



Universidad de la República - CSIC

Formulario de Informe final del Programa de Apoyo
a la Investigación Estudiantil
Edición 2014



DATOS DEL PROYECTO
<ul style="list-style-type: none">• Título del Proyecto: Búsqueda de nuevos quimiotipos con actividad anti-<i>T. cruzi</i>
<ul style="list-style-type: none">• Número ID del proyecto: 112
<ul style="list-style-type: none">• Área de conocimiento: Química Orgánica - Química Medicinal
<ul style="list-style-type: none">• Facultad o Servicio: Facultad de Ciencias
<ul style="list-style-type: none">• Nombre completo de los-as Integrantes del equipo: Belén Dávila, Valentina Machin, Carina Sánchez
<ul style="list-style-type: none">• Correo electrónico del/de la estudiante referente: caarisanchez@hotmail.com
<ul style="list-style-type: none">• Nombre completo del docente orientador-a y co-orientador: Dra. Mercedes González Hormaiztegy, Lic. Marcos Couto.
<ul style="list-style-type: none">• Correo electrónico del/de la docente orientador-a: megonzal@fq.edu.uy

INFORME FINAL

1. Objetivos de acuerdo a la propuesta original

Objetivo General:

Síntesis y evaluación biológica frente a *T. cruzi* de nuevas ditioltionas en la búsqueda de potenciales fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Objetivos Específicos:

- Diseño de los nuevos compuestos a partir de la combinación de ditioltionas y furanos de reconocida actividad tripanosomicida.
- Síntesis de los productos diseñados en el objetivo i), utilizando metodologías clásicas y modernas de síntesis orgánica.
- Caracterización fisicoquímica de todos los productos desarrollados en el transcurso de este proyecto.
- evaluación de los productos sintetizados en el objetivo ii), frente a forma epimastigote.
- evaluación del efecto tóxico inespecífico sobre células mamíferas de los compuestos activos frente a *T. cruzi*. Determinación de la selectividad parásito/huésped.

2. Actividades realizadas para cumplir los objetivos planteados

Actividad 1: Diseño de nuevos compuestos.

Estudios previos realizados por del grupo de Química Medicinal permitieron identificar la ditioltiona I como hit molecular. En base a esto y como forma de generar quimiodiversidad en la búsqueda de nuevos quimiotipos antichagásicos se propusieron cuatro nuevos derivados (figura 1).

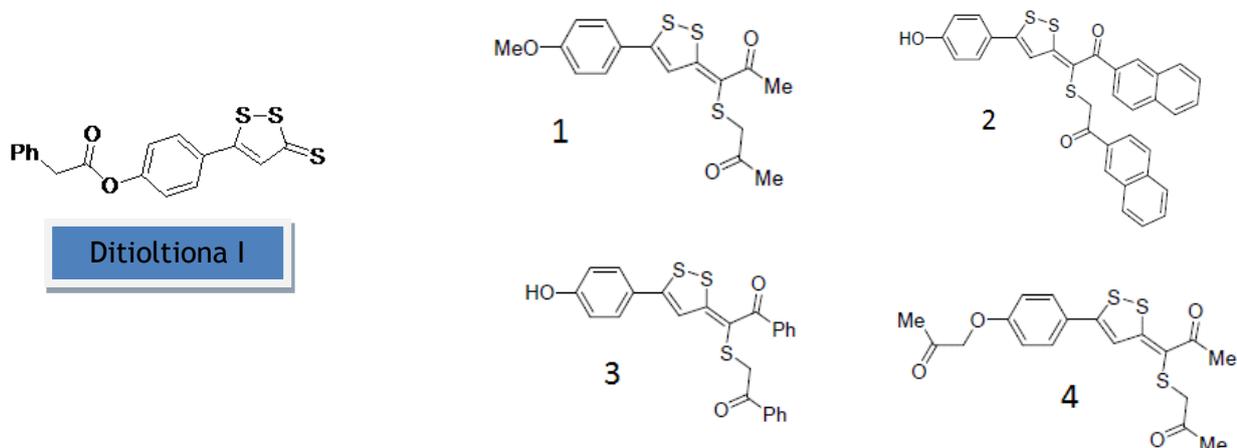
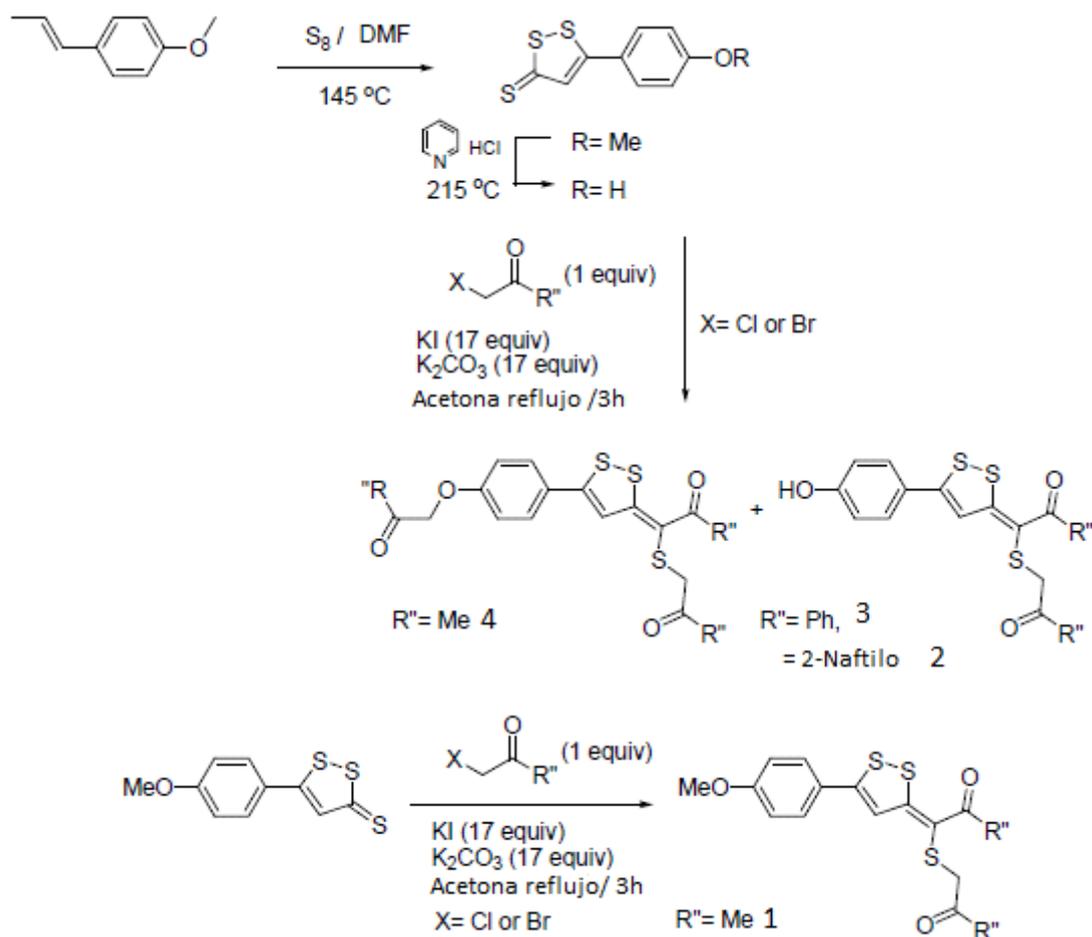


Figura 1. Hit molecular Productos diseñados.

Actividad 2: Síntesis de nuevos compuestos.

Los compuestos diseñados en la actividad 1 fueron sintetizados utilizando metodologías de química orgánica convencional. En el desarrollo de esta actividad se estudiaron condiciones experimentales, tales como: temperatura, tiempo, disolventes y uso de irradiación con microondas.

Para obtener estos compuestos se utilizaron las rutas sintéticas que se detallan a continuación:



Esquema 1. Rutas sintéticas para obtener los productos diseñados.

Actividad 3: Caracterización fisicoquímica de los compuestos desarrollados.

Se utilizaron técnicas espectroscópicas típicas en química orgánica sintética (Espectroscopía infrarroja, Resonancia Magnética Nuclear, Espectroscopía de Masas). Esta actividad es de suma importancia para verificar la estructura de los compuestos obtenidos.

Actividad 4: Caracterización biológica *in vitro*.

Esta actividad se realizó bajo la orientación de la tutora M. González en la sala de Cultivo del Instituto de Química Biológica y utilizando los protocolos establecidos en el Grupo de Química Medicinal.

En esta instancia se evaluó la capacidad que tienen los compuestos de inhibir el crecimiento de la forma epimastigote del parásito a dosis fija y variable. La cepa utilizada fue Tulahuen-2 de *T. cruzi*. En base a estos resultados se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento a concentración fija. Por otra parte, trabajando con concentraciones variables se obtuvo la concentración necesaria capaz de inhibir el 50% de crecimiento del parásito (IC_{50}).

Como forma de profundizar en el mecanismo de acción de los productos se estudió:

i) la capacidad de estos productos de inhibir la enzima cruzipaina (proteasa del *T. cruzi*) aislada de epimastigotes. Inicialmente se estudió la inhibición de cruzipaina a una concentración de 100 μM . A los compuestos que presentaron una inhibición de la actividad enzimática mayor al 85% se les determinó IC_{50} .

ii) la capacidad de inhibir la biosíntesis de esteroides de membrana de los parásitos. Se analizó la acumulación o disminución de algunos intermedios o productos finales de esta ruta bioquímica (escualeno, lanosterol, ergosterol) al hacer crecer los parásitos en presencia de los productos a una concentración de 2 x IC_{50} .

iii) el perfil metabólico excretado al medio por los parásitos promovidos por 2 y 4 por resonancia magnética nuclear (^1H RMN). Se analizan los cambios en las sales excretadas de los ácidos carboxílicos, lactato (Lac), acetato (Ace), piruvato (Pyr), y succinato (Succ) y los aminoácidos alanina (Ala) y glicina (Gly).

Compuestos	1	2	3	4
Inhibición de la forma epimastigote (IC_{50} / μM)	5,9	4,9	5,5	7,7
Inhibición de enzima cruzipaina (IC_{50} / μM)	15,1	~50	3,35	15,5
Inhibición de biosíntesis de esteroides de membrana	-	-	-	Acumulación de escualeno y reducción de ergosterol.
Metabolómica	-	-	-	Disminución de Gly y Pyr excretados

Actividad 5: Escritura del informe y presentación de resultados.

Se redactó el informe final del proyecto y los resultados se presentaron en una publicación científica en una revista internacional.

Actualmente se está realizando la filmación y edición de un audiovisual que se entregará el día de la muestra del poster, como material de difusión.

3. Modificaciones realizadas

En base a resultados experimentales previamente realizados por los Orientadores del proyecto, el trabajo se enfocó principalmente en el diseño de compuestos derivados de ditioltionas y no en furanos como estaba planteado en los objetivos.

Con respecto a la actividad 4, se propuso determinar el índice de selectividad sobre células de macrófagos murinos, por problemas técnicos propios de la realización de este ensayo, no se logró realizar esta parte de las actividades de este proyecto PAIE aunque se realizó por integrantes del Grupo de Química Medicinal.

Sin embargo, en base a los resultados obtenidos se fueron adicionando diversas técnicas que nos ayudarían a entender de mejor manera la eficacia de estos nuevos quimiotipos. Entre estas técnicas se destacan, inhibición de cruzpaína, inhibición de síntesis de esteroides de membrana y el estudio del perfil metabólico.

4. Resultados obtenidos

Con esta investigación fue posible la identificación de cuatro nuevos derivados de ditioltionas con buena capacidad tripanosomicida y diferentes efectos sobre las rutas metabólicas del parásito.

En el caso del compuesto 4 podemos afirmar que es un compuesto multidiana ya que presenta un interesante nivel de inhibición frente a los diferentes blancos moleculares.

Por otra parte, se identificaron nuevos quimiotipos (compuestos 1, 2, 3) que se podrían someter a modificaciones estructurales y mejorar sus propiedades anti-*T. cruzi*.

Estos resultados coinciden con lo esperado por el grupo, ya que contábamos con evidencia previa de la inhibición que presentaban los derivados de ditioltionas frente al *T. cruzi*. No obstante, la inhibición en algunos casos fue mejor de lo esperada.

5. Difusión de los resultados

Los resultados finales del proyecto fueron difundidos a través de la presentación de una publicación científica (Couto M, Sánchez C, Dávila B, Machín V, Varela J, Álvarez G, Cabrera M, Celano L, Aguirre-López B, Cabrera N, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R, Cerecetto H, González M. *Molecules*. 2015 12;20(8):14595-610. doi: 10.3390/molecules200814595. 3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-*Trypanosoma cruzi* Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies) y a su vez, fueron presentados en el congreso Spanish-Italian Medicinal Chemistry Congress; Barcelona, España - Julio 2015. Por otra parte, en lo que refiere a la difusión en el medio universitario local se hará una presentación pública en el marco de los seminarios del Grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias.

6. Sugerencias o comentarios

Estos proyectos ofrecen una oportunidad única para que el estudiante se integre al área de conocimiento que más llame su atención. Por otra parte es una excelente instancia para familiarizarse con las herramientas de laboratorio que no son usuales o accesibles en cursos prácticos, además de aportar a nuestra formación como investigadoras en cuanto a escritura gestión, realización y ejecución de un proyecto de investigación. Por tales motivos nos vemos favorecidas de haber formado parte de este proyecto.

7. Resumen publicable:

Búsqueda de nuevos quimiotipos con actividad anti-*T. cruzi*

Belén Dávila, Valentina Machin, Carina Sánchez
Orientadora: Mercedes González
Co-orientador: Marcos Couto
Facultad de Ciencias, UdelaR

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas es una enfermedad histídica y hemática producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El protozooario parásito es transmitido a animales y seres humanos a través de insectos vectores (triatomíneos hematófagos) que se encuentran distribuidos en América del Sur, América Central y México (zona endémica), conocidos en nuestro país, con el nombre de vinchucas. Estos insectos al picar mamíferos infectados adquieren el parásito y posteriormente al picar al ser humano los depositan con las heces que ingresan al organismo por mucosas y heridas.

Al no existir vacunas, la quimioterapia es el único método para tratar individuos afectados o para disminuir la transmisión poblacional. Los dos fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son Nifurtimox y Benznidazol que presentan muy importantes efectos secundarios por lo que la búsqueda de nuevos fármacos es imperiosa.

En el presente estudio se identificaron cuatro ditioltionas capaces de inhibir además del crecimiento del parásito, enzimas esenciales del mismo entre ellas cruzipaína y triosafosfato isomerasa así como interviniendo en la síntesis de esteroides de membrana.

Estos resultados permitieron considerar a estos compuestos como nuevos prototipos para poder avanzar en la búsqueda de agentes que inhiban el parásito sin afectar la toxicidad hacia el huésped.

- Equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción
1	Filmadora hp t200
2	Memorias SDHC 32 gb
1	Tripode
-	-
-	-
-	-

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año
-	-
-	-
-	-
-	-

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- **Un CD con el informe final en formato .odt o .pdf. Y con el póster en su versión digital en formato .jpg o .pdf**
- **Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)**

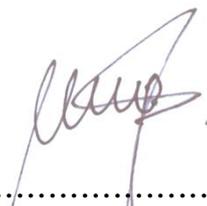
Carina Sánchez
carina sánchez

FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

Comentarios del docente orientador:

El equipo de investigación estudiantil ha trabajado en forma muy adecuada, eficiente, con un interés muy importante. Las actividades han sido desarrolladas de acuerdo a los objetivos planteados además de realizarse por parte de las estudiantes otras actividades no propuestas como ser el estudio de diferentes mecanismos de acción de los productos. Las estudiantes además colaboraron en la publicación en la revista Molecules que presenta estos resultados juntos con otros del Grupo de Química Medicinal. Esta formación les ha proporcionada otra mirada del trabajo que es sumamente importante en su futura condición de investigadoras. Los resultados obtenidos han sido muy buenos y se ha podido avanzar en este agrupamiento químico poco estudiado. Por lo que considero que el trabajo ha sido excelente y que se ha podido trabajar en forma muy adecuada y con unos muy buenos resultados.



FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR