012; Fonseca-Berzal *et al*., 2014b, 2015a).

Estos compuestos se diseñaron con el fin de explorar la actividad de análogos de estas estructuras con sustituyentes insaturados o cadenas alquílicas ω-sustituidas en las posiciones mencionadas. Con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, algunas de las modificaciones estructurales se realizaron con el propósito de mejorar la limitada solubilidad acuosa de los compuestos pertenecientes a las series I (Vega *et al*., 2012) y II.

• Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

Como en series anteriores, generalmente se obtuvo una mejor actividad para las 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas que para los 3-alcoxi-5-nitroindazoles (Tabla 15). Especial mención merecen las 5-nitroindazolinonas con grupos insaturados en posición N-1, tales como vinilo (**VATR89**) o alilo (**VATR92**), así como con cadenas alquílicas ω-sustituidas: 2-bromoetilo (**VATR87**), 3-bromopropilo (**VATR98**), 3-(dimetilcarbamoil)propilo (**VATR85**), 2-hidroxietilo (**VATR75**) y 3-hidroxipropilo (**VATR127**), con valores de CI_{50} < 5 μM.

Por el contrario, los compuestos con estructura de bisindazol (**VATR90** y **VATR91**) y las quinazolinonas **VATR71**–**74** no presentaron actividad relevante. Con respecto a las segundas, previamente se ha demostrado la baja actividad de las quinazolinas frente a epimastigotes de la cepa Dm28c (DTU TcI) (Mura *et al*., 2013).

La destacable actividad de **VATR75**, **VATR85**, **VATR87**, **VATR89**, **VATR92**, **VATR127** y **VATR131** se acompañó de una baja citotoxicidad que resultó en una selectividad hacia epimastigotes (IS > 45,91) muy superior a la del BZ. Junto a éstos, **VATR78**, **VATR82**, **VATR84**, **VATR93**, **VATR136**, **VATR138** y **VATR141** también superaron el *cut-off* de selectividad marcado por el BZ, siendo todos ellos seleccionados para el posterior ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares.

• Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares

Los resultados obtenidos en amastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ*, muestran una significativa mejora en la actividad y potencia (P < 0,05) de las 2-bencil-1-(ω-hidroxialquil)indazolinonas **VATR75** y **VATR127** y del acetoxi derivado **VATR131**, en comparación con el BZ (Tabla 16).

Considerando la inestabilidad metabólica de los ésteres, **VATR131** (2-acetoxietil derivado) podría estar comportándose como profármaco de **VATR75** (2-hidroxietil derivado). En las últimas décadas se ha recurrido al diseño de profármacos en la búsqueda de nuevos tratamientos para las enfermedades tropicales desatendidas, incluida la enfermedad de Chagas (Chin Chung *et al*., 2008). La presencia de carboxilesterasas en *T. cruzi* (Repetto *et al*., 1983) se ha propuesto como responsable de la bioactivación de este tipo de profármacos (Wong-Baeza *et al*., 2015).

Debido a que es la forma replicativa de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado, la gran susceptibilidad que los amastigotes muestran a la acción de estos compuestos resulta especialmente relevante en la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas.

• Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

Como se ha comentado anteriormente, una vez identificado un compuesto con potencial aplicación para el desarrollo de antichagásicos, resulta imprescindible estudiar su actividad en otras cepas de *T. cruzi* pertenecientes a aquellos DTU directamente involucrados en el desarrollo de la infección en humanos. Las distintas presentaciones clínicas de la enfermedad aparecen como consecuencia de la infección por las diferentes cepas de *T. cruzi,* las cuales se encuentran agrupadas en seis DTU mostrando diferente distribución geográfica, ecotopo y hospedador vertebrado (Zingales *et al*., 2014).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cepa CL-B5, se exploró la actividad de **VATR75** sobre las cepas Tulahuen (amastigotes) e Y (amastigotes y TS). Como se ha comentado anteriormente, los ensayos sobre la primera, permiten confirmar su actividad en cepas sensibles a los fármacos de referencia (CL Brener y Tulahuen, DTU TcVI), mientras que la Y (DTU TcII) está definida como una "cepa de resistencia moderada a los mismos" (Soeiro *et al*., 2013). Previamente, se determinó su toxicidad en las células empleadas como hospedadoras en estos ensayos, CC y L929.

Citotoxicidad en cultivos primarios de células cardíacas y en células L929

El derivado **VATR75** no presentó toxicidad sobre las células hospedadoras de *T. cruzi*, haciendo factible el posterior ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares (Tabla 17). Asimismo, se confirmó la ausencia de cardiotoxicidad para este derivado, característica importante en el desarrollo de agentes antichagásicos (Fonseca-Berzal *et al*., 2015a).

Actividad *in vitro* frente a las cepas Tulahuen *lacZ* e Y

Al igual que con **VATR1** y **VATR3**, se confirmó la actividad de **VATR75** sobre amastigotes de las cepas Tulahuen (DTU TcVI) e Y (DTU TcII). Este derivado obtuvo valores de CI_{50} < 10 μM

en las tres cepas ensayadas, resultando también 10 veces más activo que tóxico para la correspondiente célula hospedadora (Tabla 18). De esta manera **VATR75** cumple dos de los requisitos propuestos por Don e Ioset (2014) para que un compuesto sea identificado como potencial *hit* en la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas.

Asimismo, **VATR75** mostró un perfil muy similar al de **VATR1** y **VATR3**, no presentando actividad *in vitro* sobre TS (Tabla 18). Como se ha comentado anteriormente, varios compuestos con estructura de 5-nitroindazol 1,3-disustituido resultan activos sobre TS (Boiani *et al*., 2009; Rodríguez *et al*., 2009b) o muestran actividades en el mismo rango de concentración para las tres formas de *T. cruzi* (Muro *et al*., 2014). Por el contrario, las 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas que en el presente trabajo fueron evaluadas sobre las tres formas del parásito presentaron el mismo perfil, siendo siempre más activas sobre las formas replicativas de *T. cruzi* que sobre las no replicativas.

- **Toxicidad aguda *in vivo***

Una de las principales limitaciones que encontramos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, reside en la gran variedad de reacciones adversas que provocan los dos fármacos actualmente disponibles (Castro *et al*., 2006). De esta manera, resulta indispensable descartar la toxicidad aguda de los potenciales candidatos antes de evaluar su eficacia en modelos *in vivo* (Batista *et al*., 2010; da Silva *et al*., 2012).

Con el fin de reducir la variabilidad y minimizar el número de animales utilizados, los ensayos de toxicidad aguda se realizaron en ratones de un único género. Generalmente, machos y hembras responden de manera similar a los test de toxicidad aguda. No obstante, en aquellos casos en los que se han observado diferencias, las hembras presentan mayor sensibilidad (Lipnick *et al*., 1995), habiéndose seleccionado éstas para los ensayos de toxicidad aguda efectuados en este trabajo.

Es importante recordar que **VATR75** presentó problemas de solubilidad a dosis mayores de 12,5 mg/kg, interrumpiéndose el ensayo tras administrar la segunda dosis. De esta manera, la dosis acumulativa (DA) alcanzada en ratón fue de 25 mg/kg, resultando imposible determinar el NOAEL para **VATR75**, que en cualquier caso fue superior a la DA.

Los animales tratados con 25 mg/kg de **VATR75** no mostraron signos evidentes de toxicidad aguda durante las 48 h posteriores a su administración (Tabla 19). Tampoco se produjeron alteraciones en el peso de los animales y en sus órganos internos (Fig. 53 y 54), ni las hubo en los parámetros evaluados en el hemograma y análisis bioquímico (Tablas 20 y 21). Todos estos resultados apoyan que **VATR75** es bien tolerado a dicha posología y por tanto, se seleccionó la dosis de 25 mg/kg/día como la mayor a evaluar en el ensayo de eficacia *in vivo*.

- **Eficacia *in vivo***

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en un modelo de Chagas agudo en el que se emplearon ratones Swiss infectados con *T. cruzi* cepa Y (Romanha *et al*., 2010). A pesar de que machos y hembras Swiss presentan periodos de prepatencia similares y picos de parasitemia en el 8º d.p.i., los machos se muestran más vulnerables a la infección con esta cepa de *T. cruzi*, siendo sus parasitemias generalmente mayores y presentando menor supervivencia durante la fase aguda de la infección (Guedes-da-Silva *et al*., 2015).

El tratamiento con **VATR75** se realizó en el 5º y el 8º d.p.i., evaluándose tres concentraciones distintas (25, 12,5 y 6,25 mg/kg/día) administradas por vía oral (p.o.) e intraperitoneal (i.p.). Los mejores resultados se obtuvieron con la mayor dosis de compuesto administrada p.o. y la menor i.p. (25 y 6,25 mg/kg/día, respectivamente), alcanzando ca. 30% de reducción en la parasitemia el 8º d.p.i. (Fig. 55 y 58). Previamente se han obtenido resultados similares con otros prototipos aplicando el mismo esquema de tratamiento. Concretamente, la diamidina DB1362 presenta su mayor actividad con la menor dosis administrada vía i.p., reduciendo la parasitemia un 40% el 8º d.p.i. (da Silva *et al*., 2008). En un comportamiento similar al del BZ, la baja solubilidad acuosa de **VATR75** podría estar afectando a la biodisponibilidad oral del compuesto (Palmeiro-Roldán *et al*., 2014), requiriéndose en su administración oral dosis mayores en comparación con la vía i.p.

No obstante, debido a que los ensayos *in vitro* posicionaron a **VATR75** como un excelente agente tripanocida de acuerdo con su actividad en amastigotes intracelulares y no por los resultados frente a TS, cabría replantearse nuevos ensayos *in vivo* administrando esquemas de tratamiento más largos o sobre un estado más avanzado de la infección.

Por otra parte, considerando que **VATR131** podría actuar como un profármaco del anterior, cabría esperar un mejor perfil de actividad para esta molécula en el modelo *in vivo* debido a una mejora de su perfil ADME. El derivado **VATR131** está formado por la unión de dos restos polares (R-OH y R-COOH) cuya eliminación por el hospedador es previsiblemente más favorable que la que presentan el NX y el BZ, ambos fármacos extremadamente apolares (Wong-Baeza *et al*., 2015). Asimismo, se debe tener en cuenta la aplicación de recursos tecnológicos destinados a incrementar la solubilidad de **VATR75** y en consecuencia, a potenciar su biodisponibilidad y actividad *in vivo* (Palmeiro-Roldán *et al*., 2014).

4.1.4. ACTIVIDAD FRENTE A *T. cruzi* DE LA SERIE IV DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL

Con el propósito de mejorar la solubilidad de las tres series anteriores, se sintetizó la serie IV de derivados de 5-nitroindazol, caracterizada por presentar grupos amino (NH_2, NHR o

NR_2) en la posición terminal de las cadenas alquílicas introducidas en N-1 (2-bencil-5-nitroindazolinonas) así como en la posición 3-O del indazol (3-alcoxi-2-bencil-5-nitroindazoles). En esta serie también encontramos algunos derivados con estructura de 3-(ω-hidroxialquilamino)-5-nitroindazol, procedentes de la trasposición intramolecular de 3-(ω-aminoalcoxi)-5-nitroindazoles.

Previamente a la realización de este estudio, han sido sintetizadas varias series derivadas de 5-nitroindazol conteniendo aminas primarias, secundarias o terciarias en sus estructuras, con interesante actividad anti-*T. cruzi* (Arán *et al*., 2005; Boiani *et al*., 2009; Rodríguez *et al*., 2009b; Muro *et al*., 2014).

- **Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica**

En concordancia con las series anteriores, los resultados obtenidos en el cribado farmacológico primario (Tabla 22) confirman la mayor actividad que generalmente presentan los derivados con estructura de 5-nitroindazolinona.

Comparando los resultados obtenidos por los distintos análogos con aminas primarias (**VATR99**), secundarias (**VATR100**) o terciarias (**VATR101**), se aprecia una ligera caída de la actividad frente a epimastigotes como consecuencia de la introducción de sustituyentes metilo en el grupo NH_2. Tales inserciones no supusieron grandes alteraciones en su perfil de actividad tripanocida (Muro *et al*., 2014). Sin embargo, tuvieron un mayor impacto sobre la citotoxicidad inespecífica de estas moléculas, repercutiendo ambos aspectos de manera conjunta sobre su selectividad: IS **VATR99** (NH_2) > IS **VATR100** ($NHCH_3$) > IS **VATR101** [$N(CH_3)_2$]. Un comportamiento similar se observó entre **VATR120** y **VATR79**, con grupos NH_2 y $N(CH_3)_2$, respectivamente; donde el impacto que el grado de sustitución de las aminas ejerció sobre la actividad y selectividad fue más evidente: **VATR120** CI_{50} = 0,35 µM e IS = 677,74, **VATR79** CI_{50} =10,63 µM e IS > 24,08.

La presencia del grupo piperidino (**VATR81** y **VATR102**) influyó de manera positiva en la actividad de estos derivados frente a epimastigotes, sin repercutir sobre su citotoxicidad (Arán *et al*., 2005). Sin embargo, a pesar de que ambos compuestos mejoraron de manera significativa la actividad del BZ (P < 0,05), sus valores de CI_{50} fueron muy inferiores a los obtenidos por sus respectivos análogos **VATR120** y **VATR99** (Tabla 22).

En esta línea, estudios previos con derivados de 5-nitroindazol sugieren una favorable inhibición de la tripanotión reductasa (TryR) por estas moléculas, en la que además del heterociclo central, la presencia de grupos bencilo y de cadenas alquílicas laterales con grupos NH_2 protonables, jugaría un papel importante en su afinidad hacia la TryR (Aguilera-Venegas *et al*., 2013).

• Actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares

Los resultados frente a amastigotes intracelulares se correlacionaron con los obtenidos en epimastigotes (Tablas 22 y 23). Los derivados **VATR99** y **VATR120** fueron los más activos frente al parásito intracelular, presentando ambos aminas primarias al final de la cadena alquílica introducida en N-1. Similar a lo ocurrido en epimastigotes, el aumento en el grado de sustitución de las aminas supuso una caída en la actividad y selectividad de las moléculas: IS **VATR99** (NH_2) > IS **VATR100** ($NHCH_3$) > IS **VATR101** [$N(CH_3)_2$], así como IS **VATR120** (NH_2) > IS **VATR79** [$N(CH_3)_2$]. La presencia del sustituyente piperidino en **VATR81** y **VATR102** también provocó una considerable pérdida de actividad en comparación con la de sus respectivos análogos **VATR120** y **VATR99** (Tabla 23).

Como se ha comentado previamente, son pocos los estudios en la literatura relativos a la actividad de derivados de 5-nitroindazol frente a la forma intracelular del parásito (Muro *et al*., 2014; Fonseca-Berzal *et al*., 2014b, 2015a, 2016), hecho que dificulta la discusión de los resultados obtenidos a este nivel de cribado.

• Ensayos complementarios de actividad farmacológica *in vitro*

En la misma línea de trabajo que para las series de 5-nitroindazoles anteriores, varios compuestos de la serie IV fueron seleccionados para un posterior estudio de su actividad sobre otras cepas de *T. cruzi*. En base a los resultados obtenidos con la cepa CL-B5 *lacZ*, **VATR81**, **VATR99**, **VATR100** y **VATR102**, todos ellos con estructura de 5-nitroindazolinona, fueron sometidos a diversas pruebas de actividad *in vitro* frente a las cepas Tulahuen e Y.

Citotoxicidad en cultivos primarios de células cardíacas y en células L929

Estas cuatro nitroindazolinonas mostraron un perfil de toxicidad similar al de los derivados de 5-nitroindazol anteriormente evaluados sobre cultivos de CC y de fibroblastos L929 (Tabla 24). La utilización de estas células como hospedadoras de *T. cruzi* para los ensayos de actividad frente a amastigotes intracelulares (Fonseca-Berzal *et al*., 2015a, 2016), se vio favorecida por la ausencia de citotoxicidad que presentaron estas moléculas.

Actividad *in vitro* frente a las cepas Tulahuen *lacZ* e Y

Los derivados **VATR99** y **VATR100** mantuvieron un perfil similar al mostrado anteriormente por las 5-nitroindazolinonas en los ensayos de actividad frente a las cepas Tulahuen e Y (Tabla 25). En su evaluación frente a amastigotes intracelulares de los DTU TcII y TcVI, ambos superaron con éxito los requisitos de actividad y selectividad propuestos para la identificación de un compuesto como potencial *hit* en el desarrollo de antichagásicos (Don e

Ioset, 2014). Por el contrario, **VATR81** y **VATR102** presentaron valores de CI_{50} > 10 μM sobre una (**VATR81**) o ambas cepas (**VATR102**), guardando estos resultados correlación con los obtenidos previamente frente a amastigotes de la cepa CL (Tabla 23).

Ninguno resultó activo en las pruebas *in vitro* realizadas frente a TS (Tabla 25), al contrario que otros derivados de 5-nitroindazol 1,3-disustituidos con grupos amino en la posición terminal de las cadenas alquílicas introducidas en N-1 (Boiani *et al*., 2009; Rodríguez *et al*., 2009b, Muro *et al*., 2014). Este hecho contrasta con los resultados previos de varios derivados con grupos piperidino, los cuales muestran importantes porcentajes de lisis sobre TS de la cepa CL Brener (Boiani *et al*., 2009). En la misma línea que los compuestos **VATR1**, **VATR3** y **VATR75**, el distinto comportamiento que muestran **VATR81** y **VATR102** en relación con otros derivados de 5-nitroindazol podría deberse a la diferente estructura de los compuestos (5-nitroindazoles 1,3-disustituidos *versus* 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas), la distinta susceptibilidad de las cepas de *T. cruzi* empleadas o las diferentes condiciones de los respectivos ensayos *in vitro*.

- **Toxicidad aguda *in vivo***

De acuerdo con los resultados de actividad *in vitro*, **VATR99** y **VATR100** se seleccionaron para ser evaluados *in vivo*, previa valoración de su toxicidad aguda. A diferencia de **VATR75**, estos derivados no presentaron problemas de solubilidad en el vehículo utilizado (10% DMSO en agua) y fueron administrados por ambas vías hasta alcanzar una DA = 200 mg/kg (Tablas 26 y 27). La presencia de grupos amino en **VATR99** y **VATR100**, los cuales a pH fisiológico se encuentran protonados en buena proporción, favorece el carácter hidrófilo de estos compuestos y por tanto su solubilidad en medio acuoso.

Ninguno de los animales presentó alteraciones en su comportamiento tras la administración de **VATR99** y **VATR100**, ya fuera p.o. o i.p., ni se observaron signos de toxicidad aguda durante las 48 h posteriores al tratamiento. Sin embargo, la administración intraperitoneal de **VATR99** condujo a una ligera pérdida de peso en los animales, similar a la que experimentaron aquellos a los que se administró el vehículo (Fig. 62), no siendo ésta significativa en cualquier caso. Este hecho, junto con la ausencia de anomalías en los órganos internos (Fig. 63) así como de parámetros alterados en el análisis bioquímico y en el hemograma (Tablas 28 y 29), apoyan que **VATR99** es bien tolerado en su administración por ambas vías hasta 200 mg/kg, encontrándose el NOAEL para este derivado por encima de mencionada dosis. De manera similar, el ensayo de toxicidad aguda realizado para **VATR100** no desveló alteraciones en el peso de los animales, morfología de los órganos internos, hemograma y bioquímica (Fig. 64 y 65, Tablas 30 y 31), fijándose igualmente su NOAEL > 200 mg/kg.

- **Eficacia *in vivo***

En un primer ensayo, se evaluó la actividad de ambos derivados siguiendo el modelo de Chagas agudo habitual (Romanha *et al*., 2010), administrando dos dosis de 50, 25 o 12,5 mg/kg/día, p.o. o i.p. en el 5º y el 8º d.p.i. (Batista *et al*., 2010; da Silva *et al*., 2014). Posteriormente, de acuerdo con los resultados de este primer estudio, se llevó a cabo un segundo ensayo en el que los compuestos se administraron a las dosis y vías seleccionadas, durante un periodo de 10 días consecutivos (5–14º d.p.i.) en regímenes de 1 o 2 dosis diarias (cada 24 o cada 12 h, respectivamente) (Batista *et al*., 2010).

El tratamiento con **VATR99** obtuvo su mejor resultado con la administración de la menor dosis vía i.p., alcanzando una reducción de la parasitemia ca. 71% en el 8º d.p.i. (Fig. 66 y 68). Sin embargo, la supervivencia de los animales tratados con este derivado fue baja, no consiguiéndose curas parasitológicas a la posología administrada (Fig. 67 y 69).

La administración del mismo en dosis de 12,5 mg/kg/día vía i.p. durante 10 días consecutivos no supuso mejoras en la reducción de la parasitemia, siendo además el porcentaje de supervivencia para ambos grupos (1 ó 2 dosis diarias) del 16,67% con respecto al grupo de animales infectados sin tratar (Fig. 80 y 81).

Con respecto al tratamiento realizado con **VATR100**, la administración de dos dosis de 50 mg/kg/día p.o. supuso ca. 50% de reducción de la parasitemia en el 8º d.p.i. (Fig. 73). No obstante, todos los animales murieron antes de concluir la fase aguda (Fig. 74).

El tratamiento durante 10 días consecutivos administrando dosis de 50 mg/kg/día p.o. no tuvo ninguna repercusión sobre la parasitemia, alcanzándose en el 8º d.p.i. una reducción máxima del 25,71% en su administración cada 12 h (Fig. 83). Únicamente cabe destacar que dicha posología aumentó la supervivencia de los animales en un 66,67% (Fig. 84). Sin embargo, ésta vino acompañada de una importante pérdida de peso en comparación con el grupo control y el tratado con BZ (Fig. 85). Este hecho, junto con los niveles de parasitemia registrados a lo largo de la fase aguda, confirma la ausencia de cura parasitológica en los animales tratados con **VATR100.**

Finalmente, la necropsia realizada el 45º d.p.i. a los animales del grupo tratado durante 10 días con **VATR100** en dos dosis diarias de 50 mg/kg/día p.o. que superaron la fase aguda (Fig. 89), reveló diferencias significativas en el peso relativo del bazo con respecto al de los animales sanos ($P < 0,05$). Este hecho podría ser consecuencia de un mantenimiento de la infección en estos animales, ya que la fase aguda de la enfermedad en humanos cursa frecuentemente con esplenomegalia (Rassi *et al*., 2010), apareciendo igualmente en la infección experimental en ratón (de Meis *et al*., 2009). No obstante, a pesar de que el tratamiento con BZ eliminó la parasitemia, el bazo de estos animales experimentó un aumento de tamaño similar ($P > 0,05$). Diversos estudios *in vivo* señalan la persistencia

de la esplenomegalia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Y tras someterse a diferentes esquemas de tratamiento con BZ (Olivieri *et al*., 2002, 2010).

Como se ha comentado anteriormente en el caso de **VATR75**, debido a que la eficacia de estos 5-nitroindazoles reside en su perfil de actividad sobre amastigotes intracelulares, cabría replantearse nuevos esquemas de tratamiento con **VATR99** y **VATR100** con el fin de potenciar su actividad *in vivo*.

- **Citometría de flujo**

Finalmente, se analizó el PMM de TS tratados con los compuestos **VATR81**, **VATR99** y **VATR100** mediante citometría de flujo con el marcador TMRE (Tabla 32 y Fig. 90). El tratamiento con **VATR81** no repercutió sobre la mitocondria de *T. cruzi*, siendo el porcentaje de la población afectada similar al del control. Por el contrario, **VATR99** y **VATR100** provocaron una pérdida de PMM en prácticamente el total de la población de TS, apuntando a la interferencia de estos compuestos con el gradiente de potencial electroquímico de la membrana mitocondrial de *T. cruzi* (da Silva *et al*., 2008).

4.1.5. ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE DOS SERIES DE 2,4-DIARIL-1,2,3,4-TETRAHIDROQUINOLINAS DE SÍNTESIS

Se evaluó la actividad frente a *T. cruzi* de una serie química constituida por 22 derivados de tetrahidroquinolina, dividida a su vez en las series **AR** y **DM**, cuya síntesis había sido previamente publicada (Kouznetsov *et al*., 2007; Romero Bohórquez y Kouznetsov, 2010) y su actividad ensayada frente a *Plasmodium falciparum* (datos no publicados).

- **Actividad de la serie AR**

Previamente a la realización de este estudio, varias familias de tetrahidroquinolinas de síntesis evaluadas frente a *T. cruzi*, presentaron gran actividad en epimastigotes (Gómez-Barrio *et al*., 2006; Romero Bohórquez *et al*., 2012) así como en amastigotes (Pagliero *et al*., 2010). De hecho, la presencia de sustituyentes alquílicos en la posición C-6 del anillo de quinolina parece ejercer una importante influencia sobre la actividad tripanocida de varias de estas moléculas (Gómez-Barrio *et al*., 2006). En nuestros ensayos se obtuvieron resultados similares, donde diversas tetrahidroquinolinas pertenecientes a la serie **AR** (Fig. 24) con sustituyentes alquilo o metoxilo en posición C-6 (**AR40** con etilo, **AR41** y **AR91** con grupos metoxilo) mostraron una importante selectividad hacia epimastigotes y amastigotes (Tablas 33 y 35). Sin embargo, aquellos derivados que presentan un átomo de cloro en dicha posición (**AR43** y **AR92**) resultaron tóxicos en células L929, a pesar de que este tipo de

inserciones normalmente no inducen un incremento en la toxicidad potencial de los compuestos (Hernandes *et al*., 2010). Por otra parte, la introducción bien del grupo NO_2 (**AR42**, **AR44**, **AR45** y **AR45F2**) implicado en el mecanismo de acción de los fármacos antichagásicos de referencia (Wilkinson y Kelly, 2009), bien del grupo NH_2 (**AR46** y **AR47**), supuso un aumento en la citotoxicidad de las tetrahidroquinolinas (Tocher, 1997; Ma *et al*., 2005) en detrimento de su selectividad hacia el parásito (Tablas 33 y 35).

Debido a que las reacciones adversas, frecuentemente observadas en los enfermos de Chagas tratados con BZ y NX (Castro *et al*., 2006), en ocasiones provocan el abandono de estas terapias por parte de los pacientes, el estudio de la toxicidad resulta un punto importante en el cribado farmacológico de los candidatos antichagásicos. En este estudio, los resultados de citotoxicidad *in vitro* (Tabla 33) se correlacionaron con los relativos a su riesgo potencial, obtenidos *in silico* mediante el software OSIRIS (http://www.organic-chemistry.org/prog/peo) (Fonseca-Berzal *et al*., 2013). De esta manera, se observó como la presencia de grupos NO_2 y NH_2 en el anillo de tetrahidroquinolina incrementa la toxicidad de estas moléculas, de modo que la introducción del grupo NO_2 en la posición C-5 (**AR44**, CL_{50} = 28,44) o C-8 (**AR45**, CL_{50} = 27,60) produce además potenciales efectos mutagénicos (Fig. 122). Sin embargo, los resultados obtenidos *in silico* con el BZ revelaron un mayor riesgo potencial para el fármaco de referencia, únicamente superado por la tetrahidroquinolina **AR46** (Fig. 122), la más citotóxica de la serie **AR** (CL_{50} = 9,56).

Asimismo, se espera una excelente biodisponibilidad oral para todas las tetrahidroquinolinas de acuerdo con la predicción virtual realizada mediante el software Molinspiration (http://www.molinspiration.com/services/), basada en las reglas de Lipinski y la superficie topológica polar (TPSA) de estas moléculas (Fonseca-Berzal *et al*., 2013).

• Actividad de la serie DM

Con respecto a la serie **DM** (Fig. 25), **DM15** presentó una interesante actividad anti-*T. cruzi*, siendo además el único compuesto de la misma no citotóxico (Tablas 34 y 35). Resultados similares fueron previamente obtenidos por Pagliero *et al*. (2010), donde el compuesto más activo de una serie de tetrahidroquinolinas fue el derivado con un grupo NO_2 en la posición *para* de un radical fenilo. En dicho trabajo, se sugiere que la introducción de grupos electroatractores produce un efecto positivo sobre la actividad de estos compuestos, similar a lo que sucede con **DM15** al introducir el grupo CN. Sin embargo, la presencia del grupo NO_2 (atractor de electrones de carácter fuerte) en el anillo de tetrahidroquinolina (**DM1**, **DM7**, **DM12** y **DM13**) podría causar un daño celular excesivo, responsable no sólo de la actividad sobre *T. cruzi*, sino también de la citotoxicidad de estas moléculas (Raether y Hänel, 2003). Por otra parte, los resultados obtenidos con OSIRIS (Fig. 122) muestran una vez más el potencial efecto mutagénico de las moléculas con grupos NO_2 y NH_2 en la

posición C-8 del anillo de tetrahidroquinolina: **DM1**, **DM7**, **DM8**, **DM12** y **DM13** (Fonseca-Berzal *et al*., 2013). Asimismo, la introducción de hidroxilos fenólicos tuvo un impacto negativo sobre la inocuidad de las moléculas de la serie **DM** (Tabla 34), resultando por lo general muy tóxicas para fibroblastos (Chang *et al*., 2000).

	Potential risk[a,b]					
Series	Mut.	Tum.	Irr.	Rep. Eff.	Drug-likeness	Drug-score
AR39					3.29	0.58
AR40					2.83	0.47
AR41					3.04	0.46
AR42					−3.67	0.28
AR43					3.30	0.46
AR44					−3.91	0.22
AR45					−4.46	0.22
AR45F2					−3.29	0.28
AR46					1.59	0.17
AR47					3.19	0.50
AR89					4.78	0.57
AR91					4.54	0.57
AR92					4.79	0.45
DM1					−3.78	0.24
DM5					3.41	0.63
DM6					−0.98	0.36
DM7					−4.06	0.25
DM8					3.30	0.53
DM9					−1.26	0.37
DM12					−6.87	0.21
DM13					−9.44	0.21
DM15					−11.60	0.25
Benznidazole					−3.32	0.18

[a] , drug-conform; , middle risk; , undesired effects.
[b] Calculated on http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/ accessed in January 2013.

Fig. 122. Perfil de riesgo potencial inducido por las tetrahidroquinolinas de las series **AR** y **DM**. Mut.: mutagénico, Tum.: tumorigénico, Irr.: irritante, Rep. Eff.: efectos sobre la reproducción. Predicción realizada mediante el software OSIRIS. Fuente: Fonseca-Berzal *et al*. (2013).

4.1.6. ACTIVIDAD *in vitro* FRENTE A *T. cruzi* DE DOS SERIES DE SÍNTESIS DERIVADAS DE 7-CLORO-4-AMINO(OXI)QUINOLINA

Basándonos en la actividad mostrada por ciertos derivados de tiazolidina (Joyeau *et al*., 2000; Magdaleno *et al*., 2009) y diversas aminoquinolinas (Kinnamon *et al*., 1997; Yardley *et al*., 2010) frente a *T. cruzi*, se evaluó una primera serie de síntesis formada por 16 derivados de 7-cloroquinolina con fragmentos de tipo bencilamino (compuestos **1**–**4**) o de tipo *N*-aminoalquil–1,3-tiazolidin-4-ona (compuestos **5**–**16**) en la posición C-4 del anillo (**Grupo 1**), previamente sintetizados y ensayados como potenciales antimaláricos (Rojas Ruiz *et al*., 2011). Concretamente, ciertas propiedades biológicas asociadas a las 1,3-tiazolidin-4-onas sustituidas han dado lugar a la introducción de esta estructura en agentes antimicrobianos (Jain *et al*., 2012) así como en prototipos de antichagásicos con prometedora actividad *in vitro* (Kouznetsov *et al*., 2004; Pizzo *et al*., 2011).

De manera similar, una segunda serie de derivados de 4-ariloxi-7-cloroquinolina (Bueno *et al*., 2012) (compuestos **17**–**22**, **Grupo 2**) anteriormente evaluados frente a *P. falciparum* (datos no publicados), fue ensayada *in vitro* como potenciales agentes tripanocidas.

- **Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica**

De los 22 derivados de 7-cloroquinolina que forman parte de esta serie, los más activos frente a epimastigotes fueron los compuestos **3**, **7** y **12** (Tabla 36). Dichos resultados, junto con los valores de LogP predichos para estas moléculas (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a), confirman la importancia de una adecuada lipofilia para acceder al interior del parásito (Aguirre *et al*., 2004; Fonseca-Berzal *et al*., 2013) y en consecuencia, interactuar con la correspondiente enzima o receptor (Paula *et al*., 2009). Así, la presencia de radicales de tipo 4-hidroxi-3-metoxifenilo (compuestos **13**–**15**) o 3-hidroxi-4-metoxifenilo (compuesto **16**) sobre el anillo de tiazolidinona, conllevó una disminución de su lipofilia situándola por debajo de la estimada como promedio para estas moléculas (LogP = 4,095) (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a) y repercutiendo en su actividad sobre la forma extracelular de *T. cruzi* (CI_{50} = 32–235,89 μM) en comparación con sus análogos sin sustituir (compuestos **11** y **12**, CI_{50} < 7,02 μM). No obstante, la introducción de grupos hidroxilo en la posición *para* del radical fenilo (compuestos **13**–**15**) no sólo originó los compuestos más inactivos (da Silva *et al*., 2013) del **Grupo 1**, sino también los menos tóxicos para fibroblastos. Tal efecto no se percibió cuando el hidroxilo fenólico se introdujo en *meta* (compuesto **16**).

Simultáneamente, se exploró la citotoxicidad *in vitro* de estas moléculas sobre células L929 (Tabla 36). Es importante destacar que algunos derivados anteriormente definidos como tóxicos para macrófagos J774 (compuestos **3**, **7** y **8**) y no para células HepG2 (Rojas Ruiz *et al*., 2011), no lo fueron tampoco para fibroblastos L929. Tales diferencias podrían ser el resultado de una mayor captación de compuesto por parte de los macrófagos (línea celular fagocítica), en comparación con la experimentada por hepatocitos y fibroblastos, ambas líneas celulares no fagocíticas (Rolón *et al*., 2006b). Por otra parte, varios estudios revisados por Edinger y Thompsom (2004) defienden la idea de que los procesos de autofagia observados en células de mamífero y habitualmente involucrados en su supervivencia, pueden actuar además como un mecanismo de muerte celular (PCD tipo II). De hecho, la toxicidad de la cloroquina sobre macrófagos murinos y fibroblastos L como consecuencia de la inducción de procesos de autofagia se ha estudiado previamente, obteniéndose un efecto tóxico más uniforme en macrófagos (Fedorko *et al*., 1968a, b). Este hecho también explicaría las diferencias registradas en la toxicidad de nuestros derivados de cloroquina sobre fibroblastos L929, clon de la línea parental L (Sanford *et al*., 1948).

Varios agentes antimaláricos, como la quinacrina, presentan notable actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* como inhibidores de la TryR e interactúan con el sitio activo de la enzima a través de un átomo de nitrógeno situado en un anillo, un átomo de cloro, un grupo metoxilo y un sistema aromático plano (Bonse *et al.*, 1999). Según nuestros resultados, las 4-ariloxiquinolinas derivadas de núcleos de (iso)vainillina (compuestos **19** y **20**) presentaron mayor actividad en epimastigotes que los derivados sin grupos metoxilo (compuestos **17** y **18**) (Tabla 37). Este hecho, junto con la relación estructura-actividad anteriormente comentada, sugiere que la enzima TryR pudiera ser una potencial diana para estos derivados. Asimismo, los compuestos más activos de este segundo grupo corresponden a las 4-ariloxiquinolinas **21** y **22**, las cuales incorporan fragmentos de tipo (iso)eugenol con una cadena lateral alquenilo de tres carbonos, similar a otras quinolinas ensayadas en *T. cruzi* (Fakhfakh *et al.*, 2003). Por el contrario, la baja selectividad de los derivados **18**–**21** permite especular sobre la ausencia de mecanismos de acción específicos sobre *T. cruzi*, asumiendo que la presencia de grupos metoxilo sobre el radical fenilo de estas moléculas (compuestos **19**–**21**) potencia su citotoxicidad (Tabla 37). Varios compuestos heterocíclicos con afinidad por la TryR de *T. cruzi* como es el caso de algunas fenotiazinas, también inducen efectos de tipo anti-calmodulina o provocan la disrupción mitocondrial en epimastigotes y tripomastigotes (Lacuara *et al.*, 1991; Rivarola y Paglini-Oliva, 2002), no sólo generando estos daños en el parásito, sino también interfiriendo *in vitro* sobre la viabilidad de los cultivos celulares (Dudani y Gupta, 1987; Abdel-Razaq *et al.*, 2011).

La estimación de riesgo potencial realizada *in silico* (Fonseca-Berzal *et al.*, 2014a) señaló la ausencia de toxicidad para los derivados **1**–**16**, prediciéndose un riesgo moderado para los derivados **21** y **22**, así como efectos negativos en el caso de **17**–**20**, NX y BZ. El análisis de predicción de su biodisponibilidad oral (Fonseca-Berzal *et al.*, 2014a) reveló excelentes valores para todas las quinolinas.

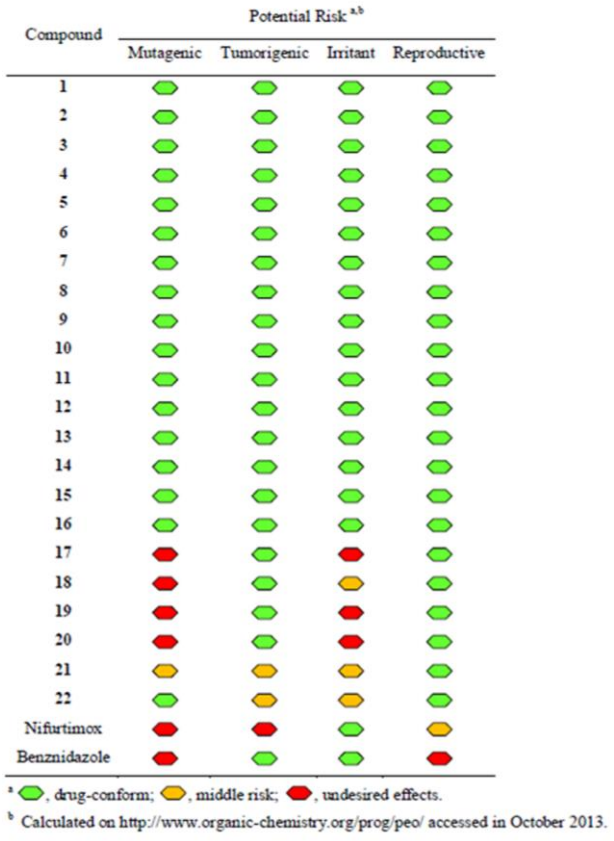


Fig. 123. Riesgo potencial inducido por los derivados de cloroquina **1**–**22**. Predicción realizada con el software OSIRIS. Fuente: Fonseca-Berzal *et al*. (2014a).

- **Actividad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares**

Con respecto a los ensayos de actividad sobre amastigotes intracelulares, nuestro grupo de investigación ha demostrado gran experiencia en el desarrollo de este tipo de pruebas utilizando como hospedadoras de *T. cruzi* tanto células fagocíticas (Muelas *et al*., 2001, 2002) como no fagocíticas (Saraiva *et al*., 2007; Fonseca-Berzal *et al*., 2013, 2014b).

Estudios previos han demostrado alteraciones en el ciclo intracelular de *T. cruzi* como consecuencia de los efectos producidos por la cloroquina, afectando tanto a nivel del parásito como de la célula hospedadora. Así, Hrabák *et al*. (1998) sugieren un bloqueo irreversible en la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos peritoneales de ratón, con el consiguiente aumento en la tasa de infección por *T. cruzi.* Por otra parte, Stecconi-Silva *et al*. (2003) observan una cinética diferente cuando cultivos de células Vero infectados con tripomastigotes son tratados con el fármaco antipalúdico. Considerando estos hallazgos, junto con la estructura de los compuestos seleccionados para su evaluación en amastigotes y la relativa citotoxicidad encontrada sobre macrófagos J774 (Rojas Ruiz *et al*., 2011), se seleccionó nuevamente la línea celular L929 como hospedadora de *T. cruzi* para los ensayos de actividad frente a amastigotes intracelulares.

Dicho ensayo se llevó a cabo para aquellos compuestos que tras el cribado primario superaron el *cut-off* establecido por el BZ. De esta manera, sólo los derivados **3**, **7** y **12** fueron evaluados frente a amastigotes, alcanzando el compuesto **3** la mejor CI_{50} (Tabla 38). Resultados similares fueron publicados por Blackie *et al*. (2008), quienes obtienen el compuesto más activo de una serie 4-aminoquinolinureas ferrocénicas al incorporar un grupo bencilo como sustituyente en una amina secundaria. Asimismo, se propuso la influencia de los grupos bencilamino sobre la actividad de los compuestos hacia la forma intracelular de *T. cruzi* (Fonseca-Berzal *et al*., 2014b), dado que este fragmento está presente en el fármaco de referencia BZ. Por otra parte, cuanto mayor fue el valor de LogP obtenido para estas moléculas (Fonseca-Berzal *et al*., 2014a), mayor actividad mostraron en amastigotes, demostrando una vez más el impacto positivo de la lipofilia sobre la actividad biológica. Sin embargo, tal y como demuestran sus valores de CI_{50} (Tablas 36 y 38) los compuestos **3**, **7** y **12** fueron más activos sobre epimastigotes que sobre amastigotes intracelulares, lo que sugiere que la célula hospedadora puede actuar como barrera para estas moléculas (Rolón *et al*., 2006b).

4.1.7. ACTIVIDAD TRIPANOCIDA *in vitro* DE UNA SERIE DE DERIVADOS DE 2,2-DIÓXIDO DE 4-AMINOIMIDAZO[4,5-*c*][1,2,6]TIADIAZINA

Diversos compuestos de síntesis derivados de tiadiazina han recibido especial atención en el desarrollo de antiprotozoarios. Concretamente, varias series con estructura de tetrahidro-2*H*-

1,3,5-tiadiazin-2-tiona (THTT) han mostrado actividad como potenciales tripanocidas (Bermello *et al*., 2011). Asimismo, varios compuestos derivados de 1,2,6-tiadiazina han sido evaluados frente al agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Atienza *et al*., 1992; Herrero *et al*., 1992; di Maio *et al*., 1999; Muelas *et al*., 2001). Recientemente se ha propuesto que ciertos derivados de 1,2,6-tiadiazina actúan bloqueando la glucólisis de *T. cruzi* mediante inhibición selectiva de la enzima triosafosfato isomerasa (Minini *et al*., 2015).

En este contexto, se evaluó la actividad frente a *T. cruzi* de una serie de derivados de 2,2-dióxido de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina.

• Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

De acuerdo con los resultados obtenidos, ninguno de los compuestos fue activo sobre epimastigotes, presentando además cierta toxicidad en fibroblastos L929 (Tablas 39–41).

Resultados similares fueron obtenidos por di Maio *et al*. (1999) a partir de una serie de derivados de 1,1-dióxido de 1,2,6-tiadiazin-3,5-diona, activos frente a epimastigotes de *T. cruzi* cepa Y a la mayor concentración evaluada; experimentado en su mayoría una sustancial pérdida de actividad a 10 μg/mL y concentraciones inferiores. No obstante, las moléculas más activas de dicha serie presentaron a 100 μg/mL una elevada toxicidad sobre macrófagos J774 (Muelas *et al*., 2001), manteniéndose en muchas de ellas este efecto sobre células Vero a 10 μg/mL (di Maio *et al*., 1999). La toxicidad de estos derivados generalmente estuvo ligada a la presencia de grupos NO_2 en sus sustituyentes: 5-nitro-2-tienilo, 5-nitro-2-furilo o *p*-nitrofenilo (di Maio *et al*., 1999; Muelas *et al*., 2001).

En nuestro estudio, los derivados de 1,2,6-tiadiazina mostraron una importante citotoxicidad a partir de distintas concentraciones: 256 μM (2 derivados), 128 μM (7 derivados, 4 de ellos con grupo NO_2 sobre un sustituyente de tipo bencilo en N-1) o 64 μM (4 derivados). Curiosamente, el único compuesto que no presentó toxicidad en células L929 fue **DIT6c**, derivado con un sustituyente *m*-nitrofenilo sobre el anillo de imidazol. Por todo esto, la presencia de grupos NO_2 en estas moléculas parece no tener una especial repercusión sobre su actividad o toxicidad, a diferencia de los 1,1-dióxidos de 1,2,6-tiadiazin-3,5-diona (Muelas *et al*., 2001). Por otro lado, la presencia de grupos NH_2 en los 2,2-dióxidos de 4-aminoimidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazina podría estar influyendo en la citotoxidad de esta serie (Ma *et al*., 2005).

Otras series con tiadiazina en sus estructuras, como es el caso de ciertos derivados de THTT, han mostrado interesante actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas Y (Ochoa *et al*., 1999; Coro *et al*., 2005) y CL-B5 *lacZ* (Muelas *et al*., 2002; Coro *et al*., 2005). Su comportamiento como profármacos, a partir de los cuales isotiocianatos generados mediante hidrólisis del anillo de tiadiazin-2-tiona interaccionarían con diversas

cisteín proteasas parasitarias, ha sido propuesto como posible mecanismo de acción de estas moléculas (Coro *et al*., 2005).

4.1.8. ACTIVIDAD TRIPANOCIDA *in vitro* DE UNA SERIE DE QUELANTES HETEROCÍCLICOS

La alteración de los procesos biológicos dependientes de iones es una estrategia en la lucha frente a las enfermedades infecciosas, entre ellas las ocasionadas por protozoos. Entre otras características, el patógeno ha de ser capaz de captar hierro para sobrevivir de manera exitosa en el hospedador. Este hecho, junto con la participación en su metabolismo de moléculas dependientes de metales, ha hecho de los agentes quelantes una alternativa a considerar en el campo de la quimioterapia experimental (Santos *et al*., 2012).

No obstante, es necesario considerar que ciertos iones metálicos son cruciales para el mantenimiento de las funciones biológicas del hospedador, siendo indispensable que el efecto quelante se dirija hacia el patógeno, buscando la selectividad de los compuestos.

En este contexto, el hierro resulta un elemento de importancia en la patogénesis de las enfermedades causadas por tripanosomátidos, así como en su control inmunitario (Santos *et al*., 2012). Como mecanismo de defensa frente a estas infecciones sistémicas, el hospedador experimenta una respuesta hipoferrémica que limita la biodisponibilidad del hierro en el torrente sanguíneo y su utilización por los parásitos extracelulares, controlando de esta manera su desarrollo y patogenia. Sin embargo, la intervención de los macrófagos en este mecanismo de regulación, supone un incremento de los niveles de hierro en el citoplasma de estas células que a su vez favorece la multiplicación del parásito a nivel intracelular, como ocurre en el caso de *T. cruzi* (Loo y Lalonde, 1984).

El hierro también interviene como cofactor de diversas enzimas involucradas en la protección del parásito frente al estrés oxidativo, convirtiéndose en una potencial diana para el desarrollo de fármacos. En *T. cruzi* encontramos cuatro enzimas superóxidodismutasa dependientes de hierro (Fe-SOD), exclusivas de bacterias y de ciertos protozoos, diferentes de las SOD dependientes de Cu-Zn o Mn de mamíferos (Taylor y Kelly, 2010). Además, en sustitución de las clásicas catalasas y glutatión peroxidasas Se-dependientes presentes en la célula hospedadora, los tripanosomátidos expresan diferentes peroxidasas. Concretamente, la peroxidasa dependiente de ascorbato de *T. cruzi* y *Leishmania* es una hemoproteína capaz de metabolizar H_2O_2, aunque no peróxidos orgánicos (Taylor y Kelly, 2010).

La mioglobina presente en las células cardíacas, la ferritina a nivel citoplasmático o la transferrina en el torrente sanguíneo, son fuentes de hierro para *T. cruzi* en el hospedador vertebrado. Igualmente lo es para las formas epimastigote la transferrina presente en la sangre ingerida por el vector (Taylor y Kelly, 2010).

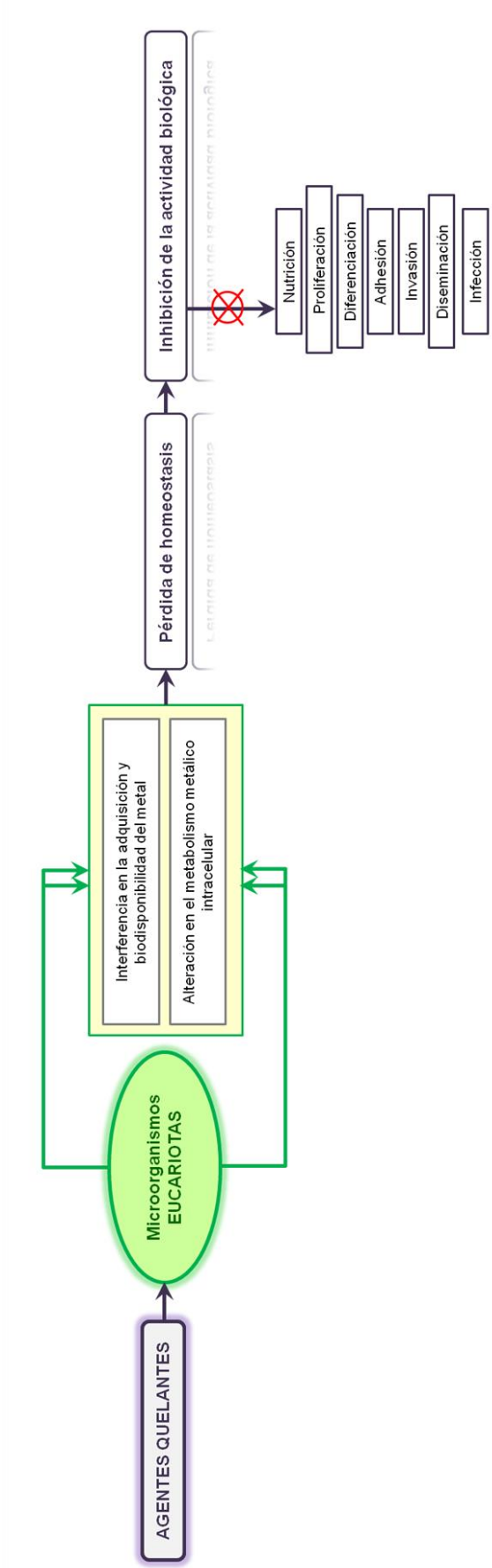


Fig. 124. Mecanismo general de acción de los agentes quelantes sobre la célula eucariota microbiana. Fuente: adaptación de la figura propuesta en Santos *et al*. (2012).

En la última década, diversos estudios hacen referencia a la eficacia del quelante de hierro desferrioxamina (DFO) como tratamiento de la infección aguda en ratón. Arantes *et al*. (2007) muestran que en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Y tratados durante 21 días consecutivos con DFO, se produce un aumento en la duración del periodo de patencia acompañado de una importante reducción en la parasitemia y en la mortalidad, indicando una atenuación de la virulencia de la cepa correlacionada con los niveles de hierro encontrados en hígado y suero. Posteriormente, Francisco *et al*. (2008) demuestran una mayor efectividad de los tratamientos con DFO y BZ cuando éstos se usan en terapia combinada. Un balance entre la estimulación de las defensas antioxidantes del hospedador y la acción directa sobre *T. cruzi* mediada por un aumento simultaneo del estrés oxidativo, se ha propuesto como mecanismo de acción de la DFO (Francisco *et al*., 2010).

No solamente el hierro, también otros metales como el zinc o el calcio, intervienen de forma activa en *T. cruzi*, suponiendo una alteración en sus niveles la desregulación de diversas funciones biológicas en el parásito (Santos *et al*., 2012). Sin embargo, no son muchos los datos existentes en la literatura relativos a la actividad tripanocida de quelantes metálicos.

Basándonos en estos aspectos, se evaluó la actividad frente a *T. cruzi* de 22 compuestos heterocíclicos de síntesis incorporando en sus estructuras sistemas con propiedades quelantes, tales como 1,10-fenantrolina, imidazol, piridina o catecol.

• Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica

La actividad *in vitro* de diversos quelantes metálicos frente a epimastigotes de *T. cruzi* ha sido previamente estudiada, proponiéndose como mecanismo de acción su capacidad para interferir en el metabolismo del hierro, cobre o zinc (Rodrigues *et al*., 1995).

Concretamente, un estudio llevado a cabo por Lane *et al*. (1998) muestra la efectividad de la 1,10-fenantrolina frente a epimastigotes, sugiriéndose asimismo su efecto quelante como posible mecanismo de acción, al interferir en el balance intracelular de calcio y originar depósitos de dicho metal en el parásito. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tablas 42–44), los compuestos **4**, **5**, **6** y **10**, todos con 1,10-fenantrolina en sus estructuras, presentaron valores de $CI_{50} \leq CI_{50}$ del BZ. Sin embargo, esos mismos derivados fueron los más citotóxicos ($CL_{50} < 10$ μM), pudiendo este efecto relacionarse con una disrupción en la homeostasis del calcio a nivel de la célula hospedadora (Trump y Berezesky, 1995).

La capacidad que muestra la 1,10-fenantrolina como quelante de Zn se ha visto involucrada en la inhibición de diversas metaloproteasas implicadas en los procesos de invasión celular y metaciclogénesis (Santos *et al*., 2012). Por otra parte, también se ha demostrado su efecto antifúngico interfiriendo en los niveles de ergosterol (Coyle *et al*.,

2003), componente de la membrana celular de *T. cruzi.* Estas características hacen de la 1,10-fenantrolina una estructura a considerar en el diseño de potenciales tripanocidas.

Los átomos de N presentes en la estructura tricíclica resultan fundamentales en la actividad biológica de estas moléculas, siendo todos los isómeros de fenantrolina sistemas coordinadores de metales (Coyle *et al*., 2003). Caso contrario es el fenantreno, análogo estructural de la fenantrolina sin átomos de nitrógeno. De acuerdo con estas premisas, cabría esperar una pérdida de actividad en los derivados de fenantreno (compuestos **24**, **25** y **28**). Sin embargo, su perfil de actividad fue similar al de las fenantrolinas **4**, **5**, **6** y **10**, siendo ligeramente menos tóxicos (Tabla 44).

De manera general, estas 22 moléculas presentaron un comportamiento biológico semejante, hecho que podría deberse a la combinación de diversas estructuras quelantes en todas ellas: fenantrolina, imidazol-piridina, oxazol-piridina, imidazol-fenol o catecol. Cabe destacar que el compuesto **14** fue el menos activo en epimastigotes y también uno de los menos citotóxicos. Este hecho resulta sorprendente, debido a que para esta molécula cabría esperar una mayor actividad y citotoxicidad, asociadas a un daño celular excesivo inducido por la presencia del grupo NO_2 (Raether y Hänel, 2003).

4.1.9. ACTIVIDAD *in vitro* FRENTE A *T. cruzi* DE UNA SERIE DE CROMENOAZOLDIONAS DE SÍNTESIS

La existencia de aspectos biológicos comunes entre el cáncer y el parasitismo, ha servido a la investigación en Parasitología como punto de partida para el desarrollo de antiparasitarios a partir de antitumorales y *viceversa* (Oliveira, 2015). La gran capacidad que presentan las quinonas para generar ROS ha sentado las bases para su investigación como antitumorales (Morales *et al*., 2013) y supone un especial atractivo en su aplicación como antichagásicos.

El ciclo redox de las quinonas (Fig. 125) puede iniciarse mediante su reducción por la captación de 1 electrón cedido por el sistema NADPH-citocromo P450 reductasa, dando lugar a semiquinonas inestables. Estas moléculas transfieren electrones al O_2, adquiriendo la estructura original de quinona y generando $O_2^{\bullet -}$, los cuales puede dar lugar a H_2O_2 a través de las SOD, seguido de la formación de $HO^{\bullet}$ en presencia de Fe^{3+} (reacción de Fenton). Todos los radicales generados pueden interaccionar con ADN, lípidos o proteínas, induciendo daño celular (Pinto y de Castro, 2009).

La reducción de las quinonas mediante captación de 2 electrones es catalizada por la NAD(P)H-quinona oxidorreductasa (NQO1 o DT-diaforasa). Esta enzima reduce la generación de especies reactivas tóxicas, derivando la producción de radicales semiquinona hacia hidroquinonas y disminuyendo la formación de ROS por la célula. El desplazamiento de esta reacción hacia los mecanismos de detoxificación o la generación de estrés oxidativo

depende de la estabilidad de las hidroquinonas formadas y su mayor o menor capacidad de autoxidación (Pinto y de Castro, 2009).

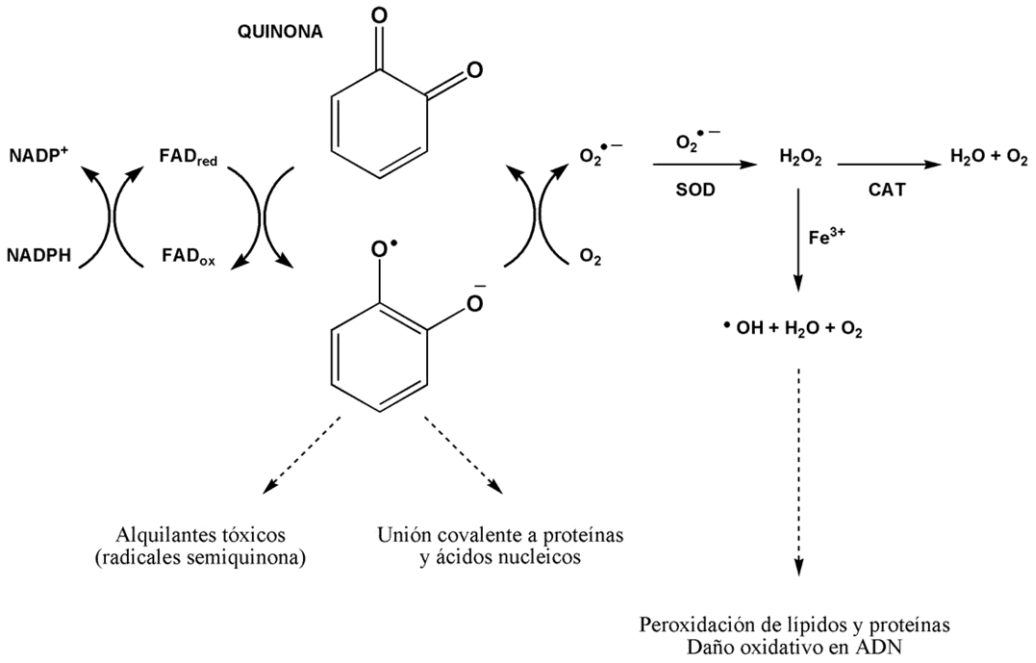


Fig. 125. Ciclo redox experimentado por las quinonas y generación de metabolitos tóxicos. SOD: superóxidodismutasa, CAT: catalasa. Fuente: adaptación del esquema propuesto por Pinto y de Castro (2009).

En la búsqueda de nuevos compuestos con actividad tripanocida, se han evaluado numerosos prototipos con estructura de quinona frente a *T. cruzi*, encontrándose en la literatura multitud de ensayos realizados con derivados de naftoquinona (Pinto y de Castro, 2009; Salomão *et al*., 2013; Prati *et al*., 2015).

De acuerdo con el potencial que muestran las quinonas para el desarrollo de agentes tripanocidas, se evaluó la actividad de una serie de derivados de síntesis, principalmente constituida por cromenopirazoldionas, cuyas propiedades antitumorales han sido previamente ensayadas (Morales *et al*., 2013, 2015). Asimismo, estudios previos realizados *in silico* han propuesto un buen perfil farmacocinético para estas moléculas, indicando su idoneidad para ser administradas oralmente (Morales *et al*., 2015), vía preferida en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de las enfermedades tropicales desatendidas (Nwaka y Hudson, 2006).

- **Actividad *in vitro* sobre epimastigotes y citotoxicidad inespecífica**

De manera general, los derivados de quinona pertenecientes a la serie **PM** (Fig. 30) no presentaron una actividad relevante en epimastigotes (Fig. 91 y Tabla 45). Un estudio previo

realizado por Tapia *et al*. (2002) muestra la síntesis de una serie de moléculas con anillos de *p*-quinona y pirazol en sus estructuras y su evaluación en *T. cruzi*. No obstante, dicho trabajo concluye con una débil actividad de estos compuestos sobre epimastigotes de la cepa Tulahuen, equiparando únicamente dos de ellos la actividad del BZ.

En nuestro modelo, los compuestos **PM199**, **PM203** y **PM401** presentaron mejor valor de CI_{50} que el BZ. Estos derivados de *p*-cromenopirazoldiona (**PM199** y **PM401**) y *o*-cromenopirazoldiona (**PM203**) tienen en sus estructuras fragmentos que reconocemos en otros derivados de quinona como son la β-lapachona y su isómero α-lapachona. Tales compuestos, así como diversos derivados de síntesis, han mostrado una importante inhibición del crecimiento de epimastigotes de la cepa Tulahuen, ya sea por inducir la generación de ROS en el parásito a través del ciclo redox o inhibir su respiración celular (Salas *et al*., 2008).

Sin embargo, la actividad de **PM199**, **PM203** y **PM401** estuvo acompañada de un importante efecto tóxico sobre fibroblastos L929 (Fig. 92 y Tabla 45), probablemente vinculado a la producción de ROS en estas células. Recientemente se ha descrito un efecto antiproliferativo de las cromenopirazoldionas sobre diversas líneas tumorales de origen humano como HepG2, LNCaP y MDA-MB-231 (Morales *et al*., 2013, 2015). Un efecto similar podría ser el responsable de la citotoxicidad registrada para la línea celular L929 (Sanford *et al*., 1948), mostrando una baja selectividad de estas moléculas hacia *T. cruzi* y en consecuencia, ninguna fue ensayada frente a amastigotes intracelulares.

4.1.10. ACTIVIDAD TRIPANOCIDA *in vitro* DEL ALQUIL-LISOFOSFOLÍPIDO EDELFOSINA

Los alquil-lisofosfolípidos (ALP) comprenden una serie de compuestos metabólicamente estables, entre los que se encuentran varias alquilfosfocolinas como la hexadecilfosfocolina (miltefosina), la 1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (edelfosina, ET-18-OCH) o la 1-hexadeciltio-2-metoximetil-*rac*-glicerofosfocolina (ilmofosina, BM 41.440). Tales análogos de síntesis han sido objeto de una importante investigación en el desarrollo de agentes antitumorales (Urbina, 2006); asimismo se ha demostrado su actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *T. cruzi* y otros tripanosomátidos (Apt, 2010).

La aplicación de los ALP como potencial terapia anticancerosa en humanos, ha facilitado información acerca de la farmacología, toxicología y tolerancia de estos compuestos, hecho que supone una ventaja en lo relativo al desarrollo de compuestos para el tratamiento de las enfermedades parasitarias tropicales (Santa-Rita *et al*., 2000). Concretamente, la miltefosina ha adquirido gran importancia como agente leishmanicida, siendo en la actualidad el único fármaco disponible para el tratamiento por vía oral de la

enfermedad visceral. Sin embargo, se ha observado una gran variabilidad entre las distintas especies de *Leishmania* en términos de susceptibilidad, así como efectos adversos a nivel gastrointestinal y un potencial riesgo teratogénico (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015), que ha impulsado la investigación de otros ALP como antiparasitarios.

En este contexto, previamente a este trabajo se ha demostrado la eficacia de la edelfosina frente a *Leishmania* spp. (Croft *et al*., 1996; Varela *et al*., 2012) y *T. cruzi* (Croft *et al*., 1996; Santa-Rita *et al*., 2000; Lira *et al*., 2001) aplicando diversos modelos *in vitro*. No obstante, no se han encontrado datos acerca de su actividad sobre las formas replicativas de la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

- **Actividad *in vitro* en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica**

Los resultados de actividad obtenidos sobre epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ* tras 72 h de tratamiento (Fig. 93), muestran una mejor actividad de la edelfosina (CI_{50} = 7,51 μM) en comparación con el BZ (CI_{50} ca. 30 μM). Estos resultados son comparables a los obtenidos por Santa-Rita *et al*. (2000) a las 72 h de tratar cultivos axénicos de *T. cruzi* cepa Y. Poco después, Lira *et al*. (2001) afirman no encontrar diferencias relativas a la proliferación de epimastigotes de las cepas EP e Y tratados con edelfosina. Asimismo, en un estudio realizado por Varela *et al*. (2012) se señala la actividad de varios ALP tras 72 h de incubación con promastigotes de *Leishmania* spp., siendo el perfil de actividad de la edelfosina en *L. amazonensis* (CI_{50} = 6,40 μM) similar al obtenido sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

El carácter anfipático de los ALP permite su interacción con componentes lipídicos asociados a las membranas celulares (Urbina, 2006). En los epimastigotes de *T. cruzi*, los ALP bloquean la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina mediante una inhibición selectiva de la vía de Greenberg, minoritaria en células de mamífero, produciendo una alteración en la composición de fosfolípidos. La mayor concentración de ALP requerida para inhibir la vía de síntesis de fosfatidilcolina predominante en éstas células (vía de Kennedy), explica la selectividad de estos compuestos en su actividad antiparasitaria (Lira *et al*., 2001).

Como consecuencia de la alteración en los niveles basales de fosfolípidos, se ha observado una modificación en la composición de esteroles en epimastigotes tratados con diversos ALP (Lira *et al*., 2001). Siguiendo esta línea, se ha demostrado una acción sinérgica de estos compuestos en combinación con ketoconazol (Santa-Rita *et al*., 2005).

Las observaciones realizadas mediante MET y MEB en epimastigotes tratados con edelfosina, ya sea sola (Santa-Rita *et al*., 2000) o en combinación con ketoconazol (Santa-Rita *et al*., 2005), señalan a la membrana plasmática, los reservosomas y la mitocondria como potenciales dianas, y a las interferencias ocasionadas en el metabolismo lipídico como la causa última de su acción.

Es importante mencionar que en nuestros ensayos la actividad de la edelfosina podría encontrarse parcialmente inhibida por la presencia de suero en los medios de cultivo. La frecuente unión a proteínas plasmáticas que experimentan los ALP supone una menor concentración de fármaco libre y en consecuencia, un "efecto protector" del suero frente a la toxicidad de estos compuestos sobre *T. cruzi* (Santa-Rita *et al*., 2000, 2006).

Simultáneamente, se evaluó la potencial toxicidad de la edelfosina en cultivos de macrófagos J774 (Fig. 93). Previamente se ha demostrado que la edelfosina 10 μM es incapaz de inducir apoptosis en dicha línea celular tras 24 h de incubación y provoca una muerte celular inferior al 15% tras 48 h de tratamiento (Varela *et al*., 2012). Este hecho se corroboró en los ensayos de citotoxicidad, donde el tratamiento con edelfosina 10 μM durante 48 h supuso un %C = 15,25%. Una rápida inducción de la apoptosis en estas células, impediría su utilización como célula hospedadora en el posterior ensayo de actividad frente a amastigotes intracelulares (Varela *et al*., 2012). De manera similar, se ha demostrado que los fibroblastos L929 son resistentes a la acción proapoptótica de la edelfosina debido a una incorporación ineficaz de la misma junto con la ausencia de receptores Fas en estas células (Gajate *et al*., 2000). Sin embargo, la escasa captación de edelfosina por parte de las células L929 podría repercutir en su actividad sobre el parásito intracelular. Estas limitaciones no se han observado en los macrófagos J774 (Varela *et al*., 2012), resultando en este estudio idóneas para el desarrollo de las pruebas de citotoxicidad y de actividad en amastigotes.

- **Actividad *in vitro* frente a amastigotes**

En comparación con los resultados obtenidos en epimastigotes, la edelfosina mostró una actividad ligeramente superior frente a la forma intracelular de *T. cruzi*, alcanzando una CI_{50} = 4,76 μM (Fig. 94). Estudios previos han demostrado que el efecto producido por este fármaco sobre la proliferación de amastigotes axénicos de *T. cruzi* y diversas especies de *Leishmania*, es similar al inducido en epimastigotes y promastigotes, respectivamente (Croft *et al*., 1996; Varela *et al*., 2012). Igualmente, las concentraciones de edelfosina requeridas para inhibir la proliferación del ciclo intracelular de *T. cruzi* se encuentran en el mismo rango (Santa-Rita *et al*., 2000). No obstante, se ha registrado una mayor susceptibilidad del parásito cuando se emplean macrófagos como célula hospedadora (Croft *et al*., 1996).

En base a estos hallazgos, cabría suponer una acción de la edelfosina mediada por la generación de NO. Varios estudios indican la capacidad de estos ALP para activar macrófagos de manera inespecífica (Urbina, 2006). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la incubación del fármaco con macrófágos J774, así como con cultivos primarios de éstas células, no genera niveles detectables de NO (Varela *et al*., 2012). Asimismo, experimentos realizados *in vivo* han mostrado un mantenimiento de la acción leishmanicida de los ALP en modelos murinos inmunodeficientes (Urbina, 2006). Estos

resultados sugieren que la actividad antiparasitaria de la edelfosina deriva de un efecto directo sobre el parásito y no de una acción inmunomoduladora, al no encontrarse el sistema inmune involucrado en su mecanismo de acción (Urbina, 2006; Varela *et al*., 2012).

El análisis ultraestructural de los daños desencadenados por la edelfosina en amastigotes axénicos, confirma que la membrana plasmática es la principal diana de este fármaco en *T. cruzi* (Santa-Rita *et al*., 2006).

4.2. Formulaciones de compuestos antichagásicos

4.2.1. EVALUACIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS DE BENZNIDAZOL SOBRE *T. cruzi*

Las serias limitaciones que presentan los fármacos con baja solubilidad acuosa en términos de biodisponibilidad, supone un problema para su correcta administración, especialmente importante en aquellas enfermedades que a día de hoy presentan un limitado arsenal quimioterapéutico, como es la enfermedad de Chagas.

Actualmente, se están aplicando diversos recursos de tecnología farmacéutica en el desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de las enfermedades desatendidas (Durán *et al*., 2009), entre ellas la enfermedad de Chagas (Romero y Morilla, 2010; Salomón, 2012). En este contexto, se han llevado a cabo estudios con BZ y NX, dirigidos a potenciar la actividad *in vitro* de ambos fármacos de referencia y reducir su citotoxicidad (Sánchez *et al*., 2002; Lyra *et al*., 2012), así como a mejorar su eficacia *in vivo* (Maximiano *et al*., 2011).

Por otra parte, es importante destacar que ambos fármacos antichagásicos se hallan disponibles únicamente en formas de dosificación sólidas, encontrándose sus desventajas asociadas frecuentemente relacionadas con la absorción errática que a menudo presentan los fármacos de baja solubilidad (Lamas *et al*., 2006). Concretamente, el BZ presenta una baja solubilidad acuosa – 0,4 mg/mL (Kasim *et al*., 2004) – más comprometida si cabe en los fluidos gástrico y entérico – 0,237 mg/mL y 0,244 mg/mL, respectivamente – (Maximiano *et al*., 2010). El carácter hidrófobo que posee el BZ se encuentra muy probablemente conectado a su limitada actividad, debido a la influencia que ejercen los perfiles de disolución sobre la biodisponibilidad de los fármacos (Rasenack y Müller, 2002).

La Tecnología Farmacéutica señala a la producción de dispersiones sólidas (DS) como un método útil en la optimización de la liberación y/o absorción de fármacos hidrófobos con la consecuente mejora de su biodisponibilidad oral (Leuner y Dressman, 2000), significando su aplicación al BZ una alternativa a considerar en la controvertida quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Estos sistemas de liberación pretenden solventar

el carácter hidrófobo del fármaco mediante su dispersión en una matriz hidrófila o en un surfactante, modificando de esta manera sus propiedades fisicoquímicas para conseguir una mejor liberación y biodisponibilidad (García-Rodríguez *et al*., 2011; Tran *et al*., 2011). En este sentido, las DS habitualmente conducen a una mayor biodisponibilidad del fármaco que las formulaciones convencionales, debido al menor tamaño de partícula y a la mayor humectabilidad que adquiere el principio activo (Leuner y Dressman, 2000; Vasconcelos *et al*., 2007). Asimismo, las DS potencian la solubilidad del fármaco alterando su estructura cristalina hacia estructuras más amorfas (García-Rodríguez *et al*., 2011), requiriéndose una menor energía durante el proceso de disolución para romper tales estructuras (Janssens y van den Mooter, 2009). Conjuntamente, la introducción de sales biliares favorece la biodisponibilidad de estos fármacos incrementando su perfil de disolución en el tracto gastrointestinal (Kakemi *et al*., 1970), estando el uso de tales surfactantes ampliamente distribuido en estos estudios (Li y Hu, 2004; Manandhar *et al*., 2008; Chun *et al*., 2012).

- **Velocidad de disolución *in vitro***

Como se ha venido comentando, el desarrollo de nuevas formulaciones de BZ, así como de cualquier fármaco de administración oral, debe implicar una optimización de su perfil de disolución y/o absorción, con el propósito de aumentar su biodisponibilidad y obtener un mejor efecto terapéutico (García-Rodríguez *et al*., 2011; Tran *et al*., 2011). El aumento de la superficie específica obtenido mediante reducción del tamaño de partícula, junto con la mayor humectabilidad del principio activo (Leuner y Dressman, 2000; Vasconcelos *et al*., 2007), son algunas de las propiedades que contribuyen a potenciar la solubilidad acuosa del fármaco. Concretamente, el carácter tensoactivo que muestran las sales biliares, entre ellas el desoxicolato sódico (NaDC), ha impulsado su utilización en este tipo de sistemas (Otsuka *et al*., 1998; Li y Hu, 2004; Kim *et al*., 2011). La introducción de surfactantes evita además la recristalización del principio activo a su estructura cristalina original, un problema de estabilidad comúnmente asociado a las DS (Vasconcelos *et al*., 2007).

De acuerdo con los resultados, la velocidad de disolución del BZ experimentó un claro aumento tras el proceso de liofilización (Fig. 95A). Esta mejora en el perfil del BZ recristalizado (R-BZ) con respecto al del BZ materia prima es atribuida a una pérdida parcial de su estructura cristalina original, en la que el principio activo adquiere una estructura más amorfa (García-Rodríguez *et al*., 2011). Sin embargo, la incorporación de NaDC, generó una matriz insoluble que condujo a una liberación controlada del BZ originando perfiles de disolución más lentos con el aumento en la proporción de surfactante, tanto en las mezclas físicas (MF) como en las DS (Fig. 95). Como explicación a este hecho se asume la transformación que a pH gástrico sufre el NaDC (pKa 5,15) a su correspondiente ácido biliar, cuya precipitación o agregación sería la responsable de tal matriz insoluble, suponiendo una menor cesión del BZ en ambientes ácidos (Kim *et al*., 2011; Chun *et al*., 2012). Por otra

parte, el perfil de disolución de las DS fue más rápido que el de las MF, debido a los cambios estructurales y al menor tamaño de partícula que adquiere el BZ tras el proceso de liofilización (García-Rodríguez *et al*., 2011). Sin embargo, a la proporción 1:10, MF y DS presentaron perfiles similares, prevaleciendo el impacto negativo del NaDC sobre el tipo de formulación (Fig. 95).

A pesar de que concentraciones elevadas de NaDC provocaron perfiles de disolución *in vitro* más lentos, la incorporación de sales biliares podría promover la absorción del BZ a través de las vías paracelular y transcelular (Kim *et al*., 2011; Chun *et al*., 2012). Sin embargo, resulta imprescindible considerar la toxicidad que concentraciones elevadas de NaDC pueden generar *in vitro* e *in vivo* (Fry y Staffeldt, 1964; Szoka *et al*., 1987), habiéndose confirmado tal comportamiento *in vitro* en nuestros ensayos de citotoxicidad (Tabla 49). Con el fin de descartar un efecto sinérgico atribuido a una posible toxicidad del NaDC, se reformuló la DS más selectiva (DS-1:3) reemplazando el surfactante por hidroxipropilcelulosa de bajo peso molecular (L-HPC). Esta nueva DS presentó un perfil de disolución *in vitro* más rápido (Fig. 96) que el que mostraron todas las DS con NaDC (Fig. 95), probablemente asociado al mayor incremento de la superficie específica y a la mejor humectabilidad del BZ (García-Rodríguez *et al*., 2011; Tran *et al*., 2011), así como a una liberación del BZ independiente del pH del medio de disolución (Guo *et al*., 1998).

La caracterización fisicoquímica de las DS de BZ en NaDC o en L-HPC, mediante microscopía electrónica de barrido (Fig. 126 y 127), difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido, confirmó una pérdida progresiva de la estructura cristalina del BZ en todas las DS, siendo ésta más acusada en presencia de NaDC (Palmeiro-Roldán *et al*., 2014).

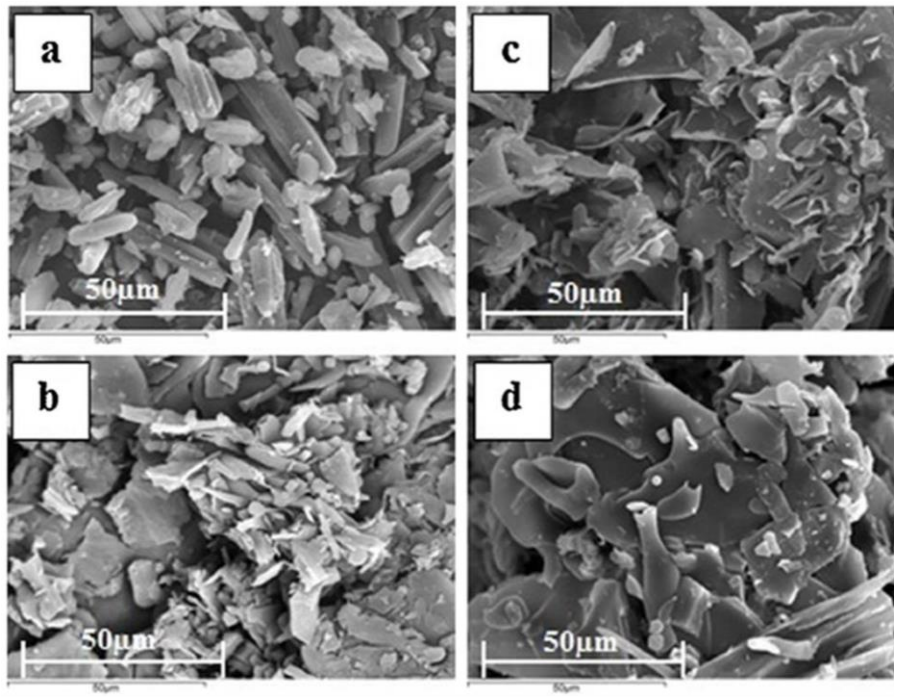


Fig. 126. MEB de las formulaciones de BZ en NaDC: (a) MF-1:3, (b) DS-1:3, (c) DS-1:1,5, y (d) DS-1:6. Fuente: Palmeiro-Roldán *et al.* (2014).

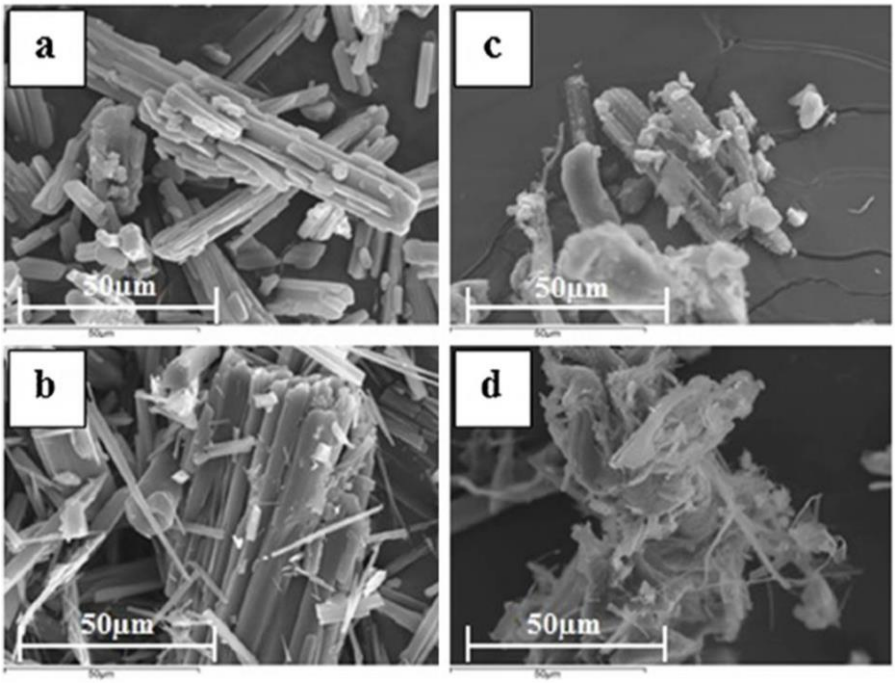


Fig. 127. MEB de las formulaciones de BZ: (a) materia prima, (b) R-BZ, (c) MF-1:3 BZ:L-HPC y (d) DS-1:3 BZ:L-HPC. Fuente: Palmeiro-Roldán *et al*. (2014).

- **Actividad frente a epimastigotes y citotoxicidad inespecífica**

Los ensayos frente a epimastigotes se realizaron en medio LIT (pH 7,4), donde tanto el BZ materia prima como el R-BZ mostraron una actividad similar. Sin embargo, el aumento en el contenido de NaDC mejoró progresivamente los valores de CI_{50} (Tabla 48). Estos resultados sugieren una posible afectación de la permeabilidad de membrana en el parásito ocasionada por el surfactante, promoviendo de esta manera la entrada del BZ en los epimastigotes (Rangel-Yagui *et al*., 2007). Este efecto del NaDC sobre membranas biológicas justificaría igualmente la toxicidad sobre células L929 (evaluada en MEM a pH 7,2) observada para las formulaciones con mayor proporción de excipiente (DS-1:6 y SD-1:10). Por el contrario, la ausencia de citotoxicidad que mostraron las DS con bajo contenido de NaDC o L-HPC (Tabla 49) podría deberse a la adecuada solubilidad del BZ en estos sistemas (Fig. 95 y 96).

- **Actividad frente a amastigotes intracelulares**

En la enfermedad de Chagas, la membrana plasmática de la célula hospedadora, así como la complejidad del entorno en el que se desarrolla el parásito intracelular, supone una barrera que en muchas ocasiones compromete la eficacia de los agentes tripanocidas a nivel de los amastigotes (Romero y Morilla, 2010). No obstante, la actividad que estas DS presentaron frente a amastigotes intracelulares (Tabla 50) fue superior a la obtenida en epimastigotes (Tabla 48). En este sentido, las propiedades surfactantes del NaDC podrían estar facilitando la difusión del BZ a través de membranas biológicas (González-Martín *et al*., 2000), reflejándose esta interacción en una leve mejora ($P > 0,05$) de los valores de CI_{50} con

respecto al obtenido por el BZ materia prima (Tabla 50). Sin embargo, ratios elevados de BZ:NaDC (DS-1:6 y DS-1:10) conllevaron peores actividades, con un efecto bloqueante del surfactante prevaleciendo sobre el de promoción de la permeabilidad. La leve acidificación que el medio extracelular experimenta durante el largo periodo de incubación que requieren los cultivos celulares en estos ensayos (McConnell *et al*., 1992) estaría relacionada con la menor cesión del BZ en ambientes ácidos (Chun *et al*., 2012) y por tanto, con la pérdida de actividad sobre amastigotes sufrida por las DS-1:16 y DS-1:10.

- **Actividad *in vivo***

De acuerdo con los resultados de actividad *in vitro*, la DS-1:3 (BZ:NaDC) se seleccionó para su evaluación en un modelo murino de infección aguda (Romanha *et al*., 2010) y se ensayó la DS-1:6 a fin de corroborar la pérdida de actividad experimentada por esta formulación. Asimismo, se incluyó en el ensayo la DS-1:3 en L-HPC, asumiendo que ésta podría presentar una importante actividad *in vivo* de acuerdo con su excelente perfil de disolución.

En esta ocasión, los ensayos de actividad *in vivo* se realizaron en grupos de hembras NMRI. Como se ha comentado anteriormente y tal y como queda reflejado en los diferentes ensayos *in vivo* presentados en esta memoria, los machos Swiss se muestran más susceptibles que las hembras a la infección con *T. cruzi* cepa Y, presentando habitualmente niveles de parasitemia más elevados y una mayor mortalidad durante la fase aguda (Guedes-da-Silva *et al*., 2015). Sin embargo, se ha demostrado también que la sensibilidad que presentan estos ratones al tratamiento con BZ es mayor en el caso de las hembras (Guedes-da-Silva *et al*., 2015), motivo por el que fueron seleccionadas en este estudio para comparar la eficacia de las DS del fármaco de referencia.

Debido a que en el modelo experimental aplicado la dosis del BZ habitualmente administrada (100 mg/kg/día) reduce drásticamente los niveles de parasitemia (ver ensayos de actividad *in vivo*: Fig. 45, 55, 66, 73, 80 y 83), hecho que dificultaría la apreciación de cualquier mejora en su actividad como consecuencia de las distintas formulaciones, se seleccionó la dosis de 25 mg/kg/día a fin de establecer una mejor comparación entre las parasitemias registradas en los diferentes grupos de tratamiento.

A pesar de que ninguna de las DS en NaDC fue aparentemente tóxica en dosis de 25 mg/kg/día administradas durante 5 días consecutivos, es importante destacar la inocuidad que inicialmente presentan los derivados de celulosa (L-HPC) junto con los resultados de actividad *in vivo* obtenidos por dicha DS.

Como matriz polimérica, la HPC origina DS que mantienen al principio activo en un estado amorfo, generando sistemas más efectivos debido a la inestabilidad termodinámica adquirida (Vasconcelos *et al*., 2007) y en consecuencia, de mayor solubilidad. La gran

humectabilidad que proporcionan los derivados de celulosa ha promovido su aplicación en el desarrollo experimental de sistemas de liberación de fármacos de limitada solubilidad acuosa (Tran *et al*., 2011), como algunos antiparasitarios (García-Rodríguez *et al*., 2011). La L-HPC proporciona una considerable dispersión del principio activo en la matriz, logrando la máxima solubilidad para este tipo de fármacos (Tran *et al*., 2011). En nuestros estudios, el bajo peso molecular de la HPC empleada proporcionó el perfil de disolución más rápido a las DS (Fig. 96), alcanzando además una mejor actividad (%AUPC = 96,65%) en comparación con la equivalente DS en NaDC (%AUPC = 91,93%). Tal impacto sobre los niveles de parasitemia (Fig. 97) se correlaciona con la cinética de liberación del BZ observada en el ensayo de disolución *in vitro*: a mayor velocidad de disolución (DS-1:3 en L-HPC > BZ materia prima > DS-1:3 en NaDC), mayor reducción en la parasitemia (%AUPC DS-1:3 en L-HPC > %AUPC BZ materia prima > %AUPC DS-1:3 en NaDC). Este efecto fue más evidente en el 12º d.p.i., donde la parasitemia del grupo tratado con la DS formulada en celulosa fue significativamente menor a la del grupo tratado con la DS en NaDC ($P < 0,05$).

A propósito de la DS-1:6, se registró una pérdida de actividad *in vivo* (%AUPC = 83,14%), correlacionándose con los resultados adquiridos por esta formulación en otros entornos ácidos, como son el medio empleado en el ensayo de velocidad de disolución y el medio de cultivo celular tras 7 días de incubación (Fig. 95, Tabla 50). No obstante, a pesar de que las DS en NaDC mejoraron el perfil de actividad del BZ *in vitro* en comparación con el del BZ materia prima, las parasitemias obtenidas en el modelo *in vivo* fueron similares (Fig. 97). A nivel intestinal, las sales biliares no conjugadas como el NaDC presentan menor solubilidad acuosa que las conjugadas que de manera fisiológica se encuentran en dicha localización, pudiendo afectar a la absorción de fármacos desarrollados como formas sólidas (Holm *et al*., 2013), hecho que argumentaría las semejanzas encontradas entre la actividad *in vivo* de las DS y del BZ materia prima.

Con respecto a la supervivencia de los animales, ninguno de los ratones sometidos a tratamiento murió durante la fase aguda, al contrario que los no tratados (Fig. 98). Asimismo, ninguno mostró signos aparentes de toxicidad aguda a la dosis administrada. De manera conjunta, estos hechos señalan que las DS evaluadas son bien toleradas en ratón a la posología establecida, reducen sustancialmente la parasitemia y protegen frente a la mortalidad asociada al modelo murino aplicado.

4.2.2. EVALUACIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL SOBRE *T. cruzi*

Una vez seleccionada la L-HPC como el excipiente más idóneo para el desarrollo de DS de agentes antichagásicos de baja solubilidad acuosa (Palmeiro-Roldán *et al*., 2014; Fonseca-

Berzal *et al*., 2015b), se elaboraron nuevas DS de los derivados 2-bencil-1-propil- (**VATR1**) y 2-bencil-1-butil-5-nitroindazolinona (**VATR3**), previamente evaluados frente a *T. cruzi*.

Con respecto al polímero, el peso molecular de la HPC puede variar en función del grado de polimerización (n) del esqueleto de glucosa (Fig. 36), lo que a su vez controla la viscosidad del sistema influyendo en la velocidad de liberación del principio activo. Mientras que los polímeros de elevada viscosidad se utilizan en el desarrollo de formas de liberación controlada, aquellos que presentan bajo peso molecular y por tanto bajo grado de viscosidad, como la L-HPC, suponen un aumento en la velocidad de liberación del principio activo (Guo *et al*., 1998; Sharma *et al*., 2009).

Los derivados **VATR1** y **VATR3** se seleccionaron para este estudio de acuerdo con su destacable actividad *in vitro* e *in vivo* (Vega *et al*., 2012; Fonseca-Berzal *et al*., 2014b; Fonseca-Berzal *et al*., 2015a) habiéndose presentado sus resultados en el apartado 3.1.1. A pesar de que ninguno de estos compuestos viola las reglas de Lipinski, prediciéndose por tanto una adecuada biodisponibilidad oral, su carácter relativamente lipófilo con valores de LogP = 3,617 (**VATR1**) y 4,176 (**VATR3**) (Ibáñez-Escribano *et al*., 2015) así como su baja solubilidad acuosa – 0,02 mg/mL para **VATR1** y 0,01 mg/mL para **VATR3** – sugieren un comportamiento más hidrófobo que el que muestra el BZ – LogP = 0,778 (Fonseca-Berzal *et al*., 2013, 2014a) y 0,4 mg/mL (Kasim *et al*., 2004) –, señalando a ambos derivados como perfectos candidatos para el desarrollo de nuevas DS.

- **Velocidad de disolución *in vitro* y actividad tripanocida *in vivo***

Las distintas DS se evaluaron en el modelo murino de enfermedad de Chagas aguda habitual (Romanha *et al*., 2010), mediante administración oral de dosis bajas (12,5 mg/kg/día) de ambos compuestos durante 5 días consecutivos.

La actividad *in vivo* de todas las formulaciones se evaluó en grupos de machos NMRI. Como se ha comentado anteriormente, la susceptibilidad de los machos a la infección por *T. cruzi* es habitualmente superior a la que muestran las hembras (Guedes-da-Silva *et al*., 2015). Sin embargo, los niveles de parasitemia de estos animales fueron los más bajos de entre todos los experimentos realizados. Igualmente, se observó un retraso en el pico de máxima parasitemia, alcanzándose en el 12º d.p.i. (Fig. 100 y 103). Tales variaciones en las curvas de parasitemia podrían ser consecuencia del mayor peso corporal que presentaron los ratones al inicio de estos ensayos (Sampson-Ward y Urdaneta-Morales, 1988).

Con respecto a **VATR1**, los resultados obtenidos con las DS muestran una importante mejora en la eficacia de este derivado con la incorporación de L-HPC en las formulaciones: %AUPC = 53,80, 82,25 y 81,05% para materia prima, DS-1:2,5 y DS-1:10, respectivamente (Fig. 100). No obstante, esta correlación fue más evidente en el caso de

VATR3 (Fig. 103), cuyo perfil de actividad mejoró progresivamente con el incremento de la proporción de L-HPC en las DS: %AUPC = 24,51% (materia prima), 61,12% (DS-1:2,5) y 85,42% (DS-1:10). Comparando los resultados de actividad de ambos derivados, la menor solubilidad acuosa que posee **VATR3** obligó a incorporar una mayor proporción de excipiente para potenciar la misma y en consecuencia su actividad, bastando el ratio 1:2,5 para superar el 80% de eficacia en el caso de **VATR1** y requiriéndose una proporción 1:10 para conseguir un efecto equiparable con el derivado **VATR3**.

Correlacionando estos resultados con los obtenidos en el ensayo de velocidad de disolución (Fig. 99 y 102), la escasa diferencia en el porcentaje de **VATR1** liberado que mostraron las DS-1:2,5 y DS-1:10 una vez concluidas las 3 h de ensayo (62,40 ± 0,50% y 79,75 ± 5,98%, respectivamente) quedó reflejada en una actividad *in vivo* semejante para ambas formulaciones: %AUPC = 82,25 y 81,05%, respectivamente. De manera similar, las DS-1:5, DS-1:10 y DS-1:20 de **VATR3** liberaron alrededor del 70–80% de derivado una vez finalizado el ensayo, presuponiéndose una actividad *in vivo* similar de las mismas. Este hecho motivó el desarrollo de una nueva DS-1:2,5 para este derivado, asumiéndose una liberación más sostenida de **VATR3** a partir de este sistema y en consecuencia, establecer una mejor comparación de los resultados de actividad *in vivo*.

Centrándonos en los resultados logrados el día de máxima parasitemia, las reducciones que se consiguieron tras administrar dosis de 12,5 mg/kg/día de ambos derivados así como de sus respectivas formulaciones (Fig. 100 y 103), fueron superiores a las obtenidas con dosis de 100 mg/kg/día (Fig. 45). A pesar de que los picos de parasitemia se presentaron en días distintos, apareciendo en este estudio una vez administrado el tratamiento completo (12º d.p.i.) y tras administrar 3 dosis en el ensayo anteriormente referido (8º d.p.i.), la limitada solubilidad acuosa de estos derivados estaría afectando a la cantidad de fármaco disponible, siendo ésta en el tratamiento con 100 mg/kg/día menor a la presumiblemente administrada en cada dosis.

En este contexto, se han llevado a cabo estudios previos en los que la escasa solubilidad acuosa de varios derivados de 5-nitroindazol ha sido solventada mediante su inclusión en ciclodextrinas, persiguiendo un aumento en su biodisponibilidad y actividad tripanocida (Jullian *et al*., 2008; Pérez-Cruz *et al*., 2009). Sin embargo, estos trabajos no incluyen ensayos biológicos que corroboren el mejor perfil de actividad de los 5-nitroindazoles, fruto de las aproximaciones teóricas y experimentales realizadas.

En nuestro estudio, los resultados de actividad biológica fueron consistentes con los obtenidos en los ensayos de disolución *in vitro*. De esta manera, la mayor velocidad de liberación que presentan los derivados **VATR1** y **VATR3** a partir de las formulaciones en L-HPC, conduce a un aumento en su actividad antiparasitaria (García-Rodríguez *et al*., 2011; Palmeiro-Roldán *et al*., 2014).

4.3. Modelos QSAR/ADL de predicción de actividad tripanocida

4.3.1. CONSTRUCCIÓN DE LA BASE DE DATOS

La base de datos (BD) creada para la confección de los modelos QSAR/ADL de predicción de actividad se constituyó inicialmente por 1.308 moléculas evaluadas frente a *T. cruzi*, 759 activas y 549 inactivas, recopiladas a través de búsqueda bibliográfica utilizando diversas fuentes (apartado 2.3.1.). Esta BD comprende un mayor número de moléculas que otras utilizadas en estudios *in silico* anteriores (Montero-Torres *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2006; Castillo-Garit *et al.*, 2010, 2011, 2012). Mediante un análisis de sus estructuras, se retiraron un total de 71 moléculas de la BD inicial (Tabla 51), entre las cuales 20 se encontraban repetidas y 3 mostraban errores en sus estructuras. Esta exploración es importante debido a que la presencia en la BD de estructuras duplicadas o erróneas puede afectar negativamente al correcto desarrollo de los modelos de predicción (Dearden *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que la complejidad que muestra el ciclo biológico de *T. cruzi* y su progresión a epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes, hace que las pruebas de cribado farmacológico a menudo se realicen frente a las tres formas del parásito, las cuales presentan distinta susceptibilidad a los compuestos antichagásicos (Maya *et al.*, 1997; Moraes *et al.*, 2014). Estas diferencias también se acusan entre las distintas cepas y clones pertenecientes a los seis DTU (Zingales *et al.*, 2014). Esta variabilidad junto con la diversidad de protocolos experimentales que existe actualmente para la evaluación de compuestos potencialmente tripanocidas dificulta la construcción de la BD, pieza fundamental para el desarrollo posterior de los modelos QSAR/ADL.

Con el objetivo de confeccionar una BD lo más homogénea posible y puesto que nuestro protocolo de cribado secuencial *in vitro* realiza el cribado farmacológico primario sobre cultivos de epimastigotes, se recopilaron datos de actividad de compuestos evaluados *in vitro* frente a dicha forma extracelular de *T. cruzi*. Independientemente de la cepa sobre la que se reportase la actividad, se estableció como criterio general de actividad/inactividad presentar un IS > 10 o un valor de CI_{50} < 30 μM, de acuerdo con los resultados obtenidos por el BZ en los ensayos frente a epimastigotes de la cepa CL-B5 *lacZ* bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 2.1.8.6. Diversos estudios sugieren que en el caso de los epimastigotes no existe una clara asociación entre la sensibilidad que el parásito muestra a los fármacos de referencia y el DTU al que pertenece (Boiani *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2010; Zingales *et al.*, 2014; Fonseca-Berzal *et al.*, 2015a), apoyándose de esta manera que el punto de corte establecido en la BD para clasificar un compuesto como activo o inactivo, fuera siempre el mismo sin considerar la cepa de *T. cruzi*. Esta BD incluye a su vez la publicada por DNDi y disponible en CheMBL (https://www.ebi.ac.uk/chemblntd/download/#

dndi_dataset_chagas, acceso: marzo de 2012) cuyos datos de actividad se refieren a ensayos realizados en células infectadas con parásitos pertenecientes a la cepa Tulahuen *lacZ* y para la que se mantuvo el mismo criterio de inclusión. Habitualmente, a través de los protocolos de cribado farmacológico se detectan sólo unos pocos compuestos activos frente a una gran cantidad de inactivos (Chang *et al.*, 2013). Sin embargo, dicha inactividad no suele ser objeto de publicaciones científicas. Ante esta situación y debido a la escasez de compuestos inactivos descritos en la literatura, fue necesario recurrir a la incorporación en este grupo de 139 compuestos con otros usos farmacológicos y presumiblemente inactivos frente a *T. cruzi* de acuerdo con los resultados obtenidos en varios estudios *in silico* previos (Castillo-Garit *et al.*, 2010, 2011, 2012). A pesar de ser clasificadas como inactivas, la ausencia de corroboración experimental para estas 139 moléculas conlleva la posibilidad de que algunas realmente no lo sean y den lugar a mecanismos de acción en el parásito no detectados virtualmente, pudiendo este hecho afectar a la clasificación final del grupo de compuestos inactivos (Castillo-Garit *et al.*, 2012; Martins Alho *et al.*, 2014).

Por último, en la creación de la BD es necesario dividir ésta en las respectivas series de entrenamiento (SE) y predicción (SP). Mientras que sobre la primera se construyen estrictamente los modelos de predicción, la segunda es responsable de la evaluación de su poder predictivo mediante procedimientos de validación externa. Es importante que el modelo se valide con un conjunto amplio de moléculas que no se encuentren incluidas en la SE, recomendándose que al menos el 20% del total de moléculas de la BD constituya la SP (Gramatica, 2007), habiéndose retirado el 25% de las mismas en este estudio (Fig. 105).

4.3.2. DESARROLLO DE MODELOS QSAR/ADL DE PREDICCIÓN DE ACTIVIDAD TRIPANOCIDA

Mediante la aplicación de técnicas computacionales, un modelo QSAR establece una relación estructura-actividad a través de una ecuación matemática que viene determinada por un conjunto de moléculas de actividad conocida. Dicha relación puede establecerse calculando multitud de descriptores moleculares (DM) variados así como empleando diferentes métodos estadísticos, de modo que la ecuación obtenida (función discriminante) se utiliza para predecir la actividad de nuevas moléculas (Weaver y Gleeson, 2008).

Una vez elaborada la BD y definidas las SE y SP (apartado 2.3.1.1.) se procedió con la obtención de las correspondientes funciones discriminantes que permiten clasificar los compuestos como activos o inactivos. Se desarrollaron un total de 45 modelos de predicción QSAR/ADL a partir de las diez propiedades atómicas que implementa la versión utilizada del programa TOMOCOMD-CARDD (masa atómica, electronegatividad, polarizabilidad, volumen de van der Waals, LogP, carga, dureza, área de superficie polar, refractividad y blandura) por

cada una de las cuatro matrices de adyacencia a su vez disponibles: no estocástica (NS), estocástica (SS), doble estocástica (dS) y de probabilidad mutua (PM). De esta manera se incrementó el número de modelos en relación a otros trabajos anteriores, en los que éstos se crean a partir de cuatro propiedades atómicas (masa atómica, electronegatividad, polarizabilidad y volumen de van der Waals) y dos matrices de adyacencia (NS y SS) (Montero-Torres *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2006; Castillo-Garit *et al.*, 2010, 2011, 2012).

La selección de DM adecuados presenta un claro impacto sobre el desarrollo de los modelos y su calidad de predicción (Chang *et al.*, 2003). En esta ocasión los modelos se confeccionaron a partir de DM de índice lineal basados en relaciones de átomos y su calidad se estudió de acuerdo con los parámetros estadísticos comúnmente utilizados en la evaluación de algoritmos de predicción: coeficiente de correlación de Matthews (C), exactitud total (Q), sensibilidad (S), especificidad (E) y razón de falsa alarma (RFA) (Baldi *et al.*, 2000). Cabe mencionar que dicho trabajo propone a la E como la probabilidad de que una predicción positiva sea correcta (o lo que es lo mismo, como el valor predictivo positivo), habiéndose recurrido a esta definición en anteriores estudios de predicción de actividad (Montero-Torres *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2006; Castillo-Garit *et al.*, 2010, 2011, 2012, 2015). Sin embargo, en el presente trabajo se mantuvo la definición clásica de E, la cual se refiere a la probabilidad de clasificar correctamente un caso negativo (en este caso, un compuesto inactivo) y se prefirió la inclusión del parámetro precisión ($Prec$) como indicador del valor predictivo positivo (Tabla 5).

Los 45 modelos QSAR/ADL obtuvieron valores de Q superiores al 80,52% y de C mayores de 0,60 para las SE y SP, alcanzándose los valores máximos con el modelo **45**. Con respecto a estos parámetros, el valor de C se considera más eficaz para evaluar su poder predictivo, al medir la correlación lineal existente entre las variables independientes (DM) y la dependiente (clasificación) en la ecuación discriminante (Baldi *et al.*, 2000; Castillo-Garit *et al.*, 2012). La RFA también resulta indispensable para evaluar la calidad de los modelos, debido a que refleja el número de compuestos clasificados erróneamente como activos por el sistema (falsos positivos, FP) y su valor debe ser lo más bajo posible para no interferir en el cribado virtual (CV), siendo inferior al 31,30% para las SE y SP en estos modelos.

Otros parámetros como la λ de Wilks y el cuadrado de la distancia de Mahalanobis (D^2) determinan la calidad de la función discriminante, indicando el primero de ellos la capacidad de discriminación global que muestra el sistema clasificador adquiriendo valores desde 0 (discriminación perfecta) hasta 1 (ausencia de discriminación), mientras que la D^2 mide la separación existente entre el grupo de compuestos activos e inactivos y por tanto es preferible que adopte valores elevados (Casañola-Martín *et al.*, 2015). En general, todos los modelos mostraron parámetros estadísticos adecuados para ambas SE y SP (Tabla 52), destacando entre todos ellos el modelo **45**. Como resume la Tabla 73, sus resultados fueron comparables a los obtenidos previamente con otros modelos QSAR/ADL de predicción de

actividad tripanocida construidos con DM de índices lineal (IL), bilineal (IBL) o cuadrático (IQ) y basados en relaciones de átomos o de enlaces (Vega *et al*., 2006; Castillo-Garit *et al*., 2010, 2011, 2012).

Tabla 73. Comparación del modelo **45** con otros modelos QSAR/ADL de la literatura empleados para el CV de compuestos potencialmente tripanocidas.

Mod.	Índice	SE				SP				λ Wilks	D^2	Fuente
		C	*Q*	*S*	*RFA*	*C*	*Q*	*S*	*RFA*			
45	ILBA-Gral	0,84	92,03	92,60	8,71	0,80	89,94	89,27	9,16	0,32	8,69	
Ec. 1	IQBANS-E	0,87	93,06	92,31	4,92	0,88	94,23	95,24	3,33	0,36	7,10	[a]
Ec. 1	ILBANS-E	0,91	95,45	92,86	2,63	1,00	100	100	0,00	0,32	8,27	[b]
Ec. 1	IQBENS-E	0,86	93,35	98,33	ND	0,90	95,74	100	—	0,35	8,10	[c]
Ec. 2	IQBESS-M	0,73	87,57	87,50	ND	0,69	86,17	91,30	—	0,50	4,41	[c]
Ec. 1	ILBENS-P	0,79	90,46	89,17	ND	0,83	92,55	100	—	0,40	6,33	[d]
Ec. 2	ILBESS-M	0,82	91,33	92,50	ND	0,79	90,43	100	—	0,43	5,61	[d]
Ec. 1	IBLBANS	0,76	89,02	85,83	9,29	0,67	85,11	91,30	16,90	0,42	5,97	[e]
Ec. 2	IBLBASS	0,77	89,60	85,33	9,73	0,66	88,30	95,65	14,08	0,45	5,36	[e]
Ec. 1	IBLBENS	0,73	87,86	84,17	10,18	0,67	86,17	86,96	14,08	0,46	5,17	[f]
Ec. 2	IBLBENS	0,70	86,42	83,33	11,95	0,69	86,17	91,30	15,49	0,51	4,22	[f]

[a] Montero-Torres *et al*. (2005). [b] Vega *et al*. (2006). [c] Castillo-Garit *et al*. (2010). [d] Castillo-Garit *et al*. (2011). [e] Castillo-Garit *et al*. (2012). [f] Castillo-Garit *et al*. (2015).

De acuerdo con los principios establecidos por la OECD *(Organization for Economic Cooperation and Development)* para la validación de modelos QSAR, estos estudios deben contemplar los siguientes aspectos (Gramatica, 2007; Dearden *et al*., 2009):

- Un punto de medición definido: en este caso, la clasificación de compuestos activos e inactivos frente a *T. cruzi* mediante su valor de CI_{50}. Idealmente, los modelos QSAR deben desarrollarse a partir de BD homogéneas en las que los datos experimentales provengan de un único protocolo estandarizado. Sin embargo y como se ha comentado en el punto anterior, es difícil llevar a la práctica la creación de BD homogéneas y frecuentemente se recurre a la combinación de datos obtenidos a partir de distintas metodologías.
- Un algoritmo no ambiguo: en este trabajo se estableció una metodología bien definida basada en: (i) la creación de una BD y definición del criterio de actividad/inactividad, (ii) la construcción de las SE y SP, (iii) el cálculo de DM de índice lineal basados en relaciones de átomos aplicando las diez propiedades atómicas y las cuatro matrices del programa TOMOCOMD-CARDD y (iv) la obtención de la función de clasificación aplicando el análisis discriminante lineal (ADL) realizado a través del programa STATISTICA (versión 10, Statsoft) como método matemático para discriminar la actividad de las moléculas de acuerdo con los DM obtenidos a partir de su estructura química.

- Un dominio de aplicación (DAp) definido: el DAp se define como una región teórica del espacio químico determinada por los DM de cada modelo y el punto de medición, dependiendo por tanto de la naturaleza de los compuestos que forman la SE. En otras palabras, el DAp de un modelo QSAR mide el rango de tolerancia que el sistema posee para una nueva molécula, de modo que sus predicciones sólo resultan fiables para aquellos casos que se encuentran dentro del DAp para el que han sido desarrollados. La necesidad de concretar un DAp señala que los modelos QSAR muestran una serie de limitaciones relacionadas con las estructuras químicas, propiedades fisicoquímicas y mecanismos de acción a partir de las que realizan las correspondientes predicciones (Castillo-Garit *et al*., 2012; Martins Alho *et al*., 2014).
- Medidas apropiadas de robustez y predictibilidad (procedimientos de validación interna y externa, respectivamente): la robustez de los modelos QSAR seleccionados para el CV se confirmó mediante las técnicas de validación cruzada *(LGO, Leave-Group-Out)* y aleatorización de la variable respuesta *(Y-scrambling)*, mientras que la calidad y poder predictivo de todos ellos quedó reflejada a través de los parámetros estadísticos obtenidos para la SP.
- Una interpretación mecanicista, *si es posible*: en este caso no podemos proporcionar una interpretación mecanicista debido a que los modelos de predicción fueron construidos únicamente para obtener la clasificación de los compuestos como activos o inactivos y su selección fue llevada a cabo de acuerdo con el ajuste estadístico de los mismos.

4.3.3. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA MULTICLASIFICADOR

Tras obtener los correspondientes modelos QSAR/ADL, se exploró su combinación formando un sistema multiclasificador (SMC) o ensamble con el propósito de potenciar el poder de predicción de los clasificadores individuales. El estudio de la diversidad de los modelos es fundamental para la confección del correspondiente SMC, ya que uno de los aspectos sobre los que recae la calidad del ensamble reside en partir de clasificadores individuales que además de precisos sean lo más diversos posible (Shipp y Kuncheva, 2002; Kuncheva y Whitaker, 2003). De esta manera y mediante el programa DASDE, a partir de los 45 modelos de predicción se seleccionaron únicamente 16 en base a los resultados obtenidos con las distintas medidas de diversidad que implementa (Tabla 53).

Como estrategia de combinación para la obtención del SMC el programa DASDE se basa en la fusión de clasificadores, la cual asume que todos los modelos son competitivos y complementarios, o lo que es lo mismo, igualmente *expertos* (Meneses Gómez y Cedré Gutiérrez, 2013). De esta manera, las salidas proporcionadas por los distintos clasificadores individuales ($\Delta P\%$) son utilizadas como entradas del SMC para obtener la clasificación final

del sistema (Martins Alho *et al.*, 2014) y su combinación para proceder con esta estrategia puede llevarse a cabo mediante distintas reglas como el voto mayoritatio o diversos métodos estadísticos (Shipp y Kuncheva, 2002; Kuncheva y Whitaker, 2003). A partir de los métodos de combinación que incorpora el programa DASDE (voto mayoritario, promedio, mínimo, máximo y mediana) y aplicando siempre el principio de parsimonia, fueron seleccionados de manera sucesiva un primer SMC constituido por tres modelos individuales (denominado **SMC1**) y en un posterior ensamble dos nuevos SMC (**SMC2** y **SMC3**).

Con respecto al **SMC1**, el mejor ensamble resultó con los modelos **10**, **22** y **29** aplicando como regla de combinación el promedio (Fig. 106), de modo que la clasificación final proporcionada por el **SMC1** surgió de la media de las clasificaciones obtenidas por cada modelo individual que lo constituye. Cabe destacar que en esta ocasión al aplicar el principio de parsimonia y seleccionar el SMC con menor número de clasificadores, el modelo **45** quedó fuera del **SMC1**, no así el modelo **22** el cual muestra un perfil prácticamente idéntico al del anterior (Tabla 52). En la validación del **SMC1**, los tres modelos mostraron robustez y calidad de predicción de acuerdo con los resultados obtenidos en las correspondientes validaciones internas y externa. (Fig. 107–112).

Como alternativas al **SMC1**, en un posterior ensamble se identificaron los **SMC2** y **SMC3**, constituidos respectivamente por los modelos **21**, **22** y **29** y por los modelos **22**, **29** y **45** (Fig. 113). Mientras que el **SMC2** empleó el voto mayoritario para proporcionar la clasificación final de acuerdo con las clasificaciones obtenidas por los tres modelos, en el **SMC3** se recurrió de nuevo al promedio como método de combinación de los clasificadores individuales. En ambos SMC los procesos de validacion interna y externa efectuados sobre los modelos que los integran, corroboraron la robustez y el poder predictivo de los mismos (Fig. 114–117).

Es importante mencionar que tanto el **SMC1**, como los **SMC2** y **SMC3**, se seleccionaron para ser aplicados en el CV en función de sus parámetros estadísticos, de acuerdo con los cuales los tres sistemas ensamblados mejoraron aquellos obtenidos por el modelo **45**, el cual fue establecido como *cut-off*. Como muestra la Tabla 74, los tres SMC optimizaron los parámetros estadísticos referidos a la SE de los respectivos modelos que los integran. De este modo se satisfizo el principal objetivo de los SMC al suponer una mejora en los clasificadores individuales o modelos con el fin de obtener mejores predicciones en el análisis (Meneses Gómez y Cedré Gutiérrez, 2013). Sin embargo, las escasas diferencias detectadas en los resultados estadísticos de los tres SMC obtenidos respectivamente para la SE (Tablas 54 y 63) y la SP (Tablas 55 y 64), permitieron presuponer que los **SMC1**, **SMC2** y **SMC3** mostrarían un comportamiento bastante similar en lo relativo al CV.

Tabla 74. Comparación de los parámetros estadísticos obtenidos para la SE de los distintos SMC y los modelos individuales que integran cada uno.

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
10	0,67	83,75	83,68	83,83	16,17	87,15
22	0,83	91,71	92,41	90,80	9,20	92,94
29	0,78	89,24	90,51	87,56	12,44	90,51
SMC1 10_22_29	0,85	92,47	92,98	91,79	8,21	93,69

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
21	0,69	84,61	84,25	85,07	14,93	88,10
22	0,83	91,71	92,41	90,80	9,20	92,94
29	0,78	89,24	90,51	87,56	12,44	90,51
SMC2 21_22_29	0,84	92,14	92,41	91,79	8,21	93,65

Modelo	*C*	*Q*	*S*	*E*	*RFA*	*Precisión*
22	0,83	91,71	92,41	90,80	9,20	92,94
29	0,78	89,24	90,51	87,56	12,44	90,51
45	0,84	92,03	92,60	91,29	8,71	93,31
SMC3 21_29_45	0,84	92,25	92,41	92,04	7,96	93,83

C: coeficiente de correlación de Matthews, *Q*: exactitud, *S*: sensibilidad, *E*: especificidad, *RFA*: razón de falsa alarma.

4.3.4. CRIBADO VIRTUAL DE LAS SERIES DE SÍNTESIS

Finalmente, como corroboración experimental adicional de los sistemas QSAR/ADL y de los respectivos SMC, se llevó a cabo el CV de 148 moléculas pertenecientes a las series de síntesis evaluadas previamente y cuyas estructuras han sido presentadas en el apartado 2.1.7.1. de esta memoria: derivados de 5-nitroindazol, tetrahidroquinolinas, derivados de cloroquina, tiadiazinas, quelantes heterocíclicos y cromenoazoldionas.

A pesar de los excelentes resultados obtenidos en la confección de los modelos y de los tres SMC, el CV de las moléculas de síntesis generó resultados discordantes con respecto a los obtenidos en los ensayos *in vitro* frente a epimastigotes. Resultan especialmente llamativos los valores de *C* logrados en la estadística global del CV (Tablas 62 y 71), cuya proximidad a 0 apunta hacia una ausencia de correlación entre los DM del sistema y la clasificación *in silico* de estas 148 moléculas (Baldi *et al.*, 2000). Asimismo, los resultados estadísticos del CV obtenidos con los tres SMC (Tablas 62 y 71) manifiestan que en la práctica, ninguno supuso una mejora con respecto a la clasificación del mejor modelo individual (modelo **22** para los **SMC1** y **SMC2**, modelo **45** para el **SMC3**), al contrario de lo

ocurrido con la SE (Tablas 54 y 63). En este contexto, Shipp y Kuncheva (2002) exponen que modelos que *a priori* son considerados como "los mejores" de acuerdo con la estadística de la SE, no siempre resultan serlo cuando se aplican para la evaluación de SP externas.

4.3.5. EXPLORACIÓN DEL DOMINIO DE APLICACIÓN

En un esfuerzo por conocer las posibles causas de los resultados obtenidos en el CV, a partir del **SMC1** se exploraron diferentes aspectos relacionados con su DAp. Estos estudios se realizaron únicamente con el primer SMC debido a que los resultados que se alcanzaron con los **SMC2** y **SMC3** no supusieron una mejora con respecto a los del **SMC1**.

• Dominio de aplicación

Como se ha comentado anteriormente, en la creación de modelos QSAR es necesario definir un DAp para los sistemas clasificadores que posteriormente serán empleados en el CV, que comprenda tanto las moléculas sobre las que se han construido como aquellas objeto del CV. Este aspecto es importante puesto que un clasificador robusto y de calidad no implica que sea válido para predecir la actividad de cualquier molécula del universo de estructuras químicas, sino que sus predicciones son fiables siempre y cuando éstas se realicen para moléculas situadas dentro de dicho DAp (Gramatica, 2007). Por tanto, el DAp es un concepto importante en los estudios QSAR, ya que permite estimar el grado de incertidumbre en la predicción de actividad para una determinada molécula, de acuerdo con la similitud que ésta muestra con las moléculas empleadas para construir el modelo (Weaver y Gleeson, 2008).

El análisis efectuado con el programa Ambit para el **SMC1** indicó que tanto las moléculas de la BD como las sometidas al CV se encuentran en el DAp del sistema. Este hecho sugirió *a priori* que no hay compuestos dentro de la BD que influyan negativamente sobre el **SMC1** *(outliers)*, así como que todos aquellos evaluados en el CV se encuentran dentro del rango de tolerancia del sistema (Martins Alho *et al.*, 2014).

• Análisis de conglomerados

Debido a que todas las moléculas evaluadas en el CV se encuentran dentro del DAp del **SMC1**, otras hipótesis pudieran basarse en: (i) las moléculas son muy parecidas entre sí y el sistema no es capaz de discriminar las ligeras variaciones estructurales responsables de su actividad o inactividad *in vitro*, o en (ii) una baja representación de las mismas en la SE.

Un nuevo análisis de conglomerados de tipo k-medias realizado a partir de los DM del **SMC1** permitió dividir la SE de activas en 20 *clusters*. Por el contrario, las 148 moléculas sometidas al CV quedaron agrupadas en 12 de estos *clusters*, concentrándose el 66,89% de

las mismas únicamente en tres de ellos que suponen apenas el 6,64% de las estructuras que constituyen la SE de moléculas activas. Estos números señalan una escasa diversidad entre las moléculas del CV, lo que a menudo ocurre cuando éstas proceden de series de síntesis donde las diferencias estructurales entre sus miembros son mínimas. De hecho, moléculas que son prácticamente idénticas en sus estructuras muestran con frecuencia actividades opuestas pudiendo causar problemas en su clasificación por los modelos de predicción (Chang *et al.*, 2013). Asimismo, los resultados anteriores acusan una baja representación de las moléculas sometidas al CV en la SE de activos. En efecto, la predicción realizada por los modelos QSAR es fiable cuando el compuesto ensayado *in silico* presenta similitud con los que constituyen la SE (Netzeva *et al.*, 2005). Igualmente, este análisis justifica las diferencias percibidas en los valores estadísticos de la SP de los modelos (Tabla 52) cuya representación en la SE queda garantizada cuando se definen ambas SE y SP (Eriksson *et al.*, 2003), con respecto a la estadística global del CV (Tablas 62 y 71). En este contexto, se ha propuesto que las validaciones externas de los modelos se realicen empleando dos tipos de SP: una constituida por compuestos con amplia representación en la SE (es decir, una SP estricta) y otra con baja representación en la SE (lo que en este trabajo equivaldría a las 148 moléculas del CV), metodología cuya práctica no se encuentra generalizada (Dearden *et al.*, 2009).

Volviendo a la BD, a pesar de que la SE presenta un mayor número de moléculas activas (527 *versus* 402 inactivas), lo que podría afectar negativamente a la clasificación del CV hacia la obtención de casos FP, la baja representación de estas 148 moléculas en la SE de activos podría estar a su vez influyendo sobre los resultados *in silico*, a juzgar por la mayor tendencia que mostraron los modelos individuales y los tres SMC seleccionados hacia su clasificación como compuestos inactivos (Chang *et al.*, 2013).

• Análisis de componentes principales

Mediante análisis de componentes principales (ACP) se llevó a cabo una última exploración de las estructuras que constituyen la SE de activos e inactivos, así como de las moléculas sometidas al CV. El objetivo de esta técnica estadística se basa en reducir la dimensión (número de variables) de las observaciones (en este caso, las moléculas), manteniendo aquellas que suponen el mayor porcentaje de variabilidad en el conjunto de datos. El ACP identifica nuevas variables denominadas componentes principales (CP) o factores, los cuales son independientes entre sí y surgen como resultado de combinaciones lineales de las variables originales (Ferreira, 2002; Sieg *et al.*, 2007).

De las 21 variables que conforman el **SMC1**, el ACP desveló que con tres factores se explica el 84,83% de la varianza, siendo el CP1 responsable del 49,49% y los CP2 y CP3 del 18,62 y 16,72%, respectivamente. Puesto que CP1–CP2 contuvo la mayor información del sistema, se representó el correspondiente *score plot* (Fig. 118) para los compuestos que

forman parte de la SE y los evaluados en el CV. Asimismo, debido a que las varianzas de CP2 y CP3 fueron similares, también se representó la proyección CP1–CP3 (Fig. 119). La representación gráfica de los CP en el denominado como *score plot*, permite visualizar agrupaciones y tendencias entre los compuestos, así como detectar posibles *outliers* (Eriksson *et al.*, 2003; Sieg *et al.*, 2007). De esta manera, es importante tener en cuenta que aquellos puntos que se encuentran alejados de la nube central de compuestos, sugieren un comportamiento distinto al de la mayoría de las observaciones (Sieg *et al.*, 2007). En el caso de que los compuestos alejados de la SE formen parte de la serie evaluada, su predicción podría resultar dudosa, mientras que tratándose de compuestos miembros de la SE éstos podrían reforzar el modelo (Gramatica, 2007). Por tanto, la retirada de estos compuestos ha de considerarse con cautela, ya que supone un reajuste del modelo que a menudo repercute sobre su calidad predictiva, pudiendo impactar de una manera positiva pero también negativamente (Eriksson *et al.*, 2003; Dearden *et al.*, 2009). Por otra parte, en ambos gráficos se aprecia un solapamiento entre las regiones donde se sitúan los compuestos activos e inactivos de la SE que podría estar afectando a la clasificación de las nuevas moléculas, al no existir un patrón claramente diferenciado que la defina. Como se ha tratado en el apartado anterior, en ocasiones la capacidad predictiva de un modelo se puede ver afectada cuando las moléculas que conforman el grupo de activas son similares a las del grupo de inactivas (Chang *et al.*, 2013). Asimismo, ambos *score plots* muestran una mayor tendencia de las 148 moléculas del CV a distribuirse en el espacio que ocupa la SE de inactivas, siendo este hecho más evidente en la proyección CP1–CP3 (Fig. 119).

Todos estos análisis señalan la importancia que tiene para la construcción de los modelos QSAR/ADL partir de una BD en la que todas las estructuras sometidas al CV estén representadas de forma equilibrada (Eriksson *et al.*, 2003). Asimismo, las BD creadas a partir de resultados obtenidos bajo un mismo protocolo disminuyen la variabilidad existente entre los datos biológicos, desembocando generalmente en modelos de predicción de mayor calidad (Cronin y Schultz, 2003; Dearden *et al.*, 2009). Considerando estas afirmaciones, es indispensable llevar a cabo una continua retroalimentación de la BD con nuevas moléculas que hayan sido evaluadas experimentalmente sobre *T. cruzi* y en el caso que nos ocupa, incluir las 148 estructuras sometidas al CV. Por otra parte, en la creación de un modelo QSAR es importante definir de antemano si éste cubrirá un amplio espectro de aplicabilidad comprometiéndose en cierta medida su nivel de predicción, o si por el contrario ésta se verá limitada a determinados grupos de moléculas manteniendo un mayor poder predictivo (Netzeva *et al.*, 2005) para en concordancia, dirigir la elaboración de la BD hacia uno u otro objetivo. En el primer caso, los modelos resultarían de gran aplicación para detectar compuestos activos mediante estrategias de *drug-repurposing*, mientras que el segundo tipo de modelos estaría más orientado a la detección de compuestos activos dentro de series de síntesis concretas.

CONCLUSIONS
CONCLUSIONES

"Nothing is impossible,
the word itself says: I´m possible"

- Audrey Hepburn -

5. CONCLUSIONS

1. 5-Nitroindazole derivatives constitute several series of synthetic molecules with outstanding activity on *Trypanosoma cruzi*. Concretely, 1,2-disubstituted 5-nitroindazolinones show better effectiveness than those with 3-alkoxy-5-nitroindazole scaffold and therefore, the former have been identified as prototypes of antichagasic drugs.

2. The most promising 5-nitroindazolinones result from the introduction of a benzyl moiety at the N-2 position of the indazole scaffold. Among them, compounds **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR99** and **VATR100**, achieve similar trypanocidal profiles over both drug-sensitive (DTU TcVI: CL Brener and Tulahuen) and moderately drug-resistant (DTU TcII: Y) strains. These facts, together with their lack of toxicity, confirm the great selectivity of these derivatives on *T. cruzi*.

3. 5-Nitroindazole derivatives display a different behavior against replicative and non-replicative forms of the parasite, being considerably less active on the latter. These differences suggest that 5-nitroindazoles may be acting specifically upon targets and/or metabolic pathways absent in *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes.

4. The mechanism of action triggered by 5-nitroindazole derivatives in *T. cruzi* is not exactly elucidated. However, oxidative stress induction, mitochondrial affectation and autophagic processes are proposed as part of the machinery involved in parasite death.

5. The low water solubility of several 5-nitroindazole derivatives (i.e., **VATR1**, **VATR3** and **VATR75**) interferes over their effectiveness as treatment during the acute infection of *T. cruzi* in mice. The optimization of their physicochemical properties by applying pharmaceutical technology resources arises as an alternative to obtain better activity profiles *in vivo*.

6. Among the 22 tetrahydroquinolines assayed, five are active over intracellular amastigotes of *T. cruzi* CL-B5 *lacZ* without any toxic effect towards the host cell.

7. None of the chloroquinoline derivatives is more active than the reference drugs on the intracellular parasite. Nevertheless, derivative **7** is proposed as prototype of putative anti-*T. cruzi* agents, supported by the *in silico* prediction of a good oral bioavailability and a suitable risk profile.

8. Compounds based on the thiadiazine scaffold, chelators or chromenoazolediones have no notable activity in the phenotypic screening carried out on *T. cruzi* epimastigotes.

9. The *in vitro* activity shown by edelfosine on *T. cruzi*, is a preliminary step to reaffirm the potential application of alkyl-lysophospholipid drugs as a chemotherapeutic alternative for the treatment of the disease.

10. Solid dispersions of benznidazole in sodium deoxycholate improve the trypanocidal activity of the reference drug at physiological pH. However, high concentrations of surfactant negatively affect drug cession from formulations in acidic environments and generate lower dissolution profiles, impacting such an effect on benznidazole effectiveness *in vivo*.

11. Solid dispersions of benznidazole and of the two 5-nitroindazolinones **VATR1** and **VATR3** formulated in low-substituted hydroxypropylcellulose, enhance the low water solubility of these three compounds and therefore, ameliorate their activity prolife when administrated as treatment in the murine model of *T. cruzi* acute infection.

12. TOMOCOMD-CARDD and DASDE combination is an effective strategy to develop multiclassifier systems, based on both the diversity and the statistics displayed by individual predictive models of trypanocidal activity, performed with the molecular descriptors implemented in the first software.

13. The external and internal validation methods applied confirm both robustness and predictive power of the individual models and the multiclassifier systems selected.

14. In QSAR/LDA modeling, it is essential to create a database for which structural variety has been established in advance and thus, defined according to the application finally assigned to these predictive models.

15. A low representation in the database of the molecules subsequently evaluated *in silico*, supposes a critical point in their final correct classification by predictive models.

5. CONCLUSIONES

1. Los derivados de 5-nitroindazol constituyen varias series de moléculas de síntesis con actividad destacable frente a *Trypanosoma cruzi*. Concretamente, los derivados con estructura de 5-nitroindazolinona 1,2-disustituida presentan un mayor potencial que aquellos con estructura de 3-alcoxi-5-nitroindazol, habiéndose identificado los primeros como prototipos para el desarrollo de agentes antichagásicos.

2. Las 5-nitroindazolinonas más prometedoras resultan de la introducción de un grupo bencilo en la posición N-2 del anillo de indazol. De este grupo, los compuestos **VATR1**, **VATR3**, **VATR75**, **VATR99** y **VATR100**, muestran un perfil de actividad similar frente a cepas sensibles (DTU TcVI: CL Brener y Tulahuen) y de moderada resistencia (DTU TcII: Y) a los fármacos de referencia antichagásicos. Su ausencia de toxicidad posiciona a estos derivados como prototipos con elevada selectividad hacia *T. cruzi*.

3. Los derivados de 5-nitroindazol muestran un comportamiento distinto sobre las formas replicativas y no replicativas del parásito, siendo su actividad sobre las primeras considerablemente superior. Estas diferencias sugieren una acción específica de los derivados de 5-nitroindazol sobre dianas y/o rutas metabólicas ausentes en las formas sanguíneas de *T. cruzi*.

4. No se conoce con exactitud el mecanismo de acción que los derivados de 5-nitroindazol desencadenan en *T. cruzi*. No obstante, la inducción de estrés oxidativo, afectación de la mitocondria e intervención de procesos de autofagia, se postulan como algunos de los efectos involucrados en la muerte celular del parásito.

5. La limitada solubilidad acuosa de ciertos derivados de 5-nitroindazol como **VATR1**, **VATR3** y **VATR75**, interfiere sobre la eficacia de los tratamientos realizados en el modelo murino de infección aguda causada por *T. cruzi*. La optimización de sus propiedades fisicoquímicas mediante la aplicación de diversos recursos de tecnología farmacéutica, se plantea como alternativa para mejorar su perfil de actividad *in vivo*.

6. De las 22 tetrahidroquinolinas evaluadas, cinco son activas frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi* CL-B5 *lacZ*, sin causar efecto tóxico sobre la célula hospedadora.

7. Ningún derivado de cloroquina mejora la actividad de los fármacos de referencia frente al parásito intracelular. No obstante, el derivado **7** se presenta como punto de partida para el desarrollo de potenciales agentes tripanocidas, apoyado por la predicción *in silico* de una adecuada biodisponibilidad oral y ausencia de riesgo potencial.

8. Los compuestos derivados de tiadiazina, quelantes o cromenoazoldionas no presentan una actividad destacable en el ensayo fenotípico realizado frente a epimastigotes de *T. cruzi*.

9. La actividad *in vitro* que muestra la edelfosina frente a *T. cruzi*, supone un primer paso para reafirmar la potencial aplicación de fármacos de tipo alquil-lisofosfolípidos como potencial alternativa terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.

10. A pH fisiológico, las dispersiones sólidas de benznidazol en desoxicolato sódico favorecen la actividad del fármaco de referencia frente a *T. cruzi*. Sin embargo, concentraciones elevadas del surfactante en las formulaciones, comprometen la cesión del principio activo en ambientes ácidos y generan perfiles de disolución más lentos, repercutiendo este efecto sobre la eficacia del benznidazol *in vivo*.

11. Las dispersiones sólidas de benznidazol y de las dos 5-nitroindazolinonas **VATR1** y **VATR3** formuladas en hidroxipropilcelulosa de bajo peso molecular, incrementan la solubilidad acuosa de estos tres compuestos activos y en consecuencia, mejoran considerablemente sus perfiles de actividad en el modelo murino de infección aguda causada por *T. cruzi*.

12. La combinación de los programas TOMOCOMD-CARDD y DASDE resulta una estrategia eficaz para la confección de sistemas multiclasificadores, basados en la diversidad y en la estadística mostrada por los modelos individuales de predicción de actividad tripanocida, creados a partir de los descriptores moleculares que implementa el primer software.

13. Los ejercicios de validación externa e interna llevados a cabo, confirman la robustez y el poder predictivo de los modelos individuales y de los sistemas multiclasificadores seleccionados.

14. En la creación de modelos QSAR/ADL, resulta primordial elaborar una base de datos cuya variedad estructural quede establecida de antemano y venga definida por la aplicación que finalmente se dará a los sistemas de predicción de actividad.

15. La baja representación en la base de datos de las moléculas posteriormente evaluadas *in silico*, supone un punto crítico en su correcta clasificación por los sistemas de predicción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Razaq, W., Kendall, D. A., Bates, T. E. (2011). The effects of antidepressants on mitochondrial function in a model cell system and isolated mitochondria. Neurochem. Res. 36, 327–338.

Ablett, E. M., Sturm, R. A., Parsons, P. G. (1998). Improved β-galactosidase reporter assays: optimization for low activity in mammalian cells. Tech. Tips Online 3, 29–31.

Aguilera-Venegas, B., Olea-Azar, C., Arán, V. J., Speisky, H. (2013). Indazoles: a new top seed structure in the search of efficient drugs against *Trypanosoma cruzi*. Future Med. Chem. 5, 1843–1859.

Aguirre, G., Cerecetto, H., di Maio, R., González, M., Montoya Alfaro, M. E., Jaso, A., Zarranz, B., Ortega, M. A., Aldana, I., Monge-Vega, A. (2004). Quinoxaline *N*,*N*'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 3835–3839.

Allen, D. D., Caviedes, R., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J., Caviedes, P. A. (2005). Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. Drug Dev. Ind. Pharm. 31, 757–768.

Almeida-de-Faria, M., Freymüller, E., Colli, W., Alves, M. J. M. (1999). *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp. Parasitol. 92, 263–274.

Alonso-Padilla, J., Cotillo, I., Presa, J. L., Cantizani, J., Peña, I., Bardera, A. I., Martín, J. J., Rodríguez, A. (2015). Automated high-content assay for compounds selectively toxic to *Trypanosoma cruzi* in a myoblastic cell line. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003493, doi: 10.1371/journal.pntd.0003493.

Alves, M. J. M., Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. IUBMB Life 59, 274–279.

Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. Pharm. Res. 12, 413–420.

Andrade, L. O., Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay: location, invasion, retention. Nat. Rev. Microbiol. 3, 819–823.

Andrews, K. T., Fisher, G., Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 4, 95–111.

Andriani, G., Chessler, A. D. C., Courtemanche, G., Burleigh, B. A., Rodríguez, A. (2011). Activity *in vivo* of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1298, doi: 10.1371/journal.pntd.0001298.

Apt, W., Aguilera, X., Arribada, A., Pérez, C., Miranda, C., Sánchez, G., Zulantay, I., Cortés, P., Rodríguez, J., Juri, D. (1998). Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 133–138.

Apt, W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Des. Devel. Ther. 4, 243–253.

Arán, V. J., Ochoa, C., Boiani, L., Buccino, P., Cerecetto, H., Gerpe, A., González, M., Montero, D., Nogal, J. J., Gómez-Barrio, A., Azqueta, A., López de Ceráin, A., Piro, O. E., Castellano, E. E. (2005). Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. Bioorg. Med. Chem. 13, 3197–3207.

Arán, V. J., Kaiser, M., Dardonville, C. (2012). Discovery of nitroheterocycles active against African trypanosomes. *In vitro* screening and preliminary SAR studies. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 4506–4516.

Arantes, J. M., Pedrosa, M. L., Martins, H. R., Veloso, V. M., de Lana, M., Bahia, M. T., Tafuri, W. L., Carneiro, C. M. (2007). *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. Exp. Parasitol. 117, 43–50.

Araújo-Jorge, T. C., de Castro, S. L. (2000). Doença de Chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ, 2000, 368 p. Antropologia e Saúde collection ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books http://books.scielo.org.

Aravena, C. M., Olea-Azar, C., Cerecetto, H., González, M., Maya, J. D., Rodríguez-Becerra, J. (2011). Potent 5-nitrofuran derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: electrochemical, spectroscopic and biological studies. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 79, 312–319.

Atienza, J., Martínez-Díaz, R. A., Gómez-Barrio, A., Escario, J. A., Herrero, A., Ochoa, C., Rodríguez, J. (1992). Activity assays of thiadiazine derivatives on *Trichomonas vaginalis* and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Chemotherapy 38, 441–446.

Atienza Serna, J. J. (1994). Cribado farmacológico contra *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, Chagas 1909. Tesis de Doctorado. Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid.

Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L. E. Jr, Fornaciari, G., Allison, A. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2034–2039.

Bahia, M. T., de Andrade, I. M., Martins, T. A. F., do Nascimento, A. F. S., Diniz, L. F., Caldas, I. S., Talvani, A., Trunz, B. B., Torreele, E., Ribeiro, I. (2012). Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1870, doi: 10.1371/journal.pntd.0001870.

Bahia, M. T., Diniz, L. F., Mosqueira, V. C. F. (2014a). Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. Expert Opin. Investig. Drugs 23, 1225–1237.

Bahia, M. T., Nascimento, A. F. S., Mazzeti, A. L., Marques, L. F., Gonçalves, K. R., Mota, L. W. R., Diniz, L. F., Caldas, I. S., Talvani, A., Shackleford, D. M., Koltun, M., Saunders, J., White, K. L., Scandale, I., Charman, S. A., Chatelain, E. (2014b). Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 4362–4370.

Baldi, P., Brunak, S., Chauvin, Y., Andersen, C. A. F., Nielsen, H. (2000). Assensing the accuracy of prediction algorithms for clasiffication: an overview. Bioinformatics Review 16, 412–424.

Barr, S. C., Warner, K. L., Kornreic, B. G., Piscitelli, J., Wolfe, A., Benet, L., McKerrow, J. H. (2005). A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 5160–5161.

Barrias, E. S., Reignault, L. C., de Souza, W., Carvalho, T. M. U. (2010). Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. PLoS One 5, e7764, doi: 10.1371/journal.pone.0007764.

Basso, B. (2013). Modulation of immune response in experimental Chagas disease. World J. Exp. Med. 3, 1-10, doi:10.5493/wjem.v3.i1.

Batista, D. G. J., Batista, M. M., de Oliveira, G. M., do Amaral, P. B., Lannes-Vieira, J., Britto, C. C, Junqueira, A., Lima, M. M., Romanha, A. J., Sales Junior, P. A., Stephens, C. E., Boykin, D. W., Soeiro, M. N. C. (2010). Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 2940–2952.

Bellini, M. F., Silistino-Souza, R., Varella-García, M., de Azeredo-Oliveira, M. T. V., Silva, A. E. (2012). Biologic and genetics aspects of Chagas disease at endemic areas. J. Trop. Med. 2012:357948, doi: 10.1155/2012/357948.

Bermello, J. C., Piñeiro, R. P., Fidalgo, L. M., Cabrera, H. R., Navarro, M. S. (2011). Thiadiazine derivatives as antiprotozoal new drugs. Open Med. Chem. J. 5, 51–60.

Bern, C. (2015). Chagas' disease. N. Engl. J. Med. 373, 456–466.

Bernstein, R. E. (1984). Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. J. R. Soc. Med. 77, 608–609.

Bestetti, R. B., Martins, C. A., Cardinalli-Neto, A. (2009). Justice where justice is due: a posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879–1934), the discoverer of American trypanosomiasis (Chagas' disease). Int. J. Cardiol. 134, 9–16.

Bettiol, E., Samanovic, M., Murkin, A. S., Raper, J., Buckner, F., Rodríguez, A. (2009). Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e384, doi: 10.1371/journal.pntd.0000384.

Bilbao-Ramos, P., Sifontes-Rodríguez, S., Dea-Ayuela, M. A., Bolás-Fernández, F. (2012). A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotes. J. Microbiol. Methods. 89, 8–11.

Blackie, M. A. L., Saravanamuthu, A., Fairlamb, A. H., Chibale, K. (2008). Inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by ferrocenic 4-aminoquinoline ureas. ARKIVOC 2008, 52–68.

Boiani, M., Boiani, L., Denicola, A., Torres de Ortiz, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., Sanabria, L., Yaluff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Vega, C., Rolón, M., Gómez-Barrio, A., Cerecetto, H., González, M. (2006). 2*H*-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. J. Med. Chem. 49, 3215–3224.

Boiani, L., Gerpe, A., Arán, V. J., Torres de Ortiz, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., Sanabria, L., Yaluff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A. Maya, J. D., Morello, J. A., Cerecetto, H., González, M. (2009). *In vitro* and *in vivo* antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles. Eur. J. Med. Chem. 44, 1034–1040.

Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., Denicola, A. (2010). Mode of action of nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?. Biochem. Pharmacol. 79, 1736–1745.

Bonaldo, M. C., Souto-Padrón, T., de Souza, W., Goldenberg, S. (1988). Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell Biol. 106, 1349–1358.

Bonse, S., Santelli-Rouvier, C., Barbe, J., Krauth-Siegel, R. L. (1999). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. J. Med. Chem. 42, 5448–5454.

Bot, C., Hall, B. S., Bashir, N., Taylor, M. C., Helsby, N. A., Wilkinson, S. R. (2010). Trypanocidal activity of aziridinyl nitrobenzamide prodrugs. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 4246–4252.

Bovellan, M., Fritzsche, M., Stevens, C., Charras, G. (2010). Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: blebbing in programmed cell death. FEBS J. 277, 58–65.

Braga, M. V., Urbina, J. A., de Souza, W. (2004). Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Antimicrob. Agents 24, 72–78.

Branquinha, M. H., Oliveira, S. S. C., Sangenito, L. S., Sodré, C. L., Kneipp, L. F., d'Avila-Levy, C. M., Santos, A. L. S. (2015). Cruzipain: an update on its potential as chemotherapy target against the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Curr. Med. Chem. 22, 2225–2235.

Brener, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 4, 389–396.

Brener, Z., Golgher, R., Bertelli, M. S., Teixeira, J. A. (1976). Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. J. Protozool. 23, 147–150.

Brennand, A., Gualdrón-López, M., Coppens, I., Rigden, D. J., Ginger, M. L., Michels, P. A. M. (2011). Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. Mol. Biochem. Parasitol. 177, 83–99.

Bressi, J. C., Verlinde, C. L. M. J., Aronov, A. M., Shaw, M. L., Shin, S. S., Nguyen, L. N., Suresh, S., Buckner, F. S., van Voorhis, W. C., Kuntz, I. D., Hol, W. G. J., Gelb, M. H. (2001). Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. J. Med. Chem. 44, 2080–2093.

Britto, C., Cardoso, M. A., Vanni, C. M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S. S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C. M., Wincker, P. (1995). Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology 110, 241–247.

Buckner, F. S., Verlinde, C. L. M. J., La Flamme, A. C., van Voorhis, W. C. (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β-galactosidase. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2592–2597.

Buckner, F. S., Wilson, A. J., van Voorhis, W. C. (1999). Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for β-galactosidase. Infect. Immun. 67, 403–409.

Bueno, J., Ruiz, F. A. R., Estupiñan S. V., Kouznetsov, V. V. (2012). *In vitro* antimycobacterial activity of new 7-chloroquinoline derivatives. Lett. Drug Des. Discov. 9, 126–134.

Buschini, A., Ferrarini, L., Franzoni, S., Galati, S., Lazzaretti, M., Mussi, F., Northfleet de Albuquerque, C., Domingues Zucchi, T. M. A., Poli P. (2009). Genotoxicity revaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. J. Parasitol. Res. 2009:463575, doi: 10.1155/2009/463575.

Bustamante, J. M., Lo Presti, M. S., Rivarola, H. W., Fernández, A. R., Enders, J. E., Fretes, R. E., Paglini-Oliva, P. (2007). Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. Int. J. Antimicrob. Agents 29, 733–737.

Bustamante, J. M., Tarleton, R. L. (2011). Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. Expert Opin. Drug. Discov. 6, 653–661.

Bustamante, J. M., Tarleton, R. L. (2014). Potential new clinical therapies for Chagas disease. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 7, 317-325.

Bustamante, J. M., Craft, J. M., Crowe, B. D., Ketchie, S. A., Tarleton, R. L. (2014). New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J. Infect. Dis. 209, 150–162.

Cáceres, A. J., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quinones, W., Avilan, L., Salazar, L., Dubourdieu, M., Michels, P. A. M., Concepción, J. L. (2003). Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 126, 251–262.

Camargo, E. P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6, 93–100.

Campbell, A. K., Matthews, S. B. (2015). Darwin diagnosed?. Biol. J. Linn. Soc. 116, 964–984.

Campos, M. C., Salomão, K., Castro-Pinto, D. B., León, L. L., Barbosa, H. S., Maciel, M. A. M., de Castro, S. L. (2010). *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 107, 1193–1204.

Canavaci, A. M. C., Bustamante, J. M., Padilla, A. M., Pérez Brandan, C. M., Simpson, L. J., Xu, D., Boehlke, C. L., Tarleton, R. L. (2010). *In vitro* and *in vivo* high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e740, doi: 10.1371/journal.pntd.0000740.

Cançado, J. R. (1999). Criteria of Chagas disease cure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 Suppl. I, 331–335.

Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O., Buekens, P. (2015). Congenital Chagas disease: an update. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 363–368.

Casañola-Martín, G. M., Le-Thi-Thu, H., Pérez-Giménez, F., Marrero-Ponce, Y., Merino-Sanjuán, M., Abad, C., González-Díaz, H. (2015). Multi-output model with Box-Jenkins operators of linear indices to predict multi-target inhibitors of ubiquitin-proteasome pathway. Mol. Divers. 19, 347–356.

Castillo-Garit, J. A., Vega, M. C., Rolón, M., Marrero-Ponce, Y., Kouznetsov, V. V., Amado Torres, D. F., Gómez-Barrio, A., Álvarez Bello, A., Montero, A., Torrens, F., Pérez-Giménez, F. (2010). Computational discovery of novel trypanosomicidal drug-like chemicals by using bond-based non-stochastic and stochastic quadratic maps and linear discriminant analysis. Eur. J. Pharm. Sci. 39, 30–36.

Castillo-Garit, J. A., Vega, M. C., Rolón, M., Marrero-Ponce, Y., Gómez-Barrio, A., Escario, J. A., Álvarez Bello, A., Montero, A., Torrens, F., Pérez-Giménez, F., Arán, V. J., Abad, C. (2011). Ligand-based discovery of novel trypanosomicidal drug-like compounds: *in silico* identification and experimental support. Eur. J. Med. Chem. 46, 3324–3330.

Castillo-Garit, J. A., del Toro-Cortés, O., Kouznetsov, V. V., Puentes, C. O., Romero Bohórquez, A. R., Vega, M. C., Rolón, M., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., Abad, C. (2012). Identification *in silico* and *in vitro* of novel trypanosomicidal drug-like compounds. Chem. Biol. Drug Des. 80, 38–45.

Castillo-Garit, J. A., del Toro-Cortés, O., Vega, M. C., Rolón, M., Rojas de Arias, A., Casañola-Martín, G. M., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., Abad, C. (2015). Bond-based bilinear indices for computational discovery of novel trypanosomicidal drug-like compounds through virtual screening. Eur. J. Med. Chem. 96, 238–244.

Castro, J. A., de Mecca, M. M., Bartel, L. C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum. Exp. Toxicol. 25, 471–479.

Cavalier-Smith, T. (2009). Kingdoms Protozoa and Chromista and the Eozoan root of the eukaryotic tree. Biol. Lett. doi: 10.1098/rsbl.2009.0948.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159–218.

Chagas, C. (1911). Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiolojicos e clinicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3, 219–275.

Chagas, C. (1916a). Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8, 37–60.

Chagas, C. (1916b). Processos patojenicos da tripanozomiase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8, 5–36.

Chagas, C. (1922). The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American trypanosomiasis: historic retrospect. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 15,67–76.

Chang, Y. C., Tai, K. W., Huang, F. M., Huang, M. F. (2000). Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. J. Endod. 26, 440–443.

Chang, C. Y., Hsu, M. T., Esposito, E. X., Tseng, Y. J. (2013). Oversampling to overcome overfitting: exploring the relationship between data set composition, molecular descriptors, and predictive model methods. J. Chem. Inf. Model. 53, 958–971.

Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: toward a new era. J. Biomol. Screen. 20, 22–35.

Chatelain, E., Konar, N. (2015). Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. Drug Des. Devel. Ther. 9, 4807–4823.

Chaves, L. B., Briones, M. R. S., Schenkman, S. (1993). Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 61, 97–106.

Chen, Y. T., Brinen, L. S., Kerr, I. D., Hansell, E., Doyle, P. S., McKerrow, J. H., Roush, W. R. (2010). *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e825, doi: 10.1371/journal.pntd.0000825.

Chin Chung, M., Ferreira, E. I., Santos, J. L., Giarolla, J., Gonçales Rando, D., Almeida, A. E., Longhin Bosquesi, P., Farina Menegon, R., Blau, L. (2008). Prodrugs for the treatment of neglected diseases. Molecules 13, 616–667.

Chun, I. K., Lee, K. M., Lee, K. E., Gwak, H. S. (2012). Effects of bile salts on gastrointestinal absorption of pravastatin. J. Pharm. Sci. 101, 2281–2287.

Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38 Supl. III.

Contreras, V. T., Navarro, M. C., de Lima, A. R., Arteaga, R., Duran, F., Askue, J., Franco, Y. (2002). Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 1213–1220.

Coro, J., Pérez, R., Rodríguez, H., Suárez, M., Vega, C., Rolón, M., Montero, D., Nogal, J. J., Gómez-Barrio, A. (2005). Synthesis and antiprotozoan evaluation of new alkyl-linked bis(2-thioxo-[1,3,5]thiadiazinan-3-yl) carboxylic acids. Bioorg. Med. Chem. 13, 3413–3421.

Coura, J. R., de Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 3–24.

Coura, J. R. (2009). Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 549–554.

Coura, J. R., Dias, J. C. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 Suppl. I, 31–40.

Coura, J. R., Borges-Pereira, J. (2011). Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated?. A comprehensive review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106, 641–645.

Coura, J. R. (2013). Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible?. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 962–967.

Coyle, B., Kavanagh, K., McCann, M., Devereux, M., Geraghty, M. (2003). Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. Biometals 16, 321–329.

Croft, S. L., Snowdon, D., Yardley, V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. J. Antimicrob. Chemother. 38, 1041–1047.

Cronin, M. T. D., Schultz, T. W. (2003). Pitfalls in QSAR. J. Mol. Struc. THEOCHEM 622, 39–51.

Cubillos-Garzón, L. A., Casas, J. P., Morillo, C. A., Bautista, L. E. (2004). Congestive heart failure in Latin America: the next epidemic. Am. Heart. J. 147, 412–417.

Cunha-e-Silva, N., Sant'Anna, C., Pereira, M. G., Porto-Carreiro, I., Jeovanio, A. L., de Souza, W. (2006). Reservosomes: multipurpose organelles?. Parasitol. Res. 99, 325–327.

da Silva, C. F., Batista, M. M., Mota, R. A., de Souza, E. M., Stephens, C. E., Som, P., Boykin, D. W., Soeiro, M. N. C. (2007). Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Biochem. Pharmacol. 73, 1939–1946.

da Silva, C. F., Batista, M. M., Batista, D. G. J., de Souza, E. M., da Silva, P. B., de Oliveira, G. M., Meuser, A. S., Shareef, A. R., Boykin, D. W., Soeiro, M. N. C. (2008). *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 3307–3314.

da Silva, C. F., Batista, D. G. J., Oliveira, G. M., de Souza, E. M., Hammer, E. R., da Silva, P. B., Daliry, A., de Araújo, J. S., Britto, C., Rodrigues, A. C. M., Liu, Z., Farahat, A. A., Kumar, A., Boykin, D. W., Soeiro, M. N. C. (2012). *In vitro* and *in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form – DB1965 – against *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS One 7, e30356, doi: 10.1371/journal.pone.0030356.

da Silva, C. F., Batista, D. G. J., de Araújo J. S., Batista, M. M., Lionel, J., de Souza, E. M., Hammer, E. R., da Silva, P. B., de Mieri, M., Adams, M., Zimmermann, S., Hamburguer, M., Brun, R., Schühly, W., Soeiro, M. N. C. (2013). Activities of psilostachyin A and cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi in vitro* and *in vivo*. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 5307–5314.

da Silva, R. B., Loback, V. B., Salomão, K., de Castro, S. L., Wardell, J. L., Wardell, S. M. S. V., Costa, T. E. M. M., Penido, C. , Henriques, M. G. M. O., Carvalho, S. A., da Silva, E. F., Fraga, C. A. M. (2013). Synthesis and trypanocidal activity of novel 2,4,5-triaryl-N-hydroxylimidazole derivatives. Molecules 18, 3445–3457.

da Silva, C. F., Batista, D. G. J., Batista, M. M., Lionel, J., Hammer, E. R., Brun, R., Soeiro, M. N. C. (2014). *In vitro* and *in vivo* activity of the chloroaryl-substituted imidazole viniconazole against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 141, 367–373.

Date, A. A., Joshi, M. D., Patravale, V. B. (2007). Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. Adv. Drug Deliver. Rev. 59, 505–521.

de Araújo, J. S., da Silva, C. F., Batista, D. G. J., da Silva, P. B., Meuser, M. B., Aiub, C. A. F., da Silva, M. F. V., Araújo-Lima, C. F., Banerjee, M., Farahat, A. A., Stephens, C. E., Kumar, A., Boykin, D. W., Soeiro, M. N. C. (2014). The biological activity of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 4191–4195.

de Castro, S. L., Meirelles, M. N. (1990). Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivate upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85, 95–99.

de Meis, J., Morrot, A., Farias-de-Oliveira, D. A., Villa-Verde, D. M., Savino, W. (2009). Differential regional immune response in Chagas disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e417, doi: 10.1371/journal.pntd.0000417.

de Souza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 Suppl. I, 17–36.

de Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biol. Dis. 1:3, doi: 10.1186/1475-9292-1-3.

de Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 Suppl. I, 89–100.

de Souza, W., Rodrigues, J. C. F. (2009). Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009:642502, doi: 10.1155/2009/642502.

de Souza, W., de Carvalho, T. M. U., Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. Int. J. Cell. Biol. 2010:295394, doi: 10.1155/2010/295394.

Dearden, J. C., Cronin, M. T. D., Kaiser, K. L. E. (2009). How not to develop a quantitative structure-activity or structure-property relationship (QSAR/QSPR). SAR QSAR Environ. Res. 20, 241–266.

del Olmo, E., Armas, M. G., López-Pérez, J. L., Ruiz, G., Vargas, F., Giménez, A., Deharo, E., San Feliciano, A. (2001). Anti-*Trypanosoma* activity of some natural stilbenoids and synthetic related heterocyclic compounds. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 2755–2757.

di Maio, R., Cerecetto, H., Seoane, G., Ochoa, C., Arán, V. J., Pérez, E., Gómez-Barrio, A., Muelas, S. (1999). Synthesis and antichagasic properties of new 1,2,6-thiadiazin-3,5-dione 1,1-dioxides and related compounds. Arzneimittelforschung 49, 759–763.

Dias, J. C. P., Amato Neto, V., Luna, E. J. A. (2011). Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 375–379.

Dias, J. C. P., Coura, J. R., Shikanai Yasuda, M. A. (2014). The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 47, 123–125.

Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nat. Rev. Microbiol. 3, 251–261.

Don, R., Ioset, J. R. (2014). Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology 141, 140–146.

Drug for Neglected Disease iniciative. DNDi Annual Report. 2013.

Drug for Neglected Disease iniciative. DNDi Annual Report. 2014.

Dubner, S., Schapachnik, E., Pérez Riera, A. R., Valero, E. (2008). Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and management. Cardiol. J. 15, 493–504.

Dudani, A. K., Gupta, R. S. (1987). Effect of chlorpromazine and trifluoperazine on cytoskeletal components and mitochondria in cultured mammalian cells. Tissue Cell 19, 183–196.

Dudek, A. Z., Arodz, T., Gálvez, J. (2006). Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. Comb. Chem. High Throughput Screen. 9, 213–228.

Durán, N., Marcato, P. D., Teixeira, Z., Durán, M., Costa, F. T. M., Brocchi, M. (2009). State of the art of nanobiotechnology applications in neglected diseases. Curr. Nanosci. 5, 396–408.

Duran-Rehbein, G. A., Vargas-Zambrano, J. C., Cuéllar, A., Puerta, C. J., González, J. M. (2014). Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. Parasite, 21:38, doi: 10.1051/parasite/2014040.

Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 663–669.

Ekins, S., Mestres, J., Testa, B. (2007). *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. Br. J. Pharmacol. 152, 9–20.

Epting, C. L., Coates, B. M., Engman, D. M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 126, 283–291.

Eriksson, L., Jaworska, J., Worth, A. P., Cronin, M. T. D., McDowell, R. M., Gramatica, P. (2003). Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. Environ. Health Perspect. 111, 1361–1375.

Escalona, J., Carrasco, C. R., Padrón, J. A. (2003). Introducción al diseño de fármacos. Folleto para la docencia de la asignatura de Farmacia, Universidad de Oriente.

Fakhfakh, M. A., Fournet, A., Prina, E., Mouscadet, J. F., Franck, X., Hocquemiller, R., Figadère, B. (2003). Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. Bioorg. Med. Chem. 11, 5013–5023.

Faucher, J. F., Baltz, T., Petry, K. G. (1995). Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 81, 441–443.

Fauro, R., Lo Presti, S., Bazan, C., Baez, A., Strauss, M., Triquell, F., Cremonezzi, D., Negrete, O. S., Willhuber, G. C., Paglini-Oliva, P., Rivarola, H. W. (2013). Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. Parasitology 140, 917–927.

Fedorko, M. E., Hirsch, J. G., Cohn, Z. A. (1968a). Autophagic vacuoles produced *in vitro*. I. Studies on cultured macrophages exposed to chloroquine. J. Cell. Biol. 38, 377–391.

Fedorko, M. E., Hirsch, J. G., Cohn, Z. A. (1968b). Autophagic vacuoles produced *in vitro*. II. Studies on the mechanism of formation of autophagic vacuoles produced by chloroquine. J. Cell. Biol. 38, 392–402.

Fernandes, A. B., Neira, I., Ferreira, A. T., Mortara, R. A. (2006). Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. Parasitol. Res. 100, 59–68.

Fernandes, M. C., Andrews, N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. FEMS Microbiol. Rev. 36, 734–747.

Fernandes, M. C., da Silva Jr., E. N., Pinto, A. V., de Castro, S. L., Menna-Barreto, R. F. S. (2012). A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 139, 26–36.

Ferreira, M. (2002). Multivariate QSAR. J. Braz. Chem. Soc. 13, 742–753.

Ferreira, L. F., Jansen, A. M., Araújo, A. (2011). Chagas disease in prehistory. An. Acad. Bras. Cienc. 83, 1041–1044.

Flohé, L. (2012). The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. Biotechnol. Adv. 30, 294–301.

Florencio-Martínez, L., Márquez-Dueñas, C., Ballesteros-Rodea, G., Martínez-Calvillo, S., Manning-Cela, R. (2010). Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 126, 332–336.

Folch-Cano, C., Olea-Azar, C., Arán, V. J., Díaz-Urrutia, C. (2010). ESR and electrochemical study of 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and 2-substituted 3-alkoxy-5-nitro-2*H*-indazoles: reactivity and free radical production capacity in the presence of biological systems. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 75, 375–380.

Fonseca-Berzal, C., Merchán Arenas, D. R., Romero Bohórquez, A. R., Escario, J. A., Kouznetsov, V. V., Gómez-Barrio, A. (2013). Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing β-galactosidase. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 4851–4856.

Fonseca-Berzal, C., Rojas Ruiz, F. A., Escario, J. A., Kouznetsov, V. V., Gómez-Barrio, A. (2014a). *In vitro* phenotypic screening of 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives as putative anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 1209–1213.

Fonseca-Berzal, C., Escario, J. A., Arán, V. J., Gómez-Barrio, A. (2014b). Further insights into biological evaluation of new anti-*Trypanosoma cruzi* 5-nitroindazoles. Parasitol. Res. 113, 1049–1056.

Fonseca-Berzal, C., da Silva, P. B., da Silva, C. F., Vasconcelos, M., Batista, M. M., Escario, J. A., Arán, V. J., Gómez-Barrio, A., Soeiro, M. N. C. (2015a). Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different *Trypanosoma cruzi* strains. Parasitology Open, e10, doi: 10.1017/pao. 2015.4.

Fonseca-Berzal, C., Palmeiro-Roldán, R., Escario, J. A., Torrado, S., Arán, V. J., Torrado-Santiago, S., Gómez-Barrio, A. (2015b). Novel solid dispersions of benznidazole: preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. Exp. Parasitol. 149, 89–91.

Fonseca-Berzal, C., Ibáñez-Escribano, A., Reviriego, F., Cumella, J., Morales, P., Jagerovic, N., Nogal-Ruiz, J. J., Escario, J. A., da Silva, P. B., Soeiro, M. N. C., Gómez-Barrio, A., Arán, V. J. (2016). Antichagasic and trichomonacidal activity of 1-substituted 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-ones and 3-alkoxy-2-benzyl-5-nitro-2*H*-indazoles. Eur. J. Med. Chem. 115, 295–310.

Francisco, A. F., de Abreu Vieira, P. M., Arantes, J. M., Pedrosa, M. L., Martins, H. R., Silva, M., Veloso, V. M., de Lana, M., Bahia, M. T., Tafuri, W. L., Carneiro, C. M. (2008). *Trypanosoma cruzi*: effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. Exp. Parasitol. 120, 314–319.

Francisco, A. F., de Abreu Vieira, P. M., Arantes, J. M., Silva, M., Pedrosa, M. L., Elói-Santos, S. M., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Tafuri, W. L., Carneiro, C. M. (2010). Increase of reactive oxygen species by desferrioxamine during experimental Chagas' disease. Redox Rep. 15, 185–190.

Fry, R. J. M., Staffeldt, E. (1964). Effect of diet containing sodium deoxycholate on intestinal mucosa of mouse. Nature 203, 1396–1398.

Gadelha, C., Wickstead, B., McKean, P. G., Gull, K. (2006). Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. J. Cell. Sci. 119, 2405–2413.

Gaikwad, D. D., Chapolikar, A. D., Devkate, C. G., Warad, K. D., Tayade, A. P., Pawar, R. P., Domb, A. J. (2015). Synthesis of indazole motifs and their medicinal importance: an overview. Eur. J. Med. Chem. 90, 707–731.

Gajate, C., Fonteriz, R. I., Cabaner, C., Álvarez-Noves, G., Álvarez-Rodríguez, Y., Modolell, M., Mollinedo, F. (2000). Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. Int. J. Cancer 85, 674–682.

Gangjee, A., Kurup, S., Namjoshi, O. (2007). Dihydrofolate reductase as a target for chemotherapy in parasites. Curr. Pharm. Des. 13, 609–639.

García-Rodríguez, J. J., de la Torre-Iglesias, P. M., Vegas-Sánchez, M. C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F., Torrado-Santiago, S. (2011). Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: improved anthelmintic activity. Int. J. Pharm. 403, 23–28.

Garzoni, L. R., Caldera, A., Meirelles, M. N., de Castro, S. L., Docampo, R., Meints, G. A., Oldfield, E., Urbina, J. A. (2004a). Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Antimicrob. Agents 23, 273–285.

Garzoni, L. R., Waghabi, M. C., Batista, M. M., de Castro, S. L., Meirelles, M. N., Britto, C. C., Docampo, R., Oldfield, E., Urbina, J. A. (2004b). Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. Int. J. Antimicrob. Agents 23, 286–290.

Gerpe, A., Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., Olea-Azar, C., Rigol, C., Maya, J. D., Morello, A., Piro, O. E., Arán, V. J., Azqueta, A., López de Ceráin, A., Monge, A., Rojas, M. A., Yaluff, G. (2006). Indazole *N*-oxide derivatives as antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. Bioorg. Med. Chem. 14, 3467–3480.

Gilbert, I. H. (2002). Inhibitors of dihydrofolate reductase in *Leishmania* and trypanosomes. Biochim. Biophys. Acta 1587, 249–257.

Gobbi, P., Baez, A., Lo Presti, M. S., Fernández, A. R., Enders, J. E., Fretes, R., Gea, S., Paglini-Oliva, P. A., Rivarola, H. W. (2010). Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 107, 1279–1283.

Gomes, M. L., Galvão, L. M. C., Macedo, A. M., Pena, S. D. J., Chiari, E. (1999). Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 205–210.

Gomes, Y. M., Lorena, V. M. B., Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved?. What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 Suppl. I, 115–121.

Gómez-Ayala, S., Castrillón, J. A., Palma, A., Leal, S. M., Escobar, P., Bahsas, A. (2010). Synthesis, structural elucidation and *in vitro* antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-benzazepine derivatives. Bioorg. Med. Chem. 18, 4721–4739.

Gómez-Barrio, A., Montero-Pereira, D., Nogal-Ruiz, J. J., Escario, J. A., Muelas-Serrano, S., Kouznetsov, V. V., Méndez, L. Y. V., Gonzáles, J. M. U., Ochoa, C. (2006). Antiparasitic properties of homoallylamines and related compounds. Acta Parasitol. 51, 73–78.

Gonçalves, R. L. S., Menna-Barreto, R. F. S., Polycarpo, C. R., Gadelha, F. R., de Castro, S. L., Oliveira, M. F. (2011). A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenerg. Biomembr. 43, 651–661.

González-Martín, G., Figueroa, C., Merino, I., Osuna, A. (2000). Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomatropic carrier: preparation and trypanocidal activity. Eur. J. Pharm. Biopharm. 49, 137–142.

Gramatica, P. (2007). Principles of QSAR models validation: internal and external. QSAR Comb. Sci. 26, 694–701.

Guedes, P. M. M., Veloso, V. M., Tafuri, W. L., Galvão, L. M. C., Carneiro, C. M., Lana, M., Chiari, E., Ataide Soares, K., Bahia, M. T. (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. Acta Trop. 84, 9–17.

Guedes, P. M. M., Silva, G. K., Gutiérrez, F. R. S., Silva, J. S. (2011). Current status of Chagas disease chemotherapy. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 9, 609–620.

Guedes, P. M. M., Veloso, V. M., Mineo, T. W. P., Santiago-Silva, J., Crepalde, G., Caldas, I. S., Nascimento, M. S. L., Lana, M., Chiari, E., Galvão, L. M. C., Bahia, M. T. (2012). Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2, 151–156.

Guedes-da-Silva, F. H., Batista, D. G. J., da Silva, C. F., Meuser, M. B., Simões-Silva, M. R., de Araújo, J. S., Ferreira, C. G., Moreira, O. C., Britto, C., Lepesheva, G. I., Soeiro, M. N. C. (2015). Different therapeutic outcomes of benznidazole and VNI treatment in distinct genders of mouse experimental models of *Trypanosoma cruzi* infection. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 7564–7570.

Guo, J. H., Skinner, G. W., Harcum, W. W., Barnum, P. E. (1998). Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. Pharm. Sci. Tech. Today 1, 254–261.

Gupta, S., Igoillo-Esteve, M., Michels, P. A. M., Cordeiro, A. T. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase of trypanosomatids: characterization, target validation, and drug discovery. Mol. Biol. Int. 2011:135701, doi: 10.4061/2011/13570.

Gutiérrez, F. R., Guedes, P. M. M., Gazzinelli, R. T., Silva, J. S. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunol. 31, 673–685.

Hall, B. S., Bot, C., Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. J. Biol. Chem. 286, 13088–13095.

Hall, B. S., Wilkinson, S. R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 115–123.

Hashimoto, M., Morales, J., Uemura, H., Mikoshiba, K., Nara, T. (2015). A novel method for inducing amastigote-to-trypomastigote transformation *in vitro* in *Trypanosoma cruzi* reveals the importance of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. PLoS One 10, e0135726, doi: 10.1371/journal.pone.0135726.

Henriques, C., Henriques-Pons, A., Meuser-Batista, M., Ribeiro, A. S., de Souza, W. (2014). *In vivo* imaging of mice infected with bioluminescent *Trypanosoma cruzi* unveils novel sites of infection. Parasit. Vectors 7:89, doi: 10.1186/1756-3305-7-89.

Hernandes, M. Z., Cavalcanti, S. M. T., Moreira, D. R. M., de Azevedo Junior, W. F., Leite, A. C. L. (2010). Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. Curr. Drug Targets 11, 303–314.

Herrero, A., Ochoa, C., Atienza, J., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., Martínez-Fernández, A. R. (1992). Synthesis and antiprotozoal properties of 1,2,6-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives. Arch. Pharm. (Weinheim) 325, 509–514.

Holm, R., Müllertz, A., Mu, H. (2013). Bile salts and their importance for drug absorption. Int. J. Pharm. 453, 44–55.

Hrabák, A., Sefrioui, H., Vercruysse, V., Temesi, A., Bajor, T., Vray, B. (1998). Action of chloroquine on nitric oxide production and parasite killing by macrophages. Eur. J. Pharmacol. 354, 83–90.

Hudock, M. P., Sanz-Rodríguez, C. E., Song, Y., Chan, J. M. W., Zhang, Y., Odeh, S., Kosztowski, T., Leon-Rossell, A., Concepción, J. L., Yardley, V., Croft, S. L., Urbina, J. A., Oldfield, E. (2006). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* hexokinase by bisphosphonates. J. Med. Chem. 49, 215–223.

Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J. J., Gómez-Barrio, A., Arán, V. J., Escario, J. A. (2016). *In vitro* trichomonacidal activity and preliminary *in silico* chemometric studies of 5-nitroindazolin-3-one and 3-alkoxy-5-nitroindazole derivatives. Parasitology 143, 34–40.

Igoillo-Esteve, M., Maugeri, D., Stern, A. L., Beluardi, P., Cazzulo, J. J. (2007). The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. An. Acad. Bras. Cienc. 79, 649–663.

Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohé, L., Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Radic. Biol. Med. 45, 733–742.

Jacobs, R. T., Plattner, J. J., Keenan, M. (2011). Boron-based drugs as antiprotozoals. Curr. Opin. Infect. Dis. 24, 586–592.

Jain, A. K., Vaidya, A., Ravichandran, V., Kashaw, S. K., Agrawal, R. K. (2012). Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. Bioorg. Med. Chem. 20, 3378–3395.

Janssens, S., van den Mooter, G. (2009). Review: physical chemistry of solid dispersions. J. Pharm. Pharmacol. 6, 1571–1586.

Jaworska, J., Nikolova-Jeliazkova, N., Aldenberg, T. (2005). QSAR applicability domain estimation by projection of the training set in descriptor space: a review. ATLA 33, 445–459.

Joyeau, R., Maoulida, C., Guillet, C., Frappier, F., Teixeira, A. R. L., Schrevel, J., Santana, J., Grellier, P. (2000). Synthesis and activity of pyrrolidinyl- and thiazolidinyl-dipeptide derivatives as inhibitors of the Tc80 prolyl oligopeptidase from *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Med. Chem. 35, 257–266.

Jullian, C., Morales-Montecinos, J., Zapata-Torres, G., Aguilera, B., Rodríguez, J., Arán, V. J., Olea-Azar, C. (2008). Characterization, phase-solubility and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. Bioorg. Med. Chem. 16, 5078–5084.

Kakemi, K., Sezaki, H., Konishi, R., Kimura, T., Murakami, M. (1970). Effect of bile salts on the gastrointestinal absorption of drugs. I. Chem. Pharm. Bull. 18, 275–280.

Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A. S., Junginger, H. E., Stavchansky, S. A., Midha, K. K., Shah, V. P., Amidon, G. L. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. Mol. Pharmaceut. 2004, 85–96.

Keenan, M., Abbott, M. J., Alexander, P. W., Armstrong, T., Best, W. M., Berven, B., Botero, A., Chaplin, J. H., Charman, S. A., Chatelain, E., von Geldern, T. W., Kerfoot, M., Khong, A., Nquyen, T., McManus, J. D., Morizzi, J., Ryan, E., Scandale, I., Thompson, R. A., Wang, S. Z., White, K. L. (2012). Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. J. Med. Chem. 55, 4189–4204.

Keenan, M., Chaplin, J. H., Alexander, P. W., Abbott, M. J., Best, W. M., Khong, A., Botero, A., Pérez, C., Cornwal, S., Thompson, R. A., White, K. L., Shackleford, D. M., Koltun, M., Chiu, F. C. K., Morizzi, J., Ryan, E., Campbell, M., von Geldern, T. W., Scandale, I., Chatelain, E., Charman, S. A. (2013). Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. J. Med. Chem. 56, 10158–10170.

Kessler, R. L., Gradia, D. F., Pontello Rampazzo, R. C., Lourenco, É. E., Fidêncio, N. J., Manhaes, L., Probst, C. M., Ávila, A. R., Fragoso, S. P. (2013). Stage-regulated GFP expression in *Trypanosoma cruzi*: applications from host-parasite interactions to drug screening. PLoS One 8, e67441, doi: 10.1371/journal.pone.0067441.

Khabnadideh, S., Pez, D., Musso, A., Brun, R., Ruiz Pérez, L. M., González-Pacanowska, D., Gilbert, I. H. (2005). Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. Bioorg. Med. Chem. 13, 2637–2649.

Kim, I., Rodríguez-Enríquez, S., Lemasters, J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch. Biochem. Biophys. 462, 245–253.

Kim, K., Yoon, I., Chun, I., Lee, N., Kim, T., Gwak, H. S. (2011). Effects of bile salts on the lovastatin pharmacokinetics following oral administration to rats. Drug Deliv. 18, 79–83.

Kinnamon, K. E., Poon, B. T., Hanson, W. L., Waits, V. B. (1997). Evidence that certain 8-aminoquinolines are potentially effective drugs against Chagas disease. Ann. Trop. Med. Parasitol. 91, 147–152.

Kohl, L., Bastin, P. (2005). The flagellum of trypanosomes. Int. Rev. Cytol. 244, 227–285.

Kollien, A. H., Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. Parasitol. Today 16, 381–387.

Kouznetsov, V. V., Rodríguez, W., Stashenko, E. E., Ochoa, C., Vega, C., Rolón, M., Pereira, D. M., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. (2004). Transformation of Schiff bases derived from alpha-naphthaldehyde. Synthesis, spectral data and biological activity of new-3-aryl-2-(alpha-naphtyl)-4-thiazolidinones and N-aryl-N-[1-(alpha-naphthyl)but-3-enyl] amines. J. Heterocyclic. Chem. 41, 995–999.

Kouznetsov, V. V., Romero Bohórquez, A. R., Stashenko, E. E. (2007). Three-component imino Diels-Alder reaction with essential oil and seeds of anise: generation of new tetrahydroquinolines. Tetrahedron Lett. 48, 8855–8860.

Krauth-Siegel, R. L., Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochim. Biophys. Acta 1780, 1236–1248.

Kuncheva, L. I., Whitaker, C. J. (2003). Measures of diversity in classifier ensembles and their relationship with the ensemble accuracy. Mach. Learn. 51, 181–207.

Lacuara, J. L., de Barioglio, S. R., de Oliva, P. P., Bernacchi, A. S., de Culasso, A. F., Castro, J. A., Franke de Cazzulo, B. M., Cazzulo, J. J. (1991). Disruption of mitochondrial function as the basis of the trypanocidal effect of trifluoperazine on *Trypanosoma cruzi*. Experientia 47, 612–616.

Lamas, M. C., Villaggi, L., Nocito, I., Bassani, G., Leonardi, D., Pascutti, F., Serra, E., Salomón, C. J. (2006). Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. Int. J. Pharm. 307, 239–243.

Lane, J. E., Bogitsh, B. J., Ribeiro-Rodrigues, R., Kral, M. V., Jones, M. M., Carter, C. E. (1998). Ultrastructural effects of the chelating agent 1,10-phenanthroline on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. Parasitol. Res. 84, 399–402.

Lavorato, S. N., Sales Júnior, P. A., Murta, S. M. F., Romanha, A. J., Alves, R. J. (2015). *In vitro* activity of 1,3-bisaryloxypropanamines against *Trypanosoma cruzi*-infected L929 cultures. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 566–568.

Le-Senne, A., Muelas-Serrano, S., Fernández-Portillo, C., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. (2002). Biological characterization of a β-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 1101–1105.

Leonardi, D., Salomón, C. J., Lamas, M. C., Olivieri, A. C. (2009). Development of novel formulations for Chagas' disease: optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. Int. J. Pharm. 367, 140–147.

Leonardi, D., Salomón, C. J. (2013). Unexpected performance of physical mixtures over solid dispersions on the dissolution behavior of benznidazole from tablets. J. Pharm. Sci. 102, 1016–1023.

Lepesheva, G. I., Hargrove, T. Y., Anderson, S., Kleshchenko, Y., Furtak, V., Wawrzak, Z., Villalta, F., Waterman, M. R. (2010). Structural insights into inhibition of sterol 14α-demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 285, 25582–25590.

Lepesheva, G. I., Waterman, M. R. (2011). Sterol 14α-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. Curr. Top. Med. Chem. 11, 2060–2071.

Leuner, C., Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 47–60.

Lewis, M. D., Francisco, A. F., Taylor, M. C., Burrell-Saward, H., McLatchie, A. P., Miles, M. A., Kelly, J. M. (2014). Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. Cell. Microbiol. 16, 1285–1300.

Lewis, M. D., Francisco, A. F., Taylor, M. C., Kelly, J. M. (2015). A new experimental model for assessing drug efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection based on highly sensitive *in vivo* imaging. J. Biomol. Screen. 20, 36–43.

Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S., Nussenzweig, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. J. Exp. Med. 168, 649–659.

Li, F. Q., Hu, J. H. (2004). Improvement of the dissolution rate of silymarin by means of solid dispersions. Chem. Pharm. Bull. 52, 972–973.

Lima, A. A. N., Soares-Sobrinho, J. L., Silva, J. L., Corrêa-Júnior, R. A. C., Lyra, M. A. M., Santos, F. L. A., Oliveira, B. G., Hernandes, M. Z., Rolim, L. A., Rolim-Neto, P. J. (2011). The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. J. Pharm. Sci. 100, 2443–2451.

Lima, A. A. N., Soares-Sobrinho, J. L., Lyra, M. A. M., dos Santos, F. L. A., Figueirêdo, C. B. M., Rolim-Neto, P. J. (2015). Evaluation of *in vitro* dissolution of benznidazole and binary mixtures: solid dispersions with hydroxyprpylmethylcellulose and β-cyclodextrin inclusion complexes. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 7, 371–375.

Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M., Serrano, M. G., Buck, G. A., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 151, 166–177.

Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. N., Bruce, R. D., Stitzel, K. A., Walker, A. P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J. A., Myers, R. C. (1995). Comparison of the up-and-down, conventional LD_{50}, and fixed-dose acute toxicity procedures. Food Chem. Toxicol. 33, 223–231.

Lira, R., Contreras, L. M., Santa Rita, R. M., Urbina, J. A. (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. J. Antimicrob. Chemother. 47, 537–546.

Loo, V. G., Lalonde, R. G. (1984). Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 45, 726–730.

Luize, P. S., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., García Cortez, D. A., Morgado-Díaz, J. A., de Souza, W., Nakamura, C. V. (2006). Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 100, 31–37.

Lyra, M. A. M., Soares-Sobrinho, J. L., Figueiredo, R. C. B. Q., Sandes, J. M., Lima, A. A. N., Tenório, R. P., Fontes, D. A. F., dos Santos, F. L. A., Rolim, L. A., Rolim-Neto, P. J. (2012). Study of benznidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. J. Incl. Phenom. Macro. 73, 397–404.

Ma, C. M., Cai, S. Q., Cui, J. R., Wang, R. Q., Tu, P. F., Hattori, M., Daneshtalab, M. (2005). The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. Eur. J. Med. Chem. 40, 582–589.

Magdaleno, A., Ahn, I. Y., Paes, L. S., Silber, A. M. (2009). Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. PLoS One 4, e4534, doi: 10.1371/journal.pone.0004534.

Manandhar, K. D., Yadav, T. P., Prajapati, V. K., Kumar, S., Rai, M., Dube, A., Srivastava, O. N., Sundar, S. (2008). Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. J. Antimicrob. Chemother. 62, 376–380.

Manarin, R., Lamas, M. C., Bottasso, E., Serra, E., Revelli, S., Salomón, C. J. (2013). Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Int. 62, 79–81.

Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation 115, 1109–1123.

Marrero-Ponce, Y., Valdés-Martini, J. R., Jacas, C. R. G. (2012). TOMOCOMD-CARDD. QuBiLS software QuBiLs-MAS version 1.0, CAMD-BIR Unit, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Martínez Díaz, R. A. (1996). Variabilidad intraespecífica en *Trypanosoma cruzi* y ensayo de nuevos métodos para el cribado farmacológico. Tesis de Doctorado. Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid.

Martínez-Díaz, R. A., Escario, J. A., Nogal-Ruiz, J. J., Gómez-Barrio, A. (2000). Evaluation of drug activity against intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* employing enzyme immunoassay. J. Clin. Pharm. Ther. 25, 43–47.

Martínez-Díaz, R. A., Escario, J. A., Nogal-Ruiz, J. J., Gómez-Barrio, A. (2001). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 53–59.

Martins Alho, M. A., Marrero-Ponce, Y., Barigye, S. J., Meneses-Marcel, A., Machado Tugores, Y., Montero-Torres, A., Gómez-Barrio, A., Nogal, J. J., García-Sánchez, R. N., Vega, M. C., Rolón, M., Martínez-Fernández, A. R., Escario, J. A., Pérez-Giménez, F., García-Domenech, R., Rivera, N., Mondragón, R., Mondragón, M., Ibarra-Velarde, F., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M. G., Piñero, J., Tytgat, J., Chicharro, R., Arán, V. J. (2014). Antiprotozoan lead discovery by aligning dry and wet screening: prediction, synthesis, and biological assay of novel quinoxalinones. Bioorg. Med. Chem. 22, 1568–1585.

Maugeri, D. A., Cazzulo, J. J. (2004). The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett. 234, 117–123.

Maximiano, F. P., Costa, G. H. Y., de Souza, J., da Cunha-Filho, M. S. S. (2010). Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. Quim. Nova 33, 1714–1719.

Maximiano, F. P., de Paula, L. M., Figueiredo, V. P., de Andrade, I. M., Talvani, A., Sa-Barreto, L. C., Bahia, M. T., da Cunha-Filho, M. S. S. (2011). Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and *in vivo* evaluation in the treatment of Chagas disease. Eur. J. Pharm. Biopharm. 78, 377–384.

Maya, J. D., Repetto, Y., Agosín, M., Ojeda, J. M., Téllez, R., Gaule, C., Morello, A. (1997). Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 86, 101–106.

Maya, J. D., Bollo, S., Núñez-Vergara, L. J., Squella, J. A., Repetto, Y., Morello, A., Périé, J., Chauvière, G. (2003). *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. Biochem. Pharmacol. 65, 999–1006.

Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 146, 601–620.

McCabe, R. E., Remington, J. S., Araújo, F. G. (1984). Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 46, 372–376.

McConnell, H. M., Owicki, J. C., Parce, J. W., Miller, D. L., Baxter, G. T., Wada, H. G., Pitchford, S. (1992). The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. Science 257, 1906–1912.

McKerrow, J. H., Doyle, P. S., Engel, J. C., Podust, L. M., Robertson, S. A., Ferreira, R., Saxton, T., Arkin, M., Kerr, I. D., Brinen, L. S., Craik, C. S. (2009). Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 Suppl. I, 263–269.

Méndez-Lucio, O., Pérez-Villanueva, J., Romo-Mancillas, A., Castillo, R. (2011). 3D-QSAR studies on purine-carbonitriles as cruzain inhibitors: comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA). Med. Chem. Commun. 2, 1058–1065.

Meneses Gómez, M., Cedré Gutiérrez, D. (2013). Ambiente para la búsqueda de combinaciones de modelos bases en multiclasificadores de Quimio-Bioinformática. Trabajo de Licenciatura en Ciencias de la Computación. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Santa Clara.

Menna-Barreto, R. F. S., Corrêa, J. R., Cascabulho, C. M., Fernandes, M. C., Pinto, A. V., Soares, M. J., de Castro, S. L. (2009a). Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 136, 499–510.

Menna-Barreto, R. F. S., Salomão, K., Dantas, A. P., Santa-Rita, R. M., Soares, M. J., Barbosa, H. S., de Castro, S. L. (2009b). Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. Micron 40, 157–168.

Menna-Barreto, R. F. S., Gonçalves, R. L. S., Costa, E. M., Silva, R. S. F., Pinto, A. V., Oliveira, M. F., de Castro, S. L. (2009c). The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radic. Biol. Med. 47, 644–653.

Menna-Barreto, R. F. S., de Castro, S. L. (2014). The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. Biomed. Res. Int. 2014:614014, doi: 10.1155/2014/614014.

Miguel, D. C., Ferraz, M. L., Alves, R. O., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Torrecilhas, A. C., Romanha, A. J., Uliana, S. R. (2010). The anticancer drug tamoxifen is active against *Trypanosoma cruzi in vitro* but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 945–948.

Minini, L., Álvarez, G., González, M., Cerecetto, H., Merlino, A. (2015). Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors. Insights into the inhibition mechanism and selectivity. J. Mol. Graph. Model 58, 40–49.

Miranda, C. G., Solana, M. E., Curto, M. L., Lammel, E. M., Schijman, A. G., Alba Soto, C. D. (2015). A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi.* Acta Trop. 152, 8–16.

Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., Pou, D., Roure, S., Cabezos, J., Valerio, L., Blanco-Grau, A., Sánchez-Montalvá, A., Vidal, X., Pahissa, A. (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. N. Engl. J. Med. 370, 1899–1908

Molina, I., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A. (2015). The use of posaconazole against Chagas disease. Curr. Opin. Infect. Dis. 28, 397–407.

Moncada, C., Repetto, Y., Aldunate, J., Letelier, M. E., Morello, A. (1989). Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. Comp. Biochem. Physiol. C 94, 87–91.

Monge-Maillo, B., López-Vélez, R. (2015). Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. Clin. Infect. Dis. 60, 1398–1404.

Montero-Torres, A., Vega, M. C., Marrero-Ponce, Y., Rolón, M., Gómez-Barrio, A., Escario, J. A., Arán, V. J., Martínez-Fernández, A. R., Meneses-Marcel, A. (2005). A novel non-stochastic quadratic fingerprints-based approach for the 'in silico' discovery of new antitrypanosomal compounds. Bioorg. Med. Chem. 13, 6264–6275.

Moraes, C. B., Giardini, M. A., Kim, H., Franco, C. H., Araujo-Junior, A. M., Schenkman, S., Chatelain, E., Freitas-Junior, L. H. (2014). Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. Sci. Rep. 4:4703, doi: 10.1038/srep04703.

Morales, P., Vara, D., Gómez-Cañas, M., Zúñiga, M. C., Olea-Azar, C., Goya, P., Fernández-Ruiz, J., Díaz-Laviada, I., Jagerovic, N. (2013). Synthetic cannabinoid quinones: preparation, *in vitro* antiproliferative effects and *in vivo* prostate antitumor activity. Eur. J. Med. Chem. 70, 111–119.

Morales, P., Blasco-Benito, S., Andradas, C., Gómez-Cañas, M., Flores, J. M., Goya, P., Fernández-Ruiz, J., Sánchez, C., Jagerovic, N. (2015). Selective, nontoxic CB2 cannabinoid o-quinone with *in vivo* activity against triple-negative breast cancer. J. Med. Chem. 58, 2256–2264.

Moreno, M., D'ávila, D. A., Silva, M. N., Galvão, L. M. C., Macedo, A. M., Chiari, E., Gontijo, E. D., Zingales, B. (2010). *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility *in vitro* does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 918–924.

Morilla, M. J., Montanari, J. A., Prieto, M. J., López, M. O., Petray, P. B., Romero, E. L. (2004). Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. Int. J. Pharm. 278, 311–318.

Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A. Jr., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velázquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S. J., Yusuf, S., BENEFIT Investigators (2015). Randomized trial of benznidazole for Chronic Chagas' cardiomyopathy. N. Engl. J. Med. 373, 1295–1306.

Muelas, S., di Maio, R., Cerecetto, H., Seoane, G., Ochoa, C., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. (2001). New thiadiazine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Folia Parasitol. (Praha) 48, 105–108.

Muelas, S., Suárez, M., Pérez, R., Rodríguez, H., Ochoa, C., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. (2002). *In vitro* and *in vivo* assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2*H*-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 269–272.

Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J., Gómez-Barrio, A. (2000). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res. 86, 999–1002.

Muelas Serrano, S. (2001). Cribado farmacológico contra *Trypanosoma cruzi*. Estandarización y aplicación de nuevas técnicas. Tesis de Doctorado. Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid.

Muelas-Serrano, S., Le-Senne, A., Fernández-Portillo, C., Nogal, J. J., Ochoa, C., Gómez-Barrio, A. (2002). *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 553–557.

Müller, S., Liebau, E., Walter, R. D., Krauth-Siegel, R. L. (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol. 19, 320–328.

Mura, F., Speisky, H., Arán, V. J., Maya, J. D., Olea-Azar, C., Aguilera-Venegas, B. (2013). Indazoles and quinazolines as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: an electrochemical, ESR and biological study. J. Espectrosc. Dyn. 2013, 3.

Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz, M. J., Iborra, M. A., Segovia, M. (2010). Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1759–1764.

Muro, B., Reviriego, F., Navarro, P., Marín, C., Ramírez-Macías, I., Rosales, M. J., Sánchez-Moreno, M., Arán, V. J. (2014). New perspectives on the synthesis and antichagasic activity of 3-alkoxy-1-alkyl-5-nitroindazoles. Eur. J. Med. Chem. 74, 124–134.

Muscia, G. C., Cazorla, S. I., Frank, F. M., Borosky, G. L., Buldain, G. Y., Asís, S. E., Malchiodi, E. L. (2011). Synthesis, trypanocidal activity and molecular modeling studies of 2-alkylaminomethylquinoline derivatives. Eur. J. Med. Chem. 46, 3696–3703.

Nagajyothi, F., Machado, F. S., Burleigh, B. A., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., Mukherjee, S., Lisanti, M. P., Weiss, L. M., Garg, N. J., Tanowitz, H. B. (2012). Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cell. Microbiol. 14, 634–643.

Nava-Zuazo, C., Estrada-Soto, S., Guerrero-Álvarez, J., León-Rivera, I., Molina-Salinas, G. M., Said-Fernández, S., Chan-Bacab, M. J., Cedillo-Rivera, R., Moo-Puc, R., Mirón-López, G., Navarrete-Vázquez, G. (2010). Design, synthesis, and *in vitro* antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas. Bioorg. Med. Chem. 18, 6398–6403.

Ndao, M., Beaulieu, C., Black, W. C., Isabel, E., Vasquez-Camargo, F., Nath-Chowdhury, M., Massé, F., Mellon, C., Methot, N., Nicoll-Griffith, D. A. (2014). Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 1167–1178.

Netzeva, T. I., Worth, A. P., Aldenberg, T., Benigni, R., Cronin, M. T., Gramatica, P., Jaworsa, J. S., Kahn, S., Klopman, G., Marchant, C. A., Myatt, G., Nikolova-Jeliazkova, N., Patlewicz, G. Y., Perkins, R., Roberts, D. W., Schultz, T. W., Stanton, D. T., van de Sandt, J. J. M., Tong, W., Veith, G., Yang, C. (2005). Current status of methods for defining the applicability domain of (quantitative) structure-activity relationships. ATLA 33, 1–19.

Norman, F. F., López-Vélez, R. (2013). Chagas disease and breast-feeding. Emerg. Infect. Dis. 19, 1561–1566.

Nwaka, S., Hudson, A. (2006). Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nat. Rev. Drug. Discov. 5, 941–955.

Ochoa, C., Pérez, E., Pérez, R., Suárez, M., Ochoa, E., Rodríguez, H., Gómez-Barrio, A., Muelas, S., Nogal, J. J., Martínez, R. A. (1999). Synthesis and antiprotozoan properties of new 3,5-

disubstituted-tetrahydro-2*H*-1,3,5-thiadiazine-2-thione derivatives. Arzneimittelforschung 49, 764–769.

Oliveira, G. (2015). Cancer and parasitic infections: similarities and opportunities for the development of new control tools. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 47, 1–2.

Olivieri, B. P., Cotta-de-Almeida, V., Araújo-Jorge, T. (2002). Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3790–3796.

Olivieri, B. P., Molina, J. T., de Castro, S. L., Pereira, M. C., Calvet, C. M., Urbina, J. A., Araújo-Jorge, T. C. (2010). A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. Int. J. Antimicrob. Agents. 36, 79–83.

Olmo, F., Gómez-Contreras, F., Navarro, P., Marín, C., Yunta, M. J., Cano, C., Campayo, L., Martín-Oliva, D., Rosales, M. J. R., Sánchez-Moreno, M. (2015). Synthesis and evaluation of *in vitro* and *in vivo* trypanocidal properties of a new imidazole-containing nitrophthalazine derivative. Eur. J. Med. Chem. 106, 106–119.

OMS (2002). Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 905, OMS, Ginebra.

Otsuka, M., Ofusa, T., Matsuda, Y. (1998). Dissolution improvement of water-insoluble glybuzole by co-grinding and co-melting with surfactants and their physicochemical properties. Colloids Surf. B. Biointerfaces 10, 217–226.

Paes, L. S., Mantilla, B. S., Barison, M. J., Wrenger, C., Silber, A. M. (2011). The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to target new drugs against Chagas' disease. Curr. Pharm. Des. 17, 2074–2099.

Pagliero, R. J., Lusvarghi, S., Pierini, A. B., Brun, R., Mazzieri, M. R. (2010). Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. Bioorg. Med. Chem. 18, 142–150.

Palmeiro-Roldán, R., Fonseca-Berzal, C., Gómez-Barrio, A., Arán, V. J., Escario, J. A., Torrado-Durán, S., Torrado-Santiago, S. (2014). Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and *in vivo* evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. Int. J. Pharm. 472, 110–117.

Patel, B. P., Patel, D. M., Patel, J. K. (2012). A review on techniques which are useful for solubility enhancement of poorly water soluble drugs. Int. J. Res. Manag. Pharm. 1.

Patterson, S., Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. Trends Parasitol. 30, 289–298.

Paula, F. R., Jorge, S. D., de Almeida, L. V., Pasqualoto, K. F. M., Tavares, L. C. (2009). Molecular modeling studies and *in vitro* bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. Bioorg. Med. Chem. 17, 2673–2679.

Pereira, P. C. M., Navarro, E. C. (2013). Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 19:34, doi: 10.1186/1678-9199-19-34.

Pérez, C. J., Lymbery, A. J., Andrew Thompson, R. C. (2015). Reactivation of Chagas disease: implications for global health. Trends Parasitol. 31, 595-603.

Pérez-Cruz, F., Jullian, C., Rodríguez, J., Arán, V. J., Olea-Azar, C. (2009). Molecular encapsulation of 5-nitroindazole derivatives in 2,6-dimethyl-β-cyclodextrin: electrochemical and spectroscopic studies. Bioorg. Med. Chem. 17, 4604–4611.

Pérez-Mazliah, D. E., Álvarez, M. G., Cooley, G., Lococo, B. E., Bertocchi, G., Petti, M., Albareda, M. C., Armenti, A. H., Tarleton, R. L., Laucella, S. A., Viotti, R. (2013). Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. J. Antimicrob. Chemother. 68, 424–437.

Pez, D., Leal, I., Zuccotto, F., Boussard, C., Brun, R., Croft, S. L., Yardley, V., Ruiz Pérez, L. M., González Pacanowska, D., Gilbert, I. H. (2003). 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of leishmanial and trypanosomal dihydrofolate reductase. Bioorg. Med. Chem. 11, 4693–4711.

Pinazo, M. J., Espinosa, G., Gállego, M., López-Chejade, P. L., Urbina, J. A., Gascón, J. (2010). Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 583–587.

Pinazo, M. J., Gascón, J. (2015). The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). Acta Trop. 151, 16–20.

Pinto, A. V., de Castro, S. L. (2009). The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. Molecules 14, 4570–4590.

Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Verges, M., Gascón, J., Gómez i Prat, J., Portús, M., Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop. 103, 195–200.

Pizzo, C., Saiz, C., Talevi, A., Gavernet, L., Palestro, P., Bellera, C., Blanch, L. B., Benítez, D., Cazzulo, J. J., Chidichimo, A., Wipf, P., Mahler, S. G. (2011). Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. Chem. Biol. Drug Des. 77, 166–172.

Planer, J. D., Hulverson, M. A., Arif, J. A., Ranade, R. M., Don, R., Buckner, F. S. (2014). Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e2977, doi: 10.1371/journal.pntd.0002977.

Portman, N., Gull, K. (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. Int. J. Parasitol. 40, 135–148.

Portús Vinyeta, M. (2010). La enfermedad de Chagas en España. Chagas disease in Spain. Ars Pharm. 50, 195–204.

Prata, A., Dias, J. C. P., Coura, J. R. (2011). Os primórdios da doença. The beginning of the disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44 Suppl. II, 6–11.

Prati, F., Bergamini, C., Molina, M. T., Falchi, F., Cavalli, A., Kaiser, M., Brun, R., Fato, R., Bolognesi, M. L. (2015). 2-Phenoxy-1,4-naphthoquinones: from a multitarget antitrypanosomal to a potential antitumor profile. J. Med. Chem. 58, 6422-6434.

Raether, W., Hänel, H. (2003). Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol. Res. 90, S19–S39.

Ramírez, J. D., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A. C., Parra, E., Cucunuba, Z. M. (2014). First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. Zoonoses Public Health 61, 477–479.

Ramírez, J. C., Cura, C. I., Moreira, O. C., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., Ramírez, J. D., Alberti, A., Pavia, P., Flores-Chávez, M. D., Muñoz-Calderón, A., Pérez-Morales, D., Santalla, J., Guedes, P. M. M., Peneau, J., Marcet, P., Padilla, C., Cruz-Robles, D., Valencia, E., Crisante, G. E., Greif, G., Zulantay, I., Costales, J. A., Álvarez-Martínez, M., Martínez, N. E., Villarroel, R., Villarroel, S., Sánchez, Z., Bisio, M., Parrado, R., da Cunha Galvão, L. M., Jácome da Câmara, A. C., Espinoza, B., Alarcón de Noya, B., Puerta, C., Riarte, A., Diosque, P., Sosa-Estani, S., Guhl, F., Ribeiro, I., Aznar, C., Britto, C., Yadón, Z. E., Schijman, A. G. (2015). Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. J. Mol. Diagn. 17, 605–615.

Rangel-Yagui, C. O., Hsu, H. W. L., Barbosa, L. R. S., Caetano, W., Pessoa-Jr, A., Tavares, L. C., Itri, R. (2007). Novel potential drug against *T. cruzi* and its interaction with surfactant micelles. Pharm. Dev. Technol. 12, 183–192.

Ranjita, S. (2013). Nanosuspensions: a new approach for organ and cellular targeting in infectious diseases. J. Pharm. Investig. 43, 1–26.

Rasenack, N., Müller, B. W. (2002). Dissolution rate enhancement by *in situ* micronization of poorly water-soluble drugs. Pharmaceut. Res. 19, 1894-1900.

Rassi, A., Luquetti, A. O., Rassi, A. Jr., Rassi, G. G., Rassi, S. G., da Silva, I. G., Rassi, A. G. (2007). Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76, 58–61.

Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. Lancet 375, 1388–1402.

Ravaschino, E. L., Docampo, R., Rodríguez, J. B. (2006). Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis. J. Med. Chem. 49, 426–435.

Repetto, Y., Aldunate, J., Morello, A. (1983). *Trypanosoma cruzi*: carboxylesterase activity in intact epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. B 76, 61–64.

Repetto, Y., Opazo, E., Maya, J. D., Agosín, M., Morello, A. (1996). Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 115, 281–285.

Ribeiro, A. L., Nunes, M. P., Teixeira, M. M., Rocha, M. O. C. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. Nat. Rev. Cardiol. 9, 576–589.

Rivarola, H. W., Paglini-Oliva, P. A. (2002). *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 2, 43–52.

Rodrigues, R. R., Lane, J. E., Carter, C. E., Bogitsh, B. J., Singh, P. K., Zimmerman, L. J., Molenda, J. J., Jones, M. M. (1995). Chelating agent inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. J. Inorg. Biochem. 60, 277–288.

Rodríguez, J., Arán, V. J., Boiani, L., Olea-Azar, C., Lavaggi, M. L., González, M., Cerecetto, H., Maya, J. D., Carrasco-Pozo, C., Cosoy, H. S. (2009a). New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. Bioorg. Med. Chem. 17, 8186–8196.

Rodríguez, J., Gerpe, A., Aguirre, G., Kemmerling, U., Piro, O. E., Arán, V. J., Maya, J. D., Olea-Azar, C., González, M., Cerecetto, H. (2009b). Study of 5-nitroindazoles' anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. Eur. J. Med. Chem. 44, 1545–1553.

Rodríguez, A., Tarleton, R. L. (2012). Transgenic parasites accelerate drug discovery. Trends Parasitol. 28, 90–92.

Rojas Ruiz, F. A., García-Sánchez, R. N., Estupiñan, S. V., Gómez-Barrio, A., Torres Amado, D. F., Martín Pérez-Solórzano, B., Nogal-Ruiz, J. J., Martínez-Fernández, A. R., Kouznetsov, V. V. (2011). Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. Bioorg. Med. Chem. 19, 4562–4573.

Roldos, V., Nakayama, H., Rolón, M., Montero-Torres, A., Trucco, F., Torres, S., Vega, C., Marrero-Ponce, Y., Heguaburu, V., Yaluff, G., Gómez-Barrio, A., Sanabria, L., Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Pandolfi, E. (2008). Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *in silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. Eur. J. Med. Chem. 43, 1797–1807.

Rolón, M. S. (2005). Aplicación del ensayo de resazurina al cribado farmacológico sobre *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Doctorado. Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid.

Rolón, M., Vega, C., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. (2006a). Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol. Res. 99, 103–107.

Rolón, M., Seco, E. M., Vega, C., Nogal, J. J., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., Malpartida, F. (2006b). Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Antimicrob. Agents 28, 104–109.

Romanha, A. J., de Castro, S. L., Soeiro, M. N. C., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., Bourdin, B., Blum, B., Olivieri, B., Zani, C., Spadafora, C., Chiari, E., Chatelain, E., Chaves, G., Calzada, J. E., Bustamante, J. M., Freitas-Junior, L. H., Romero, L. I., Bahia, M. T., Lotrowska, M., Soares, M., Andrade, S. G., Armstrong, T., Degrave, W., Andrade, Z. A. (2010). *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 233–238.

Romero, E. L., Morilla, M. J. (2010). Nanotechnological approaches against Chagas disease. Adv. Drug Deliv. Rev. 62, 576–588.

Romero Bohórquez, A. R., Kouznetsov, V. V. (2010). An efficient and short synthesis of 4-aryl-3-methyltetrahydroquinolines from N-benzylanilines and propenylbenzenes through cationic imino Diels-Alder reactions. Synlett 6, 970–972.

Romero Bohórquez, A. R., Rivero, P. E., Leal, S. M., Kouznetsov, V. V. (2012). *In vitro* activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of 2,4-diaryl 1,2,3,4-tetrahydroquinoline derivatives. Lett. Drug Des. Discov. 9, 802–808.

Salas, C., Tapia, R. A., Ciudad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmerling, U., Ferreira, J., Maya, J. D., Morello, A. (2008). *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and α- and β-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. Bioorg. Med. Chem. 16, 668–674.

Salazar, R., Castillo-Neyra, R., Tustin, A. W., Borrini-Mayori, K., Naquira, C., Levy, M. Z. (2015). Bed bugs *(Cimex lectularius)* as vectors of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 92, 331–335.

Salomão, K., de Santana, N. A., Molina, M. T., de Castro, S. L., Menna-Barreto. R. F. S. (2013). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. BMC Microbiol. 13:196, doi:10.1186/1471-2180-13-196.

Salomón, C. J. (2012). First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. J. Pharm. Sci. 101, 888–894.

Sampson-Ward, L., Urdaneta-Morales, S. (1988). Urban *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of isolates from *Panstrongylus geniculatus*. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 68, 95–106.

Sánchez, G., Cuéllar, D., Zulantay, I., Gajardo, M., González-Martín, G. (2002). Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. Biol. Res. 35, 39–45.

Sanford, K. K., Earle, W. R., Likely, G. D. (1948). The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. J. Natl. Cancer. Inst. 9, 229–246.

Santa-Rita, R. M., Barbosa, H. S., Meirelles, M. N., de Castro, S. L. (2000). Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 75, 219–228.

Santa-Rita, R. M., Lira, R., Barbosa, H. S., Urbina, J. A., de Castro, S. L. (2005). Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. J. Antimicrob. Chemother. 55, 780–784.

Santa-Rita, R. M., Barbosa, H. S., de Castro, S. L. (2006). Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 100, 187–190.

Santos, F. M., Lima, W. G., Gravel, A. S., Martins, T. A. F., Talvani, A., Torres, R. M., Bahia, M. T. (2012). Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1987–1995.

Santos, A. L. S., Sodré, C. L., Valle, R. S., Silva, B. A., Abi-Chacra, E. A., Silva, L. V., Souza-Gonçalves, A. L., Sangenito, L. S., Gonçalves, D. S., Souza, L. O. P., Palmeira, V. F., d'Avila-Levy, C. M., Kneipp, L. F., Kellett, A., McCann, M., Branquinha, M. H. (2012). Antimicrobial action of chelating agents: repercussions on the microorganism development, virulence and pathogenesis. Curr. Med. Chem. 19, 2715–2737.

Sanz-Rodríguez, C. E., Concepción, J. L., Pekerar, S., Oldfield, E., Urbina, J. A. (2007). Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. J. Biol. Chem. 282, 12377–12387.

Saraiva, J., Vega, C., Rolón, M., da Silva, R., Andrade e Silva, M. L., Donate, P. M., Bastos, J. K., Gómez-Barrio, A., de Albuquerque, S. (2007). *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 100, 791–795.

Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Jaramillo, A. M. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hijar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velázquez, E., Téllez, T., Sánchez León, Z., Galvão, L., Nolder, D., Monje Rumi, M., Levi, J. E., Ramírez, J. D., Zorrilla, P., Flores, M., Jercic, M. I., Crisante, G., Añez, N., de Castro, A. M., González, C. I., Acosta Viana, K., Yachelini, P., Torrico, F., Robello, C., Diosque, P., Triana Chávez, O., Aznar, C., Russomando, G., Büscher, P., Assal, A., Guhl, F., Sosa Estani, S., da Silva, A., Britto, C., Luquetti, A., Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e931. doi: 10.1371/journal.pntd.000093.

Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102 Suppl. I, 75–85.

Schmunis, G. A., Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 115, 14–21.

Schofield, C. J., Diotaiuti, L., Dujardin, J. P. (1999). The process of domestication in Triatominae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 Suppl. I, 375–378.

Schofield, C. J., Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop. 110, 88–100.

Schormann, N., Velu, S. E., Murugesan, S., Senkovich, O., Walker, K., Chenna, B. C., Shinkre, B., Desai, A., Chattopadhyay, D. (2010). Synthesis and characterization of potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. Bioorg. Med. Chem. 18, 4056–4066.

Senkovich, O., Bhatia, V., Garg, N., Chattopadhyay, D. (2005). Lipophilic antifolate trimetrexate is a potent inhibitor of *Trypanosoma cruzi*: prospect for chemotherapy of Chagas' disease. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3234–3238.

Sharma, D., Soni, M., Kumar, S., Gupta, G. D. (2009). Solubility enhancement-eminent role in poorly soluble drugs. Res. J. Pharm. Tech. 2, 220–224.

Shikanai-Yasuda, M. A., Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. Clin. Infect. Dis. 54, 845–852.

Shipp, C. A., Kuncheva, L. I. (2002). Relationships between combination methods and measures of diversity in combining classifiers. Inform. Fusion 3, 135–148.

Sieg, S. C., Suh, C., Schmidt, T., Stukowski, M., Rajan, K., Maier, W. F. (2007). Principal component analysis of catalytic functions in the composition space of heterogeneous catalysts. QSAR Comb. Sci. 26, 528–535.

Silva, L. H., Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folha Clin. Biol. 20, 191–207.

Soares-Sobrinho, J. L., Lima, L. N. A., Perrelli, D. C., da Silva, J. L., de Medeiros, F. P. M., de la Roca Soares, M. F., Rolim-Neto, P. J. (2008). Development and *in vitro* evaluation of tablets based on the antichagasic benznidazole. Braz. J. Pharm. Sci. 44, 383–389.

Soares-Sobrinho, J. L., Santos, F. L. A., Lyra, M. A. M., Alves, L. D. S., Rolim, L. A., Lima, A. A. N., Nunes, L. C. C., Soares, M. F. R., Rolim-Neto, P. J., Torres-Labandeira, J. J. (2012). Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. Carbohydr. Polym. 89, 323–330.

Soeiro, M. N. C., de Castro, S. L. (2009). *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. Expert Opin. Ther. Targets 13, 105–121.

Soeiro, M. N. C., de Souza, E. M., da Silva, C. F., Batista, D. G. J., Batista, M. M., Pavão, B. P., de Araújo, J. S., Fortes Aiub, C. A., da Silva, P. B., Lionel, J., Britto, C., Kim, K., Sulikowski, G., Hargrove, T. Y., Waterman, M. R., Lepesheva, G. I. (2013). *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14α-demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 4151–4163.

Solari, A., Ortiz, S., Soto, A., Arancibia, C., Campillay, R., Contreras, M., Salinas, P., Rojas, A., Schenone, H. (2001). Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. J. Antimicrob. Chemother. 48, 515–519.

Stanaway, J. D., Roth, G. (2015). The burden of Chagas disease: estimates and challenges. Glob. Heart 10, 139–144.

Stecconi-Silva, R. B., Andreoli, W. K., Mortara, R. A. (2003). Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 953–958.

Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. Parasit. Vectors 7:317, doi: 10.1186/1756-3305-7-317.

Strasen, J., Williams, T., Ertl, G., Zoller, T., Stich, A., Ritter, O. (2014). Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. Clin. Res. Cardiol. 103, 1–10.

Sykes, M. L., Avery, V. M. (2013). Approaches to protozoan drug discovery: phenotypic screening. J. Med. Chem. 56, 7727–7740.

Szajnman, S. H., Yan, W., Bailey, B. N., Docampo, R., Elhalem, E., Rodríguez, J. B. (2000). Design and synthesis of aryloxyethyl thiocyanate derivatives as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. J. Med. Chem. 43, 1826–1840.

Szajnman, S. H., Montalvetti, A., Wang, Y., Docampo, R., Rodríguez, J. B. (2003). Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 3231–3235.

Szoka, F. C. Jr., Milholland, D., Barza, M. (1987). Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and *in vitro* fungicidal activity of liposome-intercalated amphotericin B. Antimicrob. Agents Chemother. 31, 421–429.

Talevi, A., Bruno-Blanch, L. E. (2009). Screening virtual: una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica. Lat. Am. J. Pharm. 28, 141–150.

Tapia, R. A., Carrasco, C., Ojeda, S., Salas, C., Valderrama, J. A., Morello, A., Repetto, Y. (2002). Synthesis of indazol-4,7-dione derivatives as potential trypanocidal agents. J. Heterocyclic. Chem. 39, 1093–1095.

Tarleton, R. L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 3, 550–554.

Tarral, A., Blesson, S., Mordt, O. V., Torreele, E., Sassella, D., Bray, M. A., Hovsepian, L., Evène, E., Gualano, V., Felices, M., Strub-Wourgaft, N. (2014). Determination of an optimal dosing

regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. Clin. Pharmacokinet. 53, 565–580.

Taylor, M. C., Kelly, J. M. (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. Parasitology 137, 899–917.

Teixeira, A. R., Nascimento, R. J., Sturm, N. R. (2006a). Evolution and pathology in Chagas disease - a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101, 463–491.

Teixeira, A. R., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C., Santos-Buch, C. A. (2006b). Chagas disease. Postgrad. Med. J. 82, 788–798.

Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int. J. Parasitol. 28, 85–104.

Timm, B. L., da Silva, P. B., Batista, M. M., da Silva, F. H. G., da Silva, C. F., Tidwell, R. R., Patrick, D. A., Jones, S. K., Bakunov, S. A., Bakunova, S. M., Soeiro, M. N. C. (2014). *In vitro* and *in vivo* biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 3720–3726.

Tocher, J. H. (1997). Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. Gen. Pharmacol. 28, 485–487.

Tomas, A. M., Miles, M. A., Kelly, J. M. (1997). Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. Eur. J. Biochem. 244, 596–603.

Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., Nussenzweig, V. (1995). The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology 110, 547–554.

Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M. A., Pécoul, B. (2010). Fexinidazole-a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e923, doi: 10.1371/journal.pntd.0000923.

Tran, P. H. L., Tran, T. T. D., Park, J. B., Lee, B. J. (2011). Controlled release systems containing solid dispersions: strategies and mechanisms. Pharmaceut. Res. 28, 2353–2378.

Trump, B. F., Berezesky, I. K. (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. FASEB J. 9, 219–228.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552, 335–344.

Turrens, J. F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Mol. Aspects Med. 25, 211–220.

Tyler, K. M., Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int. J. Parasitol. 31, 472–481.

Urbina, J. A. (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100 Suppl. I, S9–S16.

Urbina, J. A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 115, 55–68.

Urbina, J. A. (2015). Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. J. Eukaryot. Microbiol. 62, 149–156.

Vannier-Santos, M. A., de Castro, S. L. (2009). Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. Curr. Drug Targets 10, 246–260.

Varela, R. E., Villa-Pulgarin, J. A., Yepes, E., Müller, I., Modolell, M., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Muskus, C. E., López-Abán, J., Muro, A., Vélez, I. D., Mollinedo, F. (2012). *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1612, doi: 10.1371/journal.pntd.0001612.

Vasconcelos, T., Sarmento, B., Costa, P. (2007). Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug. Discov. Today 12, 1068–1075.

Vega, C., Rolón, M., Martínez-Fernández, A. R., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. (2005). A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing β-galactosidase. Parasitol. Res. 95, 296–298.

Vega, M. C., Montero-Torres, A., Marrero-Ponce, Y., Rolón, M., Gómez-Barrio, A., Escario, J. A., Arán, V. J., Nogal, J. J., Meneses-Marcel, A., Torrens, F. (2006). New ligand-based approach for the discovery of antitrypanosomal compounds. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 1898–1904.

Vega, M. C., Rolón, M., Montero-Torres, A., Fonseca-Berzal, C., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., Gálvez, J., Marrero-Ponce, Y., Arán, V. J. (2012). Synthesis, biological evaluation and chemometric

analysis of indazole derivatives. 1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug. Eur. J. Med. Chem. 58, 214–227.

Vega Gómez, M. C. (2005). *Trypanosoma cruzi*: nuevos métodos colorimétricos de cribado y alternativas terapéuticas. Tesis de Doctorado. Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid.

Veiga-Santos, P., Desoti, V. C., Miranda, N., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., Silva, S. O., García Cortez, D. A., de Mello, J. C. P., Nakamura, C. V. (2013). The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 125, 349–356.

Velasco-Castrejón, O., Rivas-Sánchez, B. (2008). Apuntes para la historia de la enfermedad de Chagas en México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 65, 57–79.

Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., Gadelha, F. R., Docampo, R. (1991). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi in situ*. J. Biol. Chem. 266, 14431–14434.

Verlinde, C. L. M. J., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Périé, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G. J., Michels, P. A. M. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resist. Updat. 4, 50–65.

Verma, J., Khedkar, V. M., Coutinho, E. C. (2010). 3D-QSAR in drug design-a review. Curr. Top. Med. Chem. 10, 95–115.

Vieira, D. F., Choi, J. Y., Calvet, C. M., Siqueira-Neto, J. L., Johnston, J. B., Kellar, D., Gut, J., Cameron, M. D., McKerrow, J. H., Roush, W. R., Podust, L. M. (2014). Binding mode and potency of *N*-indolyloxopyridinyl-4-aminopropanyl-based inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51. J. Med. Chem. 57, 10162–10175.

Villalta, F., Dobish, M. C., Nde, P. N., Kleshchenko, Y. Y., Hargrove, T. Y., Johnson, C. A., Waterman, M. R., Johnston, J. N., Lepesheva, G. I. (2013). VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. J. Infect. Dis. 208, 504–511.

Viotti, R., Alarcón de Noya, B., Araújo-Jorge, T. C., Grijalva, M. J., Guhl, F., López, M. C., Ramsey, J. M., Ribeiro, I., Schijman, A. G., Sosa-Estani, S., Torrico, F., Gascón J., on behalf of the Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA (2014). Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 635–639.

Vo, C. L. N., Park, C., Lee, B. J. (2013). Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. Eur. J. Pharm. Biopharm. 85, 799–813.

Walum, E. (1998). Acute oral toxicity. Environ. Health. Perspect. 106 Suppl. 2, 497–503.

Weaver, S., Gleeson, M. P. (2008). The importance of the domain of applicability in QSAR modeling. J. Mol. Graph. Model. 26, 1315–1326.

WHO (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series 975, WHO, Geneva.

WHO (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, WHO, Geneva.

Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 5022–5027.

Wilkinson, S. R., Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert. Rev. Mol. Med. 11:e31, doi: 10.1017/S1462399409001252.

Wilkinson, S. R., Bot, C., Kelly, J. M., Hall, B. S. (2011). Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. Curr. Top. Med. Chem. 11, 2072–2084.

Willett, P. (2006). Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. Drug. Discov. Today 11, 1046–1053.

Wong-Baeza, C., Nogueda-Torres, B., Serna, M., Meza-Toledo, S., Baeza, I., Wong, C. (2015). Trypanocidal effect of the benzyl ester of N-propyl oxamate: a bi-potential prodrug for the treatment of experimental Chagas disease. BMC Pharmacol. Toxicol. 16:10, doi: 10.1186/s40360-015-0010-4.

Yardley, V., Gamarro. F., Croft, S. L. (2010). Antileishmanial and antitrypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 5356–5358.

Yoshida, N. (2009). Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 Suppl. 1, 101–107.

Zhang, J. H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. J. Biomol. Screen. 4, 67–73.

Zingales, B., Pereira, M. E. S., Oliveira, R. P., Almeida, K. A., Umezawa, E. S., Souto, R. P., Vargas, N., Cano, M. I., da Silveira, J. F., Nehme, N. S., Morel, C. M., Brener, Z., Macedo, A. (1997). *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. Acta Trop. 68, 159–173.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 1051–1054.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect. Genet. Evol. 12, 240–253.

Zingales, B., Miles, M. A., Moraes, C. B., Luquetti, A., Guhl, F., Schijman, A. G., Ribeiro, I. (2014). Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 109, 828–833.

Zuccotto, F., Martin, A. C. R., Laskowski, R. A., Thornton, J. M., Gilbert, I. H. (1998). Dihydrofolate reductase: a potential drug target in trypanosomes and leishmania. J. Comput. Aided Mol. Des. 12, 241–257.

Zuccotto, F., Zvelebil, M., Brun, R., Chowdhury, S. F., di Lucrezia, R., Leal, I., Maes, L., Ruiz-Pérez, L. M., González Pacanowska, D., Gilbert, I. H. (2001). Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. Eur. J. Med. Chem. 36, 395–405.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1. PUBLICACIONES

A continuación se incluye la primera página de las publicaciones científicas que recogen los resultados presentados en esta tesis, así como de otras en las en las que he participado:

1. Vega, M. C., Rolón, M., Montero-Torres, A., **Fonseca-Berzal, C.**, Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., Gálvez, J., Marrero-Ponce, Y., Arán, V. J. (2012). Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug. Eur. J. Med. Chem. 58, 214–227.

2. **Fonseca-Berzal, C.**, Merchán Arenas, D. R., Romero Bohórquez, A. R., Escario, J. A., Kouznetsov, V. V., Gómez-Barrio, A. (2013). Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing β-galactosidase. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 4851–4856.

3. Palmeiro-Roldán, R., **Fonseca-Berzal, C.**, Gómez-Barrio, A., Arán, V. J., Escario, J. A., Torrado-Durán, S., Torrado-Santiago, S. (2014). Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and *in vivo* evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. Int. J. Pharm. 472, 110–117.

4. **Fonseca-Berzal, C.**, Rojas Ruiz, F. A., Escario, J. A., Kouznetsov, V. V., Gómez-Barrio, A. (2014a). *In vitro* phenotypic screening of 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives as putative anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 1209–1213.

5. **Fonseca-Berzal, C.**, Escario, J. A., Arán, V. J., Gómez-Barrio, A. (2014b). Further insights into biological evaluation of new anti-*Trypanosoma cruzi* 5-nitroindazoles. Parasitol. Res. 113, 1049–1056.

6. Legarda-Ceballos, A. L., del Olmo, E., López-Abán, J., Escarcena, R., Bustos, L. A., **Fonseca-Berzal, C.**, Gómez-Barrio, A., Dib, J. C., San Feliciano, A., Muro, A. (2015). Trypanocidal activity of long chain diamines and aminoalcohols. Molecules 20, 11554–1568.

7. **Fonseca-Berzal, C.**, da Silva, P. B., da Silva, C. F., Vasconcelos, M., Batista, M. M., Escario, J. A., Arán, V. J., Gómez-Barrio, A., Soeiro, M. N. C. (2015a). Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different *Trypanosoma cruzi* strains. Parasitology Open, e10, doi: 10.1017/pao. 2015.4.

8. **Fonseca-Berzal, C.**, Palmeiro-Roldán, R., Escario, J. A., Torrado, S., Arán, V. J., Torrado-Santiago, S., Gómez-Barrio, A. (2015b). Novel solid dispersions of benznidazole:

preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. Exp. Parasitol. 149, 89–91.

9. **Fonseca-Berzal, C.**, Ibáñez-Escribano, A., Reviriego, F., Cumella, J., Morales, P., Jagerovic, N., Nogal-Ruiz, J. J., Escario, J. A., da Silva, P. B., Soeiro, M. N. C., Gómez-Barrio, A., Arán, V. J. (2016). Antichagasic and trichomonacidal activity of 1-substituted 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-ones and 3-alkoxy-2-benzyl-5-nitro-2*H*-indazoles. Eur. J. Med. Chem. 115, 295–310.

European Journal of Medicinal Chemistry 58 (2012) 214–227

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Original article

Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug

María Celeste Vega [a,b], Miriam Rolón [a,b], Alina Montero-Torres [c], Cristina Fonseca-Berzal [a,d], José Antonio Escario [a,d], Alicia Gómez-Barrio [a,d], Jorge Gálvez [e], Yovani Marrero-Ponce [e,f,g,1], Vicente J. Arán [d,h,*]

[a] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
[b] Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Pai Pérez 265 casi Mariscal Estigarribia, Asunción, Paraguay
[c] Chemical Bioactive Center, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba
[d] CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC, Madrid, Spain
[e] Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular, Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia, Universitat de València, 46100 Burjassot, València, Spain
[f] Unit of Computer-Aided Molecular "Biosilico" Discovery and Bioinformatic Research (CAMD-BIR Unit), Faculty of Chemistry-Pharmacy, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba
[g] Institut Universitari de Ciència Molecular, Universitat de València, Edifici d'Instituts de Paterna, P. O. Box 22085, 46071 València, Spain
[h] Instituto de Química Médica (IQM), CSIC, c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 June 2012
Received in revised form
3 October 2012
Accepted 8 October 2012
Available online 16 October 2012

Dedicated to our dear colleague Dr. Carmen Ochoa de Ocáriz, former director of Instituto de Química Médica (IQM, CSIC, Madrid) for her outstanding contribution to Medicinal Chemistry, on the occasion of her retirement.

Keywords:
Antiprotozoan agents
Chagas disease
Cluster analysis
Cytotoxicity
Indazoles
Structure–activity relationships

ABSTRACT

Chagas disease chemotherapy, currently based on only two drugs, nifurtimox and benznidazole, is far from satisfactory and therefore the development of new antichagasic compounds remains an important goal. On the basis of antichagasic properties previously described for some 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones (**21**, **33**) and in order to initiate the optimization of activity of this kind of compounds, we have prepared a series of related analogs (**22**–**32**, **34**–**38**, **58** and **59**) and tested *in vitro* these products against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. 2-Benzyl-1-propyl (**22**), 2-benzyl-1-isopropyl (**23**) and 2-benzyl-1-butyl (**24**) derivatives have shown high trypanocidal activity and low unspecific toxicity. Other indazole derivatives with different substitution patterns (1-substituted 3-alkoxy-1*H*-indazoles and 2-substituted 3-alkoxy-2*H*-indazoles), arising from the synthetic procedures used to prepare the mentioned indazolinones, have moderate to low effectiveness. The exploration of SAR information using the concept of an activity landscape has been carried out with SARANEA software. We have also searched for structural similarities between 225 known antiprotozoan drugs and compound **22**. The results confirm that compounds **22**–**24** constitute promising leads and that 5-nitroindazolin-3-one system is a novel anti-*T. cruzi* scaffold which may represent an important therapeutic alternative for the treatment of Chagas disease.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease or American trypanosomiasis is a chronic infection caused by the trypanosomatid (Kinetoplastid) protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. This parasitosis, originally endemic to poor rural areas of Latin America is mainly transmitted by hematophagous triatomine insects. Now, owing to intense international migrations, it can also be found in other areas such as Western Europe, USA, Australia, etc.; in these countries where the vectors do not exist, the infection can be transmitted through blood or organ donation, congenitally from infected mothers to newborns, etc [1,2]. Chagas disease is the major parasitic disease burden of the American Continent, representing one of the most important public health problems in this area [3]. Currently, there are ca. 15 million

* Corresponding author. Instituto de Química Médica (IQM), CSIC, c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. Tel.: +34 915622900; fax: +34 915644853.
E-mail addresses: agbarrio@farm.ucm.es (A. Gómez-Barrio), ymarrero77@yahoo.es (Y. Marrero-Ponce), vjaran@iqm.csic.es (V.J. Arán).
[1] URL: http://www.uv.es/yoma/.

0223-5234/$ – see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.009

Author's personal copy

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23 (2013) 4851–4856

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

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

Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing β-galactosidase

Cristina Fonseca-Berzal [a,b,*], Diego R. Merchán Arenas [c], Arnold R. Romero Bohórquez [c], José A. Escario [a,b], Vladimir V. Kouznetsov [c], Alicia Gómez-Barrio [a,b]

[a] CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC, Madrid, Spain
[b] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
[c] Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Bucaramanga, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 May 2013
Revised 24 June 2013
Accepted 27 June 2013
Available online 12 July 2013

Keywords:
Trypanosoma cruzi
Tetrahydroquinolines
Cytotoxicity
Lipinski's rule
OSIRIS software

ABSTRACT

The growth inhibitory effect on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and the unspecific cytotoxicity over NCTC-929 fibroblasts of two series of previously synthesized 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines (THQ), have been studied in vitro and compared with those of benznidazole (BZ). Derivatives **AR39**, **AR40**, **AR41**, **AR91** and **DM15** achieved outstanding selectivity indexes (SI) on the extracellular form ($SI_{THQ} > SI_{BZ} > 9.44$) and thus, were tested in a more specific in vitro assay against amastigotes, showing less effectiveness than the reference drug ($SI_{BZ} > 320$) but also accomplishing great selectivity on the intracellular stage ($SI_{THQ} > 25$). These promising results, supported by the in silico prediction of high bioavailability and less potential risk than benznidazole, reveal several tetrahydroquinolines as prototypes of potential antichagasic drugs.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The World Health Organization has classified Chagas disease as one of the 17 neglected tropical diseases (NTD), since the chronic nature of this parasitic infection originally affects poorest people of rural areas along Central and South America. The parasitic illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* currently affects about 10 million people worldwide, mainly in the 21 endemic countries of Latin America[1] where the disease is naturally transmitted by blood-sucking triatomine bugs.[2,3] In spite of the fact that numerous advances have been achieved regarding control campaigns against Chagas disease spreading,[4–6] the emerging character that this parasitosis has recently acquired in countries without vectorial mechanisms of transmission, such as USA and Spain[7,8] together with the existence of several routes of transmission alternative to the vectorial one,[9–11] has contributed to the non-eradication of the illness, becoming in the last decades a worldwide public health problem.[12]

Neither satisfactory drug nor a vaccine has been developed since the commercialization of the only two drugs (nifurtimox and benznidazole) up to now available for the specific treatment of the disease.[13] Although these *nitro*-heterocyclic derivatives are successful in the parasitological cure during the acute phase of the disease, both turn into ineffective when the treatment starts in the chronic one.[14] Because of the fact that nowadays the lack of a suitable therapy for the treatment of Chagas disease is still a reality, researching this field in order to attain new prototypes potentially applied as trypanocidal drugs becomes a priority.

For the last two decades, our research group has been working in the design and biological evaluation of new potential antichagasic drugs,[15–19] having also demonstrated great experience in studies of chemotherapy against other NTD, like malaria.[20,21]

According to this, a group of 22 tetrahydroquinoline derivatives, whose synthesis is reported elsewhere[22,23] and have been previously tested against *Plasmodium falciparum* (data not published), are now evaluated against *T. cruzi* as promising molecules with trypanocidal effectiveness. The structures and stereochemistry of all the obtained racemic tetrahydroquinolines identified as series **AR** and **DM** (Fig. 1 and 2) were determined by ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy[22,23] testing each sample as a pure chemical substance (Physicochemical properties of tested compounds are enclosed in the Supplementary material).

Molecular design was achieved based on structure–activity relationship studies and virtual screening analysis reported in literature. The pre-screening for *hit* identification from synthetic compounds libraries was based on the oral bioavailability using the Lipinski's rules concepts,[24] performing the analysis of the rule of five by employing the Molisnpiration free software (http://

* Corresponding author. Tel.: +34 913941818; fax: +34 913941815.
E-mail address: crfonseca@pdi.ucm.es (C. Fonseca-Berzal).

0960-894X/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.079

International Journal of Pharmaceutics 472 (2014) 110–117

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

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

Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease

Ricardo Palmeiro-Roldán [a], Cristina Fonseca-Berzal [b,c], Alicia Gómez-Barrio [b,c], Vicente J. Arán [b,d], José A. Escario [b,c], Susana Torrado-Durán [a], Santiago Torrado-Santiago [a,*]

[a] Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain
[b] CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC, Madrid, Spain
[c] Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain
[d] Instituto de Química Médica (IQM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), c/Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 March 2014
Received in revised form 4 June 2014
Accepted 7 June 2014
Available online 10 June 2014

Keywords:
Benznidazole
Solid dispersions
Physicochemical characterization
Dissolution study
Trypanocidal activity

ABSTRACT

This work aims to develop novel benznidazole (BZN) solid dispersions (SD) to improve its solubility and bioavailability properties. Low-substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) and sodium deoxycholate (NaDC) were evaluated as carriers. BZN solid dispersions containing different ratios of carrier were prepared by a freeze-drying process and characterized by SEM, powder X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and dissolution studies. The reduced BNZ crystallinity in the new formulations was confirmed by XRD, and supported by DSC. BNZ:L-HPC solid dispersion at a 1:3 ratio (w/w) (SD-1:3 L-HPC) improved the BNZ dissolution rate (85% at 5 min) in comparison with BNZ raw material (23% at 5 min). However, NaDC formulations showed a prolonged release (24% at 30 min for SD-1:3 NaDC), due to the formation of a sustained release matrix in acidic medium. In vivo studies performed in a murine model of Chagas disease showed that the formulation achieving the highest parasitemia suppression at a low dose of 25 mg/kg/day after five days of treatment was SD-1:3 L-HPC (60% of parasitemia suppression versus 33% of suppression exerted by BNZ), suggesting that BNZ:L-HPC systems enhance the bioavailability of the drug.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

American trypanosomiasis caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, also known as Chagas disease in humans, is considered one of the most important parasitic infections in Latin America, where it is endemic in 21 countries. However, as a result of international migration the disease is not only confined to South America but has been increasingly detected in the United States, Canada, and a number of European and Western Pacific countries in recent decades (Lima et al., 2011; Machado-de-Assis et al., 2013; WHO, 2013).

Although Chagas disease was discovered more than 100 years ago, the World Health Organization (WHO) reports that its current pharmacological treatment has certain major drawbacks such as: (i) a decrease in its efficacy the longer a person has been in contact with the parasites, (ii) the extended duration of the treatment (up to 2 months), and (iii) the high incidence of adverse reactions occurring in up to 40% of patients (WHO, 2013).

Benznidazole (BNZ), *N*-benzyl-2-(2-nitroimidazol-1-yl) acetamide, is the drug of choice for the treatment of the disease (Leonardi and Salomon, 2013; Lima et al., 2009). However, BNZ treatments present some problems such as the large BNZ doses administered, prolonged time treatments, and the high incidence of adverse reactions (increased by extended treatments with high doses), which are probably related to the low solubility of BNZ (Lima et al., 2011; WHO, 2013). According to the data provided by Maximiano et al. (Maximiano et al., 2010), benznidazole can be described as a poorly water-soluble drug and classified as class 4 in the Biopharmaceutical Classification System; thus, suggesting a limited and/or variable absorption (Leonardi et al., 2009). There is, therefore, considerable interest in developing strategies to improve the dissolution rate of benznidazole and eventually increase its bioavailability.

* Corresponding author. Tel.: +34 13941620; fax: +34 13941736.
E-mail address: torrado2@ucm.es (S. Torrado-Santiago).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.015
0378-5173/© 2014 Published by Elsevier B.V.

Author's personal copy

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24 (2014) 1209–1213

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

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

In vitro phenotypic screening of 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives as putative anti-*Trypanosoma cruzi* agents

Cristina Fonseca-Berzal [a,b,*], Fernando A. Rojas Ruiz [c], José A. Escario [a,b], Vladimir V. Kouznetsov [c], Alicia Gómez-Barrio [a,b]

[a] CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC, Madrid, Spain
[b] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
[c] Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678 Bucaramanga, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 November 2013
Revised 17 December 2013
Accepted 18 December 2013
Available online 9 January 2014

Keywords:
Trypanosoma cruzi
Chloroquinoline derivatives
Cytotoxicity
Lipinski's rule
OSIRIS software

ABSTRACT

In this study, a series of 22 pre-synthesized 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives was assayed in vitro as potential antichagasic agents. A primary screening against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and a non-specific cytotoxicity assay on murine fibroblasts were simultaneously performed, resulting quinolines **3**, **7** and **12** with great selectivity (SI) on the extracellular parasite (SI_{7}, SI_{3}, SI_{12} and SI_{BZ} >9.44). Therefore, the activity of these derivatives was evaluated on intracellular amastigotes, achieving derivative **7** the best SI (SI = 12.73). These results, supported by the in silico prediction of a good oral bioavailability and a suitable risk profile, propose the 4-amino-7-chloroquinoline scaffold as a potential template for designing trypanocidal prototypes.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Although more than a century has elapsed since the discovery of Chagas disease (American trypanosomiasis), the etiological treatment of a neglected tropical disease that is currently endemic in poor rural areas of 21 countries along Central and South America is still unsatisfactory.[1] The parasitic illness caused by the hemoflagellate *Trypanosoma cruzi* and endemically transmitted by triatomine vectors, has in the last years emerged in non-endemic countries outside Latin America since the increase of international migrations and the existence of non-vectorial mechanisms of transmission (e.g., congenital route),[2,3] infecting this way about 10 million people worldwide.[1] Focusing on the chemotherapy, nifurtimox (a 5-nitrofuran) and benznidazole (a 2-nitroimidazole), the only two drugs up to now commercialized for the specific treatment of Chagas disease, were introduced more than forty years ago and their accessibility to patients has been discontinued through this time.[4] Although they are effective in the early stages of the trypanosomiasis, both display a limited activity during the chronic infection.[5] Moreover, the toxicity associated to these drugs[6] and the existence of *T. cruzi* strains naturally resistant to them,[7] also hinder the effectiveness of these treatments. The epidemiological data, together with the lack of either a suitable chemotherapy or a vaccine, supports the priority in the development of new prototypes of anti-*T. cruzi* agents.

In the present work, a first series of 16 different 7-chloroquinoline molecules substituted at the C-4 position by either benzylamino fragment or *N*-(aminoalkyl)-1,3-thiazolidin-4-one moiety, previously synthesized and tested against *Plasmodium falciparum*,[8] has been evaluated as potential antichagasic compounds according to the trypanocidal activity exhibited by some thiazolidine derivatives[9,10] and diverse aminoquinolines.[11,12] Concretely, the biological properties associated to the substituted 1,3-thiazolidin-4-ones have led to the introduction of this structure whether in several antimicrobial agents[13] as well as in trypanocidal prototypes with promising in vitro activity.[14,15] Nevertheless, data of neither 7-chloroquinoline-thiazolidinone derivatives (called chloroquine hybrids) nor other 4-arylaminomethylquinolines tested on *T. cruzi* models have been found in literature. Likewise, a second series of 4-aryloxy-7-chloroquinoline molecules[16] also assessed as antimalarial drug prototypes (data not published), has been in vitro evaluated as potential trypanocidal agents.

Both series of compounds were synthesized by employing straightforward and efficient procedures.[8,16] Benzylamino or aryloxy fragments were connected to the 4,7-chloroquinoline ring (DCQ) by nucleophilic substitution S_NAr using commercial benzylamines or substituted phenols to give compounds **1**–**4** and compounds **17**–**22**, respectively. Chloroquinoline–thiazolidinone hybrids **5**–**16** were assembled via a synthetic two-step protocol that includes the preparation of diamines based on DCQ ring through nucleophilic substitution of DCQ and α,ω-diaminoalkanes

* Corresponding author. Tel.: +34 913941818; fax: +34 3941815.
E-mail address: crfonseca@pdi.ucm.es (C. Fonseca-Berzal).

0960-894X/$ - see front matter © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.071

Author's personal copy

Parasitol Res (2014) 113:1049–1056
DOI 10.1007/s00436-013-3740-5

ORIGINAL PAPER

Further insights into biological evaluation of new anti-*Trypanosoma cruzi* 5-nitroindazoles

Cristina Fonseca-Berzal · José Antonio Escario · Vicente J. Arán · Alicia Gómez-Barrio

Received: 12 December 2012 / Accepted: 23 December 2013 / Published online: 17 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Twelve molecules from a series of 35 new 5-nitroindazole derivatives, selected from a successful primary screening on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, have been evaluated against intracellular amastigotes according to the previous results of their trypanocidal activity and unspecific cytotoxicity. 2-Benzyl-1-propyl (22), 2-benzyl-1-isopropyl (23), and 2-benzyl-1-butyl (24) 5-nitroindazolin-3-ones have inhibited the growth of amastigotes similarly to the reference drugs benznidazole and nifurtimox, inducing complete growth inhibition at concentrations lower than 8 μM (IC_{50}<5 μM) and accomplishing great selectivity indexes on the intracellular form of the parasite (SI>30). Further in vivo assays were developed only for two of the most active molecules (22 and 24), reaching significant reductions in parasitemia levels (52 % and 77 %, respectively) after their oral administration to infected mice. In addition, none of the mice in experimental and benznidazole groups died, unlike in the control group which is only treated with the vehicle. The trypanocidal properties found in some of the 5-nitroindazole derivatives assayed in the present work represent an interesting contribution to the urgent need for searching new antichagasic drugs.

Introduction

American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by the kinetoplastid parasite *Trypanosoma cruzi,* is a neglected tropical disease (NTD) that affects approximately 10 million people worldwide, mostly in the endemic areas of 21 countries along South and Central America (WHO 2010). The infection is naturally transmitted by hematophagous reduviid vectors (Schofield et al. 1999), but the parasite can also be transmitted by non-vectorial mechanisms, like contaminated blood transfusion, oral route, organ transplantation, or congenitally. These secondary routes of transmission, together with the international migrations from the endemic area, have led to the spread of the disease towards non-endemic countries, such as the USA and Western Europe (Schmunis 2007; Gascón et al. 2010).

Only two drugs are currently available for the specific treatment of Chagas disease: the 5-nitrofuran nifurtimox and the 2-nitroimidazole benznidazole (Urbina 2010). Both nitroheterocyclic drugs are particularly effective in the acute phase of the infection reaching up to 80 % of parasitological cures, but this rate considerably decreases when they are administered during the chronic disease (Cançado 1999; Coura 2009). However, several studies support the high curative activity of benznidazole in the early chronic phase of the disease in children (Sosa-Estani et al. 1998; Andrade et al. 2004). Not only this limited effectiveness, but also the toxicity of these drugs (Castro et al. 2006) and the existence of *T. cruzi* strains resistant to the treatment (Neal and van Bueren 1988; Murta et al. 1998), supports the priority in the development of new trypanocidal compounds. According to this, several nitroimidazole derivatives have been recently tested against *T. cruzi*, achieving promising results both in vitro and in vivo (Bahia et al. 2012; Dos Santos Gomes et al. 2012). However, other chemical structures are also investigated to get new potential chemotherapeutic agents for the treatment of Chagas disease.

In this context, our research group has synthesized new 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and other indazole derivatives, whose activity against *T. cruzi* epimastigotes as

C. Fonseca-Berzal (✉) · J. A. Escario · A. Gómez-Barrio
Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC), Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
e-mail: crfonseca@pdi.ucm.es

V. J. Arán
Instituto de Química Médica (IQM), CSIC (CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC), c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

Molecules **2015**, *20*, 11554-11568; doi:10.3390/molecules200611554

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Trypanocidal Activity of Long Chain Diamines and Aminoalcohols

Ana L. Legarda-Ceballos [1], Esther del Olmo [2,*], Julio López-Abán [1], Ricardo Escarcena [2], Luis A. Bustos [3], Cristina Fonseca-Berzal [4], Alicia Gómez-Barrio [4], Juan C. Dib [5], Arturo San Feliciano [2] and Antonio Muro [1]

[1] Laboratory of Molecular Immunology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain; E-Mails: analegarda@usal.es (A.L.L.-C.); jlaban@usal.es (J.L.-A.); ama@usal.es (A.M.)

[2] Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain; E-Mails: ricar@usal.es (R.E.); asf@usal.es (A.S.F.)

[3] Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Sciences, Catholic University of the North, 0610-Antofagasta, Chile; E-Mail: luisbustosg@gmail.com

[4] Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid (CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC), 28040-Madrid, Spain; E-Mails: crfonseca@pdi.ucm.es (C.F.-B.); agbarrio@ucm.es (A.G.-B.)

[5] Research Center on Health for the Tropics, (CIST), Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Magdalena, Colombia; E-Mail: juandib@hotmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: olmo@usal.es; Tel.: +34-923-294-528; Fax: +34-923-294-521.

Academic Editor: Christophe Dardonville

Received: 15 April 2015 / Accepted: 17 June 2015 / Published: 23 June 2015

Abstract: Thirteen aminoalcohols and eight diamines were obtained and tested against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes strains MG, JEM and CL-B5 clone. Some of them were equal or more potent (1.0–6.6 times) than the reference compound nifurtimox. From them, three aminoalcohols and two diamines were selected for amastigotes assays. Compound **5** was as potent as the reference drug nifurtimox against amastigotes of the CL-B5 strain (IC_{50} = 0.6 μM), with a selectivity index of 54.

Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different *Trypanosoma cruzi* strains

CRISTINA FONSECA-BERZAL[1,2]*, PATRICIA BERNARDINO DA SILVA[3], CRISTIANE FRANÇA DA SILVA[3], MARIANE VASCONCELOS[3], MARCOS MEUSER BATISTA[3], JOSÉ A. ESCARIO[1,2], VICENTE J. ARÁN[1,4], ALICIA GÓMEZ-BARRIO[1,2] *and* MARIA DE NAZARÉ C. SOEIRO[3]

[1] *CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC, Madrid, Spain*
[2] *Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain*
[3] *Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil*
[4] *Instituto de Química Médica (IQM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), c/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain*

(*Received 3 July 2015; revised 7 August 2015; accepted 24 August 2015*)

SUMMARY

In the present study, the potential activity of two 5-nitroindazole derivatives previously proposed as suitable antichagasic prototypes was further evaluated on diverse *Trypanosoma cruzi* strains belonging to two discrete typing units (DTUs) frequently associated with human infection (i.e. DTUs TcII and TcVI). The trypanocidal profile that both 2-benzyl-1-propyl (22) and 2-benzyl-1-butyl (24) derivatives achieved on Tulahuen amastigotes (IC_{50} = 3·56 ± 0·99 and 6·31 ± 1·04 μM, respectively) correlates with that of formerly obtained on CL Brener, corroborating an outstanding activity on DTU TcVI parasites. Moreover, a sequential screening on extracellular and intracellular stages of *T. cruzi* Y (DTU TcII) demonstrated also the effectiveness of 22 and 24 over this strain on a similar range of activity (IC_{50} epimastigotes = 3·55 ± 0·47 and 7·92 ± 1·63 μM, IC_{50} amastigotes = 2·80 ± 0·46 and 9·02 ± 5·26 μM, respectively). These results, supported by a lack of toxicity registered over either L929 fibroblasts or primary cultures of cardiomyocytes, confirm that 5-nitroindazolinones 22 and 24 display great selectivity on both drug-sensitive (CL and Tulahuen) and drug-moderately resistant (Y) *T. cruzi* strains, and therefore, represent an important outcome in the research of Chagas disease chemotherapy.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, 5-nitroindazolinone, DTU, L929 fibroblasts, cardiomyocytes.

INTRODUCTION

Chagas disease (CD), caused by the kinetoplastid haemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, is a parasitic infection naturally transmitted in 21 Latin American countries by the contaminated feces of blood-sucking bugs (i.e. triatomines). In the endemic area, CD provokes more than 7000 deaths per year and maintains over 25 million people at risk for the infection (WHO, 2015). Moreover, its emerging character in non-endemic areas due to population mobility and alternative routes of transmission (e.g. blood transfusion, organ donation, mother-to-child and through contaminated food) (Schmunis and Yadon, 2010) has contributed to the spreading of an illness that currently affects about 7 million people worldwide (WHO, 2015).

As one of the 17 tropical diseases defined by the WHO as neglected (WHO, 2015), strategies of research and development are focused on the finding of a suitable CD chemotherapy (Zingales *et al*. 2014). Many efforts have been made by institutions in order to develop new compounds potentially applicable to the treatment of CD, since the available chemotherapy relies on two old nitroheterocyclic drugs: benznidazole (BZ), the first-line treatment in most countries, and nifurtimox (NX) (WHO, 2015). Although these medicines are currently accepted to treat the acute and the early-chronic disease, both show limited effectiveness in long-term chronic infections (Urbina, 2015) and also exhibit undesirable side effects (Castro *et al*. 2006).

Concerning experimental chemotherapy research, in a previous study we proposed the 1,2-disubstituted 5-nitroindazolinone scaffold as prototype of antichagasic drug (Vega *et al*. 2012). Concretely, the 2-benzyl-1-propyl (22) and the 2-benzyl-1-butyl (24) derivatives (Fig. 1) achieved outstanding activity over the replicative stages of *T. cruzi* (i.e. epimastigotes and amastigotes) without toxicity on macrophages, what led to great selectivity on CL Brener strain (Vega *et al*. 2012; Fonseca-Berzal *et al*. 2014).

* Corresponding author: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain. E-mail: crfonseca@pdi.ucm.es

 © Cambridge University Press 2015. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
doi:10.1017/pao.2015.4

Experimental Parasitology 149 (2015) 84–91

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

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

Full length article

Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system

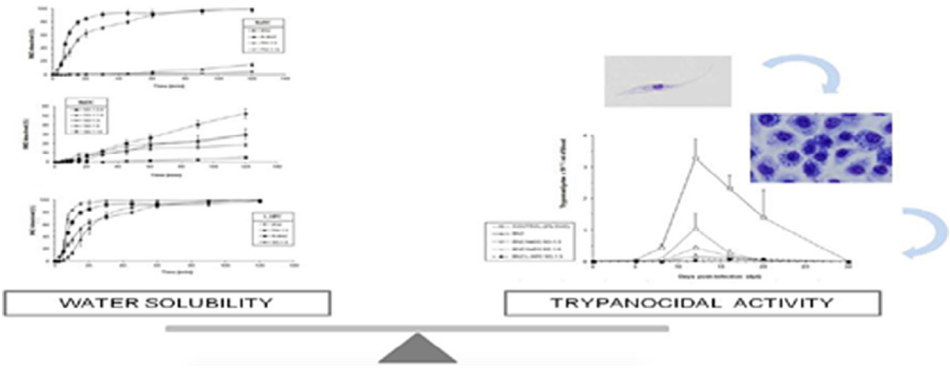
Cristina Fonseca-Berzal [a,b,*], Ricardo Palmeiro-Roldán [c], José A. Escario [a,b], Susana Torrado [c], Vicente J. Arán [a,d], Santiago Torrado-Santiago [c], Alicia Gómez-Barrio [a,b]

[a] CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC, Madrid, Spain
[b] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain
[c] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain
[d] Instituto de Química Médica (IQM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), c/ Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain

HIGHLIGHTS

- NaDC solid dispersions improved benznidazole IC_{50} on epimastigotes and amastigotes.
- Solid dispersions with low ratios of surfactant did not result cytotoxic *in vitro*.
- Highest ratios of NaDC resulted in a low cession of benznidazole in acidic milieus.
- The solid dispersion in L-HPC achieved the fastest dissolution profile.
- The L-HPC system showed the best trypanocidal profile in the acute murine Chagas.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 September 2014
Received in revised form 2 December 2014
Accepted 4 January 2015
Available online 9 January 2015

Keywords:
Benznidazole
Solid dispersions
Sodium deoxycholate
Low-substituted hydroxypropylcellullose
Dissolution rate
Trypanocidal activity

ABSTRACT

Solid dispersions (SD) of benznidazole (BNZ) in sodium deoxycholate (NaDC) or low-substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) were developed by freeze-drying process to improve the solubility of this low water-soluble drug and consequently, its trypanocidal activity. Although the dissolution studies showed a progressive decrease in the release rate of BNZ when formulated in the presence of NaDC, the increase in the surfactant concentration resulted in a better trypanocidal profile on epimastigotes, as well as in an enhancement of the unspecific cytotoxicity. However, such an effect was not so evident on amastigotes and *in vivo* (blood-trypomastigotes), where high concentrations of surfactant (BNZ:NaDC ≥ 1:6) experimented a loss of activity, correlating this fact with the minor cession of BNZ these formulations accomplished in acidic locations (i.e., dissolution test medium). According to the *in vitro* results, we reformulated the promising SD-1:3 (IC_{50} epimastigotes = 33.92 ± 6.41 μM, IC_{50} amastigotes = 0.40 ± 0.05 μM and LC_{50} = 183.87 ± 12.30 μM) replacing NaDC by L-HPC, which achieved the fastest dissolution profile. This fact, together with the safety this carrier ensures (LC_{50} > 256 μM), prompted us to evaluate the cellulose

* Corresponding author. Fax: +34 3941815.
E-mail address: crfonseca@pdi.ucm.es (C. Fonseca-Berzal).

http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.002
0014-4894/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

European Journal of Medicinal Chemistry 115 (2016) 295–310

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

Antichagasic and trichomonacidal activity of 1-substituted 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-ones and 3-alkoxy-2-benzyl-5-nitro-2*H*-indazoles☆

Cristina Fonseca-Berzal [a, b], Alexandra Ibáñez-Escribano [a, b], Felipe Reviriego [a, c], José Cumella [c], Paula Morales [c], Nadine Jagerovic [c], Juan José Nogal-Ruiz [a, b], José Antonio Escario [a, b], Patricia Bernardino da Silva [d], Maria de Nazaré C. Soeiro [d], Alicia Gómez-Barrio [a, b, **], Vicente J. Arán [a, c, *]

[a] *Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM & CSIC), Spain*
[b] *Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain*
[c] *Instituto de Química Médica (IQM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), c/Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain*
[d] *Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 November 2015
Received in revised form
26 February 2016
Accepted 14 March 2016
Available online 17 March 2016

Keywords:
Antiprotozoal drug
Nitroheterocycle
Indazole
Trichomonas vaginalis
Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

Two series of new 5-nitroindazole derivatives, 1-substituted 2-benzylindazolin-3-ones (**6**–**29**, series **A**) and 3-alkoxy-2-benzyl-2*H*-indazoles (**30**–**37**, series **B**), containing differently functionalized chains at position 1 and 3, respectively, have been synthesized starting from 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-one **5**, and evaluated against the protozoan parasites *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*, etiological agents of Chagas disease and trichomonosis, respectively. Many indazolinones of series **A** were efficient against different morphological forms of *T. cruzi* CL Brener strain (compounds **6**, **7**, **9**, **10** and **19**–**21**: IC_{50} = 1.58–4.19 μM for epimastigotes; compounds **6**, **19**–**21** and **24**: IC_{50} = 0.22–0.54 μM for amastigotes) being as potent as the reference drug benznidazole. SAR analysis suggests that electron-donating groups at position 1 of indazolinone ring are associated with an improved antichagasic activity. Moreover, compounds of series **A** displayed low unspecific toxicities against an *in vitro* model of mammalian cells (fibroblasts), which were reflected in high values of the selectivity indexes (SI). Compound **20** was also very efficient against amastigotes from Tulahuen and Y strains of *T. cruzi* (IC_{50} = 0.81 and 0.60 μM, respectively), showing low toxicity towards cardiac cells (LC_{50} > 100 μM). In what concerns compounds of series **B**, some of them displayed moderate activity against trophozoites of a metronidazole-sensitive isolate of *T. vaginalis* (**35** and **36**: IC_{50} = 9.82 and 7.25 μM, respectively), with low unspecific toxicity towards Vero cells. Compound **36** was also active against a metronidazole-resistant isolate (IC_{50} = 9.11 μM) and can thus be considered a good prototype for the development of drugs directed to *T. vaginalis* resistant to 5-nitroimidazoles.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Our research group has been pursuing during the last decade the identification of alternative therapeutic options for parasitic protozoan infections through the design, synthesis and biological activity analysis of novel nitroheterocycles. In these previous studies we reported the activity against *Trypanosoma cruzi* [1–8], *Trypanosoma brucei* [9], *Leishmania* spp. [2,10] and *Trichomonas vaginalis* [1,11–13] of 5-nitroindazole derivatives, mainly 1-substituted indazol-3-ols [11,12], 2-substituted indazolin-3-ones [11], 1-substituted 3-alkoxyindazoles [1–5,7,9], 1,2-disubstituted

☆ Dedicated to our dear colleague Dr. María Teresa García López, former director of Instituto de Química Médica (IQM, CSIC, Madrid) for her outstanding contribution to Medicinal Chemistry, on the occasion of her retirement.

* Corresponding author. Instituto de Química Médica (IQM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), c/Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain.
** Corresponding author. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.
E-mail addresses: agbarrio@ucm.es (A. Gómez-Barrio), vjaran@iqm.csic.es (V.J. Arán).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.036
0223-5234/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.