

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“DISEÑO RACIONAL DE NUEVOS INHIBIDORES DE CRUZAINA  
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA EL TRATAMIENTO DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**M. en C. ELSA VERÓNICA HERRERA MAYORGA**

**DIRECTORES:**

Dr. Gildardo Rivera Sánchez

Dr. Edgar E. Lara Ramirez

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“DISEÑO RACIONAL DE NUEVOS INHIBIDORES DE CRUZAINA  
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA EL TRATAMIENTO DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**M. en C. ELSA VERÓNICA HERRERA MAYORGA**

**DIRECTORES:**

Dr. Gildardo Rivera Sánchez  
Dr. Edgar E. Lara Ramirez

Reynosa Tamaulipas

Diciembre, 2019



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 20 del mes de Noviembre del año 2019, la que suscribe Elsa Verónica Herrera Mayorga alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A170439, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Gildardo Rivera Sánchez, Dr. Edgar Eduardo Lara Ramírez y cede los derechos del trabajo titulado "Diseño racional de nuevos inhibidores de cruzaina de *Trypanosoma cruzi* para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Bld. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elsa Verónica Herrera Mayorga



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14  
REP 2017

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:  para examinar la tesis titulada:  por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	HERRERA	Apellido Materno:	MAYORGA	Nombre (s):	ELSA VERÓNICA
-------------------	---------	-------------------	---------	-------------	---------------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **NO APROBAR**  la tesis, en virtud de los motivos siguientes:

---



---



---



---



---

### Comisión Revisora de Tesis

  
 Dr. Gilardo Rivera Sánchez  
 Director de Tesis  
 12752-EC-17, Colegiado, E3017

  
 Dr. Virgilia Bocanegra García  
 13517-EC-15, Colegiado, E3017

  
 Dr. Carlos Armando García Pérez  
 Profesor Externo

  
 Dr. Edgar Eduardo Lara Ramírez  
 2º Director de Tesis  
 Profesor Externo

  
 Dr. Xianmu Guo  
 2014-ED-17, Colegiado, E3017

  
 Presidente del Colegio de Profesores  
 Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez  
 Nombre



## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia agradezco Dios por la vida y por cada circunstancia ocurrida, a mis asesores por la confianza y apoyo otorgado durante el desarrollo de este trabajo de tesis, al Centro de Biotecnología Genómica por la oportunidad brindada y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto.

De igual manera agradezco al grupo de trabajo del laboratorio de biotecnología farmacéutica.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis a mi familia, a mi compañero de vida Alejandro y a cada uno de los partícipes en la realización de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA .....	II
TABLA DE CONTENIDOS .....	III
RESUMEN .....	V
ABSTRACT.....	VI
INDICE DE TABLAS .....	VII
INDICE DE FIGURAS .....	VIII
SIMBOLOGIA APLICADA .....	XII
1.- INTRODUCCIÓN.....	13
2.- ANTECEDENTES .....	14
2.1.-Enfermedad de Chagas .....	14
2.2.- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
2.3 Fármacos existentes.....	17
2.4 Blancos terapéuticos para <i>T. cruzi</i> .....	18
2.4 Inhibidores de Cruzaina .....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4.- HIPÓTESIS.....	31
5.- OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo general .....	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	33
6.1 Cribado virtual basado en estructura .....	33
6.2. Agrupamiento y análisis de contacto ligando-aminoácido.....	35
6.3. Evaluación <i>in vitro</i> .....	35
6.4. Inhibición enzimática .....	36
6.5 DM análisis .....	37
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
7.1 Cribado virtual basado en estructura .....	39
7.2. Agrupamiento y análisis de contacto ligando-aminoácido.....	47

7.3. Evaluación <i>in vitro</i> .....	52
7.4.- Inhibición enzimática.....	53
7.5. Análisis de dinámica molecular .....	55
8.-CONCLUSIONES.....	59
9. BIBLIOGRAFÍA.....	59
10.- ANEXOS .....	64

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas (EC), o tripanosomiasis americana, causa más de 10,000 muertes por año en el continente americano. La terapia médica actual para la EC tiene baja eficacia en la fase crónica de la enfermedad y efectos adversos graves; por lo tanto, es necesario buscar nuevos tratamientos farmacológicos. En este trabajo, se realizó un cribado virtual de la base de datos ZINC15 utilizando la estructura de la *N*-acilhidrazona y posteriormente se llevo a cabo un estudio de acoplamiento molecular en el sitio activo de la enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* para predecir nuevos inhibidores potenciales de cruzaina. Después de un proceso de selección racional, se seleccionaron cuatro compuestos, Z2 (ZINC9873043), Z3 (ZINC9870651), Z5 (ZINC9715287) y Z6 (ZINC9861447), para evaluar su actividad tripanocida *in vitro* e inhibición enzimática. El compuesto Z5 mostró la mejor actividad tripanocida contra la forma epimatigote ( $IC_{50} = 36.26 \pm 9.9 \mu M$ ) y tripomastigote ( $IC_{50} = 166.21 \pm 14.5 \mu M$  and  $185.1 \pm 8.5 \mu M$ ) sobre la cepas NINOA e INC-5, respectivamente de *Trypanosoma cruzi*. Además, Z5 mostró un mejor efecto inhibitorio sobre las proteasas de *Trypanosoma cruzi* que S1 (STK552090, 8-cloro-N-(3-morfolinopropil)-5H-pirimido [5,4-b]-indol-4-amina), un conocido inhibidor de la cruzaina.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; acoplamiento molecular; cruzaina; ZINC15; inhibidores.

## ABSTRACT

Chagas disease (CD), or American trypanosomiasis, causes more than 10,000 deaths per year in the American continent. Current medical therapy for EC has low efficacy in the chronic phase of the disease and serious adverse effects; therefore, it is necessary to search for new pharmacological treatments. In this work, a virtual screening of the ZINC15 database was performed using the structure of N-acylhydrazine and subsequently a molecular coupling study of the active site of the *Trypanosoma cruzi* enzyme cruzain was carried out to predict new new inhibitors of Cruzain After a rational selection process, select four compounds, Z2 (ZINC9873043), Z3 (ZINC9870651), Z5 (ZINC9715287) and Z6 (ZINC9861447), to evaluate their trypanocidal activity *in vitro* and enzymatic inhibition. Compound Z5 showed the best trypanocidal activity against epimatigote ( $IC_{50} = 36.26 \pm 9.9 \mu M$ ) and trypomastigote ( $IC_{50} = 166.21 \pm 14.5 \mu M$  and  $185.1 \pm 8.5 \mu M$ ) on strains NINOA and INC-5, respectively of *Trypanosoma cruzi*. In addition, Z5 showed a better inhibitory effect on *Trypanosoma cruzi* proteases than S1 (STK552090, 8-chloro-N-(3-morpholinopropyl)-5H-pyrimido [5,4-b] -indole-4-amine), a known cruzain inhibitor.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; molecular docking; cruzain; Zinc15; inhibitors.

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Blancos farmacológicos validados que se han considerado para el diseño de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas. ....	19
Tabla 2. Coordenadas del centro de interacción establecidas entre la estructura 3LXS y el ligando de referencia. ....	39
Tabla 3. Coordenadas del centro de interacción establecidas entre la estructura 1U9Q y el ligando de referencia. ....	40
Tabla 4. Estructuras y resultados de Cross-Docking (Fabian et al., 2015).....	41
Tabla 5. Estructuras de los diez compuestos principales con las mejores energías de unión obtenidas de la base de datos de ZINC15.....	44
Tabla 6. Concentración lítica media máxima de los compuestos Z2, Z3, Z5, Z6 y S1 y la drogas de referencia en epimastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> . ....	53
Tabla 7. Valores de CI <sub>50</sub> para cisteína proteasas de epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	54

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de moléculas Blanco en estudio sobre 485 fármacos de uso actual (Padilla y Rojo en 2002).....	19
Figura 2. Estructura química de derivados de ureas, tiocarbazonas, chalconas, amidas, nitrilos y derivados de hidracina como derivados de cruzaina.....	23
Figura 3. Estructura de compuestos derivados de semicarbazona con actividad tripanocida.. .....	25
Figura 4. Estructuras de bases de nitrilo inhibitoras de proteasa cisteína. ....	26
Figura 5. Estructuras de bases de vinil sulfonas inhibitoras de proteasa cisteína (McKerrow et al., 2009). ....	27
Figura 6. Ruta sintética para la obtención de los análogos de nitrofurazona (Silva et al., 2016).....	28
Figura 7. Estructura utilizada para la búsqueda de derivados de N – acilhidrazonas.....	34
Figura 8. Estructura 3LXS y ligando de referencia utilizados para el establecimiento de coordenadas de interaccion.....	40
Figura 9. Estructura 1U9Q y ligando de referencia utilizados para el establecimiento de coordenadas de interaccion.....	41
Figura 10. Estructura del ligando 186 utilizada para el docking de referencia. ....	42
Figura 11. Detección del sitio de unión en la estructura cristalográfica 1U9Q. (a) sitio de interaccion en color amarillo detectada por la herramienta DoGSiteScorer usando el servidor ProteinsPlus. (b) Interacciones registradas entre cruzaina-ligando.....	43
Figura 12. Análisis de posturas de acoplamiento entre el ligando 186 y la proteína .....	49
Figura 13. Patrón de agrupamiento obtenido con AuPosSOM basado en la huella de contacto aminoácido-ligando.....	49
Figura 14. Figura 14. Interacciones de aminoácidos de los cuatro compuestos seleccionados (Z2, Z3, Z5 y Z6) y la referencia ligando 186 en Cz.....	51
Figura 15. Análisis del sitio de interacción entre el ligando 186 y el compuesto Z5 en Cz.	55

## INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Interacciones $\pi$ identificadas por dinámica molecular y sus respectivos % de interacción. ....	57
Grafica 2. Interacciones hidrofóbicas identificadas por dinámica molecular y sus respectivos % de interacción. ....	58
Grafica 3. Interacciones hidrofóbicas identificadas por dinámica molecular y sus respectivos % de interacción. ....	58

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA .....	II
TABLA DE CONTENIDOS .....	III
RESUMEN .....	V
ABSTRACT.....	VI
INDICE DE TABLAS .....	VII
INDICE DE FIGURAS .....	VIII
SIMBOLOGIA APLICADA .....	XII
1.- INTRODUCCIÓN.....	13
2.- ANTECEDENTES .....	14
2.1 Enfermedad de Chagas.....	14
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
2.3 Fármacos existentes.....	17
2.4 Blancos terapéuticos para <i>T. cruzi</i> .....	18
2.5 Inhibidores de Cruzaina .....	22
3.- JUSTIFICACIÓN .....	30
4.- HIPÓTESIS.....	31
5.- OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo general .....	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
6.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	33
6.1 Cribado virtual basado en estructura.....	33
6.2 Agrupamiento y análisis de contacto ligando-aminoácido.....	35

6.3 Evaluación <i>in vitro</i> .....	35
6.4 Inhibición enzimática .....	36
6.5 DM análisis .....	37
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
7.1 Cribado virtual basado en estructura .....	39
7.2. Agrupamiento y análisis de contacto ligando-aminoácido.....	47
7.3. Evaluación <i>in vitro</i> .....	52
7.4. Inhibición enzimática .....	53
7.5. Análisis de dinámica molecular .....	55
8.- CONCLUSIONES .....	59
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	59
10.- ANEXOS .....	64

## **SIMBOLOGÍA APLICADA**

TT	Terapia tripanosida
TR	Tripanotiona reductasa
TS	<i>Trans</i> -sialidasa
TIM	Triosa fosfato isomerasa
ECA´s	Ensayos clínicos aleatorizados
Nfx	Nifurtimox
Bzn	Benznidazol
Cz	Cruzaina
CD	Chagas disease
CI <sub>50</sub>	Maxima Concentracion inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentracion litica media

## 1. -INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas se presenta frecuentemente en el continente Americano (centro y sur). Es una enfermedad transmitida por un insecto vector de la familia Triatominae, el cual se encarga de transmitir el parásito *Trypanosoma cruzi*. Mundialmente se estima que de 18 a 20 millones de personas son infectadas y más de 100 millones se encuentran en riesgo.

Para contrarrestar la enfermedad de Chagas se han desarrollado 2 fármacos los cuales han sido utilizados por más de 4 décadas. Sin embargo, a estos fármacos se les ha atribuido una baja eficacia y alta toxicidad. A partir de esta problemática se ha buscado diseñar nuevos compuestos con eficacia dirigida hacia distintas moléculas diana, los cuales han presentado resultados prometedores, sobre todo en aquellas proteínas que son esenciales para el desarrollo, invasión, y metabolismo del parásito, por ejemplo, cruzaina, es una proteasa de cisteína de tipo papaína la cual se ha comprobado es crucial para el desarrollo y supervivencia del parásito.

Actualmente se continúa con la búsqueda de inhibidores dirigidos hacia cruzaina ya que se ha logrado la cura parasitológica en ratones a partir de inhibidores de cruzaina. En la última década, en el desarrollo de nuevos fármacos, se recomienda apoyarse en un diseño racional, dado que resulta una buena estrategia para reducir tiempos y reactivos, permitiendo postular hipótesis sobre las características moleculares de unión y la manera en que podrían modificarse las estructuras para aumentar su afinidad (o selectividad) por el blanco, permitiendo diseñar derivados de los compuestos líderes sobre los que se realicen nuevas simulaciones del reconocimiento molecular, así como pruebas de laboratorio de su capacidad inhibitoria sobre el blanco. Con base en lo anterior, el principal propósito de este proyecto es encontrar a través de un diseño racional a nuevos y mejores compuestos inhibidores de la proteasa de cisteína (cruzaina) en el metabolismo de *Trypanosoma cruzi*, obteniendo compuestos con una mejor actividad tripanocida que las de los fármacos de uso actual.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1. Enfermedad de Chagas**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, mundialmente se registran más de 1000 millones de casos y más de 1 millón de defunciones anualmente por enfermedades de transmisión por vectores como: el paludismo, dengue, esquistosomiasis, tripanosomiasis africana humana, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, fiebre amarilla, encefalitis japonesa y oncocercosis (OMS, 2016).

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria endémica de América latina, se considera que un 30% de los enfermos crónicos presentan alteraciones cardíacas y un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas a causa de esta enfermedad. En el continente americano representa la mayor causa de enfermedad cardíaca de origen infeccioso. afectando de 18 a 20 millones de personas y poniendo en riesgo a más de 100 millones (Siles *et al.*, 2006; OMS, 2016). Los países donde se desarrolla esta enfermedad abarcan el Norte, Centro y Sur del continente americano, donde 21 países se consideran endémicos entre los que se encuentran: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Suriname, Uruguay y Venezuela (Schmunis., 2007).

De acuerdo a una recopilación de información sobre la epidemiología de la enfermedad la enfermedad de Chagas en México realizada por Schmunis en el 2007, indica que la prevalencia de infección por *T. cruzi* en bancos de sangre de los servicios de salud pública en 12 de los 34 estados mexicanos osciló entre 1.7/1000 (Chihuahua) y 17/1000 (en Morelos) de 1978 a 2004 en Puebla durante 2001-2002 con una tasa de 77 por 1000 y la ciudad de México de 1998-2000 con una tasa de 68 por 1000. La organización panamericana (OPS) y la OMS estiman que en México hay más de 1 millón de infectados, y en riesgo de infección casi 30 millones. Del 2000 al 2012 la secretaria de salud SSA

concentró más de 5000 casos, la mayoría en Oaxaca, Veracruz, Morelos, Tabasco, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco. El resto de casos se informaron en otras 13 entidades de la república.

La enfermedad en los seres humanos puede presentarse en dos fases, aguda o crónica. La fase aguda, inicia en el momento en que la persona es infectada y los síntomas persisten durante aproximadamente dos meses sin tratamiento, con una tasa de mortalidad del 2 al 8% especialmente en niños, las alteraciones patológicas se debe primero a una reacción de inflamación mononuclear focal debida a la ruptura de células parasitadas. Posteriormente en un periodo de días a 2 semanas se observa daño celular (necrosis) en el área inflamada, la cual puede darse en células parasitadas y no parasitadas, especialmente en el corazón. Algunos otros síntomas observados son la agregación plaquetaria, la desgranulación de los eosinófilos, daño microvascular, el edema, la trombosis, la estasis sanguínea y la isquemia (Andrade, 1999). Después de la infección aguda, los pacientes desarrollan una fuerte evidencia de inmunidad, pero tiene una tendencia a permanecer infectado en distintos órganos del organismo huésped (Andrade, 1999).

Después de la fase aguda de la infección, la enfermedad de Chagas no tratada entra en una fase crónica, en su mayoría inicia asintómicamente en un 20 a 50% de los casos, cuando se presentan síntomas en esta fase estos se caracterizan por: trastornos cardíacos en un 20-30% (miocardiopatía Chagásica), digestivos 10% (megaesófago) o neurológicos menos del 5%. El resto permanecerá en la forma indeterminada, sin ningún síntoma durante toda su vida (Andrade, 1999, Gascón *et al.*, 2007).

## **2.2. *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un parásito protista flagelado causante de la enfermedad de Chagas, éste parásito se aisló por primera vez en Brasil por Carlos Chagas en el año de 1909. *T. cruzi* es un parásito intracelular transmitido a los hospederos mamíferos tanto humanos como animales por medio la mordedura de insectos vectores del género *Triatoma* por medio de sus heces u orina.

El triatoma es un insecto de la familia Reduviidae y es conocido con el nombre común como vinchuca, chinche besucona o otros nombres, según la zona geográfica (Villar *et al.*, 2002, Siles *et al.*, 2006, Abrahamsohn., 1998; Guzmán-Marín *et al.*, 1999). El parásito también puede ser transmitido por contacto con sangre infectada, transfusiones de sangre y trasplante de órganos, lo que se considera el segundo modo de transmisión más común y el tercer modo de transmisión es la infección congénita (Villar *et al.*, 2002, Siles *et al.*, 2006).

*T. cruzi* puede infectar una variedad de células huésped desarrollándose en el insecto vector y en mamíferos presentando en cada uno de ellos una fase con dos estadios, desarrollando un total de cuatro estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico, promastigote o tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote. En el vector se encuentran los estadios de epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos los cuales se describen a continuación:

- El epimastigote es fusiforme, flagelado, presenta división binaria longitudinal, replicándose extracelularmente en el lumen del intestino medio. A medida que las etapas del parásito alcanzan el extremo posterior del intestino, se unen a la pared del recto y se convierten en tripomastigotes metacíclicos infectivos no replicativos.
- El tripomastigote metacíclico es infectivo no replicativo con una deficiente capacidad de reproducción, este se libera en las heces cuando el insecto se alimenta de sangre y es transmitido a su hospedero cuando son frotados en la herida de la mordida u otra superficie abierta de la piel o de la mucosa e invaden las células huésped gracias a su morfología flagelada y alargada, contiene un gran núcleo central, un cinetoplasto de gran tamaño y el blefaroplasto posterior de donde surge dicho flagelo que contornea una membrana ondulante, lo cual confiere su movimiento. En el huésped mamífero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos.

El amastigote es la etapa replicativa dentro del hospedero, aquí el parásito intracitoplasmático es de forma redondeada, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto en forma de disco el cual se duplica por división binaria simple sufriendo muchas rondas de división antes de transformarse en el siguiente estadio. El tripomastigote sanguíneo es la etapa en la

que el parásito se disemina en la sangre y la linfa donde puede infectar prácticamente cualquier célula nucleada o ser absorbidos por el insecto vector para completar el ciclo de vida, es flagelado, alargado, con el cinetoplasto grande alejado de la parte anterior del núcleo; similar al tripomastigote metacíclico puesto que también presenta flagelo y membrana ondulante, este estadio se encuentra en la sangre y no tiene capacidad para dividirse, pero sí la tiene para invadir otras células cuando es liberado por el rompimiento de la célula huésped pudiendo llegar a todos los órganos a través del torrente sanguíneo (Abrahamsohn., 1998; Minning., 2006; Guzmán-Marín., 1999).

### **2.3. Fármacos existentes**

La enfermedad de Chagas ha resultado una problemática en zonas rurales de muchos países de América Central y del Sur, razón por la cual se han establecido estrategias para la prevención y erradicación de casos por la transmisión de parásitos ya sea por contacto con insectos, en transfusión de sangre, trasplantes de órganos de individuos infectados o transmisión vertical a recién nacidos. Una de las acciones para la prevención de la enfermedad de Chagas es tratar a las personas infectadas (8 millones) con fármacos tripanocidas (Siles *et al.*, 2006, Villar *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar del entusiasmo por usar fármacos tripanocidas, existen limitaciones que incluyen incertidumbre sobre su eficacia, tolerancia pobre, producción limitada de los fármacos convencionales y producción de severos efectos adversos (Villar JC *et al.*, 2002, Siles *et al.*, 2006, Muñoz *et al.*, 2013).

La terapia tripanocida (TT) implica el uso de dos fármacos que son: el nifurtimox (Nfx) y el beznidazol (Bzn), Nfx es un nitrofurano que causa diversos efectos adversos como desencadenamiento de pérdida de peso, erupción cutánea, psicosis, náuseas y vómitos, leucopenia, neurotoxicidad, neuropatía periférica y anormalidades tisulares (en glándulas suprarrenales, colon, esófago, testículos, ovarios y glándulas mamarias) (Coura & de Castro 2002, McKerrow *et al.*, 2009, Castro María 2006). Bz es un compuesto de nitroimidazol que desencadena efectos como: edema, fiebre, erupción cutánea, dolor muscular y articular, neuropatía periférica y linfadenopatía, también puede inducir agranulocitosis, iniciada por neutropenia, dolor de garganta, fiebre y septicemia; púrpura trombocitopénica,

caracterizada por reducción de plaquetas, petequias, hemorragia, ampollas e incluso hemorragia mucosa (Coura & de Castro 2002).

De acuerdo a una revisión realizada en el 2005 sobre ensayos clínicos que se realizaron de forma controlada aleatoria, doble ciego, con o sin placebo, utilizando datos de ensayos realizados desde 1965 cuando estos tratamientos se hicieron disponibles, se concluyó que el tratamiento con estos fármacos no está suficientemente bien soportado con respecto al valor clínico y la capacidad para eliminar el parasitismo del tejido o inducir la desaparición de los anticuerpos circulantes (Vallejo y Reyes, 2005).

Por otra parte Villar y colaboradores argumentan que el gran contraste entre la carga de la enfermedad de Chagas y la evidencia existente sobre su prevención señala la necesidad de probar los fármacos de la TT o nuevos agentes en ensayos clínicos aleatorizados (ECAs) más grandes que incluyan puntos finales clínicos (Villar *et al.*, 2002) ya que algunos otros estudios indican que en América Latina tanto Nf como Bz presentan buena actividad en pacientes con casos de infección con una cura alrededor del 60% y en pacientes de fase crónica (más de 10 años de infección) una cura parasitológica del 10-20% (Coura & de Castro 2002, Fabbro *et al.*, 2007, Streiger *et al.*, 2004). Sin embargo, la falta de conocimiento sobre la efectividad de estos fármacos, así como el desinterés por desarrollar nuevos medicamentos que contrarresten la enfermedad de Chagas se debe a que es un padecimiento de poblaciones paralizadas por la pobreza y la inequidad, lo cual se ve reflejado en un mercado poco atractivo para las grandes compañías farmacéuticas, viéndonos en la necesidad de realizar la búsqueda de nuevos compuestos químicos eficaces contra distintos blancos terapéuticos y de bajo costo.

#### **2.4. Blancos terapéuticos para *T. cruzi***

El moderno desarrollo de fármacos se centra en la realización de búsquedas sistemáticas hacia moléculas blanco, es decir moléculas sobre las que actuará el medicamento con un efecto terapéutico deseado. Actualmente es del conocimiento que las proteínas representan blancos terapéuticos, fungiendo como enzimas o receptores moleculares como se muestra

en la Fig. 1, por lo cual se han dirigido el diseño de fármacos hacia este tipo de moléculas blanco para que interactúen con sitios diana de interés, basándose en la información disponible sobre el mecanismo molecular responsable del desarrollo de una determinada enfermedad (Padilla y Rojo., 2002).

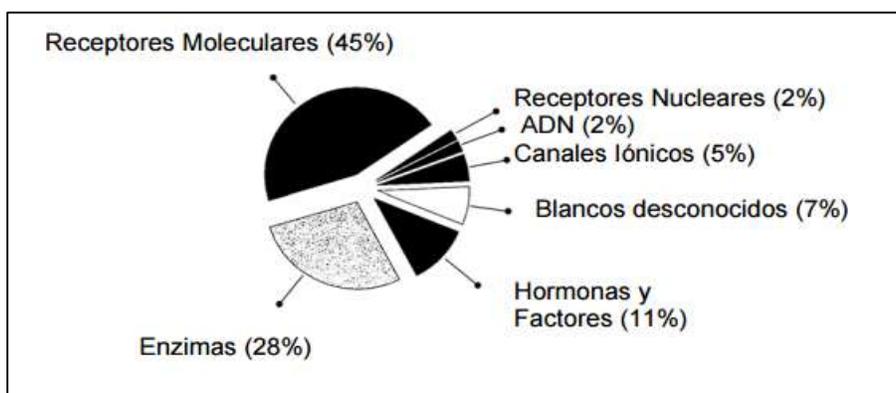


Figura 1.- Distribución de moléculas Blanco en estudio sobre 485 fármacos de uso actual (Padilla y Rojo en 2002).

En nuestro caso de estudio, los blancos terapéuticos para el diseño de nuevos fármacos contra *T.cruzi* son enzimas como la tripanotiona reductasa, la *trans*-sialidasa, la triosafosfato isomerasa, la cruzaina, entre otras (Rivera *et al.*, 2009), como se muestra en el Tabla 1 y se describen más adelante, siendo nuestro principal interés en este proyecto la enzima la cruzaina.

Tabla 1. Blancos farmacológicos validados que se han considerado para el diseño de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas.

<b>Blanco farmacológico</b>	<b>Función</b>
Tripanotiona reductasa	Enzima clave en la defensa antioxidante del tripanosoma.
<i>Trans</i> -sialidasa	Cataliza el corte y transferencia del ácido siálico de glucoproteínas del huésped al parásito.

Triosafosfato isomerasa	Enzima clave en la obtención de energía en la ruta de glucolisis.
Cruzaina	Implicada en la evasión inmune y la penetración del parásito en las células huésped.

---

La función de las enzimas antes mencionadas consiste en lo siguiente:

- Tripanotiona reductasa (TR):

Los tripanosomatídeos presentan un metabolismo redox diferente al de casi todo el resto de eucariotas y procariotas. Estos organismos carecen del sistema glutatión/glutatión reductasa presente en mamíferos el cual es reemplazado por el sistema tripanotiona (N1,N8-bis (glutacionil espermidina)/tripanotiona reductasa (TR). La TR es una flavoproteína dependiente de NADPH que participa en el metabolismo, la detoxificación de drogas, en la reducción de precursores para la síntesis de ADN y mantiene la tripanotiona en su forma reducida, contribuyendo al mantenimiento de un ambiente intracelular reductor. Dado que TR es una enzima clave en la defensa antioxidante del parásito y está ausente en mamíferos, se ha considerado a esta enzima como un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos tripanosomicidas. Desde su identificación y validación como blanco terapéutico en 1985 un gran número de inhibidores de TR han sido descritos como el caso de Nifurtimox que podría inhibir la enzima tripanotiona reductasa, que cataliza la eliminación de especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi* (Rojas *et al.*, 2007, Merlino Mellognio 2010).

- Trans- sialidasa (TS):

Esta enzima cataliza el corte y la transferencia del ácido siálico de glucoproteínas del huésped a mucinas en la membrana del parásito, es por esto que se considera que el parásito es un devorador de ácido siálico de los glicoconjugados del medio circundante. La catálisis se logra debido a que la enzima reside en la membrana superficial del tripomastigote, (etapa de invasión de células vertebradas) y también a que los tripanosomas no pueden sintetizar ácido siálico expresan la enzima unida a glicolipidos de la superficie en la membrana celular y son capaces de transferir de forma reversible al ácido siálico alfa (2 -> 3)

vinculando el extremo beta Gal de la superficie de la célula huésped a las sialoglicoproteínas con un extremo terminal beta de otro aceptor adecuado en la superficie del parásito. La reacción de transferencia es específica para los donantes con ácido siálico terminal ligado alfa-2,3 y la galactosa terminal beta-1,4 ligada es el aceptor preferido. En ausencia de un aceptor, la enzima actúa como una hidrolasa, pero la escisión es menos eficiente que la transferencia. La actividad de la *trans*-sialidasa se atribuye a unos pocos miembros de una gran familia de glicoproteínas de superficie de *T. cruzi*, muchas de las cuales se expresan simultáneamente. Las funciones de la familia de glicoproteínas de superficie *trans*-sialidasa son desconocidas, pero pueden ser importantes para la adhesión, invasión, virulencia o patogenicidad (Colli 1993, Cross y Takle 1993, Salud Pública 2007).

- Triosa fosfato isomerasa (TIM):

Es una enzima necesaria para el metabolismo de la glucosa ya que cataliza la isomerización de gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetonafofosfato en el quinto paso de la vía glicolítica. La enzima TIM es una molécula clave para la producción de energía (ATP) de la forma amastigota de *T. cruzi*. Debido a que participa en un proceso crucial para el parásito es considerada un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos con inhibición selectiva de acción sobre la función metabólica, produciendo una reducción en la supervivencia del parásito sin intervenir en los procesos metabólicos del huésped ya que la enzima del parásito presenta diferencias estructurales importantes con las correspondientes enzimas humanas (Merlino Mellognio., 2010).

La utilización como blanco terapéutico de esta enzima se debió a las observaciones realizadas en tripanosomas de la especie brucei, donde se observó una inhibición al inducir una modificación estructural en el enlace covalente de Cys14, es decir, la derivación de esta cisteína desencadena alteraciones estructurales que conducen a la abolición de la catálisis, además debido a que muchas isomerasas de trifosfato, incluyendo la enzima humana carecen de esta cisteína, por lo cual Cys14 representa un excelente objetivo para lograr la inhibición específica de la enzima, que se presenta en forma de homodímero pero se activa solamente en forma de dímero, con esta característica se ha buscado compuestos dirigidos a la interfase entre los monómeros con el objetivo de inducir modificaciones estructurales

que alteraran la integridad del dímero, provocando así la inactivación de la enzima (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; Merlino Melloquio 2010).

- Cruzaina:

Es la principal proteasa de cisteína de tipo papaína de *T. cruzi*, ya que se ha demostrado es crucial en todas las etapas del ciclo de vida del parásito. Esta proteasa de cisteína tipo papaína ha sido considerada de importancia por su sobresaliente participación en la diferenciación, la invasión celular, la multiplicación intracelular y la evasión inmune. Además, porque de acuerdo a estudios se ha demostrado que los inhibidores de la cisteína proteínasa trypanocidal presentan una toxicidad en mamíferos insignificante (Rogers., 2012). Esta proteasa se ha establecido como blanco terapéutico despertando el interés de su uso como un objetivo potencial de fármacos ya que resulta indispensable para la supervivencia y propagación de este parásito protozoario (Sajid., 2011).

## **2.5. Inhibidores de Cruzaina**

Las cisteína-proteinasas de parásitos protozoos se han caracterizado como factores de virulencia y patogenicidad en varias enfermedades humanas y veterinarias. La investigación en el campo de proteasas rápidamente convergen a la cisteína mayor, la proteínasa de *T. cruzi* (cruzipaina, cruzaina o GP57/51) (Lima *et al.*, 2001).

En una variedad de estudios se ha logrado indentificar diferentes estructuras químicas como inhibidores de Cz, entre ellos podemos mencionar los derivados de ureas, carbazonas, chalconas, carboxiamidas, ácidos carboxílicos, triazoles, vinilsulfonas, hidrazonas y otros (Figura 2) (Du *et al.*, 2000; Roushet *al.*, 2000; Zanatta *et al.*, 2008; Borchhardt *et al.*, 2010; Beaulieu *et al.*, 2010).

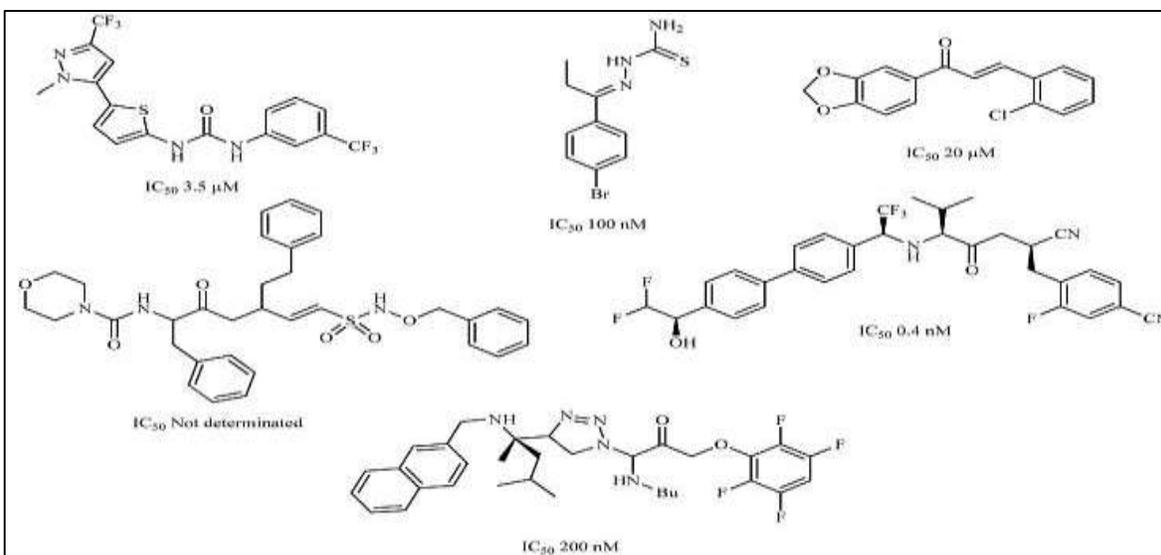


Figura 2.- Estructura química de derivados de ureas, thiocarbazonas, chalconas, amidas, nitrilos y derivados de hidracina como derivados de cruzaina.

En 1998 Engel y colaboradores demostraron que inhibidores de cruzaina pueden curar ratones de una infección experimental por *T. cruzi*, dado que presentaron el primer tratamiento exitoso de un modelo animal de la enfermedad de Chagas con inhibidores diseñados para inactivar la cruzaina. El tratamiento se basó en pseudopéptidos derivados de fluorometilcetona, este compuesto indican los autores rescató a los ratones de la infección letal. El andamiaje pseudo-péptido óptimo fue fenilalanina-homofenilalanina. Para conseguir la cura de la infección, este andamio de pseudopéptido se incorporó en un derivado de vinilsulfona menos tóxico, N-metil piperazina-Phe-homoPhe-vinilsulfona fenilo quien también rescató a los ratones de una infección letal. Seis de los ratones tratados sobrevivieron durante nueve meses, tres sin tratamiento adicional. Tres ratones que habían entrado en la fase crónica de la infección se retiraron con un régimen de 20 días. Al final de los experimentos, cinco de los seis ratones habían presentado repetidamente hemocultivos negativos, indicativos de cura parasitológica (Engel *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha demostrado que las cisteína-proteinasas de parásitos protozoos pertenecen a una familia isomorfica la cual es codificada por una familia de genes de gran tamaño. También se ha mencionado que la familia de genes cruzipaina incluye secuencias polimórficas que podrían codificar isoformas funcionalmente diferentes (Lima *et al.*, 2001).

Con base en dicha información en el 2001 se realizó un estudio de cinéticas comparativas entre la cruzaina, el arquetipo de la familia cruzipaina, y una isoforma denominada cruzipaina 2, que es expresada preferentemente por los estadios de mamíferos de *T. cruzi*. La expresión heteróloga del dominio catalítico de la cruzipaina 2 en *Saccharomyces cerevisiae* produjo una enzima que difiere marcadamente de la cruzaina con respecto a la estabilidad del pH, la especificidad del sustrato y sensibilidad a la inhibición por inhibidores naturales y sintéticos de cisteína proteasas. En este trabajo los autores sugieren que la estructura-funcional y la diversificación de la proteína impiden una evaluación definitiva, y que a pesar de que la cruzaina es un potencial objetivo, como la mayoría de las terapias potenciales el éxito disminuye en los ensayos clínicos y tanto la progresión como la resistencia de la enfermedad requieren de la terapia de combinación con varios fármacos, por lo cual la identificación de clases adicionales de moléculas inhibitoras resulta esencial (Rogers., 2012). Por esta razón durante más de una década se han dado a la tarea de estudiar este blanco terapéutico como se describe a continuación, ya que las cisteína proteasas juegan numerosos papeles indispensables en la biología de los organismos parasitarios, participan en las funciones catabólicas generales, el procesamiento de proteínas, pueden ser la clave para la inmunoevasión del parásito, la excreción / encijación, la invasión de células y tejidos.

Las proteasas de cisteína de parásitos son inusualmente inmunógenas y han sido explotadas como marcadores de serodiagnóstico y vacunas. Aunque existen homólogos del huésped, las proteasas de cisteína del parásito tienen propiedades estructurales y bioquímicas distintas. La naturaleza dispareja de la cisteína proteasa del parásito en comparación con las proteínas ortólogas del huésped ha abierto oportunidades para la quimioterapia. Además los inhibidores selectivos de esta proteasa bloquean la proliferación tanto de epimastigotes como de amastigotes (formas replicativas), y detienen la metaciclologénesis (transformación a formas invasivas) *in vitro* (Cazzulo *et al.*, 2001; Klemba *et al.*, 2002).

Otro tipo de potentes inhibidores de la cruzaina de *T. cruzi* son una serie de thio semicarbazonas los cuales han demostrado ser tripanocidas.

Inicialmente descubrieron que la 3'-bromopropiofenona tio semicarbazona inhibía la cruzaina y podía curar cultivos celulares de mamíferos infectados con *T. cruzi* sin mostrar

toxicidad para las células de mamífero. En esta misma dirección se diseñaron y sintetizaron más de 100 compuestos mediante estudios de modelización del complejo enzima-inhibidor, con una relación estructura actividad específica, y varios análogos potentes con valores de IC<sub>50</sub> en un rango nanomolar (Figura 2). Ocho análogos adicionales fueron tripanocidas en ensayos con cultivos celulares, lo cual indica que la aril tio semicarbazona es un andamio productivo para causar la muerte de este parásito. En la figura 3 podemos apreciar las estructuras de algunos de estos inhibidores (Du *et al.*, 2002).

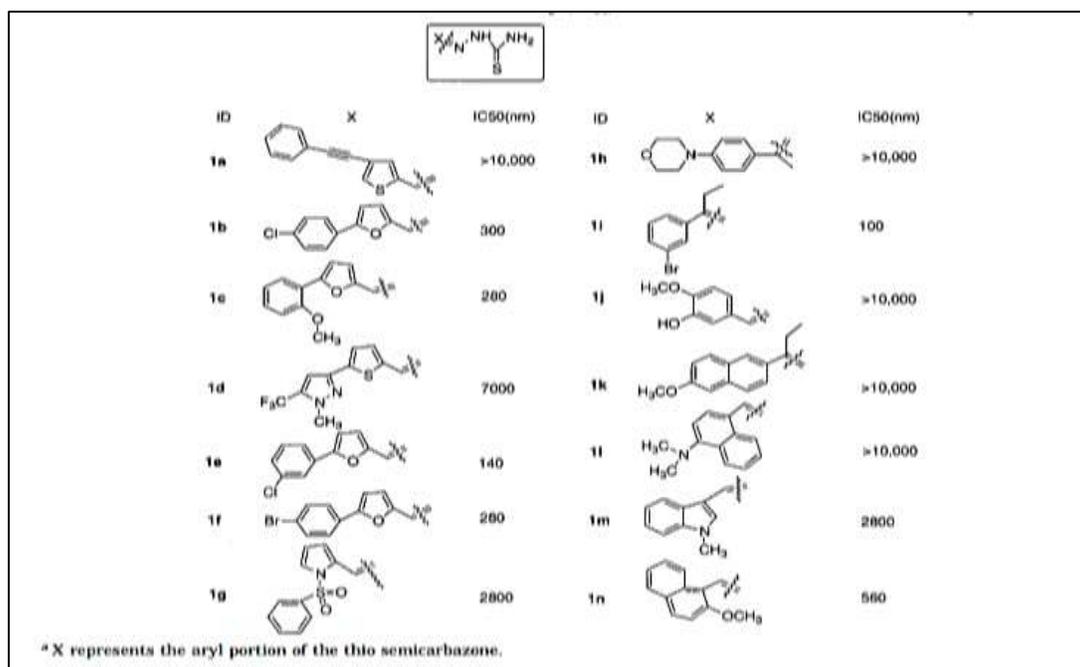


Figura 3.- Estructura de compuestos derivados de semicarbazona con actividad tripanocida.

También se han realizado trabajos utilizando bases de datos como NEQUIMED, a partir de la cual los autores establecieron algunas hipótesis para el diseño de inhibidores derivados de dipeptidil nitrilo de cruzaina con actividad tripanocida, logrando sintetizar una serie de compuestos basados en el andamio de dipeptidil nitrilo. A cada compuesto se le determinó su actividad inhibitoria sobre la cisteína cruzaina de *T. cruzi*. La relación estructura-actividad (SAR) se estableció utilizando tres, once y doce variaciones respectivamente en las posiciones P1, P2 y P3 (figura 4). El compuesto más activo presentó una concentración

inhibitoria de 16 nM. 23 inhibidores fueron evaluados por sus efectos anti-tripanosómicos obteniendo para el compuesto más potente un valor de EC<sub>50</sub> de 28 μM (Avelar *et al.*, 2015).

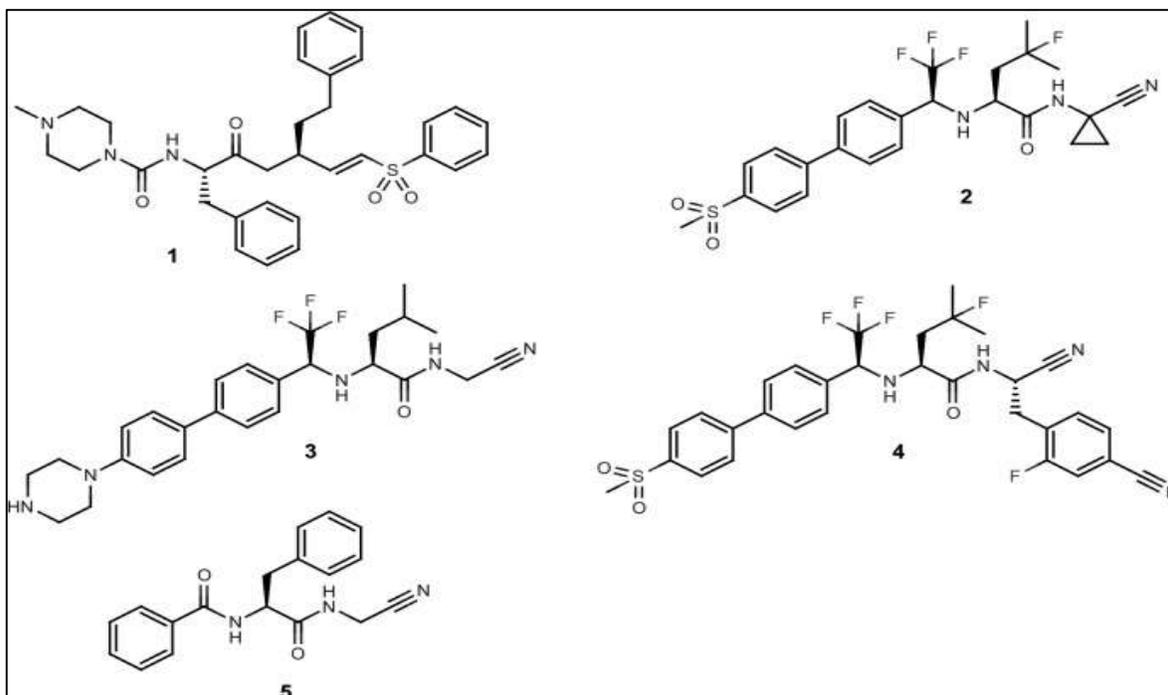


Figura 4.- Estructuras de bases de nitrilo inhibitoras de proteasa cisteina.

Otras moléculas que han resultado interesantes inhibidores de cruzaina son una clase de compuestos derivados de vinil sulfona; a partir de los cuales se han realizado estudios de cribado virtual y su respectiva validación experimental, identificando como inhibidores a derivados de sulfonatos de vinilo, sulfonatos y sulfonamidas (figura 5). Una de estas vinil sulfonas, la denominada K11777, ha resultado un inhibidor eficaz en curar o aliviar la infección por *T. cruzi* en modelos agudos y no agudos de infección en ratones. Resultando con una eficacia terapéutica en los estudios preclínicos y ha ingresado en el proceso de desarrollo de fármacos preclínicos (McKerrow *et al.*, 2009, Rogers 2012).

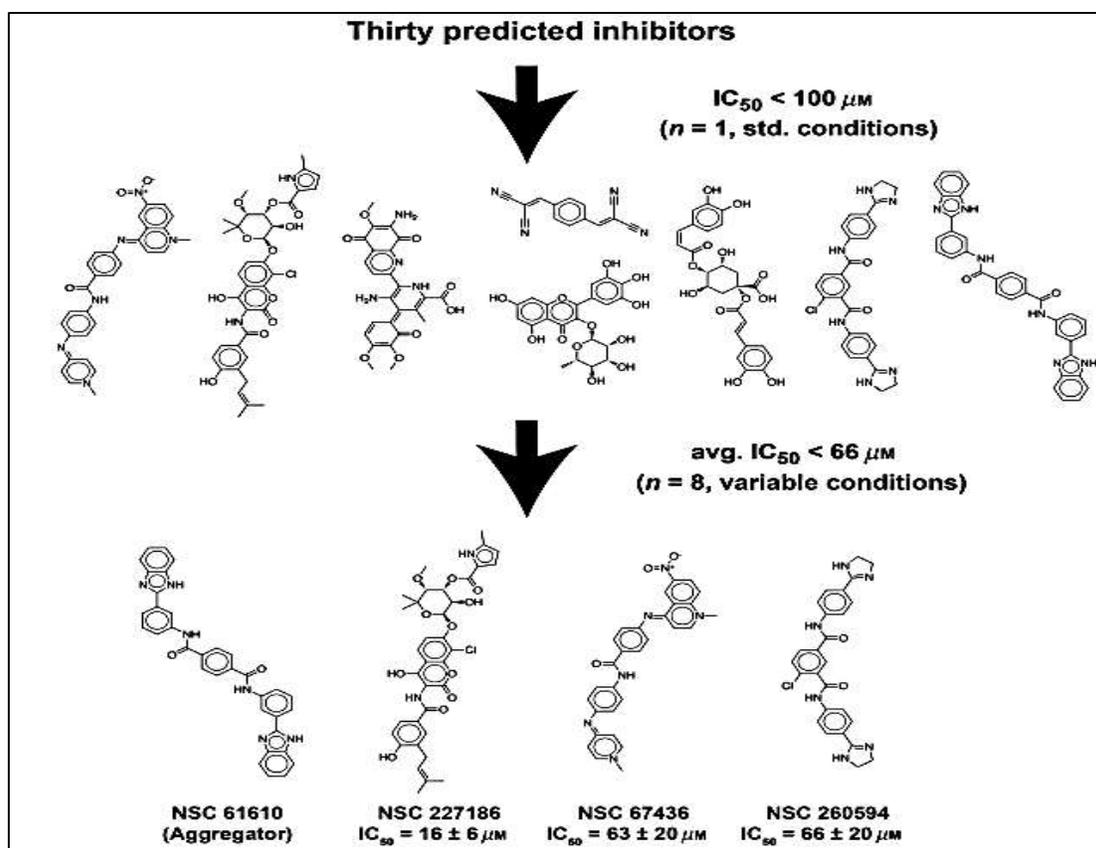


Figura 5. Estructuras de bases de vinil sulfonas inhibitoras de proteasa cisteína (McKerrow et al., 2009).

A partir de la búsqueda de sustancias antiparasitarias, se han sintetizado diferentes hidrazonas, ya que algunas tienen la capacidad de inhibir proteasas de cisteína del parásito; lo cual ha dado la pauta para la síntesis de este tipo de compuestos, los cuales han resultado con actividad prometedora como los derivados de hidrazina de semicarbazona (Trossini *et al.*, 2010), tiosemicarbazonas (Du *et al.*, 2002; Caputto *et al.*, 2011) y compuestos derivados de *N*-acilhidrazona (Romeiro *et al.*, 2009; dos Santos Filho *et al.*, 2009).

En el 2006 se trabajó la síntesis de derivados de cromano, tiocromano, alquil y aril hidrazonas, este tipo de compuestos han sobresalido por su actividad leishmanicida y su efecto sobre proteasas de cisteína, donde solamente las fenilhidrazonas han mostrado actividad sobre amastigotes de *Leishmania (V) panamensis*, sin embargo, no presentaron efecto sobre las proteasas de cisteína sugiriendo un mecanismo de acción diferente a la

inhibición de esta enzima (Muñoz *et al.*, 2006) lo que la hace una molécula interesante para el andamiaje molecular.

Recientemente en el 2016 fueron sintetizadas 4 hidrazonas aromáticas 4a, 4b, 7a y 7b mediante reemplazo bioisostérico del anillo de furano de un sistema de 1,2 a 4-triazol, utilizando 2 compuestos intermedios de la reacción denominados compuesto 3 y 6 (figura 6), las cuales se ensayaron sobre amastigotes de *T. cruzi* mostrando selectividad y actividad tripanocida baja. El compuesto 3 mostró un potencial similar a benznidazol, pero con menor eficacia. Estos resultados destacan la importancia de los restos 1,2,4-triazol thiosemicarbazonico y el grupo nitro para el diseño de nuevos compuestos potenciales para la fase crónica de la enfermedad de Chagas y se consideró la estructura del compuesto 3 para continuar usándose como un andamio para el diseño de compuestos nuevos, más activos y selectivos (Silva *et al.*, 2016).

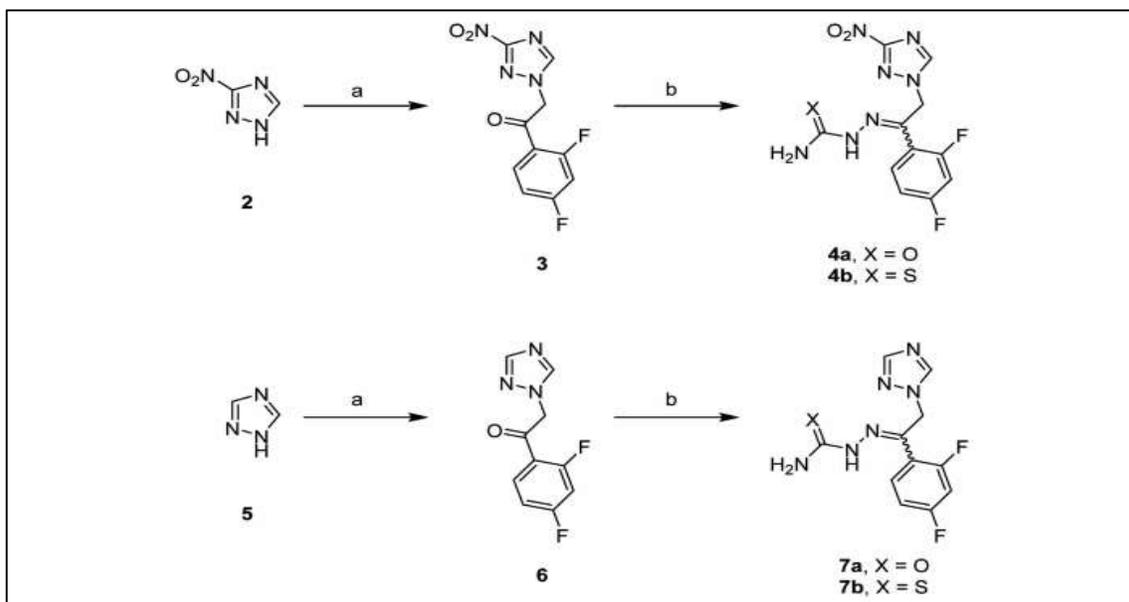


Figura 6. Ruta sintética para la obtención de los análogos de nitrofurazona (Silva *et al.*, 2016).

Las hidrazonas también han sido analizadas a partir de un estudio de relación estructura-actividad 3D (QSAR) utilizando descriptores calculados a partir del análisis comparativo

del campo molecular (CoMFA). En este estudio se seleccionaron 50 compuestos que poseen el fragmento hidrazona como un grupo común. Los compuestos que mostraron mayor actividad contra *T. cruzi* fueron LpQM-19, 28 y 31 presentando un índice de selectividad (SI) de 20. El análisis 3D-QSAR indica que una disposición electrostática particular, en la que los átomos deficientes de electrones están alineados a lo largo del eje principal de la molécula, se correlaciona positivamente con la actividad biológica del compuesto. Estos resultados proporcionan nuevas moléculas candidatas para el desarrollo de tratamientos contra la enfermedad de Chagas (Costa *et al.*, 2016).

Diferentes grupos de investigación han dirigido estudios enfocados en distintos blancos terapéutico y utilizado diferentes sustituyentes para la modificación de estructuras químicas que resulten ser prometedores inhibidores. Además, mediante los avances de los últimos años en el área de la genómica, la proteómica y la bioinformática se ha permitido la identificación y caracterización de nuevas rutas metabólicas presentes en el parásito, con el objetivo de identificar blancos terapéuticos para el diseño racional de nuevos fármacos, con el objetivo de tener orientaciones confiables de los ligandos, esto resulta importante ya que su descubrimiento permite postular hipótesis sobre las características moleculares de unión y la manera en que podrían modificarse las estructuras para aumentar su afinidad (o selectividad) por el blanco, permitiendo diseñar derivados de los compuestos líderes sobre los que se realicen nuevas simulaciones del reconocimiento molecular, así como pruebas de laboratorio de su capacidad inhibitoria sobre el blanco (Padilla y Rojo 2002, Merlino 2010). Derivado de lo anterior en este proyecto se propone el diseño racional y obtención de nuevos inhibidores de cruzaina como una opción para el potencial tratamiento farmacológico de la enfermedad de Chagas.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas, mundialmente infecta de 18 a 20 millones de personas, en nuestro país se considera que hay más de 1 millón de infectados, y en riesgo de infección casi 30 millones de personas. A pesar de que se estima mueren aproximadamente 10,000 personas anualmente, no se ha podido disminuir el número de casos, una las causas es que dicha enfermedad afecta principalmente a la clase baja y por ende se muestra el desinterés de las compañías farmacéuticas, viéndose reflejado en el número de tratamientos existentes, dado que solamente existen 2 fármacos, los cuales se ha argumentado causan efectos adversos severos con una producción limitada y con un acceso limitado. Diversos blancos farmacológicos se han propuesto para *T. cruzi*, sin embargo, cruzaina es una proteína indispensable para la supervivencia del organismo patógeno y que está ausente en el huésped, lo cual representa grandes ventajas para el desarrollo de nuevos fármacos.

Con base en lo anterior en este proyecto a partir de un diseño racional asistido por métodos computacionales se plantea proponer a nuevos compuestos derivados de *N*-acilhidrazona como inhibidores de la cruzaina, con el propósito de encontrar compuestos con mayor eficacia terapéutica y menor toxicidad. Una de las grandes ventajas del diseño racional es que permite tomar en cuenta la especificidad o selectividad molecular de la enzima, la afinidad o fuerza con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión, permitiendo el diseño de compuestos que se unan con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales, por lo cual partir de esta metodología se dirige el diseño de nuevos compuestos con una mayor actividad farmacológica que la de los líderes previos, lo cual nos permitirá encontrar a nuevos derivados de *N*-acilhidrazona con mejores características fisicoquímicas que las de los fármacos de uso actual. Adicionalmente, es importante mencionar que la subunidad de *N*-acilhidrazona ha permitido el descubrimiento de un número de compuestos líderes con potente y selectiva actividad frente a la enzima cruzaina de *T. cruzi*, informando que los inhibidores de esta enzima matan el parásito y curan a ratones infectados, por lo cual se espera que al obtener este tipo de moléculas se obtengan prometedores compuestos de fácil síntesis y bajo costo con alta eficacia sobre *T. cruzi*.

#### **4.- HIPOTESIS**

Compuestos derivados de *N*-acilhidrazona identificados a partir de estudios de acoplamiento molecular sobre el sitio activo de la enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* presentaran un efecto inhibitorio y una actividad tripanocida *in vitro*.

## 5.- OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Obtener y evaluar nuevos derivados de *N*-acilhidrazona sobre la enzima cruzafina a través del diseño racional, ensayos enzimáticos y evaluación biológica *in vitro* sobre *T. cruzi*

### 5.2. Objetivos específicos

- Analizar el complejo ligando-receptor de inhibidores de cruzafina de la literatura.
- Determinar por acoplamiento molecular a potenciales compuestos inhibidores de cruzafina de la base de datos ZINC15.
- Analizar el complejo ligando-receptor de los potenciales inhibidores de cruzafina derivados de *N*-acilhidrazona y seleccionar compuestos con la mejor energía de unión.
- Evaluar la actividad biológica *in vitro* de los nuevos compuestos sobre tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*.
- Evaluar la actividad enzimática de los nuevos compuestos sobre la enzima cruzafina.

## 6.- MATERIAL Y METODOS

El diseño racional de nuevos inhibidores de cruzaina, se realizó mediante 5 etapas:

### 6.1. Cribado virtual basado en estructura

El diseño racional de los compuestos, se realizó con un estudio de *docking* para el cual se necesitó primeramente la estructura tridimensional de la cruzaina la cual ha sido previamente determinada, por difracción de rayos X y se descargó en formato pdb, esta información fue proporcionada en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB *por sus siglas en inglés*), fuente principal de estructuras tridimensionales de proteínas, la cual es de acceso gratuito a través de la red en la dirección (<http://www.pdb.org>, 15 Julio 2018)

Posteriormente se realizó la preparación de la proteína (cruzaina) como receptor, a partir de la estructura cristalográfica PDB, se removió el inhibidor y se agregaron hidrógenos polares y cargas Gasteiger con el programa UCSF Chimera 1.11, a partir de esta estructura se realizó la reproducción de la pose del ligando, sobre el sitio activo de la proteína, esto con el fin de determinar el tamaño del espacio de búsqueda del sitio activo de la proteína donde se realizaron los acoplamientos moleculares subsiguientes, en primera instancia para los inhibidores de cruzaina ya informados en la literatura. luego, la molécula del receptor se preparó utilizando el software AutoDock Tools.

Para establecer las coordenadas del sitio de interacción nos apoyamos en un estudio previo en el que se realizó el planteamiento de un análisis de acoplamiento molecular (*docking*) de referencia usando la estructura cristalográfica de la proteasa cisteína de *T. cruzi* denominada cruzaina, esta se hizo interactuar con el inhibidor 1-(1-methyl-4,5-dioxo-pent-2-enylcarbamoil)-2-phenyl-ethyl]-carbamic acid benzyl ester cuyo número de acceso es 1U9Q. La energía de unión obtenida de este complejo se utilizó como el valor de referencia para seleccionar a los mejores potenciales inhibidores de cruzaina.

Para determinar el tamaño de los espacios de búsqueda en el sitio activo de Cz, se hizo uso del programa en línea llamado Proteins Plus y se empleó la herramienta DoGSiteScorer <https://proteins.plus> (consultada el 11 de diciembre de 2018).

La información obtenida por DoGSiteScorer nos permitió establecer las coordenadas y características del sitio de unión y establecer finalmente el diseño de una caja más óptima (Volkamer et al., 2012). Con la información obtenida, se determinó trabajar en un cuadro de cuadrícula con los siguientes tamaños: X= 18 Å, Y= 15 Å y Z= 20 Å usando como coordenadas centrales X= 7.605, Y= 9.788 y Z= 8.779. Este espacio de búsqueda se utilizó para el acoplamiento de los compuestos recuperados de la base de datos ZINC<sup>15</sup>.

Para la preparación de los ligandos, se utilizó la estructura de la figura 7 utilizando el formato smile C=NNC(C)=O de la base de datos ZINC15 (<http://zinc.docking.org>).

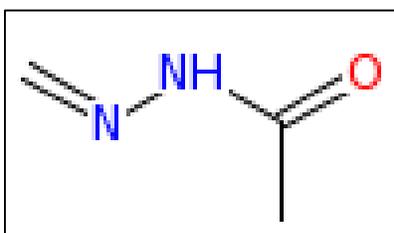


Figura 7. Estructura utilizada para la búsqueda de derivados de *N*-acilhidrazonas.

Para la búsqueda y preparación de ligandos se hizo uso de los archivos “Clean lead” (n= 4,591,276 ligandos) de la base de datos Zinc<sup>15</sup> disponibles en: (<http://zinc.docking.org>, consultado el 5 de agosto de 2018). Durante la selección se emplearon como criterios de inclusión que los compuestos presentaran un 50% de similitud con la estructura química de interés de nuestro trabajo (figura 7) y que cumplieran con las reglas de Lipinski, por esta última razón solo se utilizaron los archivos “Clean lead” debido a que esta base de datos cumple con dicha regla la cual especifica las propiedades moleculares adecuadas para el cumplimiento de la farmacocinética en el cuerpo humano de un compuesto químico.

Una vez que se obtuvo la estructura de la proteína, se realizó la selección de los ligandos y se estableció el sitio de acoplamiento, se procedió a realizar el análisis de docking mediante el programa AutoDock Vina de AutoDockTools (Trott & Olson 2010).

## 6.2. Agrupamiento y análisis de contacto ligando-aminoácido

El análisis de ligandos se realizó tomando en cuenta su huella de contacto y se llevó a cabo para los compuestos mejor clasificados que presentaron mejores energías de unión que el docking de referencia, es decir, los ligandos que presentaron durante el estudio de acoplamiento entre el ligando y los aminoácidos esenciales del receptor energías negativas mayores haciendo uso del software AuPosSOM (análisis automático de poses usando SOM) (Mantsyzov et al., 2012; Fereidoonnehzad et al., 2018).

El proceso de agrupación de los ligandos implicó tres pasos: (1) primero, se capacitó a un mapa de autoorganización de Kohonen (SOM) descripciones ligando-aminoácido; (2) luego se realizó un análisis de cluster no supervisado y (3) finalmente, se generó un archivo de árbol Newick para el análisis visual. El dendograma fue preparado usando los resultados de AuPosSOM contenidos en el árbol de Newick y los archivos fueron trazados con TreeGraph2 y analizados visualmente (Stöver&Müller, 2010).

La generación del dendograma se realizó con el objetivo de generar grupos que pudieran estar relacionados entre la energía de unión y la estructura del ligando. Además, un análisis más detallado fue realizado mediante un análisis de las interacciones entre los mejores compuestos seleccionados que se acoplaron a la proteína. utilizando el programa LigPlot (Laskowski & Swindells., 2010)

## 6.3. Evaluación *in vitro*

Para la evaluación biológica, los compuestos Z2 (ZINC9873043), Z3 (ZINC9870651), Z5 (ZINC9715287) y Z6 (ZINC9861447) se seleccionaron y compraron en Molport <https://www.molport.com> (consultado el 3 de marzo de 2018). Para la evaluación de la actividad tripanocida de los compuestos seleccionados, se utilizaron dos cepas (NINOA e INC-5) en la etapa epimastigote o tripomastigote de *T. cruzi*. Cada cepa se usó para infectar ratones CD-1 (18-20 g) intraperitonealmente con una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  tripomastigotes/mL de sangre. En el pico máximo de parasitemia, se obtuvo sangre por punción con heparina como anticoagulante. La concentración del parásito se ajustó luego

con solución salina isotónica (0.85% NaCl), y 90 µL de sangre se utilizaron para lograr una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  tripomastigotes/mL de sangre. Se evaluó una muestra de 10 µL de cada compuesto en placas de 96 pocillos. Los tratamientos realizados consistieron en un control negativo, que contenía dimetilsulfóxido (DMSO 2.5%) y los cuatro compuestos seleccionados del cribado virtual. Como controles positivos, como referencia se utilizaron los fármacos Bnz (Rochagan, Roche) y Nfx (Lampit, Bayer), así como el compuesto STK552090 (8-cloro-N-(3-morfolinopropil)-5H-pirimido [5,4-b] indol-4-amina), que se denominó internamente como S1, el cual ha sido reportado como un inhibidor de Cz en *T. cruzi* en la biblioteca ZINC<sup>15</sup>.

Una vez que los compuestos seleccionados fueron añadido después de ser homogeneizado con sangre, las placas se incubaron a 4 °C durante 24 h (Paveto et al., 2004). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego una alícuota de 5 µL se tomó de cada pocillo, se hizo una preparación nueva y se obtuvieron tripomastigotes viables siguiendo el método Pizzi (Brener, 1973; Pizzi, 1961 ). Se calculo el número de tripomastigotes viables por mL de sangre y se obtuvieron los porcentajes de supervivencia tomando el 100% del control negativo. Cada prueba se realizó por triplicado.

Para obtener una concentración de lisis del 50% (CL<sub>50</sub>) de la población, se utilizaron las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25 y 12,5 g / ml. Los valores de CL<sub>50</sub> fueron determinados usando el análisis estadístico Probit de la dosis-respuesta, y los resultados se expresaron como la media de la desviación estándar, luego se convirtieron en unidades micromolares.

#### **6.4. Inhibición enzimática**

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa INC-5 se usaron para obtener un extracto de proteína cuantificado por el método de Bradford. La evaluación de la actividad se realizó utilizando el péptido fluorogénico sintético Z-Phe-Arg-MCA como sustrato a la concentración de 5 µM, con 1 µg del extracto enzimático y el correspondiente compuestos (Z2, Z3, Z5 y Z6) a diferentes concentraciones (6.25–200 µM) usando un tampón de

reacción ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, ditioneitol 2,5 mM; pH 6,5) a temperatura ambiente.

Como control negativo de la inhibición enzimática se evaluó el sustrato sin compuestos con 2% de DMSO (concentración correspondiente a la dilución más alta de los compuestos). La hidrólisis del sustrato se monitoreo en un ensayo continuo durante 1 h en el espectrofluorómetro Spectramax M5. (Dispositivos moleculares) a 380 nm de excitación y 440 nm de emisión. La media de los cambios de fluorescencia fue normalizado tomando el control (sin inhibidor) como 100%. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  se determinaron a partir de gráficos de concentración-respuesta semilógica utilizando el método de ajuste de curva no lineal (Santos et al., 2005). La relación de la evaluación biológica con el modo de unión de las moléculas seleccionadas fue inferido en base a resultados *in vitro* y análisis de dinámica molecular.

## 6.5 DM análisis

La simulación se ejecutó usando el programa GROMACS 5.1.2 (Habraham, 2015) con la estructura tridimensional de la cruzaina (PDBID: 1U9Q) la cual se obtuvo desde la Protein Data Bank database (<http://www.pdb.org>) en formato PDB (Choe et al., 2005). Para la preparación de la proteína se requirió generar los estados de protonación a un pH de 5.5 y correcciones estructurales de los residuos utilizando la herramienta Protein Prepare Wizard (Sastry et al., 2013). La parametrización y topología de los ligandos fue realizada en el servidor LigParGen en un campo de fuerzas OPLS/C1AM (Dodda et al., 2017). Las simulaciones del complejo proteína- ligando se realizaron en un modelo de agua de 3 sitios basado en el modelo SPC en una celda de simulación dodecahédrica en un esquema de equilibramiento microcanónico NVE, utilizando 1200 moléculas de agua (Marck & Nilson 2001). Una vez solvatado el sistema se analizó las cargas de la proteína, requiriendo agregar 9 átomos de  $\text{Na}^+$  a nuestro sistema para alcanzar la neutralidad de carga. La minimización se realizó haciendo uso del algoritmo “steepest descent minimization” con una fuerza máxima no excedente de 10.00 kJ / mol. Una vez obtenido el sistema en su mínima energía se realizó el equilibrio del sistema es decir, se restringió la proteína y el ligando mediante dos etapas: la primera con el control de temperatura acoplada a un

termostato Berendsen (V-rescale) con 300K y la segunda con un acoplamiento de presión Parrinello-Rahman con una presión de 1.0 bar. A partir del equilibrio de corrida se calcularon las interacciones y fuerzas de largo alcance con el método Particle-Mesh Ewald (PME) (Darden et al., 1993) estableciendo las contribuciones Lennard-Jones y Coulomb a 1.2 nm, equilibrando el sistema con muestreos a 100 ps.

## 7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Cribado virtual basado en estructura

Para la selección de la estructura cristalográfica de la cruzaina primeramente se hizo un análisis de la información bibliográfica, se analizó el número de estructuras con las que se contaba en la base de datos PDB y las características de cada una, obteniendo un total de 25 estructuras disponibles en las bases de datos, las cuales se muestran en el anexo 1.

De acuerdo a la información revisada se planteó utilizar dos estructuras (3LXS y 1U9Q) para determinar el tamaño del espacio de búsqueda en el sitio activo de la cruzaina. La estructura 3LXS (figura 8), fue utilizada anteriormente en el trabajo realizado por Chen y colaboradores en el 2010, donde se evaluaron análogos del compuesto K11777, el cual es una vinil sulfona que ya se encuentra en evaluaciones *in vivo*.

El estudio de acoplamiento con la estructura 3LXS se estableció con un tamaño del espacio de búsqueda con una dimensión de 14Å, y su centro fue de 36.722, 41.543 y 8.499 para x, y y z, respectivamente. Con estas coordenadas (Tabla 2) se obtuvo como energía libre de unión un valor de referencia de -5.1 Kcal/mol

Tabla 2. Coordenadas del centro de interacción establecidas entre la estructura 3LXS y el ligando de referencia.

INFORMACION 3LXS	
Receptor	3lxs_protein_A.pdbqt
Ligando	3lxs_Ligand.pdbqt
Center X	55.989
Center Y	-0.25
CenterZ	19.269
Size X	44
Size Y	52
Size Z	54

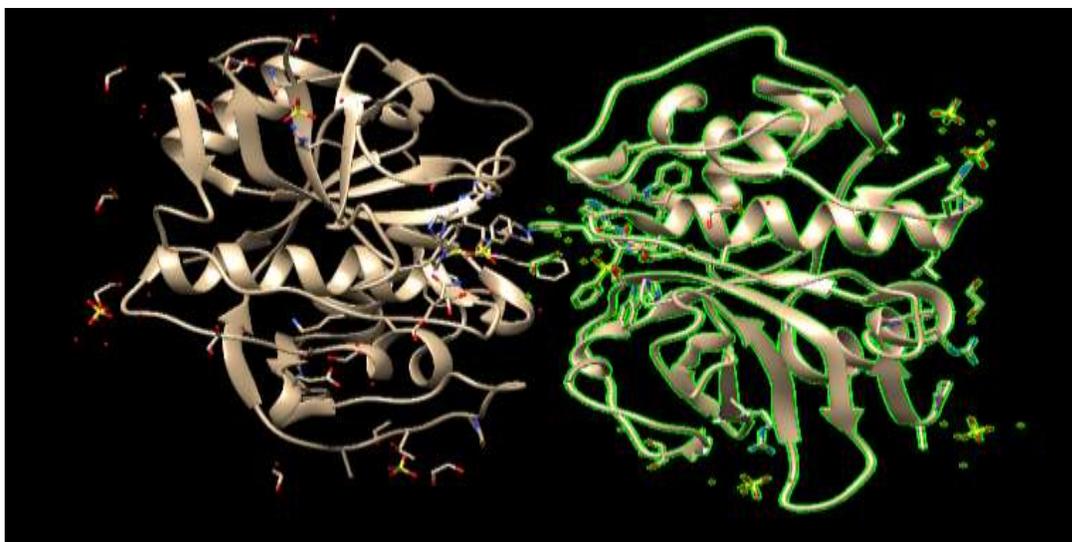


Figura 8. Estructura 3LXS y ligando de referencia utilizados para el establecimiento de coordenadas de interacción.

De igual manera se trabajó el acoplamiento de referencia con la estructura 1U9Q utilizada por Choe y colaboradores en el 2005 (figura 9), ya que es una de las estructuras que se ha utilizado como referencia en otros trabajos de acoplamiento con hidrazonas como lo es en el trabajo de Hernandez y colaboradores 2010 y Leite y colaboradores 2007. En el cuadro 3 se presentan las coordenadas establecidas para el diseño de la caja de interacción, las cuales permitieron obtener una energía libre de unión de -6.6 Kcal/mol.

Tabla 3. Coordenadas del centro de interacción establecidas entre la estructura 1U9Q y el ligando de referencia.

<b>INFORMACION 1U9Q</b>	
Receptor	1U9Q_protein.pdbqt
Ligando	Ligand.pdbqt
Center X	7.605
Center Y	9.788
CenterZ	8.779
Size X	48
Size Y	40
Size Z	54

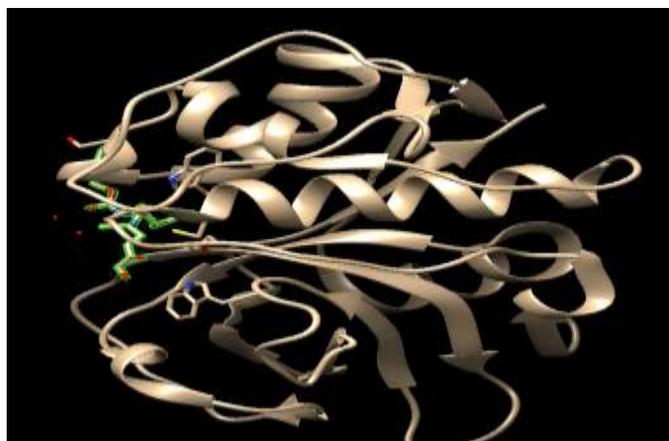


Figura 9. Estructura 1U9Q y ligando de referencia utilizados para el establecimiento de coordenadas de interacción.

Dentro del análisis bibliográfico también encontramos que estas estructuras además de que han sido utilizadas por otros autores para la búsqueda de inhibidores de cruzaina, también se ha reportado que se trata de estructuras con las que se pueden alcanzar bajos valores de RMSD y energías libres de unión mayores a  $-6.0$  Kcal/ mol, como lo presenta Fabian y colaboradores en el 2015 (Tabla 1).

Tabla 4. Estructuras y resultados de Cross-Docking (Fabian et al., 2015).

<b>PDB</b>	<b>Ligando</b>	<b><math>\Delta G</math> dock</b>	<b>RMSD</b>
1AM1	ZYA	-5.13	2.35
1EWL	R99	-3.54	1.26
1EWM	RL2	-4.23	1.87
1EWO	VSC	-5.77	1.80
1EWP	OI5	-5.34	1.12
1F29	VS1	-9.91	1.98
1F2A	VS2	-6.88	1.95
1F2B	VS3	-5.18	2.97
1F2C	VS4	-6.56	2.85
1ME3	P10	-5.43	1.96
1ME4	T10	-7.85	1.96
1U9Q	186	-6.74	1.38

2AIM	ZRA	-5.68	1.64
2OZ2	D1R	-8.43	2.66
3HD3	25B	-8.31	0.98
3I06	QL2	-6.56	4.98
3IUT	KB2	-7.55	2.80
3KKU	B95	-8.26	3.58
3LXS	4MC	-8.876	2.20

A partir de esta información se planteo trabajar con la estructura de la proteína con ID 1U9Q, la cual es la más utilizada para hidrazonas en los análisis de acoplamiento molecular. El ligando utilizado para el docking de referencia fue un éster bencílico (Figura 10). Esto fue porque en otros estudios, se han demostrado interacciones relevantes con aminoácidos de la tríada catalítica (Cys25, His159 y Asn175) y con los aminoácidos Gln19, Asp158, Trp177 y Gly66, que han sido reportado en interacciones que muestran una gran serie de derivados de hidrazona e inhibidores competitivos de Cz (Zaldini et al., 2010; Massarico et al., 2014; Ferreira et al., 2010). Además, presento un mayor puntaje negativo con un valor de -6.6 Kcal/mol, mientras que la estructura 3LXS presento un valor de -5.1 Kcal/mol.

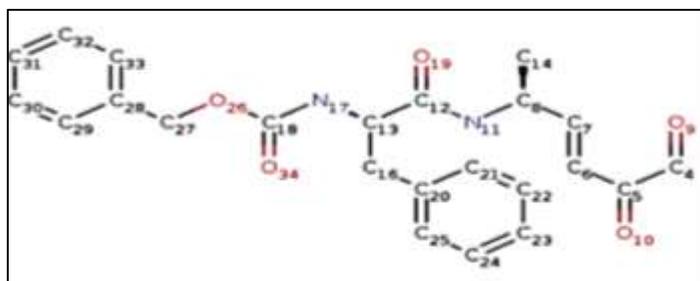


Figura 10. Estructura del ligando 186 utilizada para el docking de referencia.

Una vez establecidas la coordenadas y seleccionada la estructura cristalográfica para el acoplamiento nos aseguramos que se estuvieran incluyendo dentro del sitio de interacción los residuos de interés. Con el servidor ProteinsPlus y la herramienta DoGSiteScorer, el sitio de enlace de 1U9Q fue identificado (Figura 11a). Este sitio tiene una superficie de 820.85 Å<sup>2</sup>, donde 15 donantes de hidrógeno, 37 aceptores de hidrógeno, 35 interacciones

hidrofóbicas, 47% de aminoácidos no polares, 33% de aminoácidos polares y 7% se encuentran aminoácidos cargados positivamente y 13% cargados negativamente. Residuos contenidos en el bolsillo del sitio de unión se muestra en la Figura 11b en la cual se puede observar que se incluyeron residuos del sitio catalítico como Cys25 e His172. la Cz es una cisteína proteasa responsable de la degradación de proteínas. Su actividad enzimática está relacionada a la presencia de residuos de cisteína (Cys25) e histidina (His172) en el sitio activo. El tipo de enlace covalente formado entre el ligando y el sitio activo en Cys25 es muy importante para determinar si la inhibición es reversible o irreversible. Por ejemplo, las vinilsulfonas y las chalconas se unen al tiol activo de Cys25 y actúa como inhibidores irreversibles covalentemente.

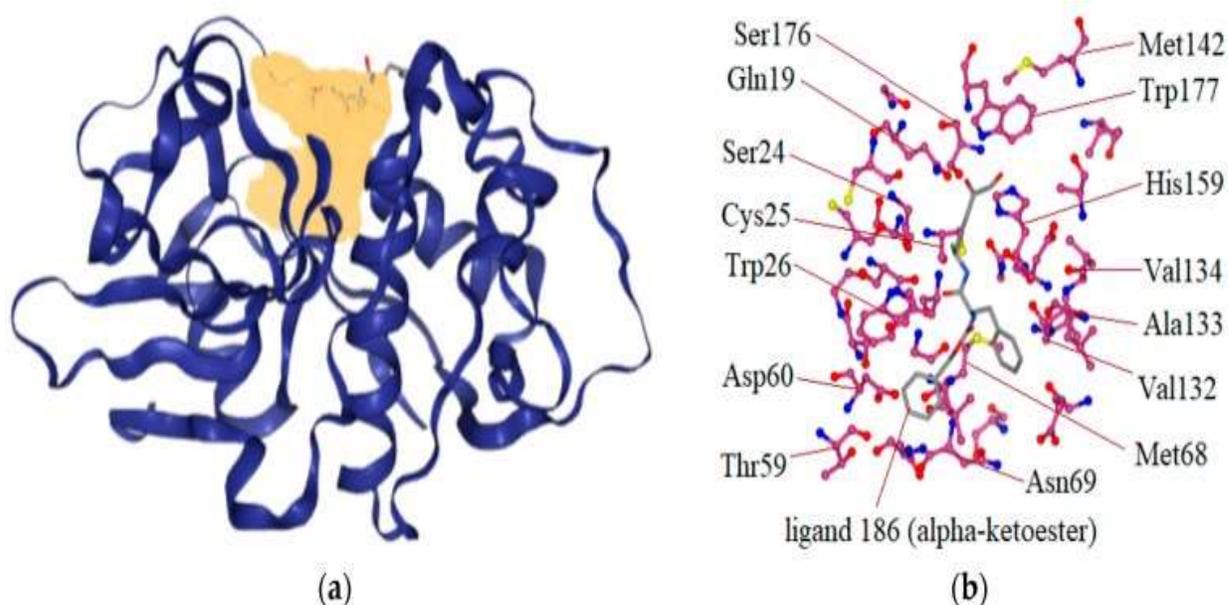


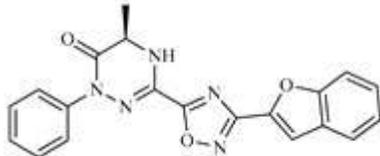
Figura 11. Detección del sitio de unión en la estructura cristalográfica 1U9Q. (a) sitio de interacción en color amarillo detectada por la herramienta DoGSiteScorer usando el servidor ProteinsPlus. (b) Interacciones registradas entre cruzaina-ligando.

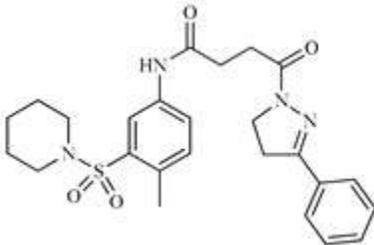
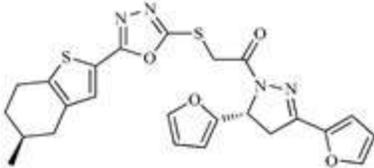
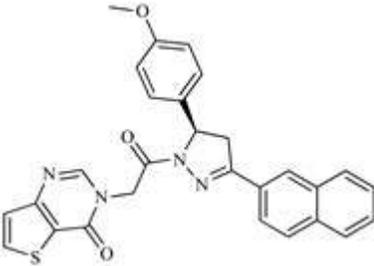
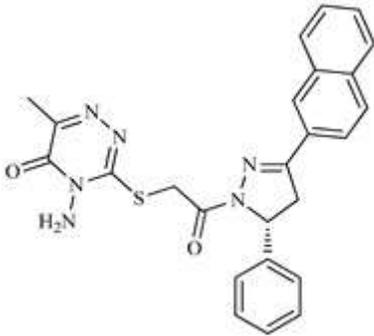
Una vez que se visualizaron las posibles interacciones que podrían presentarse se continuo con la selección de los ligandos usando el smile (C = NNC (C) = O), el cual permitio filtrar un total de 2221 compuestos recuperados de la base de datos ZINC15 que reunieron los criterios de inclusión. Los compuestos recuperados fueron derivados de *N*-acilhidrazona en su mayoría cíclicos. La razón de este alto número fue porque el pequeño tamaño del smile

aumento la probabilidad de que aparecieran durante el cribado. Sin embargo, decidimos continuar el trabajo con estos compuestos porque pertenecen a la categoría de compuestos “lead” y se sabe que se utilizan como punto de partida inicial en los esfuerzos de química médica (Oprea et al., 2001). Esta categoría también es una de las bibliotecas más amplias utilizadas en análisis de cribado virtual ya que estas estructuras simples tienen características químicas que son susceptibles a la optimización química (Sterling & Irwin 2015). Por lo tanto, estos compuestos fueron utilizados en el presente análisis.

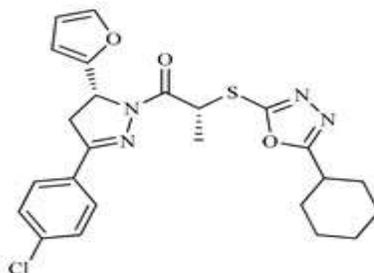
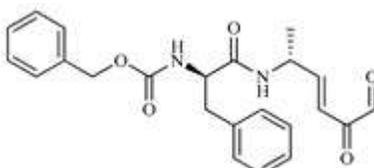
El acoplamiento molecular fue realizado con los 2221 ligandos recuperados, utilizando las coordenadas de referencia establecidas en el sitio de unión 1U9Q. Un total de 682 ligandos mostraron una energía de unión negativa ( $< -6.6$  Kcal / mol) menor que la obtenida para el ligando 186. La Tabla 1 muestra los mejores compuestos (los diez primeros con energías de unión  $< -8.0$  Kcal / mol) que contiene como estructura general (C=NNC(C)=O), donde se observa que el compuesto ZINC000129684040 obtuvo un valor de energía libre de unión de  $-8.6$  Kcal / mol.

Tabla 5. Estructuras de los diez compuestos principales con las mejores energías de unión obtenidas de la base de datos de ZINC15.

Compuesto	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)	Actividad Reportada
Z1 ZINC129684040		-8.6	None

Compuesto	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)	Actividad Reportada
Z2 ZINC9873043		-8.3	Inhibitor of cannabinoid receptor type 2
Z3 ZINC9870651		-8.2	None
Z4 ZINC9835465		-8.2	Amine oxidase inhibitor
Z5 ZINC9715287		-8.1	Amine oxidase inhibitor

Compuesto	Estructura	Energia de unión (kcal/mol)	Actividad Reportada
Z6 ZINC9861447		-8.1	Amine oxidase inhibitor
Z7 ZINC9873693		-8.1	Inhibitor of aldo keto reductases
Z8 ZINC14741665		-8.0	Inhibitor of cathepsin S
Z9 ZINC60293658		-8.0	None

Compuesto	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)	Actividad Reportada
Z10 ZINC9867137		-8.0	Amine oxidase inhibitor
186		-6.6	Cx inhibitor

## 7.2. Agrupamiento y análisis del contacto ligando-aminoácido

Se eligió un total de 682 ligandos que presentaron una energía de unión mayor a la obtenida en el acoplamiento de referencia con el ligando 186 (-6.6 Kcal / mol), este valor se usó como un valor de corte para la selección de inhibidores potenciales. Además se analizaron los aminoácidos que interactuaban con Cz, utilizando el software AuPosSOM. Se obtuvo un total de 331 ligando con energías de unión menores a la de referencia, a estos ligandos se les analizó la correlación existente entre sus energías de unión y los grupos funcionales presentes.

El análisis de agrupación de los 331 ligandos realizado con AuPosSOM mostró 20 grupos (figura 13). Ningún patrón de agrupación se correlacionó con la energía de unión, un hallazgo similar al informado por Fereidoonzhad et al., 2018, por lo cual en el presente

trabajo, se seleccionaron los compuestos con la energía de unión más alta dentro de cada clado y se revisó su disponibilidad comercial, como se hizo anteriormente por algunos otros autores (Lara-Ramírez et al., 2017).

De los 20 clados (figura 13), 9 contenían compuestos con las mejores puntuaciones distribuidas en los grupos 4, 6, 10, 11, 14, 16, 17, 18 y 19, y cuatro grupos contenían compuestos con puntuaciones más bajas (2, 12, 13 y 20). Dentro de los 20 clados, 6 compuestos Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 y Z6 mostraron los puntajes negativos más altos (Tabla 1); sin embargo, el mejor compuesto, Z1, no estaba disponible comercialmente, por lo tanto, no se consideró en posteriores análisis de selección. El compuesto Z4 no se consideró tampoco para los análisis *in vitro* porque tenía una energía de unión similar a Z3, y las interacciones presentadas fueron muy similares. Una detallada inspección visual se realizó de las interacciones de los aminoácidos (figura 12) con los compuestos Z2 y Z3, observando que ambos compuestos interactuaron en el sitio catalítico de manera similar al inhibidor de referencia 186. Los compuestos Z5 y Z6 interactuaron en un sitio de unión opuesto, lo que indicó que podrían ser inhibidores no competitivos.

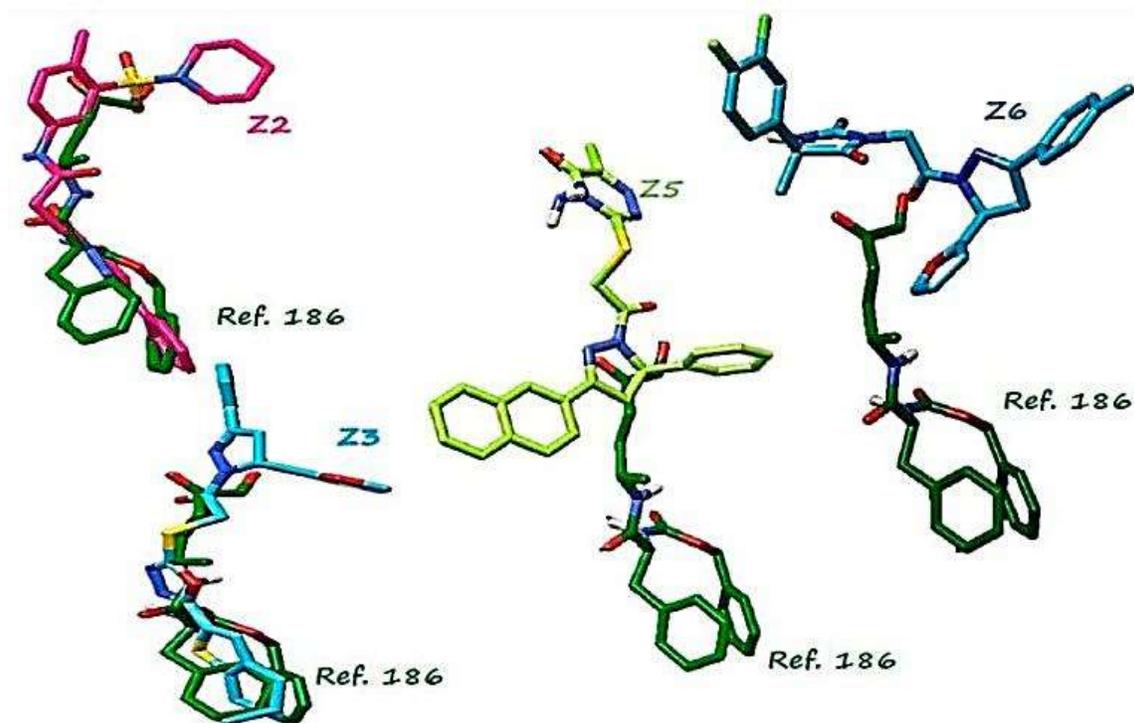


Figura 12. Análisis de posturas de acoplamiento entre la postura del ligando 186 que interactúa en el sitio catalítico (verde) y compuesto Z2 en rosa, Z3 en azul claro, Z5 en limón verde y Z6 en azul, alineación de estructuras realizadas con el programa AutoDock.



Figura 13. Patrón de agrupamiento obtenido con AuPosSOM basado en la huella de contacto aminoácido-ligando.

Otra herramienta utilizada para el refinamiento de la selección de los ligandos en este trabajo fue el uso del programa Ligplot. En la figura 14 podemos observar la presencia de interacciones ácidas para el compuesto Z2 que involucraron interacciones hidrofílicas con los aminoácidos His159 y Cys25; ambos aminoácidos son esenciales para el proceso catalítico. Otra de las interacciones observadas fueron de origen hidrofílico para el compuesto Z2 cerca del sitio catalítico con los residuos Gly66, Gln19 y Asp158. Por el contrario, el compuesto Z3 solo presentó una interacción hidrófoba con el residuo catalítico Cys25 así como interacciones hidrofóbicas con Gly66, Gln19 y Asp158. Ambos compuestos Z2 y Z3 presentaron interacciones a través de enlaces hidrófobos con aminoácidos (Ala133, Leu157, Leu67, Gly23, Trp177, Gly66 y Glu205).

Por otro lado, el compuesto Z5 mostró interacciones hidrofílicas con los residuos Asn69, Ser208, Ser207 y Val111, así como interacciones hidrofóbicas con el residuos Phe72, Asn70, Gly109, Glu73, Gln77, Trp108 y Val210. El compuesto Z6 mostró interacciones hidrofílicas con Asn69, Ser208 y Val210, así como interacciones hidrofóbicas con Asn70, Phe72, Gly109, Glu112, Leu 113, Trp123, Ala209 y Ser207. La mayoría de las interacciones hidrofílicas con los aminoácidos Cys25, His159, Gln19, Ser207 y Val210 están involucrados en la unión entre átomos de oxígeno con los grupos carbonilo presentes en los cuatro compuestos; esta clase de interacciones se han informado para inhibidores irreversibles de Cz que contienen cetonas. Estos compuestos generan reacciones que proporcionan la electrofilia necesaria para interactuar con la enzima que confiere el mecanismo de inhibición enzimática para que pueda transcurrir la reacción (Mahler & Moreira, 2012). Además, también se observó que los residuos Asn69, Ser208 y Asp158 interactuaron con átomos de hidrógeno presentes en el grupo metilo y grupos NH esto posiblemente a que se trata de residuos aceptores polares o donantes de protones.

Los compuestos Z5 y Z6 por otra parte presentaron interacciones con los residuos Asn69, Ser208, Ser207, Val111 y Val210, que fueron representados como enlaces covalentes (Figura 14). Con base a los hallazgos anteriores, los compuestos Z2, Z3, Z5 y Z6 se seleccionaron para estudios experimentales posteriores.

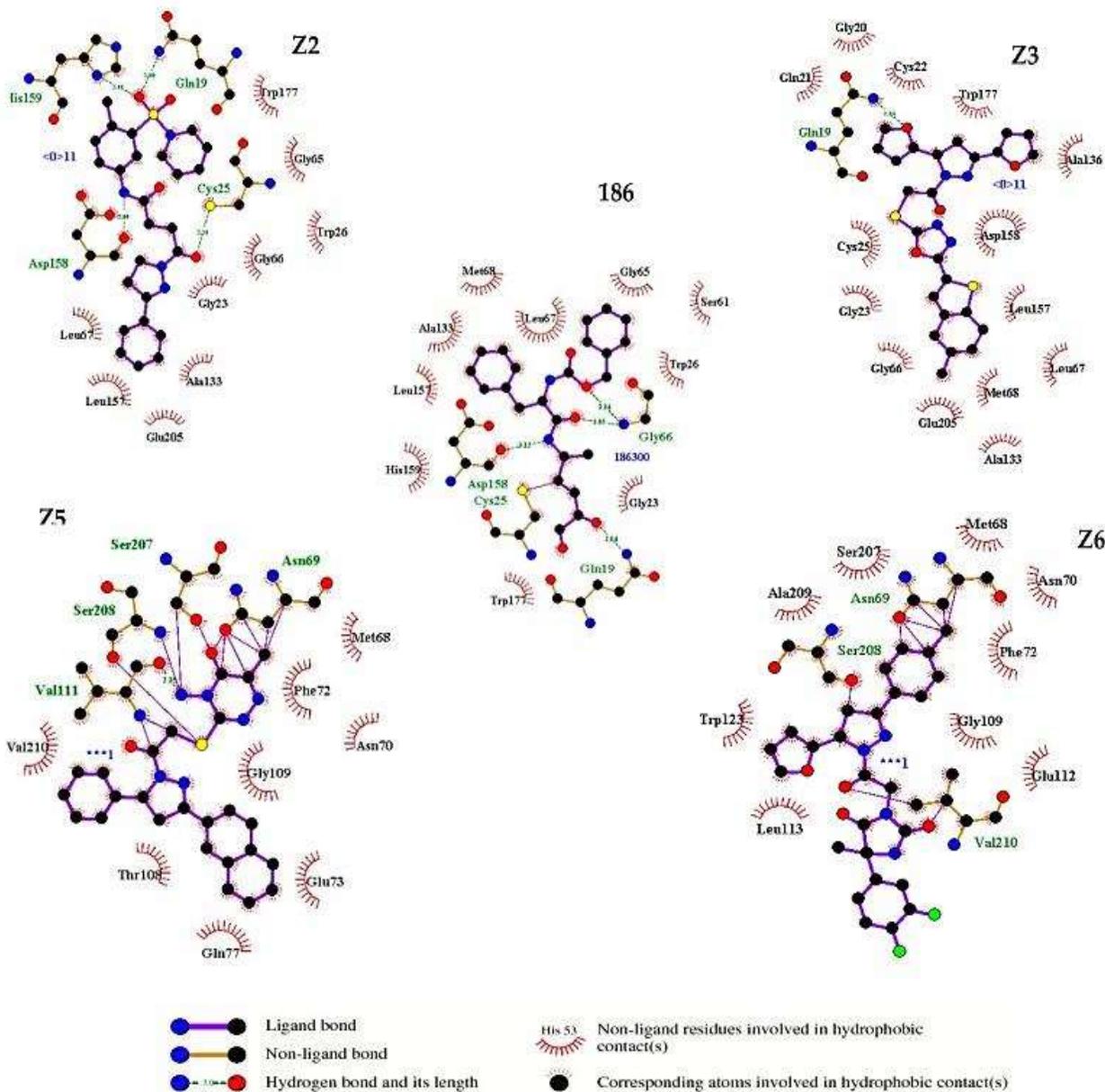


Figura 14. Interacciones de aminoácidos de los cuatro compuestos seleccionados (Z2, Z3, Z5 y Z6) y la referencia ligando 186 en Cz. En las cinco figuras, los arcos con líneas rojas representan contactos de aminoácidos hidrófobos, las líneas discontinuas verdes representan enlaces de hidrógeno y las líneas moradas representan enlaces covalentes entre proteína y ligando o enlaces "elásticos" dentro del ligando. La imagen fue producida con el software LigPlot.

### 7.3. Evaluacion *in vitro*

Los compuestos evaluados Z2, Z3, Z5 y Z6 mostraron diferentes efectos tripanocidas (Tabla 3). En la forma de epimastigote, los compuestos Z3 y Z6 no mostraron efectos tripanocidas ( $CL_{50} > 250 \mu M$ ). El compuesto S1, un inhibidor de Cz, tampoco mostró un efecto biológico. Los compuestos Z2 y Z5 solo mostraron actividad tripanocida. Z2 tuvo una actividad baja, pero Z5 mostró un efecto tripanocida similar a Nfx, aunque era cuatro veces menos potente que Bzn. El comportamiento biológico no varió entre los compuestos descritos anteriormente y el estadio de *T. cruzi* evaluado. Contra los tripomastigotes del torrente sanguíneo, los compuestos Z2, Z3, Z6 y el inhibidor S1 mostraron valores de  $CL_{50}$  mayores a  $250 \mu M$ , resultando en una concentración dos veces más alta que la obtenida con los medicamentos de referencia para ambas cepas (INC-5 y NINOA). Los resultados tripanocidas obtenidos de el inhibidor S1 difieren del reportado por Ferreira et al. (2010) y Pinto et al. (2017), porque estos autores indicaron que el compuesto S1 mostró valores de  $CL_{50}$  de  $2.5 \mu M$  en fibroblastos de ratón infectados (L929) con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahúen.

El compuesto más activo en ambas etapas y ambas cepas fue el compuesto Z5, sobre epimastigotes de la cepa INC-5 mostrando la misma actividad tripanocida que la de Nfx. En el estadio tripomastigote, Z5 presentó valores de  $CL_{50}$  inferiores a Bnz en ambas cepas con concentraciones 1.6 veces menor que los presentes con el medicamento Nfx; por lo tanto, el compuesto Z5 es una estructura prometedora en la búsqueda de nuevos agentes para tratar la enfermedad de Chagas. Esto puede atribuirse a que presentan estructuras que han sido reportadas anteriormente por otros autores que indican que los derivados de hidrazonas como las tiazolilhidrazonas han demostrado ser potentes agentes con capacidad para inhibir la replicación del epimastigote ( $CI_{50} = 0.3 \mu M$ ) con una mayor actividad tripanocida que el benznidazol ( $IC_{50} = 1.8 \mu M$ ) (Zaldini et al., 2010). Otros autores afirman que los híbridos de N-acilhidrazona y furoxano son activos en amastigotes de *T. cruzi*. Además, esta clase de compuestos, por cribado de permeabilidad en células Caco-2 y ensayos de citotoxicidad en células humanas, mostraron menos citotoxicidad, buena permeabilidad y un índice de selectividad más alto que el fármaco de referencia benznidazol (Massarico et al., 2014). Además, el resto N-acilhidrazona se considera una

estructura privilegiada en la química médica, ya que tiene el potencial de interactuar con diferentes objetivos biológicos, incluida la cisteína proteasa de *T. cruzi* (Romeiro et al., 2009; Moreira et al., 2009)

Tabla 6. Concentración lítica media máxima de los compuestos Z2, Z3, Z5, Z6 y S1 y los farmacos de referencia en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*.

Compound	Epimastigotes	Bloodstream Trypomastigotes	
	CL <sub>50</sub> (μM)	CL <sub>50</sub> (μM)	
	<i>T. cruzi</i> INC-5	<i>T. cruzi</i> NINOA	<i>T. cruzi</i> INC-5
Z2	239.40 ± 9.3	>250	>250
Z3	>250	>250	>250
Z5	36.26 ± 9.9	166.21 ± 14.5	185.1 ± 8.5
Z6	>250	>250	>250
S1	>250	>250	>250
Nfx	38.36 ± 5.2	99.41 ± 11.1	117.16 ± 16.36
Bnz	9.64 ± 4.2	183.1 ± 16.2	225.40 ± 26.5

#### 7.4. Inhibición enzimática

Para confirmar el estudio predictivo de nuevos posibles inhibidores de Cz y confirmar el mecanismo de acción, se realizó la inhibición enzimática con cisteína proteasas de *T. cruzi*. Los resultados de la concentración media inhibitoria de la actividad enzimática se muestra en la Tabla 3. Un comportamiento similar entre epimastigotes y tripomastigotes se puede observar en la evaluación *in vitro* de *T. cruzi*. Los compuestos Z2 y S1 mostraron actividades inhibitorias débiles (CI<sub>50</sub> > 200 μM). Z3 mostró un valor CI<sub>50</sub> de 84.37 μM en la inhibición de la proteasa, pero este compuesto no tuvo un efecto tripanocida en

epimastigotes y tripomastigotes. En esta evaluación, observamos que los compuestos Z5 y Z6 se caracterizaron por una mejor actividad inhibitoria con valores de  $CI_{50}$  de 56.23  $\mu\text{M}$  y 50.35  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Sin embargo, Z6 no tuvo un efecto tripanocida. En contraste, Z5 fue el mejor compuesto con actividad tripanocida sobre epimastigotes y tripomastigotes. Aunque estos resultados confirman una inhibición de la cisteína proteasas como mecanismo de acción, es necesario un estudio específico sobre la enzima Cz para determinar tipo de inhibición que podrían tener estos compuestos.

Tabla 7. Valores de  $CI_{50}$  para cisteína proteasas de epimastigotes de la cepa INC-5 de *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Z2	1410.05
Z3	84.37
Z5	56.23
Z6	50.35
S1	>200

Según los resultados obtenidos en este trabajo, Z5 presenta una actividad biológica interesante que proporciona una guía para analizar compuestos análogos, así como para continuar analizando las interacciones y el lugar donde ocurren, ya que, como se puede ver en la Figura 15, es un sitio catalítico diferente, lo cual podría posiblemente favorecer la actividad del compuesto Z5.

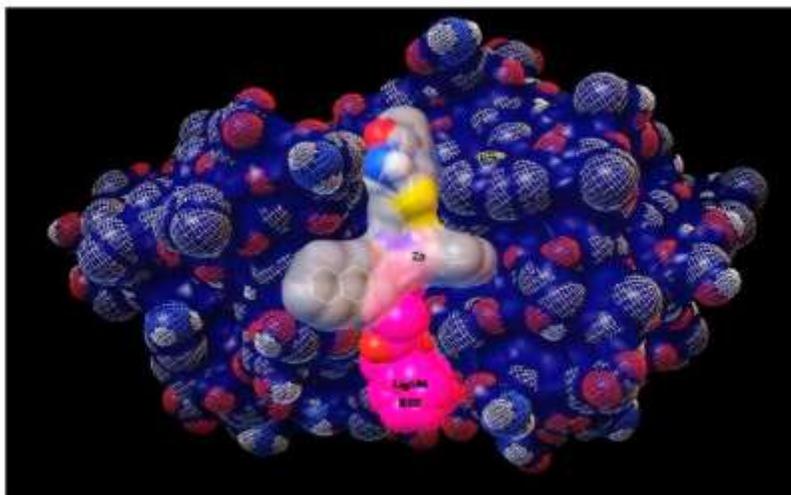


Figura 15. Análisis del sitio de interacción entre el ligando 186 y el compuesto Z5 en Cz.

De acuerdo a los resultados el modo de unión y la actividad enzimática no se correlacionaron, como esperábamos, lo cual consideramos podría deberse a las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. Esto podría interferir en la penetración de los compuestos en las membranas celulares o limitar la evaluación de la inhibición de la enzima Cz en *T. cruzi* solamente y no tener el mismo efecto debido a que se evaluó en un extracto de proteasas y no únicamente en la cruzaina que fue hacia la enzima que se biodirigió (Choe et al., 2005).

### 7.5. Análisis de dinámica molecular

Los resultados de la actividad biológica no presentaron correlación entre las energías de unión y las interacciones presentes. Por lo anterior se buscó encontrar la correlación entre el compuesto Z5 y la actividad biológica mediante una exploración de las interacciones que posiblemente estuvieran ocurriendo en un periodo de tiempo mediante un análisis de dinámica molecular.

En la figura 16 se puede apreciar mediante la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) la cual es una medida de similitud ampliamente utilizada en el análisis de estructuras y dinámicas moleculares que no existe una desviación significativa de la configuración inicial acoplada. Además se puede observar la estabilidad que presentó el compuesto Z5 durante los 100 ns con un valor de RMSD menor a 0.4 nm, el cual de

acuerdo a Carvalho y colaboradores en el 2018 indican que las fluctuaciones en un sistema dinámico deben encontrarse entre 0.35 – 0.99 nm y que mientras mas bajo sea el valor presentado, mayor estabilidad podría presentar la interaccion en el sistema biológico.

De manera contraria el compuesto Z2 presento 3 fluctuaciones en los 100 ns, alcanzando valores de RMSD de hasta 1.25 nm, estos resultados dan la pauta para plantear que el compuesto Z5 pudiera estar teniendo una actividad biológica mas sobresaliente por las interacciones que se mantuvieron en la mayoría del tiempo y que posiblemente Z2 presenta una pose muy similar al compuesto 186, pero las interacciones no son estables y eso pudiera estar interfiriendo en la actividad biológica.

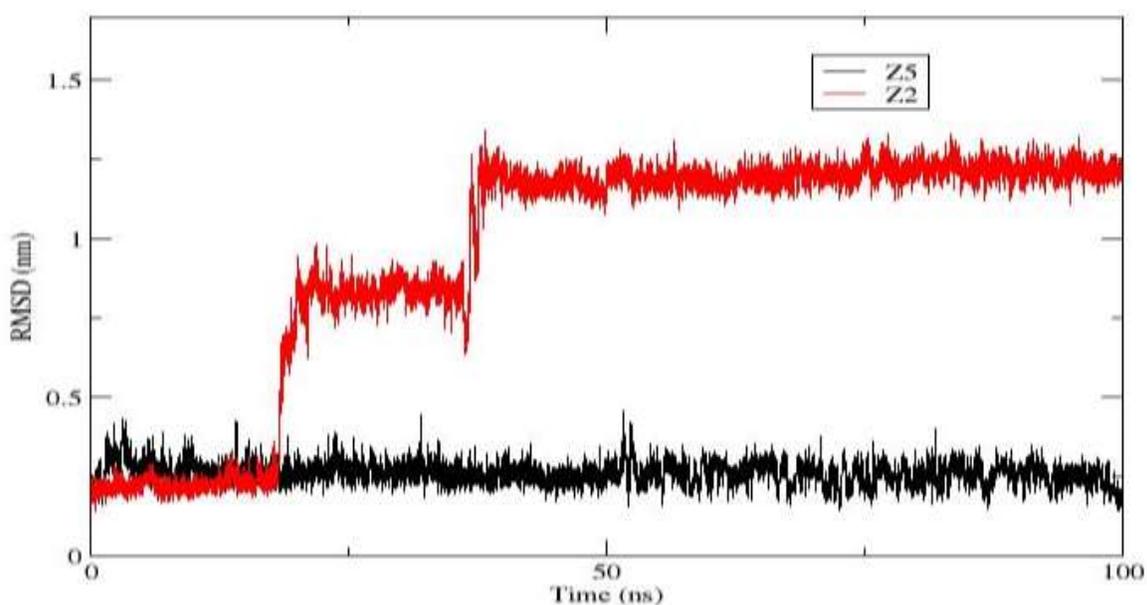
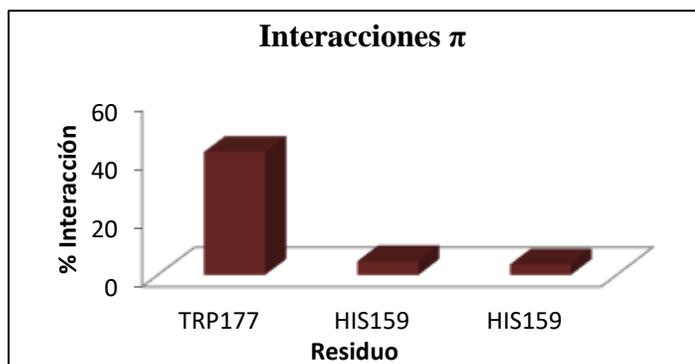


Figura 16. Valores de RMSD calculados entre el compuesto Z2 (rojo) y Z5(negro) obtenidos durante el análisis de dinámica molecular.

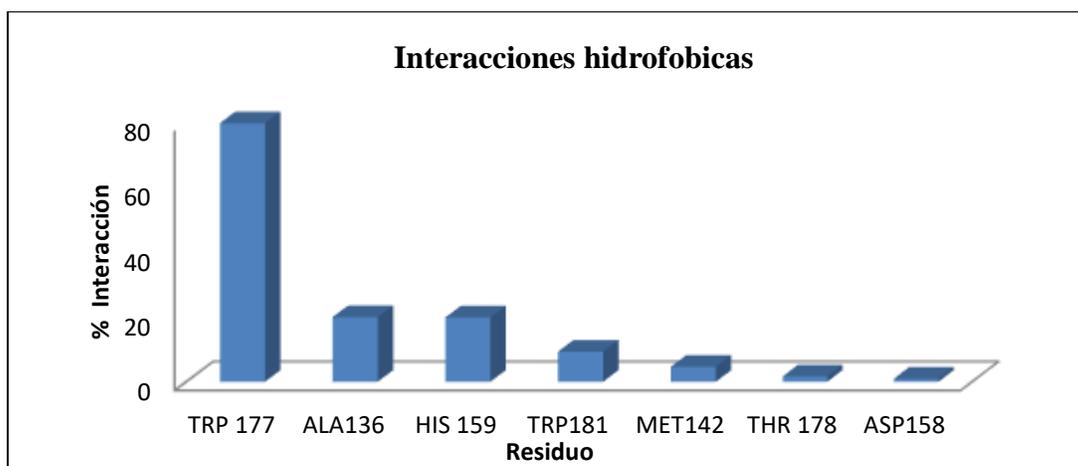
En la dinámica molecular además se analizaron las interacciones presentes, en la grafica 1 se observa que el residuo Trp177 se presento en un 42.04% durante los 100 ns y que el residuo catalítico His159 se presento en un 4.67% interactuando mediante uniones  $\pi$  staking y  $\pi$  action, la His 159 es un aminoácido esencial en la catálisis, es capaz de captar un protón de la cisteína, y desencadenar toda la reacción de hidrolisis. Este tipo de interacciones son no covalentes, y se tiene como antecedente que generan una geometría característica en anillos aromáticos permitiendo estabilizar los complejos proteína-ligando

de múltiples familias, proporcionando una alta estabilidad, por esto las interacciones  $\pi$  dentro del análisis de acolamiento deberían ser de uso general en el diseño basado en la estructura hacia interacciones optimizadas para aminoácidos aromáticos (Matter et al., 2009).



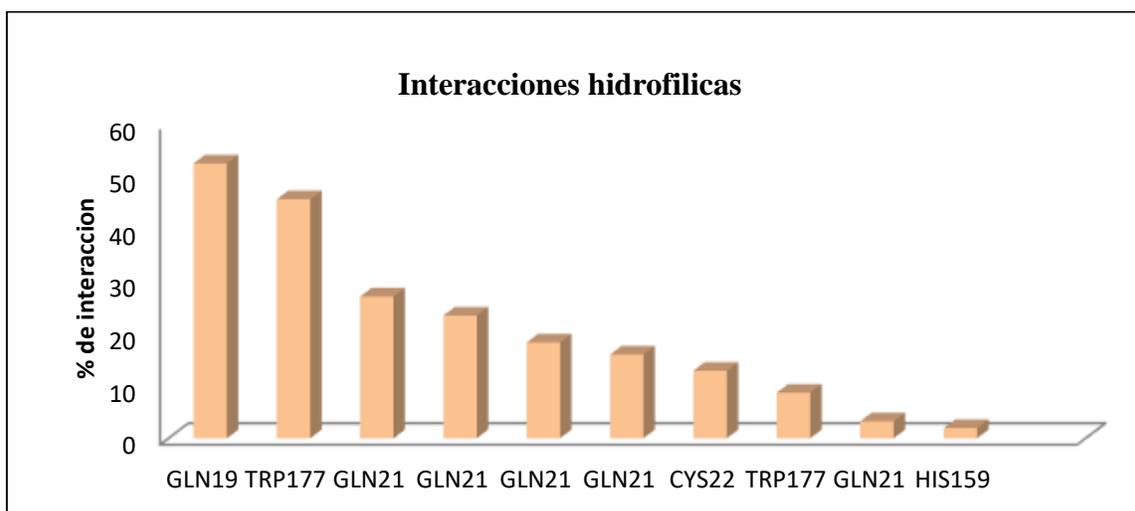
Grafica 1. Interacciones  $\pi$  identificadas por dinámica molecular y sus respectivos % de interacción.

De manera hidrofóbica se visualizó que los residuos que en mayor porcentaje se presentaron de acuerdo al gráfico 2 fueron: Trp177, Ala136, His159, Trp181, Met142, Thr178 y Asp158 con un 79.8%, 19.96%, 19.89%, 9.3%, 4.65%, 1.67% y 1% respectivamente. Nuevamente observamos que la interacción que predomina fue con Trp177, este residuo ha sido reportado por distintos autores en interacciones que muestran una gran serie de derivados de hidrazona e inhibidores competitivos de Cz (Zaldini *et al.*, 2010; Massarico *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2010).



Grafica 2. Interacciones hidrofóbicas identificadas por dinámica molecular y sus respectivos % de interacción.

La interacción hidrofílica que predominó durante la dinámica 79.81% fue con el residuo Gln 19, este residuo se ha observado interactúa con enlaces de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo en complejos cristalográficos publicados de inhibidores de cruzaina. Esta interacción junto con el residuo His159 se sabe están involucradas en la unión de átomos de oxígeno con los grupos carbonilo y se ha informado la presencia de estas interacciones para inhibidores irreversibles de Cz que contienen cetonas, dado que este tipo de interacciones genera reacciones que proporcionan la electrofilia necesaria para interactuar con la enzima confiriendo el mecanismo de inhibición enzimática para que transcurra la reacción (Mahler & Moreira 2012).



Grafica 3. Interacciones hidrofóbicas identificadas por dinámica molecular y sus respectivos % de interacción.

## 8.- CONCLUSIONES

Analizando la estructura actividad de inhibidores de cruzaina de la literatura, se encontró que las interacciones de interés para dirigir nuestra búsqueda debía darse con los residuos Cys25, His159, Asn175 que conforman la triada catalítica, así como Gln19, Asp158, Trp 177 y Gly 66 que han resultado fuertes interacciones que potencian la inhibición de cruzaina.

A partir del acoplamiento molecular se obtuvieron 330 compuestos con una energía de unión mayor a -6.6, de los cuales los 6 mejores compuestos de la base de datos ZINC15 fueron: Z<sub>1</sub>= ZINC129684040, Z<sub>2</sub>= ZINC9873043, Z<sub>3</sub>= ZINC9870651, Z<sub>4</sub>= ZINC9835465, Z<sub>5</sub>= ZINC9715287 y Z<sub>6</sub>= ZINC9861447 con energías de unión de -8.6, -8.3, -8.2, -8.2, -8.1 y -8.1, respectivamente.

La evaluación de la actividad biológica *in vitro* se realizó con los compuestos Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub>, donde el compuesto Z<sub>5</sub> presentó la mejor actividad tripanocida, con valores de CL50 en epimastigotes de  $36.26 \pm 9.9 \mu\text{M}$  y en tripomastigotes de  $166.21 \pm 14.5 \mu\text{M}$  para la cepa NINOA, y  $185.1 \pm 8.5 \mu\text{M}$  para la cepa INC-5. Además, este compuesto mostró inhibición sobre proteasas de *T. cruzi* con un valor CI50 de  $56.23 \mu\text{M}$ .

El compuesto Z5 presentó una mejor actividad biológica *in vitro* que los otros compuestos analizados, con un % de lisis 2.3 veces menor que nifurtimox y 1.6 veces menor que benznidazol.

De acuerdo al estudio *in silico* de las interacciones en el sitio activo de la enzima, Z5 podría ser un inhibidor no competitivo que posiblemente está interactuando con los residuos Trp177, Gln19 e His159.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahamsohn I.A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1998; 31: 117-121.
2. Andrade A. Z. Immunopathology of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999; 94(1): 71-80.
3. Avelar L.A., Camilo C.D., de Albuquerque S., Fernandes W.B., Goncalvez C., Kenny P.W., Leitao A., McKerrow J.H., Montanari C.A., Orozco E.V., Ribeiro J.F., Rocha J.R., Rosini F., Saidel M.E. Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. Plos Negl Trop. 2015: 14;9(7)
4. Brener Z 1992. Immune Response and Immunopathology in *Trypanosoma cruzi* Infection Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine, ISBT, São Paulo, p. 31-47.
5. Castro J.A., de Mecca M.M., Bartel L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol. 2006;25(8):471-9.
6. Cazzulo, J.J. Stoka, V. Turk, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease, Curr. Pharm. Des. 2001; 7: 1143-1156.
7. Colli W. Trans-sialidase: A unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FASEB J. 1993;7(13):1257-64.
8. Cross GA, Takle GB. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol. 1993;47:385-411.
9. Coura J.R., de Castro S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(1):3-24.
10. Costa L.B., Cardoso M.V., de Oliveira Filho G.B., de Moraes Gomes P.A., Espíndola J.W., de Jesus Silva T.G., Torres P.H., Silva Junior F.P., Martin J., de Figueiredo R.C., Leite A.C. Compound profiling and 3D-QSAR studies of hydrazone derivatives with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi*. Bioorg Med Chem. 2016;24(8):1608-18

11. dos Santos Filho, J.M. Leite, A.C. de Oliveira, B.G. Moreira, D.R. Lima, M.S. Soares, M.B. Leite, L.F. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agentes, Bioorg. Med. Chem. 2009; 17: 6682-6691.
12. Du X., Guo Ch., Hansell E., Doyle P.S., Caffrey C.R., Holler T.P., McKerrow J.H., Cohen F.E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. J. Med. Chem. 2002; 45 (13): 2695–2707.
13. Engel J.C., Doyle P.S., Hsieh I., McKerrow J.H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1998; 188(4): 725–734.
14. Fabbro D.L., Streiger M.L., Arias E.D., Bizai M.L., del Barco M., Amicone N.A. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(1):1-10.
15. Ferreira R.S., Simeonov A., Jadhav A., Eidam O., Mott B.T., Keiser M.J., McKerrow J.H., Maloney D.J., Irwin J.J., Shoichet B.K. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. J Med Chem. 2010; 53(13): 4891-905.
16. Gascón J., Albajar P., Cañas E., Flores M., I Prat G. J., N. Herrera R., Lafuente C.A., Luciardf H.L., Moncayo A., Molina L., Muñoz J., Puente S., Sanz G., Treviño B. y Sergio-Salles X. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. Rev Esp Cardiol. 2007;60(3):285-93
17. Guzmán-Marín E.S., Zavala-Castro J.E., Acosta-Viana K.Y., Rosado-Barrera M.E. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biomed. 1999; 10:177-184.
18. Klemba M., Goldberg D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Ann. Rev. Biochem. 2002; 71: 275-305.
19. Lima A.P., dos Reis F.C., Serveau C., Lalmanach G., Juliano L., Ménard R., Vernet T., Thomas D.Y., Storer A.C., Scharfstein J. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. Mol Biochem Parasitol. 2001;114(1):41-52.

20. Merlino Mellognio A.B. (2010) Investigación y Desarrollo de Nuevos Fármacos Anti-*T. cruzi* : Inhibidores de Cruzipáina Derivados del Sistema Benzofuroxano y 1,3-Dióxido de Benzimidazol (tesis licenciatura). Universidad de la República. Montevideo
21. Minning T.A., Weatherly D.B., Atwood J., Orlando R., Tarleton R.L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. 2009; 10(370): 1471-2164.
22. 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. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2009; 104(I): 263-269.
23. Muñoz D.L., Cardona D.P., Cardona A., Carrillo L.M., Quiñones W., Echeverri F., Vélez ID., Robledo S.M. Effect Of Hydrazones Against Intracellular Amastigotes Of *Leishmania Panamensis* And A Parasitic Cystein Protease. *VITAE Revista De la Facultad De Química Farmacéutica*. 2006; 13( 2): 5-12
24. Ostoa-Saloma P., Garza-Ramos G., Ramírez J., Becker I, Berzunza M., Landa A., Gomez-Puyou A., Tuena De Gomez-Puyou M., Perez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* *Eur. J. Biochem*. 2007; 244: 700-705
25. Padilla Zuñiga A.J. y Rojo Domínguez A. Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o *docking*. Aplicación al diseño de fármacos. *Mensaje Bioquímico*. 2002; (XXVI):129-145.
26. Paveto C., Güida M.C., Esteva M.I., Martino V., Coussio J., Flawiá M.M., Torres H.N. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(1):69-74.
27. Reyes P.A. y Vallejo M. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). 2005 19(4): CD004102.
28. Rivera G., Bocanegra-García V., Ordaz-Pichardo C., Noguera-Torres B., Monge A. New therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi*, advances and perspectives. *Curr Med Chem*. 2009; 16(25): 3286-3293.

29. Rojas W, Caro M.A., Lopera J.G, Triana O., Dib J.C, Bedoya G. Análisis de polimorfismos en los genes tripanotión reductasa y cruzipaína en cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi*. Biomédica. 2007; 27(1) 50-63.
30. Rogers K.E., Keränen H., Durrant J.D., Ratnam J., Doak A., Arkin M.R., McCammon J.A. Novel Cruzain Inhibitors for the Treatment of Chagas' Disease. Chem Biol Drug Des . 2012; 80(3): 398–405.
31. Romeiro N.C., Aguirre G., Hernández P., González M., Cerecetto H., Aldana I., Pérez-Silanes S., Monge A., Barreiro E.J., Lima L.M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates, Bioorg. Med. Chem. 2009; 17: 641-652.
32. Sajid M., Robertson S.A., Brinen L.S., McKerrow J.H. *Cruzain*: The path from target validation to the clinic. Adv Exp Med Biol. 2011; 712:100-15.
33. Siles R., Chen S-E., Zhou M., Pinney K.G, Trawick M.L. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2016; 16(16):4405-9.
34. Silva F.T., Franco C.H., Favaro D.C., Freitas-Junior L.H., Moraes C.B., Ferreira E.I. Design, synthesis and antitrypanosomal activity of some nitrofurazone 1,2,4-triazolic bioisosteric analogues Eur J Med Chem. 2016 Oct 4;121:553-60
35. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007; 102(I): 75-85.
36. Streiger M.L., Del Barco M.L., Fabbro D.L., Arias E.D., Amicone N.A. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas disease residing in a low endemicity area of Argentina. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37(5):365-75.
37. Villar J.C., Marin-Neto JA, Ebrahim S, Yusuf S. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. Cochrane Database Syst Rev. 2002; (1):CD003463.
38. WHO, Chagas disease (American trypanosomiasis), World Health Organization. (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Fecha de consulta Febrero 2017.

## 10.- ANEXOS

A1.- Tabla de estructuras cristalográficas de cruzaina disponibles en la base de datos PDB y características publicadas

No reg.	Autor/año	Ligando	Aa`s	Ki	Cl <sub>50</sub>	análisis
<b>4QH6</b>	Avelar -2015	Dipeptidyl nitrilos N-(2-amino ethyl)-Nalpha-benzoyl-L phenyl alaninamide N-alpha-benzoyl-N-[(2Z)-2-imino ethyl]-L-phenyl alaninamide, C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Gly 66, Leu 67, Asp 161, Cys 25, Gln 19, His 162, Mat 68, Glu 208, Ala 138A, Gly 66A, Leu67A	16 nM EC <sub>50</sub> 28 μM		QSAR
<b>4W5C</b>	Tochowicz, 2014	Applying Fragments Based- Drug Design to identify multiple binding modes on cysteine protease. Publicacion en proceso				
3H6		N-(1H-benzimidazol-2-yl)-3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>5</sub> O				Docking
3H5		N-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O	Trp 184			Docking
3H7		4,6-difluoro-1,3-benzothiazol-2-amine C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S	Gly 23B,			Docking
<b>4XUI</b>	Tochowicz, 2015	WRR-666 (4) and WRR-669 WRR-483 dipeptidyl vinyl sulfones oxanuanidina	Gly 66, Gln69, Trp184, cys25, Asp 161, Glu208. Gly 66, Gln69, Trp184, cys25, Asp 161, Glu208, Leu67			Docking
<b>4W5B</b>	Tochowicz, 2014	1 (N-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3-dimethyl-pyrazole-4-carboxamide Publicacion en proceso				
<b>B301</b>		2-[[[(1H-1,2,4-triazol-5-ylsulfanyl)acetyl]amino}thiophene-3-carboxamide C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Gln 19B, Ser25B, His162B, Gly66B			Docking

	283.33				
<b>A301</b>	N-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O		Asp161A, Gly 66A, His162, Ser25A, Gln 19A		Docking
<b>C301</b>	N-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O		Ser25C, Asp 161C		Docking
<b>4PI3</b>	Jones 2016	REPETIDO vinyl sulfone analog of WRR-483 (WRR-666)			Docking
<b>A301</b> <b>B301</b>		N-[(2S)-5-(carbamimidamidooxy)-1-oxo-1-[[[(1E,3S)-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl]amino}pentan-2-yl]-4-methylpiperazine-1-carboxamide C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> S	Gln19A, Cis 25A, Gly 66A, Glu 208A Asp 161B Gln19B, Cis 25B, Gly 66B, Glu 208B Asp 161B		Docking
<b>4KLB</b>		2-acetamidotiofeno-3-carboxamida nueva cruzina no peptídica, 2-[[[(1H-1,2,4-triazol-5-phenylsulfanyl)acetyl]amino}thiophene-3-carboxamide C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Gly66A Ser61B	3–60 μM) 10.6±0.1 μM	Crivado virtual
<b>3LXS</b>	Chen 2010	WRR 483 K11777 WRR-483, un análogo de K11777 vinil sulfona	Gln19, Trp184, Cys 25, Glu 205, Glu 208		<i>In vitro</i> <i>in vivo</i>
<b>3KKU</b>	Ferrerira 2010	Benzamidoacetato Compuesto 8 – 11 N-[2-(1H-benzimidazol-2-yl)ethyl]-2-(2-bromo phenoxy)acetamide C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> Br N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Gly 66, Cys25, Gln 19, His162, Asp161	30 nM	Docking High-Throughput

					Screen (HTS)
<b>3IUT</b>	Brak 2010	dipeptidyl vinyl sulfone 1 and 1,2,3-triazole-based tetrafluorophenoxy methyl ketone 2.	Gly23, Asp161, Glu 208, Gly 66  Ser61, Gly65, Leu 67, Cys 25, Gln 19, His 106, Gly105, Thr 103, Thr14,	3.1 $\mu$ M	Docking
<b>3I06</b>	Mott 2010	Triazine nitriles  6-[(3,5-difluorophenyl)amino]-9-ethyl-9H-purine-2-carbonitrile C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub>	Gln 19, Cys25	180 nM	HTS
<b>3HD3</b>	Bryant 2009	Non-peptidic vinylsulfones	Gln 19, Cys 25, Gly 66, Asp 161  Leu67, Glu 208, Leu160, His162, Asn182, Tr184, met 145.  Ser 104, Thr 103, Asp 18	0.014 .01 $\mu$ M	<i>in vitro</i>
<b>2OZ2</b>	Kerr 2009	Vinyl Sulfones K11777	Gly 66, Gln 19, Cys 25, Trp 184, Asp 161, His 162, Asp 182, Glu 208, Gly 65.		docking
<b>1U9Q</b>	Choe 2005	a-ketoamide-, a-ketoacid-,  a-ketoester-, and aldehyde	His 159, Cys 25, Gln19, Trp177	3.4 5.5	<i>in vitro</i> docking

<b>1EWO</b>	en proceso	N-[N'-benzyloxycarbonyl-phenylalaninyl]-3-amino-5-phenyl-pentane-1-sulfonic acid phenyl ester wrr-204 ( <i>synonym</i> ) C34H36N2O6S	Gly 66, Cys 25, His159		docking
<b>1EWM</b>	Brinen, en proceso	N-[3-Carboxy-2-Hydroxy-Propionyl]-Lhomophenylalanyl -Amino-2-Methyl Butane Wrr-112 (Synonym) C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Gln 19, Cys25, His159 Gly66, Leu 67, Ala 133		docking
<b>1EWL</b>		N-[3-Carboxy-2-Hydroxy-Propionyl]-D-Homophenylalanyl-Amino-2-Methylbutane WRR-99 (Synonym) C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Gln 19, Cys25, His159		docking
<b>1ME4</b>	Huang 2002	hydroxymethyl ketone [1-(1-Benzyl-3-Hydroxy-2-Oxo-Propylcarbamoyl)-2-Phenyl-Ethyl]-Carbamic Acid Benzyl Ester C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Gln 19, Cys25, His159, glu 205 Gly66, Cys25, His 159.	146 ±32nm 64.6±3.5nm	docking
<b>1ME3</b>	Huang 2002	1-(3-Hydroxy-2-Oxo-1-Phenethyl-Propylcarbamoyl)2-Phenyl-Ethyl]-Carbamic Acid Pyridin-4-Ylmethyl Ester	Ser61, His159, Cys 25, Gly66	146 ±32nm 64.6±3.5nm	docking
<b>1F2C</b>	Brinen 2000	phenyl-containing vinyl-sulfone, sulfonate and sulfonamide	Cys 25, Gln19, Hys159, Asn175, Trp177	$0.319 \times 10^6$ - $6.5 \times 10^6$ <1-8 nm	<i>in vitro</i> docking
<b>1F2B</b>	Brinen 2000	3-[N-[Benzyloxycarbonyl]-Phenylalaninyl-Amino]-5-Phenyl-Pentane-1-Sulfonic Acid 4-Nitro-Phenyl	Asp 158, Cys25, Gln19, Gly66 Met 142, H159, Asn 175,	$4.33 \times 10^6 \pm$ 0.30	<i>in vitro</i> docking

		Ester C34H35N3O8S	Trp 177	1.0Nm	
<b>1F2A</b>	Brinen 2000	3-[N-[Benzyloxycarbonyl]- Phenylalaninyl-Amino]-5-Phenyl- Pentane-1-Sulfonylmethylbenzene C35H38N2O5S	Cys25, Gly66	0.319 × 10 <sup>6</sup> - 6.5 × 10 <sup>6</sup> <1-8 nm	<i>in vitro</i> docking
<b>1F29</b>	Brinen 2000	3-[[N-[Morpholin-N-Yl]-Carbonyl]- Phenylalaninyl-Amino]-5- Phenyl- Pentane-1-Sulfonylbenzene C31H37N3O5S	Asp 158, Cys 25	0.319 × 10 <sup>6</sup> - 6.5 × 10 <sup>6</sup> <1-8 nm	<i>in vitro</i> docking
<b>1EWP</b>	Gillmor 1998	N-[(3S)-1-fluoro-2-oxo-5-phenylpentan- 3-yl]-N~2~-((morpholin-4-ylcarbonyl)-L- leucinamide Morpholino-Leu-homoPhe-FMK (Synonym) C22 H32 F N3 O4	Cys25, Gly66		No encuentre la Publicacion
<b>2AIM</b>	Gillmor 1997	benzoyl-Arg-Ala-fluoromethyl ketone- benzyl [(2S)-5-[(diaminome thyl)amino]- 1-[[ (2S)-4-fluoro-3-oxobutan-2- yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbamate C18 H28 F N5 O4	Arg, phe glu 205 Leu67, met 68, glu205,  Gly66, leu157, glu205, his158, gln 19, gly 23		<i>in vitro</i> docking
<b>1AIM</b>	Gillmor 1997	benzoyl-tyrosine-alanine-fluoro-methyl ketone n-alpha-[(benzyloxy)carbonyl]-n- [(2s)-4-fluoro-3-oxobutan-2-yl]-l- tyrosinamide (synonym) C21 H23 F N2 O5	Arg, phe glu 205 Leu67, met 68, glu205, Gly66, ser61, cys25, his159		<i>in vitro</i> docking