



Universidad  
de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia y Nutrición

**Diseño, síntesis y evaluación biológica de  
nuevos derivados de bases de Mannich de  
tipo arilamina como potenciales agentes  
tripanocidas y leishmanicidas**

Mery Jhenny Santivañez Veliz





Universidad  
de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia y Nutrición

**Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos  
derivados de bases de Mannich de tipo arilamina como  
potenciales agentes tripanocidas y leishmanicidas**

Memoria presentada por Dña. Mery Jhenny Santivañez Veliz para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el departamento de Química Orgánica y Farmacéutica y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 11 de octubre de 2017.

Dra. Silvia Pérez Silanes

Dra. Elsa Moreno de Viguri



Este trabajo ha sido desarrollado en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra dentro del proyecto de Enfermedades Parasitarias, Chagas promovido por el Instituto de Salud Tropical Universidad de Navarra (ISTUN-API-2011/01).

Ha sido desarrollado con el financiamiento de la Fundación Caja Navarra (Proyecto Nº. 70314), Fundación María Francisca de Roviralta y la Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA).



El desarrollo del trabajo presentado en esta memoria ha sido posible gracias a la financiación recibida a través de la “Ayuda al personal Investigador en Formación” concedida por la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.





*A mis padres,*  
*A mis hermanos,*  
*A Kike*



## AGRADECIMIENTOS

---

La realización de esta tesis doctoral ha sido un camino largo con múltiples experiencias que han llenado esta etapa de momentos alegres y de mucha ilusión pero también de frustración y agobios. A pesar de ser una etapa difícil he tenido la fortuna de contar con el apoyo de muchas personas e instituciones que me han acompañado y ayudado durante este largo camino. Por ello aprovecho estas líneas para expresarles mi más sincero agradecimiento.

A la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (ADA) por financiar este periodo de investigación y por seguir apoyando el desarrollo y formación de nuevos investigadores. Al Instituto de Salud Tropical por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis en una de sus líneas de investigación.

Al Dr. Antonio Monge, por brindarme la oportunidad de participar y trabajar en su grupo de investigación, por apoyarme desde el primer día que lo conocí. Por sus sabios consejos y sobre todo por su visión humana de la investigación. Muchas gracias por tratar en todo momento que esta estancia, lejos de mi tierra, de mi familia y de mis amigos, fuera llevadera y que todo el esfuerzo valiera la pena.

A mis directoras de tesis, la Dra. Silvia Pérez Silanes y Elsa Moreno de Viguri, por vuestra cercanía, apoyo, colaboración y por toda la ayuda brindada durante la realización de esta tesis. Por vuestros consejos y por el tiempo que me habéis dedicado desde el comienzo del proyecto. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de aprender y participar del mundo de la investigación, por darme ánimo en los momentos difíciles y por transmitirme vuestro entusiasmo por la investigación.

A la Dra. Elena Lizarraga, por su apoyo con el Gases-Masas, por resolver mis dudas durante la puesta a punto y validación del método analítico. Muchas gracias por transmitirme la confianza de que la publicación saldría adelante y por su cercanía en los momentos estresantes cercanos a la boda.

Al grupo de trabajo de la Dra. Mercedes González y del Dr. Hugo Cerecetto, por permitirme realizar la estancia de investigación en su grupo. Por abrirme las puertas de su laboratorio y por permitirme aprender de investigadores y profesores de diferentes departamentos de la Universidad de la República de Uruguay. Muchas gracias por haber estado pendientes de mi aprendizaje y por haberme enseñado el desarrollo y realización de los ensayos *in vitro*.

Al Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, por llevar a cabo la evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de los derivados presentados en esta tesis.

Al Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Navarra, por su colaboración en la evaluación de la toxicidad de los compuestos presentados.

A Carmen Elizalde, por su entusiasmo y su apoyo en el día a día en el laboratorio. Por compartir y transmitirme su alegría cuando las resos salían bonitas y cuando los CHNs salían “peloteros”. Por los buenos momentos que hemos compartido tanto dentro como fuera del laboratorio. Por esas tardes de cafetito o de un vinito en compañía del Rey. Muchas gracias por su amistad, por su preocupación, por su cariño y por haber estado siempre a mi lado.

A todos los compañeros que han compartido conmigo muchas horas de laboratorio y que han hecho posible que el trabajo sea más llevadero. Por alegrarse cuando salían bien los compuestos y por darme palabras de ánimo cuando la purificación daba más trabajo.

A Kike, por su gran amor durante estos maravillosos años que he compartido y vivido a su lado. Por enseñarme a disfrutar más de la vida y por haberme dado esa felicidad que solo he conocido a su lado. Por hacer realidad muchos sueños, por compartir día a día la ilusión que nos hace construir juntos nuestra familia, por ser mi complemento y por haber formado parte del enlace covalente que pensamos, desde antes de los preparativos de nuestra boda. Por sus ocurrencias y su alegría pero sobre todo por su paciencia, comprensión y por toda su ayuda, ya que sin él habría sido imposible finalizar con esta tesis.

A mi nueva familia Navarra, por haberme adoptado y cuidado desde el primer momento en que los conocí. Muchas gracias por darme su cariño y apoyo en todo momento.

A mis padres, a mis hermanos, a mis sobrinos y toda mi familia, por apoyarme en todo momento a pesar de la distancia. Por hacerme sentir que la distancia no importa y que es pequeña cuando existe el amor y el respaldo sincero que solo te puede dar la familia. No me alcanzan las palabras para agradecer todo lo que habéis hecho por mí durante toda mi vida, habéis sido mi fortaleza y mi motivación. Muchas gracias por comprender el camino elegido y por darme la confianza de que soy capaz de conseguir los objetivos propuestos.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>Ac:</b>	Anticuerpos	<b>GPasa:</b>	Glutación peroxidasa
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>HAI:</b>	Hemaglutinación Indirecta
<b>ADNk:</b>	ADN de kinetoplástido	<b>HBA:</b>	Grupos aceptores de enlace de hidrógeno (Number of hydrogen-bond acceptors)
<b>Ag:</b>	Antígenos	<b>HBD:</b>	Grupos donadores de enlace de hidrógeno (Number of hydrogen-bond donors)
<b>AHasa:</b>	Ascorbato hemoperoxidasa	<b>IBEs:</b>	Inhibidores de la biosíntesis de esteroides
<b>AMCHA:</b>	Iniciativa de la Región Amazónica	<b>IFI:</b>	Inmunofluorescencia Indirecta
<b>Bzn:</b>	Benznidazol	<b>IL-12:</b>	Interleucina 12
<b>CDC:</b>	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)	<b>IgM:</b>	Inmunoglobulina tipo M
<b>CD4<sup>+</sup>:</b>	Linfocitos T tipo CD4 <sup>+</sup>	<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina tipo G
<b>CD8<sup>+</sup>:</b>	Linfocitos T tipo CD8 <sup>+</sup>	<b>ITF-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón $\gamma$
<b>EC:</b>	Enfermedad de Chagas	<b>IM:</b>	Vía Intramuscular
<b>CP:</b>	Cruzipaina	<b>INCOSUR:</b>	Iniciativa del Cono Sur
<b>DMID:</b>	Diabetes mellitus de tipo 1 o insulina-dependiente	<b>IPA:</b>	Iniciativa del Pacto Andino
<b>DNDí:</b>	Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i> )	<b>IPCA:</b>	Iniciativa de América Central
<b>EEUU:</b>	Estados Unidos de Norte América	<b>IV:</b>	Vía Intravenosa
<b>ELISA:</b>	Enzimoimmunoanálisis Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	<b>LC:</b>	Leishmaniasis cutánea
<b>EROs:</b>	Especies reactivas de oxígeno	<b>LCD:</b>	Leishmaniasis cutánea diseminada
<b>ETDs:</b>	Enfermedades Tropicales Desatendidas	<b>LDPK:</b>	Leishmaniasis dérmica post-kala-azar
<b>FDA:</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)	<b>LMC:</b>	Leishmaniasis mucocutánea o "espundia"
<b>FeSOD:</b>	Superóxido dismutasa unida a hierro	<b>LV:</b>	Leishmaniasis visceral o "kala-azar"
<b>GC-MS:</b>	Cromatografía de Gases-Masas	<b>LogP:</b>	Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua
<b>GI:</b>	Gastrointestinales	<b>LogS:</b>	Logaritmo de la solubilidad acuosa medido en mol/L
		<b>Nfx:</b>	Nifurtimox

<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>VT:</b>	Vía tópica
<b>OPS:</b>	Organización Panamericana de la Salud		
<b>PK:</b>	Propiedades farmacocinéticas		
<b>PSA:</b>	Área de superficie polar ( $\text{Å}^2$ ) (Polar Surface Area)		
<b>PP<sub>i</sub>:</b>	Pirofosfatos		
<b>Poli-P:</b>	Polifosfatos		
<b>RAM:</b>	Reacción adversa a medicamento		
<b>RBE:</b>	Ruta de biosíntesis de esteroides		
	<b><i>R. prolixus:</i></b> <i>Rhodnius prolixus</i>		
<b>SOD:</b>	Superóxido Dismutasa		
<b>TB:</b>	Tuberculosis		
<b>Tbf:</b>	Terbinafina		
<b><i>T. cruzi:</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>		
<b>TcTS:</b>	Transialidasa de <i>T. cruzi</i>		
	<b><i>T. dimidiata:</i></b> <i>Triatoma dimidiata</i>		
	<b><i>T. infestans:</i></b> <i>Triatoma infestans</i>		
<b>Th0:</b>	Linfocitos T colaboradores tipo 0		
<b>Th1:</b>	Linfocitos T colaboradores tipo 1		
<b>Th2:</b>	Linfocitos T colaboradores tipo 2		
<b>TPP:</b>	Target Product Profile		
<b>TR<sub>asa</sub>:</b>	Tripanotiona reductasa		
<b>TR<sub>xasa</sub>:</b>	Triparredoxin peroxidasa		
<b>TS:</b>	Tripanotiona sintasa		
<b>TS<sub>2</sub>:</b>	Tripanotiona forma oxidada		
<b>T[SH]<sub>2</sub>:</b>	Tripanotiona		
<b>Tto:</b>	Tratamiento		
<b>UDTs:</b>	Unidades Discretas de Tipificación		
<b>VIH:</b>	Virus de inmunodeficiencia humana		
<b>VO:</b>	Vía oral		
<b>VP:</b>	Vía parenteral		

## Índice

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Enfermedad de Chagas.....	3
1.1. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas al ser humano .....	3
1.1.1. Transmisión vectorial .....	3
1.1.2. Transmisión no vectorial .....	4
1.2. Epidemiología .....	5
1.2.1. Enfermedad de Chagas en países endémicos .....	6
1.2.2. Enfermedad de Chagas en países no-endémicos.....	8
1.3. Agente causante: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
1.3.1. Estructura celular .....	9
1.3.2. Morfología.....	11
1.3.3. Ciclo de vida .....	12
1.3.4. Diversidad genética.....	13
1.4. Patogénesis.....	14
1.4.1. Fases y manifestaciones clínicas .....	14
1.4.2. Mecanismos fisiopatológicos .....	17
1.5. Diagnóstico .....	18
1.5.1. Diagnóstico en la fase aguda.....	18
1.5.2. Diagnóstico en la fase crónica.....	19
1.6. Tratamiento .....	21
1.7. Principales dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos .....	23
1.7.1. Cruzipaína:.....	24
1.7.2. Transialidasa.....	24
1.7.3. Biosíntesis de esteroides .....	25
1.7.4. Enzimas de defensa frente al estrés oxidativo.....	25
Superóxido dismutasa .....	26
Peroxidasas .....	27
Metabolismo de la Tripanotona.....	27
1.7.5. Metabolismo energético .....	27
1.7.6. Metabolismo del pirofosfato .....	28
1.7.7. Captación de purinas.....	29
1.8. Situación actual del desarrollo de fármacos .....	29
1.8.1. Desafíos en el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas .....	33
2. Leishmaniasis: definición, concepto y generalidades .....	34
2.1. Transmisión .....	34

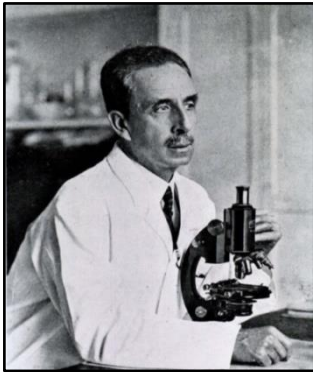
2.2. Epidemiología .....	35
2.3. Etiología: Agente causal .....	37
2.4. Características celulares .....	38
2.5. Morfología .....	38
2.6. Ciclo de vida.....	39
2.7. Manifestaciones clínicas.....	40
2.8. Tratamiento.....	42
2.9. Tratamiento combinado de fármacos .....	44
2.10. Ensayos clínicos frente a leishmaniasis .....	45
3. Referencias bibliográficas.....	46
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>57</b>
Referencias bibliográficas.....	63
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>71</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
PUBLICACIÓN 1: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> activity of new arylamine Mannich base-type derivatives .....	77
PUBLICACIÓN 2: Second generation of Mannich Base type derivatives with <i>in vivo</i> activity against <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	99
PUBLICACIÓN 3: <i>In vitro</i> antileishmanial activity and iron superoxide dismutase inhibition of arylamine Mannich base derivatives .....	141
PUBLICACIÓN 4: Development, validation and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	155
ESTUDIO 1: Evaluation of the inhibitory activity against cruzipain enzyme of some Mannich base type derivatives.....	169
ESTUDIO 2: Evaluación del perfil farmacocinético de los compuestos líderes .....	175
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>195</b>
Referencias bibliográficas.....	205
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>207</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>211</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>215</b>
ANEXO 1: Compuestos presentados en esta tesis .....	217
ANEXO 2: Futuros planes de trabajo del proyecto de investigación.....	221
ANEXO 3: Material suplementario de la Publicaciones 1 y de la Publicación 2 .....	225



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. Enfermedad de Chagas



**Figura 1.** Dr. Carlos Das Chagas

**Fuente:**<https://vivelatinoamerica.files.wordpress.com/2014/04/161214-050-bc4a2749.jpg>

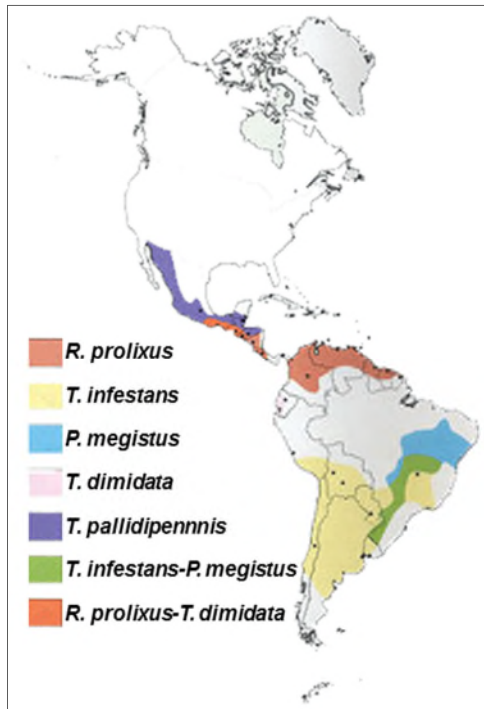
La enfermedad de Chagas (EC) o Tripanosomiasis Humana Americana es una enfermedad parasitaria de carácter crónico causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se trata de una compleja zoonosis en la que participan diferentes especies de insectos vectores hematófagos de la subfamilia *Triatominae* y más de 150 especies de vertebrados mamíferos hospedadores de diferentes órdenes, tanto domésticas como salvajes. La EC se incluye, junto con otras 16 enfermedades infecciosas, dentro del grupo de las enfermedades tropicales desatendidas (ETDs) <sup>1</sup>. La EC es endémica en 21 países de Latinoamérica y, como consecuencia de los movimientos migratorios de los últimos años, ha comenzado a ser un problema de salud pública en países no endémicos como EEUU, Canadá, países mediterráneos de Europa, Japón y Australia <sup>2, 3</sup>. Mundialmente se estima que unos 5.7 millones de personas se encuentran infectadas por la EC <sup>4</sup> y que provoca unas 7.000 muertes anuales, constituyendo un grave problema de salud pública <sup>5</sup>. La EC fue descrita por primera vez en el año 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas (1879-1934) (**Figura 1**) como fruto de un completo trabajo experimental en colaboración con el Dr. Oswaldo Cruz. Esta investigación debe destacarse por ser el único trabajo en el que se ha descrito por completo una enfermedad infecciosa determinando el patógeno, el vector, los principales hospedadores y las manifestaciones clínicas <sup>6, 7</sup>.

### 1.1. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas al ser humano

La EC se puede transmitir por dos vías, la vía vectorial y la vía no vectorial, que se diferencian fundamentalmente en si existe o no una participación directa del insecto triatomino vector.

#### 1.1.1. Transmisión vectorial

La transmisión natural de la EC al ser humano en las regiones endémicas se produce a través de chinches hematófagos o vinchucas de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. El insecto vector deposita sus heces y con ellas tripomastigotes metacíclicos altamente infectivos que pueden penetrar a través de pequeñas heridas en la zona de la picadura e infectar células de diferentes tipos.



**Figura 2.** Distribución geográfica de los principales vectores triatomínicos de la EC

Fuente: Modificado

[http://www.alcha.org.ar/enfermedad/imagenes/mapa\\_vinchuca\\_B.gif](http://www.alcha.org.ar/enfermedad/imagenes/mapa_vinchuca_B.gif)

Existe una amplia variedad de especies de insectos triatomínicos capaces de transmitir *T. cruzi*, pero sólo unas pocas especies son significativas en la transmisión de la enfermedad al ser humano. Las especies más importantes son (**Figura 2**):

-*Triatoma infestans* (*T. infestans*), vector principal en regiones subamazónicas (**Figura 3**).

-*Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*), endémico de la zona norte de Sudamérica y en América central.

-*Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*), distribuido desde el norte de Sudamérica hasta zonas centrales de México.

-*Panstrongylus megistus*, muy importante en la transmisión vectorial en Brasil.

En las zonas rurales el impacto de la transmisión vectorial es muy elevado ya que las clásicas construcciones de adobe y caña (**Figura 4**) y la

ocupación humana de los ecotopos de los insectos triatomínicos favorecen la domiciliación del vector. Las personas que viven en estas zonas rurales emigran a las grandes ciudades en busca de trabajo, transportando muchas de ellas el parásito en su organismo. De esta forma la EC comenzó a transmitirse a través de vías no vectoriales<sup>8</sup>.



**Figura 3.** *Triatoma infestans*

Fuente:<http://biologiapunto.com.blogs.pot.com.es/search?q=chagas>



**Figura 4.** Vivienda de adobe contaminada con insecto

Fuente:<http://www.unciencia.unc.edu.ar/2016/junio/chagas-disenhan-un-sistema-de-captura-de-vinchucas-para-zonas-rurales>

### 1.1.2. Transmisión no vectorial

*T. cruzi* también se puede transmitir sin la participación directa del insecto y su importancia, en cuanto al número de casos, no puede ser despreciada. Esta transmisión no vectorial puede darse a través de diferentes mecanismos entre los que destacan:

- Transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos: este mecanismo tuvo una gran importancia en la transmisión de la enfermedad en regiones urbanas de países endémicos y

en los países no endémicos con altas tasas de inmigración proveniente de Sudamérica hasta finales de la década de los 90. Actualmente los controles impuestos sobre los bancos de sangre y los donantes de órganos son muy exhaustivos y la tasa de infección por esta vía es muy baja<sup>9-14</sup>.

- Transmisión de la madre infectada al hijo: la EC puede ser transmitida directamente de la madre a su hijo a través de la vía transplacentaria durante la gestación y a través de la leche materna durante la lactancia. Diferentes investigaciones demostraron que entre el 1 y el 10% de los recién nacidos de madres con infección crónica también desarrollaron la EC<sup>15, 16</sup>. En cuanto a la transmisión a través de la leche materna, aunque los casos son muy escasos y todavía hay controversia acerca de esta vía de transmisión se recomienda pasteurizar la leche materna antes de que la consuma el niño ya que podría considerarse un tipo especial de transmisión oral<sup>17-19</sup>.
- Transmisión oral: la mayor parte de casos clínicos registrados en la bibliografía hacen referencia a brotes esporádicos por consumo de alimentos contaminados con excrementos del insecto vector, aunque es posible también una transmisión por consumo de animales de caza infectados. Este tipo de transmisión puede ser grave ya que presenta un cuadro clínico más severo cursando con una infección aguda que provoca en la mayoría de los casos una miocarditis grave que puede provocar la muerte, sobre todo en niños<sup>20</sup>.
- Transmisión por accidentes de laboratorio: el cultivo de la forma infectiva de *T. cruzi* es una tarea cotidiana en laboratorios de investigación de la enfermedad, lo cual implica un riesgo de infección por contacto directo del parásito con las mucosas o pequeñas heridas en la piel del investigador. Asimismo, investigar el insecto vector o trabajar con muestras de sangre de personas infectadas conlleva un riesgo de infección accidental. En los últimos años, la incidencia de estos mecanismos de transmisión ha disminuido en gran medida<sup>21</sup>.

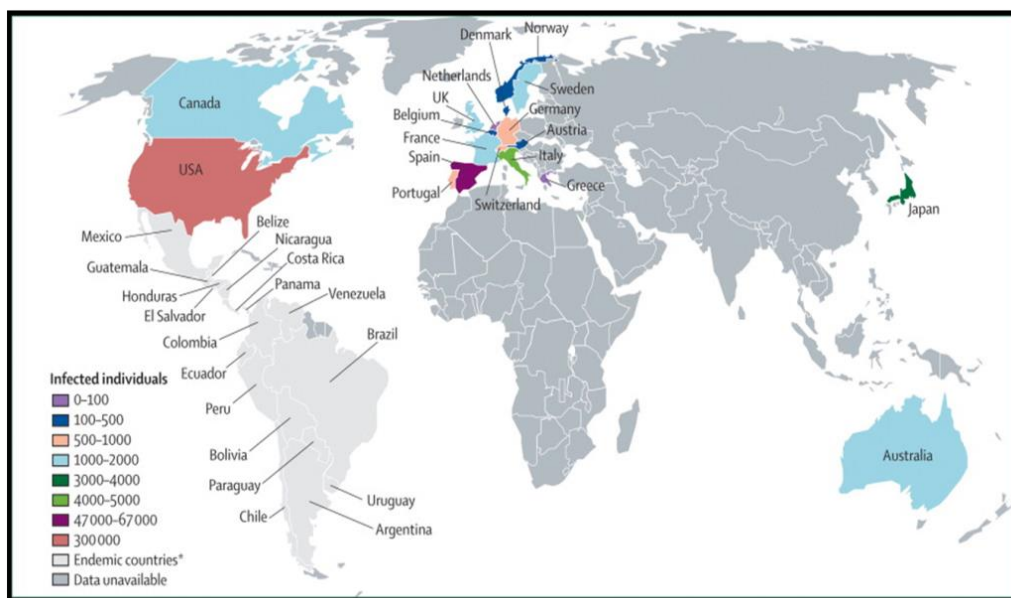
## 1.2. Epidemiología

La EC ocupa la sexta posición dentro de las ETDs con una mayor prevalencia a nivel mundial. Las ETDs son enfermedades infecciosas crónicas que afectan a cerca de 1.000 millones de personas y que están estrechamente asociadas a las condiciones socioeconómicas de la población. La palabra “Desatendida” hace referencia a las insuficientes intervenciones de salud que se han llevado a cabo por parte de gobiernos e instituciones por tratarse de enfermedades de la gente con menor poder adquisitivo y, por tanto, con menor influencia política y económica. Sin embargo, en los últimos años las ETDs se han convertido en una preocupación para los sistemas de Salud Pública de los diferentes países tanto endémicos

como no endémicos. Por este motivo las ETDs, y dentro de ellas la EC, están recibiendo una mayor atención por parte de los Gobiernos de los países afectados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y diferentes asociaciones sin ánimo de lucro. El trabajo conjunto de estas instituciones tiene el propósito de controlar y erradicar estas enfermedades en los próximos 10-20 años <sup>22-25</sup>.

### 1.2.1. Enfermedad de Chagas en países endémicos

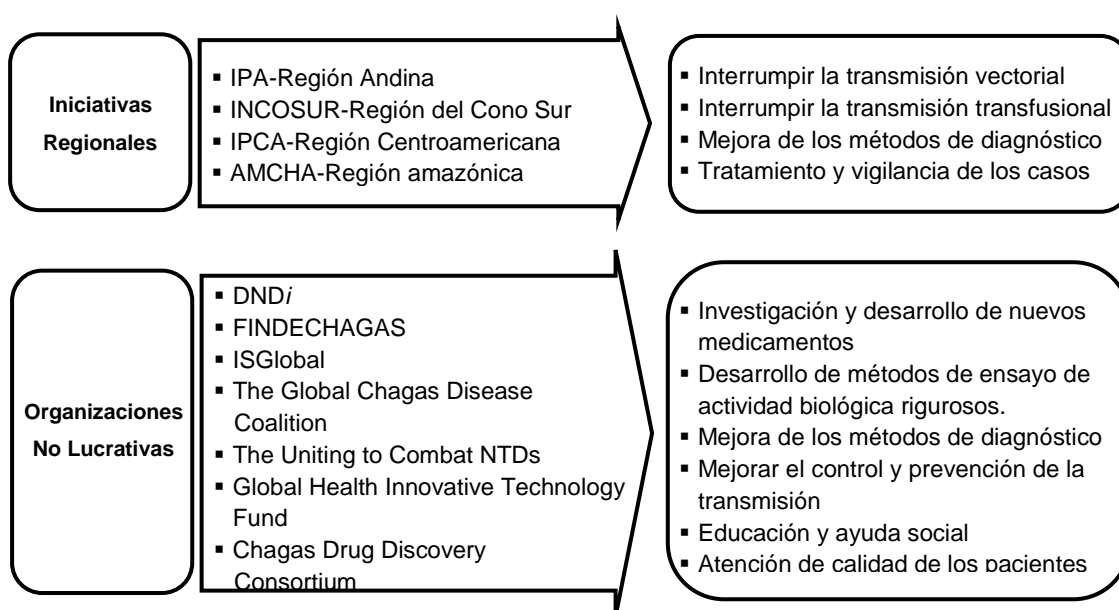
La EC se distribuye desde el norte de México hasta el sur de Chile y Argentina a través de 21 países considerados endémicos (**Figura 5**), donde la presencia del insecto vector supone un importante riesgo para la transmisión de la enfermedad. Según las estimaciones más recientes, basadas en datos recogidos por la OMS en el año 2010, la EC afecta a entre 5 y 6 millones de personas, provocando unas 7.000 muertes anuales. Se calcula que cerca de 70 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. Debido a su cronicidad y carácter incapacitante la EC causa más de 500.000 años de vida ajustados por discapacidad, medida que cuantifica la carga de la enfermedad en la población. Esta carga causa un importante impacto socioeconómico en las áreas afectadas debido a las altas tasas de morbilidad que provoca en la población activa. Según datos de la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi), sólo en Brasil, las pérdidas en salarios y productividad industrial debido a trabajadores con EC superó los 1.3 billones de dólares <sup>4, 26, 27</sup>.



**Figura 5.** Distribución geográfica de la EC.  
**Fuente:** Rassi Jr A. et al., Chagas disease, Lancet, 2010 <sup>28</sup>.

La alta prevalencia alcanzada por la EC en los años 80, más de 17 millones de personas infectadas <sup>4</sup>, obligó a los gobiernos de los países afectados, apoyados por la Organización

Panamericana de la Salud (OPS) y grupos de investigación, a impulsar una serie de iniciativas intergubernamentales con el fin de lograr el control de la EC. Tomando como referencia programas exitosos llevados a cabo en Venezuela y Brasil, se pusieron en marcha iniciativas regionales entre las cuales destacan la Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR), la Iniciativa del Pacto Andino (IPA), la Iniciativa de América Central (IPCA) y la Iniciativa de la Región Amazónica (AMCHA) (**Figura 6**)<sup>29</sup>. Estas iniciativas propusieron una serie de importantes objetivos entre los que destacaban: erradicar la transmisión vectorial; evitar la transmisión transfusional y a través de trasplantes de órganos; desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos, sensibles y específicos; implementar un sistema de vigilancia de la enfermedad; establecer un plan educacional y asegurar una atención de calidad de las personas infectadas crónicamente.



**Figura 6.** Iniciativas y asociaciones para luchar contra la EC.

Además de estas iniciativas, en los últimos años se han creado un gran número de asociaciones y organizaciones sin ánimo de lucro con el objetivo de reforzar el control de la EC y lograr su erradicación en un futuro no muy lejano. Algunas de las principales coaliciones se muestran en la **Figura 6**, y están formadas por grupos científicos, hospitales, industrias farmacéuticas e instituciones gubernamentales entre otros. Entre las principales líneas de actuación de estas asociaciones se encuentran el desarrollo de nuevos medicamentos, facilitar un tratamiento precoz y de calidad, aumentar la financiación en I+D e intentar comprometer a instituciones gubernamentales en esta tarea. Asimismo, trabajan con el propósito de incluir el diagnóstico y tratamiento de la EC en los sistemas de salud y de establecer protocolos de cribado de todas las mujeres en edad fértil, en recién nacidos y en todos los donantes de sangre y órganos. Otra parte importante es el trabajo que están desarrollando en la formación

del personal sanitario, en los planes de educación de la población y en la difusión de la importancia de las ETDs<sup>30,31</sup>.

### 1.2.2. Enfermedad de Chagas en países no-endémicos

Los cambios en los flujos migratorios mundiales de los últimos 20 años han producido una importante expansión de la EC. El aumento en el número de emigrantes provenientes de países endémicos del continente americano junto con el carácter crónico y aparentemente asintomático de la enfermedad ha permitido la transmisión a través de vías no vectoriales en países no-endémicos. EEUU, Canadá y países de Europa, Asia y Oceanía se han convertido en los principales destinos de estos emigrantes; por ello, en estos países la EC se ha convertido en un problema de salud pública que necesita controlarse (**Figura 5**). Destaca EEUU como el país con una mayor incidencia de EC importada y según estimaciones del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) hay más de 300.000 personas infectadas<sup>32</sup>.

Con respecto a Europa, a principios de los años 80 se publicó el primer caso de EC<sup>33</sup>. A partir del año 2000, la EC comenzó a tener una mayor repercusión y a suponer un problema de salud pública en Europa. Según datos de 2011 se estima entre 68.000 y 123.000 el número de personas infectadas en los 9 países de Europa con mayor presencia de inmigración proveniente de países endémicos<sup>30,34</sup>. La mayoría de estos casos se han detectado en España, donde el número de inmigrantes provenientes de zonas de riesgo alcanzó picos de más de 2.000.000 de personas en el año 2009<sup>35</sup>. Estas cifras convirtieron a España en el país no-endémico con una mayor incidencia de EC importada. La aparición de estos casos clínicos llevó a emitir en el año 2005 un Real Decreto para establecer un control en centros de transfusiones. Se estableció un cribado de la sangre de donantes procedentes de países endémicos o descendientes, nacidos en España, de mujeres provenientes de países endémicos para detectar la presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi*<sup>36-39</sup>.

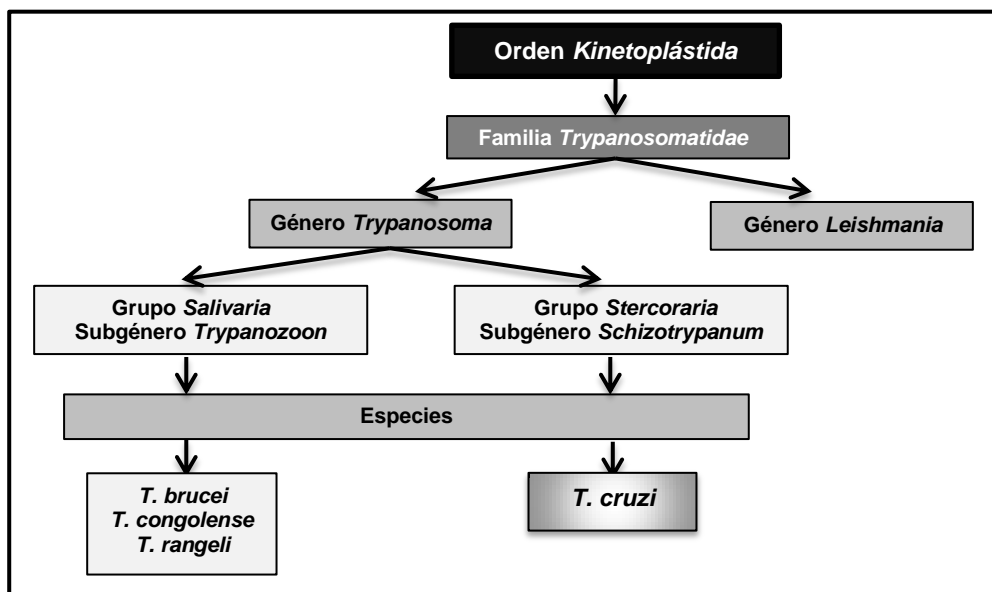
En la actualidad hacer una estimación del número de casos de EC en España es complicado debido a la movilidad migratoria a causa de la crisis económica que comenzó en el año 2008 y que provocó el retorno de más de 1.000.000 de personas a sus países de origen. Sin embargo, tomando en cuenta estimaciones realizadas por diferentes grupos en base a cifras de prevalencia en sus países de origen, el número de personas infectadas residentes en España se encontraría entre 30.000 y 90.000<sup>40</sup>.

### 1.3. Agente causante: *Trypanosoma cruzi*

El agente causal de la EC es el protozoo parásito flagelado digenético *T. cruzi*, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* dentro del orden *Kinetoplastida*. La familia *Trypanosomatidae*



se divide en dos géneros, género *Leishmania* y género *Trypanosoma*, al que pertenecen los parásitos causantes de la leishmaniasis y de la EC respectivamente (**Figura 7**). El género *Trypanosoma* se divide en dos grupos, *Stercoraria* y *Salivaria*, en función del desarrollo y localización del parásito dentro del insecto vector. Los miembros del grupo *Stercoraria*, al que pertenece *T. cruzi*, se desarrollan en el intestino del insecto vector y las formas infectantes son liberadas al medio exterior al momento de expulsar las heces. El grupo *Salivaria* incluye a los miembros que se desarrollan en el tubo digestivo y que migran a las glándulas salivales de modo que las formas infectantes se liberan a través de la saliva. A este grupo pertenece *T. brucei*, agente causante de la tripanosomiasis humana africana o enfermedad del sueño.



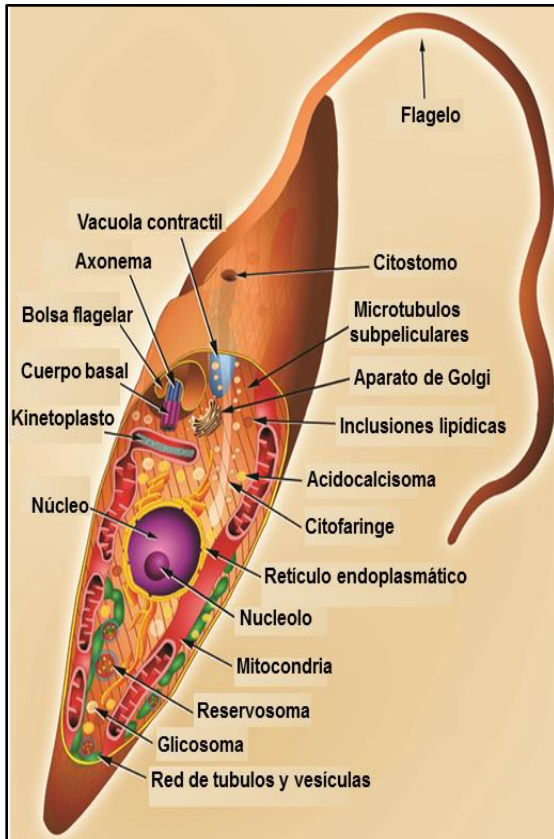
**Figura 7.** Clasificación taxonómica de *T. cruzi*

### 1.3.1. Estructura celular

Los miembros pertenecientes al orden *Kinetoplástida* se caracterizan por presentar una única mitocondria a modo de tubo ramificado que se extiende a lo largo de toda la célula y una estructura suborganular asociada a ella denominada kinetoplasto. El kinetoplasto contiene ADN mitocondrial empaquetado, el cual se denomina ADNk. Este material genético está formado por una red concatenada constituida por miles de minicírculos y entre 20 y 50 maxicírculos. El ADNk supone entre el 20 y el 30 % del total del ADN parasitario. Además, los kinetoplástidos se caracterizan por poseer entre uno y cuatro flagelos para su locomoción. *T. cruzi*, en concreto, tiene un flagelo muy característico cuya longitud varía entre 2 y 25  $\mu\text{m}$ , en función de su estadio. El flagelo posee una membrana especial rica en esteroides y esfingolípidos y se conecta con el interior de la célula por medio del cuerpo basal. En el lugar en el cual se introduce se forma una invaginación entre la membrana flagelar y la membrana plasmática que permite el contacto directo entre ambas. A esta zona se le denomina bolsa

flagelar. Esta zona es rica en receptores de membrana y en ella se produce gran parte del tráfico vesicular, tanto de endocitosis como de exocitosis, así como la captación de nutrientes del parásito. *T. cruzi* posee también una serie de orgánulos rodeados de membrana muy característicos como son: glicosomas, acidocalcisomas y reservosomas <sup>41</sup>.

-Glicosomas: específicos de los organismos del orden *Kinetoplástida*. En su interior albergan la mayor parte de las enzimas glucolíticas, por lo tanto, se consideran vitales para *T. cruzi* por la importancia de la glucosa en la nutrición del parásito.



**Figura 8.** Estructura celular de *T. cruzi*

Fuente: Adaptado de Teixeira D.E et al, *PLoS Neglected Tropical Disease* **2012**, 6, e1749 <sup>44</sup>.

-Acidocalcisomas: orgánulos ácidos que contienen altas concentraciones de fósforo en forma de pirofosfatos (PP<sub>i</sub>) y polifosfatos (poli-P), calcio, magnesio, sodio, zinc y hierro. El carácter ácido de este orgánulo viene aportado por la presencia de una gran cantidad de bombas en su membrana y canales de la familia de las acuaporinas. En la matriz, por su parte, contiene enzimas relacionadas con el metabolismo del PP<sub>i</sub> y del poli-P. Entre sus principales funciones destacan el almacenaje de cationes y fósforo, la participación en el metabolismo del PP<sub>i</sub> y poli-P, la homeostasis del calcio, el mantenimiento del pH intracelular y la osmoregulación <sup>42, 43</sup>.

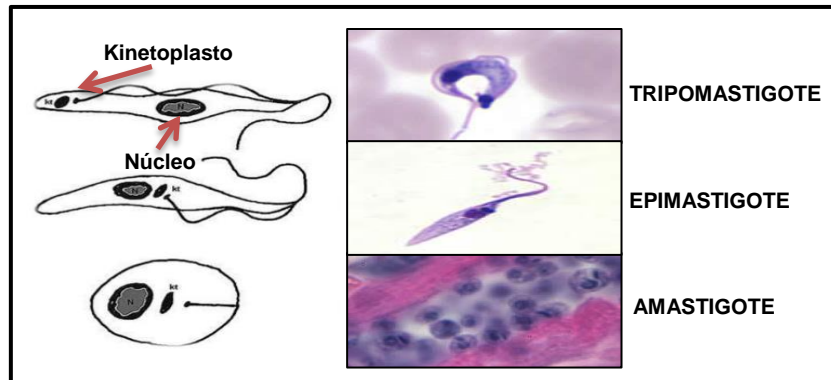
-Reservosomas: orgánulos con función de almacenaje de reservas energéticas en

forma de macromoléculas endocitadas. Estas reservas serán empleadas para llevar a cabo el proceso de diferenciación celular de la fase epimastigote a la fase tripomastigote.

-Citoesqueleto: es muy característico debido a que se encarga de dirigir importantes cambios morfológicos a lo largo del ciclo vital del parásito, además de dirigir el tráfico vesicular y de participar en la movilidad del flagelo. El citoesqueleto está formado por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos, creando una red interconectada entre sí y con la membrana plasmática aportando a *T. cruzi* una elevada resistencia mecánica y térmica <sup>44-47</sup>.

### 1.3.2. Morfología

*T. cruzi*, a lo largo de su ciclo vital, sufre procesos de diferenciación celular con el objetivo de adaptarse a los diferentes ambientes que ocupa, ya sea en el insecto vector o en el hospedador mamífero. Estos procesos de diferenciación conllevan unas variaciones morfológicas y bioquímicas importantes que permiten diferenciar tres estadios: epimastigote, tripomastigote y amastigote (**Figura 9**).



**Figura 9.** Estadios de *T. cruzi*

Fuente: Adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericana/>

**Tabla 1.** Principales diferencias estructurales y funcionales encontradas en las tres formas de *T. cruzi*

	Epimastigote	Tripomastigote metacíclico	Tripomastigote sanguíneo	Amastigote
<b>Descripción, infectividad y hospedador</b>	Forma reproductiva en el tracto digestivo del insecto vector. Forma más empleada en cultivos celulares. No infectiva <sup>48</sup> .	Forma no replicativa en el intestino posterior del insecto vector. Expulsados en heces del insecto. Altamente infectiva para el hospedador mamífero <sup>48-50</sup> .	Forma no replicativa en la sangre del hospedador mamífero. Alta infectividad de nuevas células en el hospedador vertebrado. Puede pasar al insecto vector.	Forma replicativa intracelular en el mamífero. Tiene capacidad para infectar a otras células.
<b>Morfología</b>	Fusiforme. Longitud de 10-16 $\mu\text{m}$ <sup>49</sup> .	Fusiforme. Longitud de 20-25 $\mu\text{m}$ <sup>49</sup> .		Esférico u ovalado. Longitud de 1,5-4 $\mu\text{m}$ <sup>49</sup> .
<b>Flagelo</b>	Bordea parte de la membrana ondulante emergiendo libre en el extremo anterior.	Bordea la membrana ondulante a lo largo de todo el cuerpo y emerge como un flagelo libre en la parte anterior del cuerpo.		Corto y no sale al exterior.
<b>Movilidad</b>	Elevada	Alta		Carente
<b>Kinetoplasto</b>	Situado delante o al nivel del núcleo, del cual nace la membrana ondulante corta que acaba en el flagelo libre.	Situado en la parte subterminal, alejado del núcleo, del cual nace la membrana ondulante que recorre el cuerpo hasta la parte anterior acabando en el flagelo libre <sup>50</sup> .		Situado delante o al nivel del núcleo, del cual nace un flagelo corto.
<b>Núcleo</b>	Grande con nucléolo central o ligeramente excéntrico.	Grande, central y vesiculado con nucléolo central o ligeramente excéntrico <sup>49</sup> .		Voluminoso.

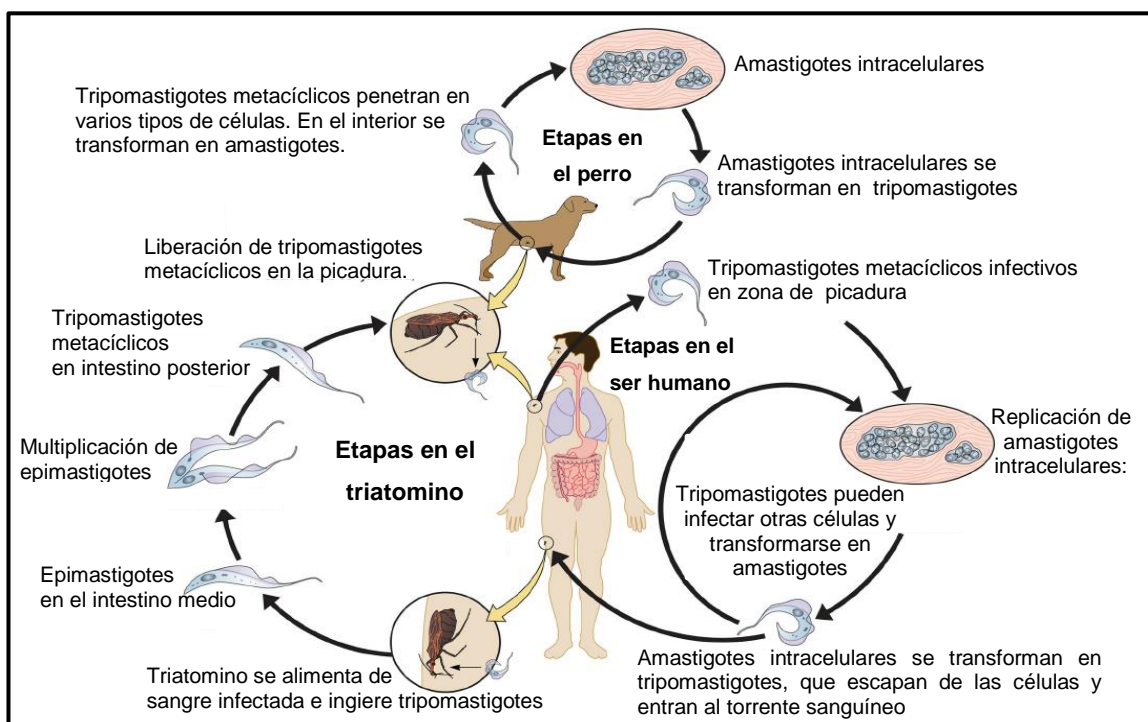
Estas tres formas son fácilmente identificables mediante microscopía en función de su morfología general, de las características del flagelo y por la posición relativa del núcleo y del

kinetoplasto. En la **Tabla 1** se resumen las principales características que presentan los diferentes estadios y las diferencias que hay entre ellos <sup>46</sup>.

### 1.3.3. Ciclo de vida

*T. cruzi* presenta un complejo ciclo de vida que requiere dos hospedadores para completarse, uno definitivo formado por una amplia variedad de mamíferos, donde establece la infección, y uno invertebrado, que actúa como vector de transmisión. El ciclo conlleva múltiples etapas de diferenciación celular entre los diferentes estadios del parásito tanto en el hospedador vertebrado como en el insecto vector. En función del hábitat del insecto vector y del hospedador vertebrado se distinguen dos tipos de ciclo:

- Ciclo selvático: se da entre insectos vectores silvestres y mamíferos vertebrados salvajes.
- Ciclo doméstico: participan insectos vectores domiciliados, animales domésticos y seres humanos <sup>7, 28</sup>.



**Figura 10.** Ciclo de vida de *T. cruzi*

Fuente: Adaptado de Clinical Microbiology Reviews 2013; 26:58-85 <sup>51</sup>.

Como se muestra en la **Figura 10**, los triatominos se infectan cuando ingieren, a través de la picadura, sangre de mamíferos infectados con *T. cruzi*. De esta manera el insecto vector es infectado por tripomastigotes que estaban presentes en la sangre periférica del mamífero <sup>52</sup>. Los parásitos ingeridos llegan hasta el estómago donde muchos mueren <sup>53</sup>. Los supervivientes se transforman en esferoamastigotes, de forma redondeada. Estos esferoamastigotes prosiguen su camino por el aparato digestivo del insecto y cuando alcanzan el intestino medio

se diferencian, tras alargar su flagelo, hasta la forma epimastigote. Los epimastigotes se alargarán mientras dispongan de los nutrientes provenientes de la ingesta de sangre. Cuando estos se acaban, los epimastigotes migran hacia el intestino posterior del insecto donde se multiplican<sup>52</sup>. Finalmente, a través de un proceso de diferenciación celular denominado metacicloogénesis se diferencian hasta la forma tripomastigote metacíclico, que es la forma infectiva para el hospedador vertebrado. Estos tripomastigotes metacíclicos son excretados junto con las heces y la orina en la zona de la picadura cuando el insecto se está alimentando de sangre. Por rascadura o pequeñas heridas penetran en el hospedador mamífero a través de las mucosas comenzando el ciclo en el ser humano<sup>54</sup>.

Los tripomastigotes metacíclicos tienen la capacidad de infectar a un amplio espectro de células nucleadas, tanto fagocíticas como no fagocíticas, cercanas al sitio de infección. Los tripomastigotes metacíclicos invaden la célula formando una vacuola parasitófora donde el tripomastigote metacíclico comienza a diferenciarse a la forma amastigote<sup>55</sup>. Los amastigotes lisan enzimáticamente la membrana de la vacuola y en el citoplasma completan su diferenciación. Tras esto se multiplican por fisión binaria durante 4 o 5 días y cuando la densidad de amastigotes en el citoplasma es muy alta comienza su diferenciación hasta la fase tripomastigote<sup>56</sup>. Los tripomastigotes provocan la lisis celular y son capaces de infectar a las células cercanas. Si estos tripomastigotes sanguíneos alcanzan la circulación sanguínea, linfática o el líquido cefalorraquídeo pueden invadir otras regiones del organismo e infectar células del bazo, hígado, músculo cardíaco y otros. Los tripomastigotes presentes en la sangre circulante podrán ser ingeridos por un insecto vector durante una picadura, comenzando de esta forma el ciclo biológico del parásito<sup>57</sup>.

#### 1.3.4. Diversidad genética

*T. cruzi* es un parásito muy antiguo y se sabe que presenta una elevada diversidad genética, biológica y bioquímica mostrando un amplio polimorfismo tanto genético como proteico<sup>58</sup>. Las principales denominaciones que han recibido los diferentes grupos de parásitos en función de sus características genéticas han sido zimodemas<sup>59-63</sup> y, más recientemente, Unidades Discretas de Tipificación (UDTs)<sup>64, 65</sup>. Las UDTs son conjuntos de poblaciones que están genéticamente más relacionados entre sí que con cualquier otra población y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes<sup>66</sup>. Esta nomenclatura es la actualmente aceptada y utilizada a nivel mundial, lo cual, ha mejorado la comunicación entre los grupos de investigación que trabajan en la caracterización de nuevas poblaciones parasitarias. En la actualidad se reconoce la existencia de 7 UDTs, *T. cruzi* I-VI (TcI-TcVI) y TcBat (**Tabla 2**). Este séptimo genotipo fue identificado en murciélagos y en 2014 se

publicó el primer caso de infección en humanos<sup>67-70</sup>. Estudios recientes de secuenciación han indicado que la UDT TcI es un grupo muy diverso y por ello se ha dividido en 5 subgrupos, denominados TcIa, TcIb, TcIc, TcId y TcIe<sup>65, 71, 72</sup>.

Todas las cepas de *T. cruzi* son consideradas infectivas para el ser humano, sin embargo, algunos estudios sugieren que las UDTs TcII, TcV y TcVI se asocian con ciclos vitales domésticos y con pacientes que presentan manifestaciones clínicas crónicas de la enfermedad. Por su parte, *T. cruzi* TcIII y TcIV se asocian con ambientes silvestres y ciclos selváticos, mientras que la TcI se relaciona con ambos ambientes<sup>60, 65, 73-80</sup>.

**Tabla 2.** Unidades discretas de tipificación de *T. cruzi*

UDT	Ciclo biológico principal	Vectores domésticos	Distribución Geográfica	Cepas de referencia
TcI	Selvático y Doméstico	<i>T. dimidiata</i>	Desde sur de USA hasta Cono Sur	Colombiana, Silvio X10, YuYu, SN3
TcII	Doméstico	<i>T. infestans</i> , <i>P. megistus</i>	Centro y Oeste de Brasil y Cono Sur	Y, Berenice 62, Berenice 78, Esmeraldo c13, VL10
TcIII	Selvático	-	Noreste de Venezuela hasta Argentina	CM17, TC3663
TcIV	Selvático	-	Sur de USA hasta Norte de Sudamérica	4167, CanIII cl1
TcV	Doméstico	<i>T. infestans</i>	Cono Sur y Gran Chaco	115, Mnc12, Arequipa
TcVI	Doméstico	<i>T. infestans</i>	Cono Sur y Gran Chaco	Tulahuen, CL Brener
TcVII o TcBat	Selvático	-	Panamá, Colombia y Centro y Sudeste de Brasil	TCC1994

## 1.4. Patogénesis

### 1.4.1. Fases y manifestaciones clínicas

La EC se divide en dos fases, una fase aguda y una fase crónica. Tras la infección con *T. cruzi* comienza la fase aguda (**Figura 11**). Se trata de un periodo que dura de 2 a 4 meses y que durante las primeras semanas presenta un rápido aumento de la parasitemia.

Tras la infección, macrófagos y células dendríticas reconocen mucinas y otras proteínas específicas de la superficie de la membrana del parásito, las cuales lo fagocitarán y lo presentarán a linfocitos Th0. La producción de IL-12 por parte de estas células presentadoras de antígenos (Ag) conduce a una respuesta Th1, que es la más efectiva para enfrentarse a patógenos intracelulares, con producción de IFN- $\gamma$ . La respuesta inmune Th1 podrá seguir la ruta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. También se va a dar una respuesta de tipo Th2 con la producción de anticuerpos (Ac) específicos frente al parásito, fundamentalmente de tipo IgM e IgG. Esta respuesta inmune hace disminuir la parasitemia y la controla durante la fase crónica de la enfermedad<sup>81</sup>.

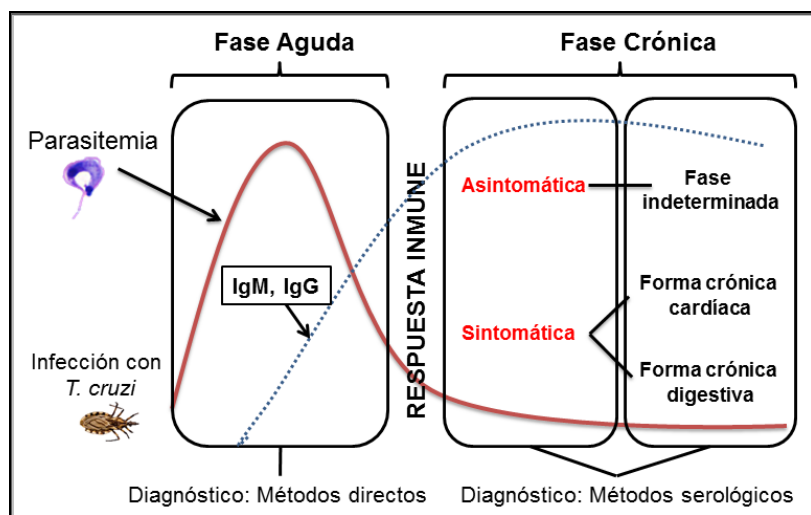


Figura 11. Patogénesis de la EC

La fase aguda normalmente no muestra una sintomatología específica clara a excepción de los edemas que en ocasiones aparecen en la zona de la picadura por parte del vector (chagoma y signo de Romaña) (Tabla 3).

Tabla 3. Principales manifestaciones clínicas de la EC

Manifestaciones clínicas		
Fase aguda	<p><u>Chagas transmitido por vector</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Puede ser asintomática o sintomática.</li> <li>•Sintomática:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chagoma y signo de Romaña en zona de picadura.</li> <li>- Síntomas generales: Fiebre, dolores musculares, dolor de cabeza, somnolencia, diarrea, problemas respiratorios.</li> <li>- Hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatía.</li> <li>- Cardiomegalia, taquicardia, bloqueo auriculoventricular.</li> <li>- Miocarditis, meningoencefalitis en casos graves.</li> </ul> </li> </ul>	
	<p><u>Chagas congénito</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Puede ser asintomática o sintomática.</li> <li>•Sintomática:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nacimientos prematuros, bajo peso al nacer, tono muscular bajo, fiebre, hepatomegalia, esplenomegalia y anemia.</li> <li>- Menos comunes y muy graves: miocarditis, meningoencefalitis y neumonitis.</li> </ul> </li> </ul>	
Fase crónica	Fase indeterminada	Asintomática.
	Forma crónica cardíaca	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sintomática:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Arritmias, fallo cardíaco, bloqueos auriculoventriculares y de rama, disnea por esfuerzo, palpitaciones, extrasístoles, murmullo sistólico, edema.</li> <li>- Miocardiopatía dilatada.</li> <li>- Tromboembolismo.</li> <li>- Muerte súbita.</li> </ul> </li> </ul>
	Forma crónica digestiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Sintomática:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disperistaltismo de esófago y megaesófago, conllevan: Disfagia, odinofagia, dolor epigástrico, regurgitación, malnutrición.</li> <li>- Disperistaltismo de colon y megacolon, conllevan: Estreñimiento prolongado, hinchazón abdominal, obstrucción intestinal.</li> </ul> </li> </ul>

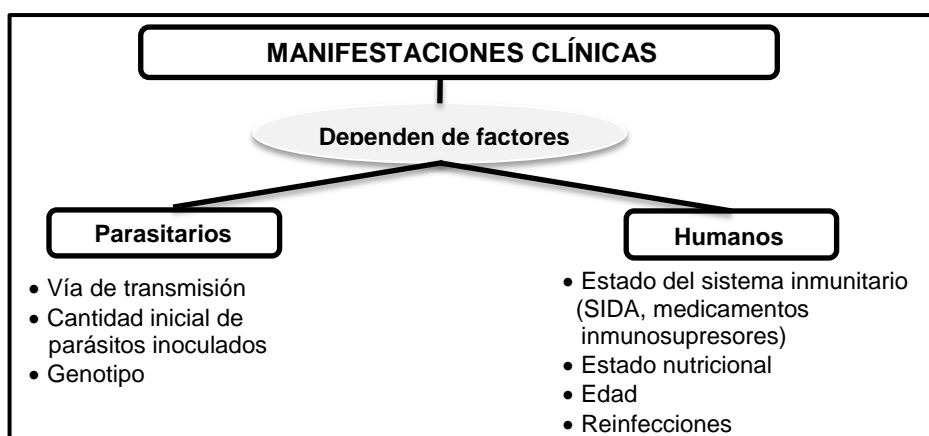
Debido a esta inespecificidad sintomática es difícil el diagnóstico ya que este se basa en la detección del parásito en sangre que sólo se realiza si hay sospecha de infección. Si se

diagnostica de manera precoz un tratamiento rápido cura un alto porcentaje de casos (> 65 %). En un bajo porcentaje de casos la infección aguda puede producir problemas más graves como miocarditis o meningoencefalitis y llegar a causar la muerte.

Si el tratamiento no se ha realizado o no ha sido efectivo, la EC seguirá su curso y avanzará hasta una fase crónica, cuya primera característica es la importante disminución de la parasitemia debida a la respuesta inmune producida. En este momento los métodos de diagnóstico de detección directa son negativos y los test serológicos positivos.

La mayor parte de los infectados que pasan a la fase crónica de la enfermedad lo hacen a una fase crónica denominada indeterminada, ya que se trata de una fase asintomática en la que los exámenes radiológicos de corazón y tubo digestivo son normales y los electrocardiogramas también.

Muchos de los pacientes pueden permanecer durante toda su vida en esta fase asintomática sin desarrollar la clínica más severa de la fase crónica de la enfermedad. Tras un periodo entre cinco y treinta años desde el primer contacto con el parásito, un 30-40 % de los infectados en fase indeterminada presentarán las manifestaciones clínicas de la EC. Estas manifestaciones afectarán principalmente a los órganos diana de la enfermedad distinguiéndose de esta manera entre la forma crónica cardíaca y la digestiva. La progresión de la fase crónica indeterminada hacia la forma cardíaca o digestiva, el tipo de manifestaciones clínicas y su gravedad van a depender de diversos factores, tanto parasitarios como humanos. Entre los factores parasitarios destaca el DTU al que pertenece la cepa ya que afectará en gran medida al tropismo por los órganos diana que el parásito desarrollará (**Figura 12**).



**Figura 12.** Factores que determinan las manifestaciones clínicas

La forma cardíaca es la que aparece con mayor frecuencia y la que más graves consecuencias tiene para la persona infectada. Suelen aparecer numerosos defectos electrocardiográficos que desembocan en una serie de importantes manifestaciones clínicas. Casos graves de esta forma de la EC pueden producir muerte súbita. La forma digestiva afecta



principalmente a esófago y colon, cuya dilatación produce una serie de importantes trastornos para el paciente (**Tabla 3**).

En el caso de pacientes que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad y que a su vez tienen el sistema inmunológico deprimido por diferentes motivos como la co-infección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o por la toma de medicamentos inmunosupresores, puede darse una reactivación de la EC. La reactivación supone un importante aumento de la parasitemia que puede producir casos graves de meningoencefalitis y miocarditis, pudiendo llegar a ser fatales<sup>82, 83</sup>.

#### **1.4.2. Mecanismos fisiopatológicos**

A lo largo de los más de 100 años desde su descripción han existido numerosas teorías acerca de la patogénesis de la EC, siendo aún un tema de debate el origen y los mecanismos patogénicos responsables de las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes<sup>84</sup>. Existen dos principales hipótesis acerca del factor determinante de la patogénesis de la EC. La primera defiende que la persistencia del parásito en el huésped es la principal causa de las alteraciones provocadas por la enfermedad. La segunda defiende que la principal causa del daño es una respuesta autoinmune frente a los tejidos de los órganos diana como corazón e intestino<sup>85, 86</sup>. Esta segunda teoría fue la más reconocida durante años basándose en diferentes mecanismos como la similitud molecular entre Ag parasitarios y tejidos del hospedador que generaría la formación de Ac autoreactivos y la activación de linfocitos-T autoreactivos. Además, en las zonas donde aparecían daños físicos debido a la enfermedad, principalmente en tejido coronario de pacientes con EC crónica, no se detectaba la presencia del parásito. Sin embargo, en los últimos años, gracias a la mejora y mayor sensibilidad de técnicas de detección como la PCR, se ha visto que la persistencia del parásito en los órganos afectados es crucial para el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Pese a ello, debido a la baja carga parasitaria en las lesiones hace pensar que una inmunopatología asociada a la presencia del parásito o el mecanismo autoinmune son importantes también en la patogénesis. Existen otras teorías para explicar el origen de las lesiones observadas en la fase crónica. Entre ellas destaca la teoría neurogénica, que trata de explicar la intensa despoblación neuronal del sistema nervioso simpático y parasimpático en tejido cardíaco, esófago y colon observados en pacientes en fase crónica. Se postuló que la muerte neuronal podía deberse a la acción de una toxina procedente del parásito, sin embargo, su existencia no ha sido demostrada.

Por lo tanto, el conocimiento completo de la patogénesis de la EC, así como de los mecanismos concretos implicados en la patogénesis es aún una barrera que superar para

conseguir un tratamiento eficaz. Lo que parece estar muy aceptado actualmente es que la persistencia del parásito en el organismo es necesaria para las manifestaciones de la fase crónica, lo cual pone de manifiesto la importancia de continuar en la búsqueda de nuevos compuestos anti-*T. cruzi* capaces de eliminar el parásito de los órganos afectados<sup>28, 87</sup>.

## 1.5. Diagnóstico

La EC, como se ha comentado, presenta dos fases claramente diferenciadas, la fase aguda y la fase crónica. Durante el desarrollo de la enfermedad se producen variaciones importantes tanto en la parasitemia como en la respuesta inmune al parásito. Estas variaciones influyen en los criterios de elección del método de diagnóstico a emplear.

### 1.5.1. Diagnóstico en la fase aguda

Cuando la parasitemia es elevada como ocurre durante la fase aguda, el periodo de reactivación en enfermos crónicos en situación de inmunosupresión y en la forma congénita de la EC, se opta por métodos parasitológicos para la detección del parásito en sangre periférica. Excepcionalmente puede llevarse a cabo esta detección en líquido cefalorraquídeo o en biopsias<sup>88, 89</sup>. Los principales métodos parasitológicos de detección directa en sangre son:

- **Examen de sangre en fresco:** Este método consiste en la detección mediante microscopía óptica de la presencia de tripomastigotes móviles en una gota de sangre en fresco. Se trata de la metodología más sencilla, rápida y económica para detectar la EC en pacientes cuya sintomatología indique una posible infección reciente o una posible reactivación.
- **Gota gruesa:** Este método consiste en concentrar la gota de sangre y desfibrarla. Posteriormente se deshemoglobina y se tiñe con Giemsa para ser examinada al microscopio.
- **Frotis de sangre:** Se extiende una gota de sangre en un portaobjetos, se fija y finalmente se tiñe con Giemsa para su mejor visualización.

Cuando es necesario aumentar la sensibilidad del diagnóstico parasitológico directo existen técnicas para concentrar la muestra. Entre estas técnicas destacan:

- **Microconcentración:** Para llevar a cabo esta técnica se recoge la muestra de sangre en tubos heparinizados y se somete a centrifugación para separar por gradiente de densidad los componentes de la sangre. De esta forma los glóbulos rojos se depositan en la parte inferior del tubo. Sobre ellos aparece un anillo blanquecino formado principalmente por los glóbulos blancos. La parte superior es líquida y transparente y constituye el plasma sanguíneo. Los parásitos sedimentan entre los glóbulos blancos y el plasma.

- **Concentración de Strout:** En esta técnica también se emplea la centrifugación para concentrar los parásitos en la muestra sanguínea. Se llevan a cabo varias centrifugaciones sobre una muestra de sangre coagulada. El sedimento se examina al microscopio en busca de tripomastigotes móviles. Es una técnica simple y sensible utilizada en la fase aguda de la enfermedad y para el seguimiento de infecciones por transmisión congénita.

Además, existen técnicas de diagnóstico parasitológico indirecto que cada vez son menos utilizadas como método de diagnóstico clínico pero que aún se utilizan en trabajos de investigación en laboratorios especializados. Entre estos métodos destacan:

- **Hemocultivo:** Consiste en la siembra de una muestra de sangre venosa en un medio de cultivo, bien artificial o celular, con el objetivo de aumentar el número de parásitos presentes. Este método es poco práctico principalmente debido al elevado tiempo de cultivo necesario para dar un resultado, unos dos meses, y por su baja sensibilidad.
- **Xenodiagnóstico:** Esta técnica permite una multiplicación de *T. cruzi* *in vivo* y consiste en picar con un triatomino vector libre de infección, a ser posible el más habitual en la región, a la persona sobre la que se sospecha infección. Posteriormente el insecto se examina para intentar detectar la presencia de *T. cruzi*. Esta técnica es muy poco utilizada actualmente.

### 1.5.2. Diagnóstico en la fase crónica

Durante la fase crónica de la EC el nivel de parásitos en sangre disminuye mucho, hasta el punto de que los métodos de diagnóstico de detección directa del parásito ya no son efectivos. Es por ello que en esta fase el diagnóstico se basa en técnicas serológicas indirectas de detección de Ac frente al parásito o en técnicas de detección del ADN parasitario.

Las técnicas serológicas más empleadas son Hemaglutinación Indirecta (HAI), Enzimoimmunoanálisis (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Western Blot, técnicas con una elevada especificidad y sensibilidad (**Figura 13**). Estas técnicas se basan en el principio de la reacción específica entre antígenos de *T. cruzi* (parásito completo, extractos purificados o antígenos recombinantes) y los anticuerpos IgG presentes en la sangre de las personas infectadas. Las características específicas de cada método se muestran en la **Figura 13**. Estas técnicas requieren de laboratorios con un equipamiento especializado y personal cualificado, condiciones que muchas veces son difíciles de conseguir en las zonas endémicas con escasez de recursos.

El diagnóstico molecular basado en la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre u órganos se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. El método consiste en extraer todo el ADN de una muestra de sangre del paciente y llevar a cabo una PCR

empleando como primers secuencias específicas de ADN de *T. cruzi*. Normalmente se amplifican secuencias de ADN presentes en los minicírculos o en los maxicírculos del ADNk. El bajo límite de detección de esta técnica permite que se pueda detectar la presencia de hasta un único parásito en 100 mL de sangre. Este método de diagnóstico es útil en la fase aguda de la infección, en los casos de transmisión congénita y para detectar la presencia del parásito en biopsias de órganos. También se puede emplear en el cribado de bancos de sangre y órganos para trasplantes. El problema de esta técnica es su difícil adaptación a los métodos de trabajo en las principales áreas endémicas, ya que requiere de material especializado y costoso.

<b>Métodos serológicos de diagnóstico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Hemaglutinación Indirecta (HAI):</b> Se emplean glóbulos rojos sensibilizados con Ag de <i>T. cruzi</i>. Los Ac anti-<i>T. cruzi</i> presentes en el suero de una persona infectada provocan reacción Ag-Ac produciéndose aglutinación.</li><li>• <b>Enzimoinmunoanálisis (ELISA):</b> Se emplean Ag solubles de <i>T. cruzi</i> adheridos a una placa de microtitulación. Para detectar la reacción Ag-Ac se emplean Ac anti-IgG humanas conjugadas con enzimas. Ofrece una alta sensibilidad (97,6-100%) y especificidad (96,5-99,6%).</li><li>• <b>Inmunofluorescencia indirecta (IFI):</b> Se utilizan como Ag epimastigotes obtenidos de cultivo fijados en láminas sobre las que se realiza la reacción Ag-Ac. Si el suero del paciente tiene Ac se produce una reacción Ag-Ac detectada mediante la adición de un Ac anti-IgG marcado con sustancias fluorescentes. Prueba altamente sensible y específica.</li><li>• <b>Western Blot:</b> Los Ag son separados mediante electroforesis en gel y transferidos a una membrana. Sobre ella se añade el suero del paciente donde tiene lugar la reacción Ag-Ac y posteriormente se añade un Ac anti-IgG humanas conjugado con enzima.</li></ul>
---	--

Figura 13. Métodos serológicos para el diagnóstico de *T. cruzi*

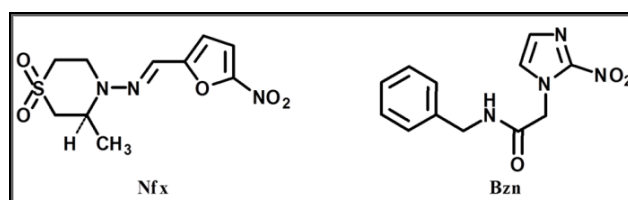
En los últimos años se han desarrollado multitud de test de diagnóstico “rápidos” basados en test serológicos. Estos test presentan la ventaja de que se pueden llevar a cabo sin necesidad de laboratorios ni personal altamente cualificado y su desarrollo ha supuesto un gran avance en el diagnóstico y seguimiento de pacientes de zonas endémicas. Según un estudio de la OMS y Médicos sin Fronteras desarrollado en el año 2014, seis de los once test más comercializados ofrecían muy buenos resultados de sensibilidad, especificidad y facilidad de manejo. Estos datos muestran que estos test pueden ser de mucha utilidad en zonas endémicas pobres como método de diagnóstico rápido que puede ayudar a ofrecer un tratamiento precoz y como método de cribado en bancos de sangre. Sin embargo, no pueden ser considerados como test definitivos por si mismos ya que todavía no alcanzan porcentajes de sensibilidad y especificidad del 100 %. Es por ello que la OMS recomienda el diagnóstico de la EC crónica empleando por lo menos dos técnicas serológicas diferentes con diferente Ag. Por lo tanto, el método de diagnóstico ideal y definitivo para la EC todavía no existe y es por ello que conseguir desarrollarlo es uno de los principales objetivos que se han propuesto las

diferentes iniciativas y organizaciones para los próximos años. Este método deberá cumplir una serie de condiciones entre las que destacan:

- Fácil de realizar en un único paso.
- Rápido.
- Que sea asequible económicamente.
- No requerir equipamientos especiales ni reactivos refrigerados.
- Sensibilidad y especificidad del 100 %. Esto evitaría que fueran necesarias más pruebas adicionales, haciendo que el proceso de diagnóstico fuese más rápido y barato <sup>90,91</sup>.

### 1.6. Tratamiento

A pesar de haber transcurrido más de 100 años desde el descubrimiento de la EC, hasta el momento no se cuenta con un tratamiento completamente seguro y eficaz frente a la enfermedad. Actualmente sólo dos fármacos, Nifurtimox (Nfx) (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) y Benznidazol (Bzn) (Abarax<sup>®</sup>, Laboratorios Elea y Lafepe Benznidazol<sup>®</sup>, Laboratorios Lafepe), presentan un uso clínico aceptado (**Figura 14**). Estos fármacos fueron desarrollados hace más de 40 años por las compañías Bayer y Roche respectivamente. Ninguno de ellos cumple con los requisitos mínimos de seguridad exigidos por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la EC en pacientes adultos, aunque si pueden ser adquiridos bajo prescripción médica a través del CDC. El Bzn ofrece mejores datos de seguridad, eficacia y tolerancia, y es por ello que suele elegirse como tratamiento de primera línea. El 29 de agosto del presente año la FDA ha aprobado su uso para tratar la EC en niños de 2 a 12 años de edad. Este importante avance se ha dado gracias a la colaboración entre las organizaciones DNDi y Mundo Sano y la empresa farmacéutica Chemo <sup>92,93</sup>. La obtención del registro sanitario del Bzn pediátrico permitirá una mayor disponibilidad del fármaco en la red pública de salud aumentando de esta manera su accesibilidad ya que, según datos del DNDi, en zonas endémicas menos del 1 % de los enfermos tiene acceso al tratamiento <sup>94-97</sup>.



**Figura 14.** Estructuras de Nifurtimox y Benznidazol

A pesar de este importante avance para el tratamiento pediátrico con Bzn todavía quedan muchas limitaciones como son la falta de un tratamiento eficaz y seguro para adultos, la

complicada dosificación, las posibles reacciones adversas, la larga duración del tratamiento (baja adhesión), la diferente eficacia mostrada en las diferentes fases de la enfermedad y la aparición de resistencias (**Tabla 4**)<sup>98,99</sup>.

**Tabla 4.** Esquema de tratamiento recomendado frente a la EC<sup>99</sup>.

	DOSIFICACIÓN		REACCIONES ADVERSAS
	Adultos fase aguda y crónica reciente	Dosis pediátrica fase aguda y crónica reciente	
Bzn	5-7 mg/kg/día 60 días	<12 años: 5-7,5 mg/kg/día, 60 días >12 años: 5-7 mg/kg/día, 60 días	Erupción alérgica, edema, prurito, somnolencia, polineuropatía, náuseas, vómitos, epigastralgia, cefalea, dolores musculares, parestesias.
Nfx	>17 años: 8-10 mg/kg/día 90-120 días	1-10 años: 15-20 mg/kg/día, 90 días 11-16 años: 12,5-15 mg/kg/día, 90 días	Anorexia, vómitos, pérdida de peso, pérdida de memoria, trastornos del sueño, temblor, parestesias, debilidad, polineuritis.

La tasa de curación, como se muestra en la **Tabla 5**, depende principalmente de la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente. De esta forma, el tratamiento se considera primordial para todos los casos de infección en fase aguda, en pacientes en edad infantil en fase crónica y en pacientes que sufran una reactivación de la enfermedad debido a una situación de inmunosupresión (pacientes trasplantados o coinfección con VIH). En estos casos un tratamiento rápido con Bzn ofrece tasas de curación superiores al 90 %. Además, se considera eficaz el tratamiento en casos de infección congénita y en casos de infección accidental donde la tasa de curación tras el tratamiento con los dos fármacos de referencia supera el 95 %.

**Tabla 5.** Tasa de curación de la EC con el tratamiento actual

	Tasa de curación			
	Fase aguda	Fase crónica reciente	Fase crónica tardía	EC Congénita
Nfx	65-80 %	15-40 %	10-20 %	> 95 %
Bzn	> 90 %	40-60 %	10-20 %	> 95 %

En el caso de pacientes adultos en fase crónica el tratamiento es recomendable aunque las tasas de curación descienden por debajo del 60 %. Para pacientes de más de 50 años el tratamiento es opcional y se debe evaluar el riesgo/beneficio ya que, a causa de las bajas tasas de curación y de los posibles efectos secundarios, sus beneficios no están totalmente demostrados. A esta limitación que supone la baja actividad antichagásica de ambos fármacos en la fase crónica de la enfermedad hay que sumarle los múltiples efectos adversos que provoca el tratamiento. Estos efectos secundarios normalmente afectan en mayor medida a personas de mayor edad, de ahí que el tratamiento en pacientes de avanzada edad sea opcional. Ambos fármacos provocan una serie de reacciones adversas, principalmente a nivel gastrointestinal, neurológico y de hipersensibilidad (**Tabla 4**). Debido a estos efectos

secundarios, el tratamiento con Nfx y/o Bzn no se recomienda durante el embarazo, la lactancia ni en casos de insuficiencia hepática o renal<sup>100-102</sup>.

Otra gran problemática en el tratamiento de la EC es la diferente susceptibilidad a Nfx y Bzn que presenta el parásito en función de la cepa a la que pertenezca y a la región geográfica donde se encuentre. La presencia de cepas resistentes se ha venido reportando desde hace años en numerosos estudios, lo cual, ha demostrado la capacidad de *T. cruzi* para desarrollar resistencia al tratamiento, tanto natural o intrínseca como adquirida, favorecida además por la baja adhesión al tratamiento. Esta aparición de resistencias puede llegar a ser muy preocupante para el futuro del tratamiento de la EC debido a la escasa variedad de fármacos, sólo Nfx y Bzn, y al todavía escaso desarrollo de nuevos fármacos<sup>79, 103</sup>.

Por todas estas limitaciones que presenta el tratamiento actual, se hace necesaria la inversión en la investigación y el desarrollo de nuevas moléculas activas contra el parásito que permitan el desarrollo de fármacos más eficaces, específicos, con un mejor perfil toxicológico y a un precio asequible. Actualmente, tal y como se muestra en la **Tabla 6**, se ha definido el Target Product Profile (TPP) del fármaco tanto aceptable como ideal para la EC que sirve como guía para el desarrollo de fármacos que cumplan una serie de características que puedan predecir su éxito a nivel clínico<sup>104, 105, 106</sup>.

**Tabla 6.** Target Product Profile para la EC adaptado del DNDi<sup>104</sup>

Criterios	Fármaco aceptable	Fármaco ideal
Fase de la enfermedad	Crónica	Aguda y crónica
Adultos/Niños	Adultos	Todos
Eficacia clínica	Superior al Bzn en todas las regiones endémicas	Superior al Bzn frente a las diferentes fases de la EC y en casos de reactivación en todas las regiones.
Actividad frente a cepas resistentes	No es necesario	Actividad frente a cepas de <i>T. cruzi</i> resistentes a nitrofuranos y nitroimidazoles.
Seguridad	Mayor que Bzn	Mayor que Bzn o Nfx
Contraindicaciones	Embarazo, lactancia	Ninguna
Precauciones	No genotóxico No pro-arritmogénico	No genotóxico No teratogénico y No pro-arritmogénico
Forma farmacéutica	VO	VO
Dosificación	Comparable a tratamientos antifúngicos sistémicos	Una toma diaria durante 30 días
Estabilidad	3 años, zona climática IV	5 años, zona climática IV
Coste	Lo más bajo posible	Similar a tratamientos actuales

### 1.7. Principales dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos

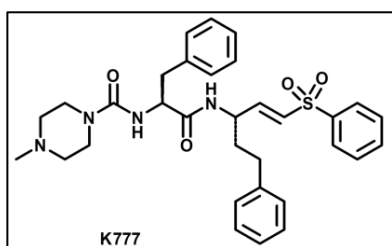
Los avances en el conocimiento de la bioquímica y biología molecular de *T. cruzi*, junto con la determinación de la secuencia completa de su genoma y el desarrollo de la bioinformática han permitido identificar sus principales dianas moleculares y sus rutas metabólicas específicas susceptibles de ser atacadas por nuevas moléculas<sup>107</sup>. A continuación se muestran las

principales dianas terapéuticas, tanto rutas bioquímicas como enzimas específicas del parásito, que se están estudiando en el desarrollo de nuevos medicamentos frente a la EC.

### 1.7.1. Cruzipaína:

La cruzipaína (CP) es la principal cisteína endopeptidasa de *T. cruzi* responsable de la mayor actividad proteolítica en todos los estadios de su ciclo vital. Su localización en el parásito varía en función del estadio, localizándose principalmente en los lisosomas en la forma epimastigote, mientras que en el amastigote se puede encontrar en los lisosomas y en la membrana plasmática<sup>108</sup>. La CP está involucrada principalmente en:

- Los pProcesos de diferenciación celular que se dan a lo largo del ciclo vital del parásito.
- Digestión lisosomal de proteínas, tanto exógenas como del propio parásito.
- Protección contra la respuesta inmune del hospedador mediante la degradación del fragmento Fc de las inmunoglobulinas.
- En el pProcesos de invasión del tripomastigote metacíclico en la célula del hospedador<sup>109</sup>.



**Figura 15.** Principal inhibidor de CP

Estas importantes funciones y su selectividad la convierten en una diana perfecta para el diseño de nuevos compuestos anti-*T. cruzi*. En los últimos años se han descubierto numerosos inhibidores de CP. El compuesto K-777 (**Figura 15**), un derivado de vinilsulfona, ha sido hasta el momento el compuesto que más lejos ha llegado en el desarrollo pre-clínico. Sin embargo, en el año 2013, el DNDi detuvo el proyecto de desarrollo clínico por problemas de tolerabilidad a bajas dosis en monos y perros<sup>110</sup>. Entre los inhibidores más potentes se han publicado derivados de vinilsulfonas, alilsulfonas, aciloximetil cetonas, mercaptometil cetonas,  $\alpha$ -dicarbonilos y nitrilos<sup>111</sup>.

### 1.7.2. Transialidasa

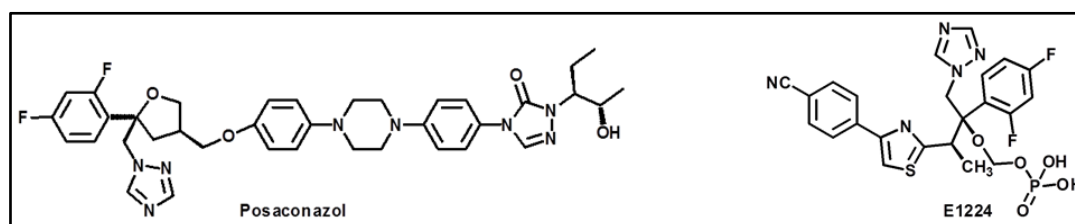
La transialidasa de *T. cruzi* (TcTS) es una enzima que se encuentra anclada a la superficie celular y que posee una función muy importante en el proceso de invasión celular. Concretamente su función es la de transferir ácido siálico de la superficie de la célula del hospedador mamífero a mucinas de la superficie de la membrana de la forma tripomastigote del parásito. Este proceso permite al parásito evadir el sistema inmune del huésped. Por lo tanto, se trata de una proteína esencial en la patogénesis de la enfermedad. La TcTS es específica de los tripanosomátidos y no existe ninguna proteína homóloga en humanos, lo que la convierte en una diana terapéutica de interés para la búsqueda de nuevos derivados con actividad anti-*T. cruzi*. A lo largo de los últimos años han sido identificados numerosos



inhibidores de la enzima, sin embargo, ninguno ha demostrado todavía una actividad lo suficientemente potente como para ser un candidato válido en la lucha contra el parásito. Por lo tanto, será necesaria una profundización en el estudio de esta diana para el diseño, descubrimiento y desarrollo de nuevos inhibidores potentes de TcTS<sup>112-114</sup>.

### 1.7.3. Biosíntesis de esteroides

La ruta de biosíntesis de esteroides (RBE) es una de las dianas más estudiadas en los proyectos de búsqueda de nuevos tratamientos frente a *T. cruzi*. Esto se debe a la demostrada incapacidad de *T. cruzi* para aprovechar el colesterol de su hospedador, lo cual hace que el parásito requiera sintetizar sus propios esteroides específicos. Los esteroides son lípidos con función estructural, ya que forman parte de la membrana celular y, por lo tanto, van a tener mucha importancia para mantener la viabilidad del parásito y poder llevar a cabo procesos de diferenciación y proliferación celular a lo largo de las diferentes etapas de su ciclo vital. Además, van a participar en las interacciones con el hospedador durante el proceso de infección. La RBE en *T. cruzi* es muy similar a la que se produce en hongos y levaduras, por ello compuestos con conocida actividad antifúngica se han investigado durante años como posibles inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBEs) en tripanosomátidos. Debido a que se trata de una ruta bioquímica esencial y específica de *T. cruzi* se considera que es una de las dianas estratégicas para el desarrollo de nuevos compuestos con potencial actividad antichagásica. Entre los IBEs identificados en los últimos años destacan el Posaconazol y el E1224, un profármaco del Ravuconazol (**Figura 16**). Ambos compuestos llegaron a ser estudiados en ensayos clínicos, sin embargo, no mostraron una mejor eficacia que el Bzn, tal y como se describe en el apartado 1.8<sup>115</sup>.



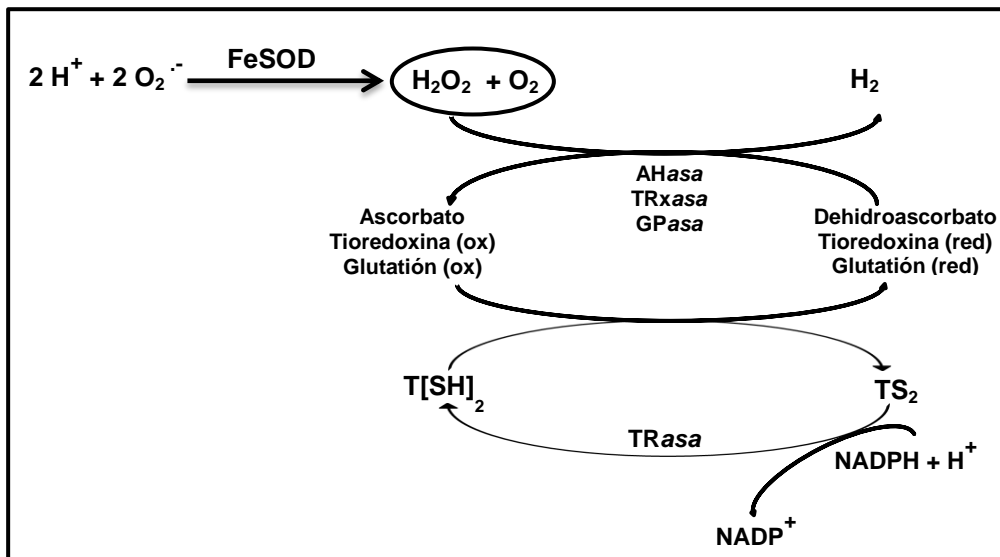
**Figura 16.** Inhibidores de la biosíntesis de esteroides

### 1.7.4. Enzimas de defensa frente al estrés oxidativo

*T. cruzi* es un protozoo que vive en condiciones aeróbicas, lo cual conlleva un metabolismo aeróbico, es decir, un metabolismo en el que el aceptor final en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria es el oxígeno. La repetición de este proceso de reducción generará la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) altamente inestables y

perjudiciales para la viabilidad celular. Dentro de estas especies destacan el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el cual es precursor del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Además, *T. cruzi* debe enfrentarse a EROs generados por la respuesta inmune innata, en especial por los macrófagos, para sobrevivir en el organismo hospedador. Para enfrentarse a estas EROs, *T. cruzi* posee proteínas que se diferencian de los sistemas presentes en el organismo hospedador. De hecho, en *T. cruzi* apenas se ha identificado actividad catalasa y del sistema glutatión/glutatión reductasa presente en la mayor parte de organismos eucariotas. Algunas de las proteínas más importantes que *T. cruzi* posee para enfrentarse al estrés oxidativo son la superóxido dismutasa (FeSOD), la tripanotona reductasa (TRasa) y diferentes tipos de peroxidasa (**Figura 17**).



**Figura 17.** Principales enzimas que participan frente al estrés oxidativo

### Superóxido dismutasa

Las Superóxido Dismutasas (SODs) son un grupo de enzimas con actividad antioxidante que forman parte del mecanismo de defensa del parásito frente al estrés oxidativo generado por la respuesta inmune del hospedador al detectar su presencia. Entre las múltiples especies reactivas de oxígeno generadas, las SODs se encargan de la eliminación del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) del medio celular catalizando la reacción que se muestra en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Reacción catalizada por la SOD

Las SODs son una familia de enzimas muy extendida en todo el árbol filogenético de la vida que generalmente se localizan en el citoplasma celular y en la mitocondria. Cabe destacar que

en tripanosomátidos además se encuentra una isoforma en el interior de los glicosomas. Estructuralmente son dímeros o tetrámeros que poseen un cofactor metálico unido que va a permitir diferenciarlas y clasificarlas. Así, la familia de las SODs se clasifica en 4 isoformas diferentes: FeSOD con cofactor hierro, Cu/ZnSOD con cobre/zinc, MnSOD unida a manganeso y NiSOD unida a níquel. En *T. cruzi* se ha identificado únicamente la isoforma unida a hierro, FeSOD. Esta diferencia estructural respecto a las SODs presentes en los hospedadores, junto a su importante actividad dentro del intrincado sistema de defensa frente al estrés oxidativo generado por la respuesta inmune hace que estas enzimas sean dianas de alto interés en la búsqueda de nuevos fármacos activos y selectivos frente al parásito<sup>116-118</sup>.

### **Peroxidasas**

Las diferentes enzimas peroxidasas presentes en *T. cruzi* se encargan de la metabolización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cumplen la función que en mamíferos lleva a cabo la catalasa. Como se muestra en la **Figura 17**, destacan la ascorbato hemoperoxidasa (AHasa), la triparredoxin peroxidasa (TRxasa) y la glutatión peroxidasa (GPasa).

### **Metabolismo de la Tripanotiona**

*T. cruzi* al igual que otros miembros de la familia *Tripanosomatidae* presenta un metabolismo redox dependiente de la tripanotiona (*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>8</sup>-bis(glutationil)espermidina). La tripanotiona (T[SH]<sub>2</sub>) es el principal ditiol de bajo peso molecular formado por dos moléculas de glutatión unidas por espermina en una reacción catalizada por la tripanotiona sintasa (TS). Este tiol forma parte del sistema (T[SH]<sub>2</sub>)/TRasa, el cual, cumple funciones homólogas a las del sistema glutatión/glutatión reductasa presente en mamíferos. La TRasa es una flavoproteína dependiente de NADPH cuya función es mantener la tripanotiona oxidada (TS<sub>2</sub>) en su forma reducida (T[SH]<sub>2</sub>) (**Figura 17**). Esta enzima es clave a la hora de mantener un ambiente reductor y evitar daños por EROs. El parásito necesita mantener altas concentraciones de T[SH]<sub>2</sub> para su supervivencia y esto se consigue gracias a la acción combinada de dos enzimas, la TRasa y la TS. Por lo tanto, las vías metabólicas involucradas en su biosíntesis y regeneración son dianas interesantes para el diseño de nuevos fármacos<sup>119, 120</sup>.

#### **1.7.5. Metabolismo energético**

El metabolismo energético de los tripanosomátidos es muy complejo y difiere entre especies y entre las diferentes fases del ciclo vital. Estas diferencias están determinadas por la disponibilidad de nutrientes en los diferentes ambientes en los que el parásito se desarrolla. Dentro de los tripanosomátidos, *T. cruzi* presenta uno de los metabolismos energéticos más

complejos ya que puede utilizar como fuente de energía aminoácidos y ácidos grasos, además de la glucosa. Cuando la forma tripomastigote de *T. cruzi* se encuentra en un medio rico en glucosa, como la sangre del hospedador mamífero, la mayor parte del ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato mediante la glucólisis. Cuando el parásito se encuentra en el intestino del insecto vector, forma epimastigote, dispone de un entorno rico en aminoácidos como L-treonina, L-prolina y D-prolina. A partir de estos aminoácidos es capaz de obtener ATP a través de la fosforilación oxidativa. Los amastigotes por su parte poseen un metabolismo basado en la glucosa pero parece que son capaces de utilizar de manera efectiva los ácidos grasos para la obtención de energía. Se ha visto también que *T. cruzi* es capaz de almacenar reservas de energía endógenas en forma de hidratos de carbono, proteínas y ácidos grasos <sup>108</sup>.

La degradación de la glucosa en *T. cruzi* se produce a través de la glucólisis, la cual, presenta una serie de variaciones respecto a la que tiene lugar en el hospedador mamífero. La principal diferencia radica en que la mayor parte de las reacciones metabólicas de esta vía tienen lugar en los glicosomas. Este orgánulo posee en su interior a las enzimas que participan en las reacciones catabólicas de la glucólisis. Dentro de estas enzimas se ha puesto especial interés en la Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (GAPDH) y en la Triosafofato isomerasa (TIM), ya que se ha visto que presentan diferencias estructurales respecto a sus homólogas en mamíferos y representan una diana interesante en la búsqueda de nuevos inhibidores específicos <sup>121, 122</sup>.

Como resultado del catabolismo de la glucosa, debido a la imposibilidad de *T. cruzi* para oxidarla completamente hasta CO<sub>2</sub> se producen una serie de metabolitos que son excretados al medio. Entre estos metabolitos excretados destacan el succinato, el acetato, piruvato, L-alanina, lactato, glicina y malato. La cantidad excretada varía en función del estadio del ciclo vital en el que se encuentre el parásito (**Tabla 7**). La cuantificación de los metabolitos excretados permite determinar la posible capacidad inhibitoria de nuevos compuestos sobre alguna ruta del metabolismo energético de *T. cruzi* <sup>123, 124</sup>.

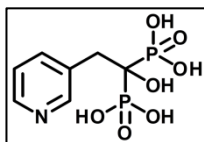
**Tabla 7.** Los principales metabolitos en cada estadio de *T. cruzi*

Estadio	Metabolitos excretados
Tripomastigote	Succinato y acetato
Amastigote	Acetato, glicina, piruvato y succinato
Epimastigote	Succinato, L-alanina y acetato, D-lactato

#### 1.7.6. Metabolismo del pirofosfato

El metabolismo del PP<sub>i</sub> es otra posible diana para el diseño de nuevos compuestos activos ya que es un compuesto importante para la viabilidad celular por estar relacionado con la respuesta del parásito al estrés ambiental, con la osmoregulación y con procesos de transducción de energía. Las moléculas más estudiadas como inhibidores de esta vía son los

bisfosfonatos, compuestos ampliamente conocidos y empleados en el tratamiento de la osteoporosis. Los bisfosfonatos se consideran análogos inertes del  $PP_i$  y se ha visto en ensayos en ratones que se acumulan en el acidocalcisoma. Al ser análogos del  $PP_i$  su presencia en el orgánulo puede inhibir la acción de enzimas del metabolismo del  $PP_i$  como la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS), pirofosfatasas de las bombas de protones y la piruvato fosfato dikinasa <sup>108</sup>.



**Figura 19.** Risedronato

Los ensayos realizados con *N*-alquil-bisfosfonatos, análogos del  $PP_i$ , mostraron una importante selectividad frente a *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*. Ensayos *in vivo* en ratones empleando risedronato (**Figura 19**) mostraron una alta selectividad frente al parásito y una

buena tolerancia, aunque no se observó una curación completa. Esto llevó a considerar a los derivados de bisfosfonatos como un grupo de compuestos líderes para el desarrollo de nuevos derivados frente a *T. cruzi*, aunque la realidad es que actualmente ninguno de estos derivados se encuentra en fases de desarrollo clínico <sup>125, 126</sup>.

### 1.7.7. Captación de purinas

Para la síntesis de sus ácidos nucleicos los tripanosomátidos deben incorporar purinas desde el medio externo ya que son incapaces de sintetizarlas de *ново*. Las purinas captadas son incorporadas al anabolismo de ácidos nucleicos, ruta metabólica de interés en el desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de esta ruta se identificó la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), que transforma las bases púricas hipoxantina y guanina en sus correspondientes nucleótidos. En los años 90 se identificó un análogo a las bases púricas, el alopurinol, como posible compuesto anti-*T. cruzi*. Sin embargo, el compuesto no mostró alta eficacia en ensayos clínicos en humanos por lo que su uso fue desestimado <sup>127</sup>.

### 1.8. Situación actual del desarrollo de fármacos

Como se ha comentado en el apartado 1.2.1, en los últimos años se ha incrementado en gran medida el número de grupos de investigación y de organizaciones que han invertido sus esfuerzos en la búsqueda y desarrollo de nuevos tratamientos frente a la EC. Sin embargo y a pesar del avance en el conocimiento a nivel bioquímico y genético del parásito únicamente han alcanzado ensayos clínicos de fase III y IV estudios de nuevas formulaciones de Nfx y Bzn. Además, las moléculas que han alcanzado fases I y II han sido obtenidas mediante la estrategia de reposicionamiento, donde destacan los IBEs. En la **Figura 20** se muestran los ensayos clínicos más destacados diseñados para la búsqueda de tratamientos más eficaces frente a la EC <sup>128, 129</sup>.

En cuanto a los ensayos clínicos con IBEs destacan los estudios CHAGASAZOL, STOP CHAGAS y Poc Study E1224 llevados a cabo con posaconazol y ravuconazol (E1224).

- Estudio CHAGASAZOL (NCT01162967): Se evaluó la eficacia del Posaconazol en pacientes adultos en fase crónica comparando los resultados con los obtenidos en pacientes tratados con Bzn. El estudio reveló como el Posaconazol no superó la eficacia observada en pacientes tratados con el Bzn. No obstante los pacientes tratados con Posaconazol mostraron menores efectos adversos que los tratados con Bzn <sup>130</sup>.
- Estudio STOP CHAGAS (NCT01377480): Se llevó a cabo la comparación de eficacia en pacientes en fase crónica indeterminada tratados con Posaconazol y con Bzn. Se vió que el Posaconazol no ofrecía mejores resultados de eficacia que el Bzn ni en monoterapia ni en terapia combinada con Bzn. Además, se observó como el Posaconazol generaba una menor cantidad de reacciones adversas en comparación con los pacientes tratados con Bzn <sup>131</sup>.
- PoC study E1224 (NCT01489228): El E1224 es un profármaco del ravuconazol y su eficacia fue estudiada en pacientes adultos en fase crónica indeterminada. E1224 fue efectivo en la reducción parasitaria en las primeras etapas del estudio, sin embargo, el análisis de los pacientes tras un año de estudio mostró una efectividad claramente inferior a la observada en los pacientes tratados con el Bzn <sup>132</sup>.

Por lo tanto, debido a la menor eficacia de Posaconazol y E1224 con respecto a Bzn no se continuó con su desarrollo clínico. Sin embargo, estos compuestos no se han sido descartados para su estudio en terapias combinadas con Bzn debido a su buen perfil de eficacia y baja toxicidad <sup>105, 130, 133</sup>.

Con respecto al Nfx, hay dos importantes ensayos clínico programados:

- Estudio CHICAMOCHA-3 (NCT02369978): Este ensayo clínico se realizará en la Universidad Autónoma de Bucaramanga (Colombia). Se trata de un ensayo de fase II para el Nfx y fase III para el Bzn en el que se estudiará la capacidad tripanocida del Nfx durante la fase crónica de la enfermedad y esta se comparará con la eficacia y seguridad que muestre el Bzn.
- Estudio CHICO (NCT02625974): Ensayo clínico en fase III patrocinado por Bayer que ha sido diseñado para profundizar en el entendimiento a nivel de eficacia, tolerancia y farmacocinética de una nueva formulación de Nfx a diferentes dosificaciones pediátricas en el tratamiento de niños (0-17 años) con EC.

En lo que respecta al Bzn, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos en los que se ha evaluado su eficacia, seguridad y farmacocinética en diferentes fases de la EC y en diferentes tipos de pacientes (**Figura 20**). Los ensayos más destacados son:

- Estudio BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis, NCT00123916): Ensayo patrocinado por Population Health Research Institute y que fue diseñado para evaluar la eficacia y seguridad del Bzn en pacientes adultos crónicos con cardiomiopatía. Mediante PCR se observó una disminución de la presencia parasitaria, sin embargo, la cura parasitológica no fue completa y no se dio una mejora en las manifestaciones clínicas.<sup>134-137</sup>
- Estudio TRAENA (TRAtamiento EN pacientes Adultos, NCT02386358): Ensayo patrocinado por el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chaben, diseñado para evaluar la eficacia de Bzn en pacientes adultos con EC en fase crónica. Se observó como el Bzn presentaba un claro efecto tripanocida, pero al igual que en BENEFIT no se observó una reducción de la mortalidad ni de las manifestaciones clínicas propias de la fase crónica de la EC<sup>128, 138</sup>.

Ambos ensayos clínicos mostraron como el Bzn no era capaz de modificar la evolución natural de la EC crónica en pacientes adultos confirmándose de esta manera los problemas de baja eficacia del Bzn durante esta fase de la EC<sup>139</sup>.

En los últimos años se está enfatizando mucho el estudio de una dosificación y una formulación más adecuada del Bzn, destacando los siguientes ensayos:

- Estudio Pop PK Chagas (NCT01549236): Ante la falta de una forma farmacéutica del Bzn adaptada al tratamiento farmacológico pediátrico, el DNDi y LAFEPE se asociaron con el objetivo de desarrollar una tableta de 12,5 mg que permitiera un tratamiento más adecuado en niños con EC en fase aguda o en fase crónica indeterminada temprana. Fruto de este estudio la nueva formulación desarrollada fue registrada en Brasil en 2011 y pasó a formar parte de la Lista de medicamentos esenciales para niños de la OMS en el año 2013<sup>128, 129, 132</sup>.
- Estudio farmacocinético de Bzn en niños con EC (NCT00699387): Es un ensayo patrocinado por el Hospital de Niños R. Gutierrez de Buenos Aires que se propuso como objetivo el estudio de la farmacocinética del Bzn en niños (2-12 años) y correlacionar los datos obtenidos con la eficacia y efectos secundarios mostrados por el tratamiento. El ensayo mostró como los niños eliminaban el fármaco más rápidamente que los adultos, lo cual se traducía en concentraciones plasmáticas más bajas. Además se observó que los niños presentaban pocos efectos adversos. A partir de los resultados observados se propuso un ajuste de las dosis en adultos con el objetivo de mejorar la eficacia y disminuir los efectos adversos<sup>140</sup>.
- Estudio CINEBENZ (NCT01755403): Estudio farmacocinético patrocinado por el Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona en el que se pretendía determinar un

perfil farmacocinético del Bzn en pacientes adultos con EC crónica para optimizar la dosis del tratamiento. Se observó que la dosis empleada (2,5 mg/kg/12 h) es demasiado alta y se propuso la disminución hasta 2,5 mg/kg/24 h con el objetivo de disminuir los efectos secundarios manteniendo la eficacia <sup>141</sup>.

- Estudio MULTIBENZ (NCT03191162): Se trata de un ensayo de fase II esponsorizado por el Instituto de Investigación Hospital Universitario Vall d'Hebron, como parte del Proyecto BERENICE. El objetivo del estudio es evaluar tres dosis diferentes de Bzn en pacientes adultos en fase crónica de la EC.

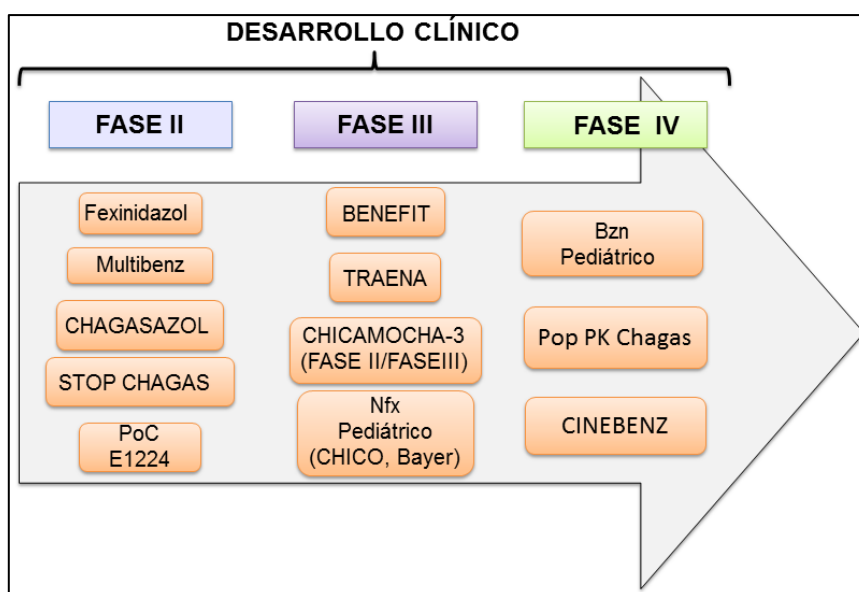


Figura 20. Portafolio de ensayos clínicos frente a la EC

El proyecto BERENICE (BENZnidazol and triazol REsearch group for Nanomedicine and Innovation on Chagas disease), financiado por la Unión Europea, tiene como objetivo la reformulación del Bzn mediante el uso de nanotecnología para conseguir un tratamiento más efectivo, mejor tolerado y más barato que el actualmente empleado. Este proyecto involucra a numerosos socios europeos y latinoamericanos tanto del mundo académico como de la industria farmacéutica, entre los que se encuentran el Hospital Universitari Vall d'Hebron, Médicos Sin Fronteras, la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud 'Dr. Carlos G. Malbran' de Argentina, el CIBER-BBN de Zaragoza, la Fundación FIOCRUZ de Brasil y el laboratorio Elea de Argentina <sup>132, 142, 143</sup>.

El Fexinidazol, un 5-nitroimidazol no genotóxico estudiado en la Tripanosomiasis Humana Africana, ha demostrado ser efectivo frente a *T. cruzi* en estudios preclínicos. Se llevó a cabo un ensayo clínico de fase II de este derivado vs placebo en Bolivia en pacientes adultos en fase crónica indeterminada. El ensayo tuvo que ser interrumpido por problema de seguridad y tolerancia y actualmente se ha diseñado un nuevo estudio <sup>144</sup>.



### 1.8.1. Desafíos en el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas

El proceso de descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco involucra un complejo y largo periodo de investigación que requiere de grandes aportes económicos y que en la mayoría de las ocasiones tiene escasas posibilidades de éxito. Dentro del marco de la EC esta realidad se hace aún más patente, ya que como se comentó en secciones anteriores, los fármacos empleados para su tratamiento fueron descubiertos hace prácticamente cincuenta años. Durante la última década se ha producido un importante impulso en el conocimiento de la enfermedad y en el proceso de investigación y desarrollo de nuevos fármacos debido principalmente al establecimiento de importantes alianzas internacionales entre instituciones académicas, compañías farmacéuticas y diferentes asociaciones<sup>30, 145</sup>. Los esfuerzos realizados dieron sus frutos y diferentes moléculas avanzaron en su desarrollo llegando a ser estudiadas en diferentes fases de ensayos clínicos, algo que no se había conseguido en los últimos cuarenta años. Entre estas moléculas destacaron los derivados de azoles, que habían ofrecido prometedores resultados durante la fase preclínica. Sin embargo, esos buenos resultados no se corroboraron en los ensayos clínicos, ya que mostraron altos porcentajes de fracaso en el tratamiento durante la fase crónica principalmente<sup>133</sup>. Los resultados llevaron a pensar que se necesita una reflexión profunda sobre el modo de afrontar el desarrollo de nuevos fármacos frente a la EC. Gracias a las redes colaboradoras internacionales formadas y a la numerosa información recopilada tras los ensayos clínicos se propusieron los desafíos reales a afrontar en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la EC. Entre estos retos cabe destacar<sup>105, 146-148</sup>:

- La necesidad de avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la EC y de las relaciones parásito-hospedador así como de la influencia de la variabilidad genética en la respuesta al tratamiento.
- La determinación de los regímenes de administración óptimos de los fármacos actuales, Bzn y Nfx.
- El desarrollo de un mayor número de moléculas con una mayor diversidad química a nivel estructural y con novedosos mecanismos de acción.
- La necesidad de una estandarización de los protocolos de evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* que permita una comparativa de los resultados biológicos obtenidos a nivel internacional.
- La necesidad de establecer criterios de selección estandarizados para la determinación de compuestos líderes que permitan alcanzar los requisitos propuestos por el TPP.

- La necesidad de establecer nuevos biomarcadores que informen sobre la progresión de la enfermedad y que sean capaces de confirmar la cura terapéutica.
- El desarrollo de métodos de diagnóstico específicos, altamente eficaces y accesibles durante la fase crónica de la enfermedad.
- El desarrollo de estudios epidemiológicos en pacientes que sufren la fase indeterminada de la enfermedad para evaluar el impacto del tratamiento sobre la progresión de la EC.

## 2. Leishmaniasis: definición, concepto y generalidades

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa parasitaria causada por protozoos del género *Leishmania*, los cuáles, son transmitidos naturalmente al ser humano a través de la picadura de insectos hematófagos hembras de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Se trata de una enfermedad zoonótica y antroponótica en la que numerosas especies de roedores, el perro y el ser humano actúan como los principales reservorios.

Al igual que la EC, la leishmaniasis pertenece al grupo de las 17 ETDs<sup>5, 149</sup>. Se encuentra ampliamente extendida a lo largo de las zonas cálidas y templadas del planeta donde afecta principalmente a personas en situación de pobreza. La leishmaniasis presenta cuatro formas clínicas principales, forma visceral (LV) o kala-azar, forma dérmica post-kala-azar (LDPK), forma cutánea (LC) y forma mucocutánea (LMC).

### 2.1. Transmisión

El protozoo parásito *Leishmania* es transmitido naturalmente a través de la picadura de insectos dípteros hembra de los géneros *Lutzomyia* (**Figura 21**) y *Phlebotomus* (**Figura 22**). El género *Phlebotomus* es el responsable de la transmisión en el Viejo Mundo (Europa, norte de África y Asia) mientras que *Lutzomyia* es el transmisor en el Nuevo Mundo (desde Argentina hasta el sur de Estados Unidos). En función de la localización donde ocurre la transmisión y del tipo de animal reservorio implicado se distinguen tres tipos de ciclo de transmisión:

- Ciclo selvático, cuando la infección del ser humano ocurre de manera accidental al encontrarse este en una zona de transmisión salvaje.
- Ciclo doméstico o peridoméstico, cuando el reservorio del parásito es un animal doméstico o peridoméstico, principalmente roedores y el perro.
- Ciclo antroponótico, cuando no existe un reservorio animal o se desconoce su existencia.

La transmisión de la enfermedad se da en su mayoría a través de los vectores anteriormente comentados, sin embargo, al igual que ocurre en la EC, existen mecanismos de transmisión no vectorial que tienen importancia, especialmente en la transmisión de la LV. La

transmisión no vectorial se producen a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, transmisión congénita, transmisión sexual, transmisión por accidentes de laboratorio y transmisión directa entre personas por contacto con las lesiones ulcerosas en casos de LC y LMC<sup>149, 150</sup>.



**Figura 22.** Insecto vector género *Lutzomyia*

**Fuente:**<http://journals.plos.org/plospathogens/article/figure/image?size=large&id=info:doi/10.1371/image.ppat.v05.i08.g001>



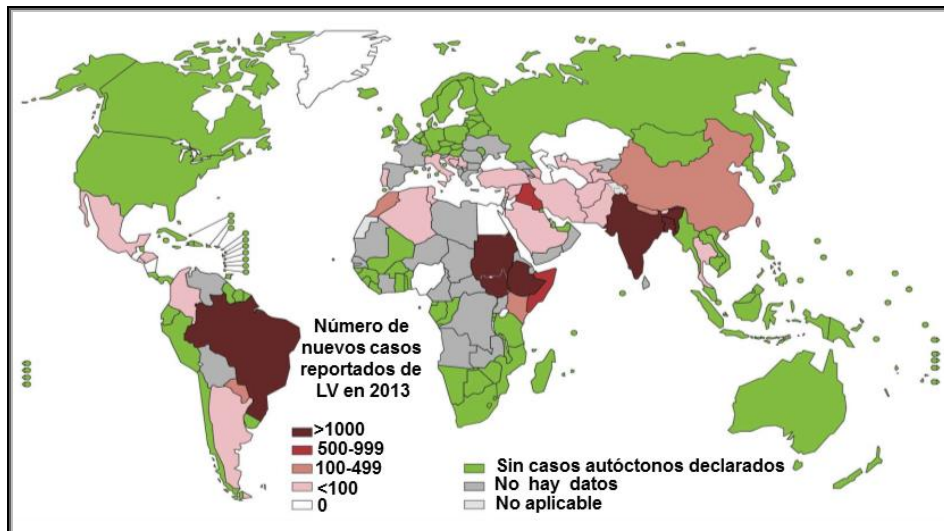
**Figura 22.** Insecto vector género *Phlebotomus*

**Fuente:**[https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/10277/10277\\_lores.jpg](https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/10277/10277_lores.jpg)

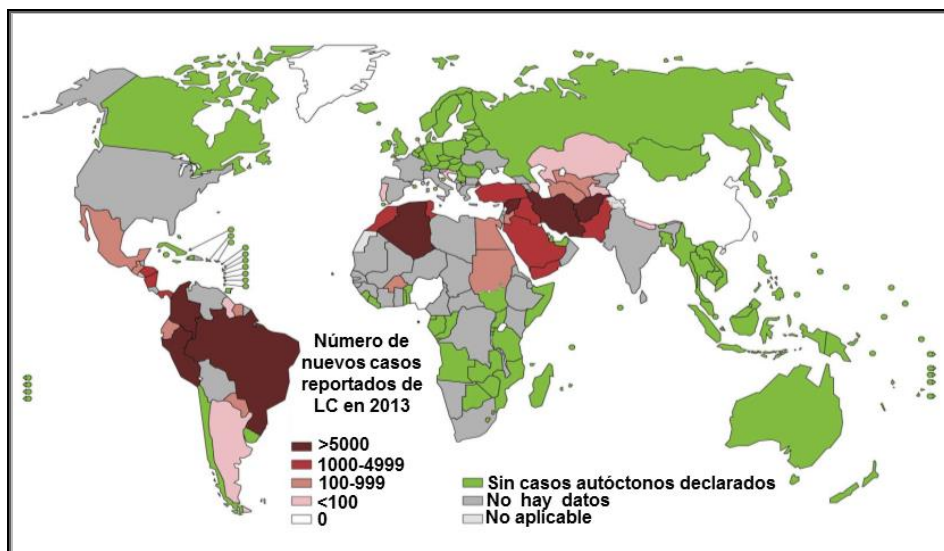
## 2.2. Epidemiología

La leishmaniasis es una enfermedad presente en las zonas de clima templado y cálido de todos los continentes y actualmente está presente en 98 países, causando unas 40.000 muertes anuales. Se estima que cada año se producen más de 1,2 millones de nuevos casos, de los cuales, alrededor del 30 % corresponden a LV y más del 50 % corresponden a LC y LMC. Un total de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de infección, la mayor parte de ellas en zonas pobres de África, Asia y Latinoamérica. El 90 % de los casos de LV a nivel mundial (**Figura 23**) se dan en 6 países: India, Bangladesh, Sudan, Sudan del Sur, Etiopía y Brasil, mientras que la LC y LMC se presenta más repartida a nivel mundial aunque casi el 75 % de los casos se concentran en Afganistán, Irán, Pakistán, Siria, Argelia, Túnez, Arabia Saudí, Brasil, Colombia, Perú y Bolivia (**Figura 24**). En las zonas de alto riesgo de infección se cumplen una serie de factores que aumentan la probabilidad de contraer la enfermedad. Entre estos factores destacan<sup>5, 151</sup>:

- Bajo nivel socioeconómico y malas condiciones de vivienda.
- Malas condiciones higiénicas.
- Masivos movimientos migratorios que ponen en contacto a personas infectadas y sanas.
- Cambios climáticos y ambientales, como la deforestación y la urbanización, que provocan los cambios en el patrón de vida del vector.
- Un sistema inmunológico deprimido, coinfección con VIH.



**Figura 23.** Distribución geográfica y nuevos casos de leishmaniasis visceral a nivel mundial (2013)  
 Fuente: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>



**Figura 24.** Distribución geográfica y nuevos casos de leishmaniasis cutánea a nivel mundial (2013)  
 Fuente: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

En España la leishmaniasis se considera una enfermedad endémica debido a la presencia de dos especies de *Phlebotomus* endémicas de la península ibérica y las Islas Baleares, *P. perniciosus* y *P. ariasi*. La enfermedad es causada por *L. infantum*, única especie de *Leishmania* presente en el país y capaz de provocar las tres formas clínicas principales. De cualquier manera la incidencia de la enfermedad es muy baja, produciéndose menos de un caso por cada 100.000 habitantes según diferentes estimaciones. El principal reservorio de la leishmaniasis que se encuentra en España es el perro, animal que sufre la denominada leishmaniasis canina, enfermedad con una elevada seroprevalencia (10-20 %) <sup>152-156</sup>.

### 2.3. Etiología: Agente causal

*Leishmania* es un protozoo parásito que, al igual que *T. cruzi*, se clasifica taxonómicamente dentro de la familia *Trypanosomatidae* y orden *Kinetoplastida* (Figura 25). Dentro del género *Leishmania*, actualmente, se distinguen dos subgéneros denominados *Leishmania* y *Viannia*, los cuales se diferencian por el lugar donde se reproducen en el interior del tubo digestivo del insecto vector. Ambos subgéneros están formados por diferentes grupos de especies denominados complejos que se diferencian entre sí por características bioquímicas, moleculares y genéticas. En cuanto a la distribución geográfica, las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* están presentes tanto en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África) como en el Nuevo Mundo (América), mientras que las especies pertenecientes al subgénero *Viannia* están presentes en el Nuevo Mundo.

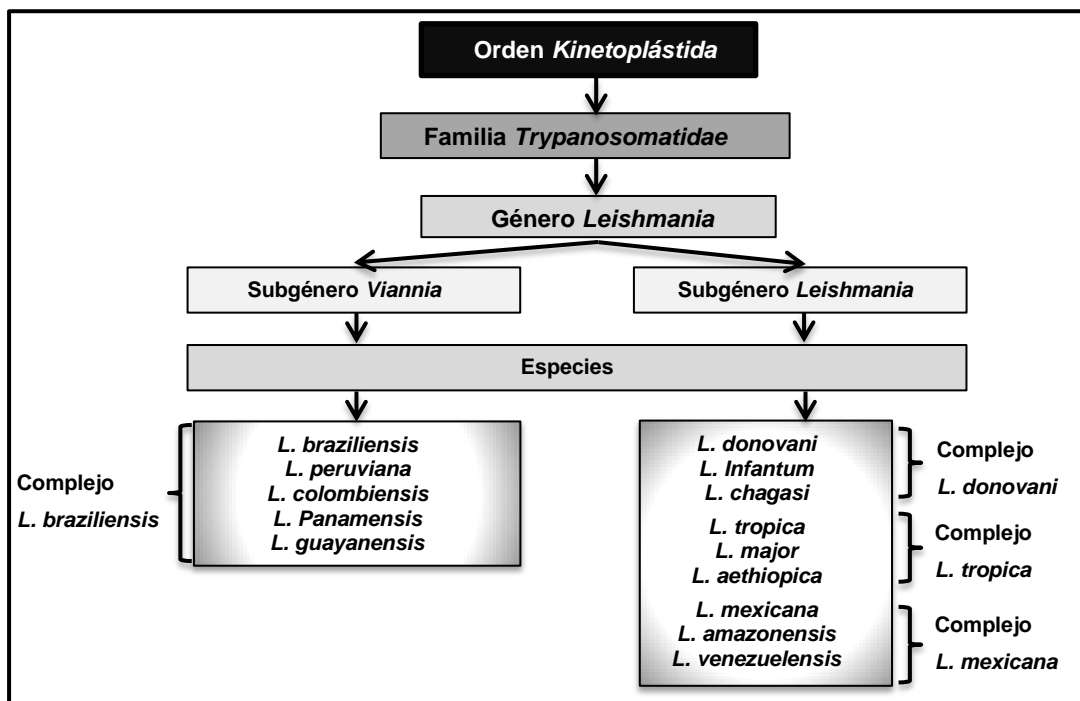


Figura 25. Clasificación taxonómica de *Leishmania* spp

Hasta el momento se han identificado más de treinta especies de *Leishmania*, de las cuales más de veinte se consideran patógenas para el ser humano. En la **Tabla 8** se muestran las especies patógenas más extendidas geográficamente y que en mayor medida afectan al ser humano. Estas especies se diferencian principalmente en cuanto a su distribución geográfica, la forma clínica que provocan y su reservorio principal. La clasificación de las diferentes especies dentro del género *Leishmania* sigue siendo un tema de discusión que se encuentra en continua revisión <sup>153, 155, 157, 158</sup>.

**Tabla 8.** Principales especies patógenas de *Leishmania spp*

Especie de <i>Leishmania</i>	Subgénero	Distribución	Forma clínica	Reservorio principal
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania</i>	Zona mediterránea, Norte de África, Asia occidental, Oriente Medio, América del Norte, Central y Sudamérica	LV y canina	Perro
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Leishmania</i>	India y China, Este y centro de África, Oriente medio y América Latina	LV y LVPK	Hombre, perro, roedores
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Leishmania</i>	Asia Central, Oriente Medio, India, Centro y Norte de África y Australia.	LC y LV	Roedores (gundi), hombre, perro
<i>Leishmania major</i>	<i>Leishmania</i>	Norte y centro de África, Oriente Medio y Asia Central	LC	<i>Roedores gerbilinos</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Viannia</i>	Noreste de Brasil, Bolivia, Colombia, Argentina, Perú, Guatemala y Venezuela	LC y LMC	Numerosos mamíferos selváticos
<i>Leishmania peruviana</i>	<i>Viannia</i>	Región andina Peruana y Bolivia	LC	Perro
<i>Leishmania aethiopica</i>	<i>Leishmania</i>	Este de África (Etiopía y Kenia) y Asia Central	LC	<i>Procapra Capensis</i> o Damán de El Cabo, roedores principalmente
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Leishmania</i>	Bolivia, Brasil, Venezuela y Argentina	LC y LV	-
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania</i>	Perú, México y Texas	LC	Diferentes especies de roedores de bosque

## 2.4. Características celulares

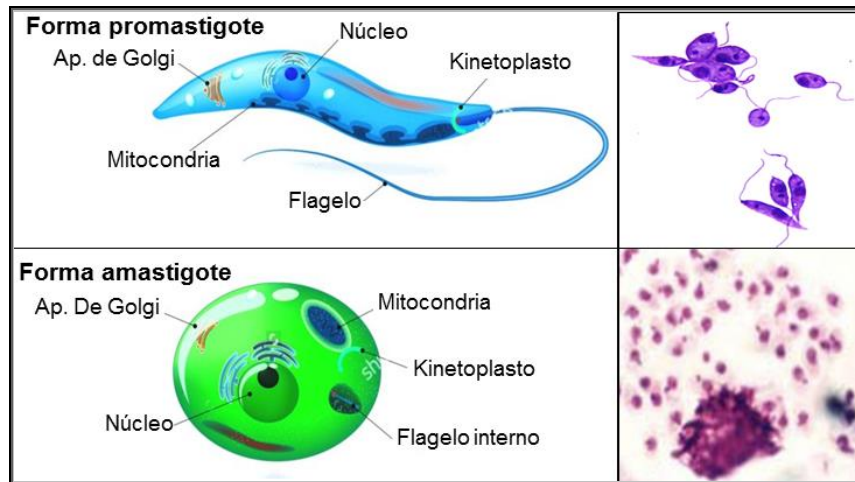
Los miembros del género *Leishmania* pertenecen a la familia *Trypanosomatidae* y es por ello que van a presentar una serie de características estructurales comunes con *T. cruzi*. Principalmente destaca la presencia de un flagelo, de diferente longitud y aspecto según la etapa del ciclo biológico, y una mitocondria de gran tamaño donde se encuentra el kinetoplasto, orgánulo característico de los miembros pertenecientes al orden *Kinetoplastida* y que tiene una estructura similar a la encontrada en *T. cruzi*, organizado en minicírculos y maxicírculos (**Figura 5**).

## 2.5. Morfología

El género *Leishmania* presenta dos formas evolutivas principales a lo largo de su ciclo vital, la forma amastigote y la forma promastigote (**Figura 26**).

- **Promastigote:** Tiene una morfología general fusiforme y mide entre 15 y 20  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de anchura. Posee un largo flagelo de unas 20  $\mu\text{m}$  de longitud que le permite tener una elevada movilidad. Existen dos formas promastigotes diferenciadas, el procíclico y el metacíclico. El promastigote procíclico apenas tiene capacidad infectiva y tras un proceso de diferenciación denominado metaciclogénesis da lugar a la forma infectiva metacíclica. En cuanto a su estructura celular, presenta un núcleo redondeado en la parte central y el kinetoplasto en la parte anterior del cuerpo.

- **Amastigote:** Tiene una morfología general redondeada y mide entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud. Presenta un gran núcleo central y el kinetoplasto se localiza en la parte anterior del cuerpo. No posee un flagelo externo, por lo que son formas no móviles. Es la forma replicativa del parásito en el interior de los macrófagos del hospedador vertebrado <sup>159</sup>.



**Figura 26.** Estadios de *Leishmania* spp

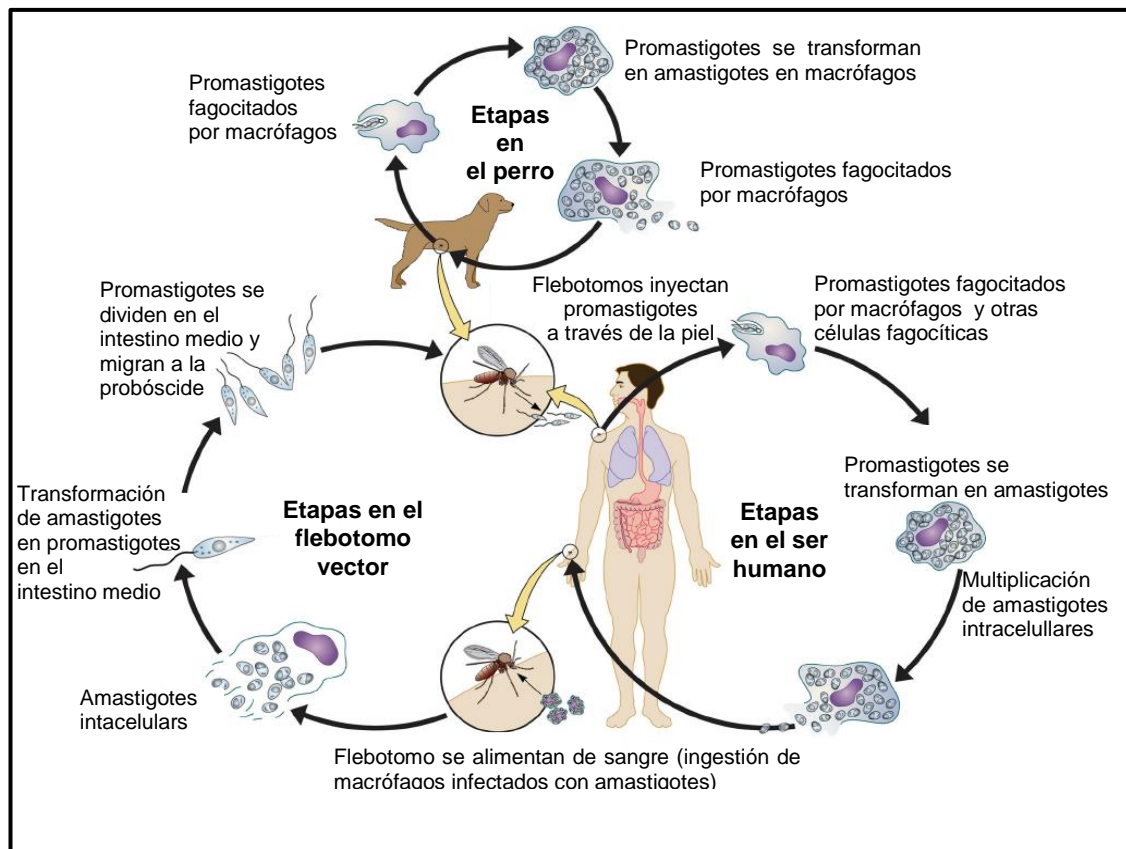
**Fuente:** Adaptado de <http://www.biologynoteshelp.com/leishmanialeishmaniasis/>  
<https://classconnection.s3.amazonaws.com/529/flashcards/1190529/png/leishman1334271853386.png>  
[http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2513/3\\_forma\\_cutanea\\_difusa.htm](http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2513/3_forma_cutanea_difusa.htm)

## 2.6. Ciclo de vida

Como se muestra en la **Figura 27**, *Leishmania* presenta un ciclo vital heteroxeno que consta de dos hospedadores, el insecto flebotomo hembra, que actúa como vector, y un mamífero, principalmente roedores, el perro y el hombre.

En el caso del ser humano, cuando un flebotomo hembra infectado se alimenta de sangre, inyecta a través de la picadura la forma promastigote metacíclica del parásito. Estos promastigotes son detectados y reconocidos por macrófagos y otras células del sistema fagocítico mononuclear y posteriormente fagocitados. En el interior de la vacuola parasitófora el promastigote evade la respuesta inmune innata del hospedador y se transforma en la forma amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en el interior de la vacuola parasitófora hasta que alcanzan una elevada densidad y rompen la célula liberándose al torrente sanguíneo. Estos amastigotes podrán dirigirse a otros tejidos, frecuentemente hígado, bazo y ganglios linfáticos, donde serán fagocitados por macrófagos y otras células fagocíticas. Los tejidos afectados y la forma clínica dependerán de la especie de *Leishmania*, de la interacción hospedador-parásito y de la respuesta inmune. Si un insecto flebotomo se alimenta de sangre de una persona infectada, podrá ingerir a su vez macrófagos infectados por la forma amastigote de *Leishmania*. En el intestino del insecto se liberan los amastigotes, los cuales se transforman en promastigotes procíclicos, se adhieren al intestino y se multiplican

activamente en el intestino medio. Los promastigotes procíclicos tras la metacicloogénesis migran finalmente a la probóscide del insecto, por donde a través de una picadura podrán volver a infectar a un hospedador vertebrado y continuar el ciclo <sup>158</sup>.



**Figura 27.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp.  
Fuente: Adaptado de Clinical Microbiology Reviews 2013; 26:58-85. <sup>158</sup>

## 2.7. Manifestaciones clínicas

La leishmaniasis presenta diferentes manifestaciones clínicas en función de una serie de factores, tanto parasitarios como humanos. Los principales factores de los que depende la forma clínica manifestada son la especie del parásito y sus características genéticas, ya que cada especie posee diferentes órganos diana preferenciales, y las características genéticas e inmunológicas de la persona infectada.

En función del lugar de replicación del parásito las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se clasifican en:

- **Leishmaniasis visceral o “kala-azar” (LV):** se trata de la forma más grave de leishmaniasis y sin un tratamiento adecuado puede ser mortal en unos meses. Afecta al sistema retículo endotelial y los principales síntomas son la aparición de espasmos, fiebre, una disminución importante de peso, esplenomegalia, hepatomegalia y anemia. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta forma de la enfermedad son la malnutrición y las malas



condiciones higiénicas. Los países más afectados por esta forma clínica son India, Bangladesh, Nepal, Sudan y Brasil <sup>149, 160</sup>.

- **Leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK):** esta forma de leishmaniasis aparece como una consecuencia poco frecuente de la LV y suele manifestarse entre 6 meses y varios años después de que los pacientes aparentemente ya estén curados. La manifestación principal es una erupción maculopapular en la cara, cerca de la boca, pero que puede extenderse a cualquier parte del cuerpo. Esta forma de la enfermedad se encuentra principalmente en zonas donde *L. donovani* es endémica, especialmente en Sudan, India y Bangladesh <sup>160, 161</sup>.
- **Leishmaniasis cutánea (LC):** en esta forma clínica, tras la picadura del flebotomo, se produce un periodo de incubación que oscila entre uno y tres meses, tras el cual, se forma una lesión papulosa de 0,5 a 10 cm de diámetro. Esta lesión va evolucionando con el tiempo apareciendo una costra y un borde escamoso de tono rojizo (**Figura 29**). La LC no pone en riesgo la vida del paciente pero si provoca serias alteraciones en su vida cotidiana. Se trata de la manifestación clínica de la leishmaniasis más extendida a nivel mundial, aunque prácticamente el 90 % de los casos se dan en 8 países: Brasil, Perú, Argelia, Siria, Irán, Arabia Saudí, Afganistán y Pakistán. Existen formas más graves de LC denominadas LC difusa y LC diseminada (LCD), las cuales, se caracterizan por el desarrollo de lesiones cutáneas por todo el cuerpo <sup>149, 160, 162</sup>.



**Figura 29.** Paciente con LMC

Fuente: <http://www.who.int/leishmaniasis/>



**Figura 29.** Úlcera de paciente con LC

Fuente: <https://commons.wikimedia.org/wiki/>

- **Leishmaniasis mucocutánea o “espundia” (LMC):** en las regiones tropicales amazónicas de Brasil, Bolivia y Perú principalmente, una lesión cutánea primaria puede evolucionar en un 15-50 % de los casos hacia esta forma clínica de la enfermedad. En estos casos se produce una importante destrucción de los cartílagos de la nariz y la mucosa bucal evolucionando hasta una destrucción de todos los tejidos adyacentes, dando lugar a una desfiguración del paciente (**Figura 28**) <sup>149, 160</sup>.

## 2.8. Tratamiento

La leishmaniasis, es una enfermedad curable si se diagnostica de forma precoz y eficaz y si se selecciona un tratamiento adecuado. Como se muestra en la **Tabla 9** el arsenal terapéutico disponible actualmente es más amplio que el disponible para la EC. En general, la eficacia que presentan los diferentes fármacos es bastante elevada, aunque depende en gran medida de la localización geográfica y de la especie de *Leishmania* ya que es muy común el desarrollo de resistencias en regiones endémicas. Sin embargo, como se muestra en la **Tabla 9**, los tratamientos empleados actualmente presentan una serie de importantes desventajas como son la toxicidad, los efectos adversos sobre los pacientes, los largos periodos de tratamiento, el elevado coste de los medicamentos y, en algunos casos, la vía de administración y la necesidad de monitorización hospitalaria. Por todo esto, la elección de un fármaco en concreto dependerá de diferentes factores entre los que destacan la forma clínica de la enfermedad, la región geográfica donde reside el paciente, la especie del parásito y el acceso al tratamiento que el paciente tenga. Además, la presencia de una inmunosupresión debida a enfermedades subyacentes como la infección por VIH complica el tratamiento ya que los pacientes sufren en mayor medida la toxicidad de los fármacos y las probabilidades de recaída y muerte son más altas <sup>160, 163-165</sup>.

Los principales tratamientos actualmente empleados frente a la leishmaniasis (**Tabla 9**) son fármacos de reposicionamiento que inicialmente fueron desarrollados frente a una patología y posteriormente se descubrió de manera experimental su actividad leishmanicida. Los fármacos actualmente utilizados son:

- Antimoniales pentavalentes: Destacan el antimonio de meglumina y el estibogluconato sódico. Comenzaron a utilizarse hace más de 50 años y se consideran todavía los fármacos de primera línea en las regiones donde no se han observado altas tasas de resistencia. En regiones resistentes como Bihar y Nepal muestran un elevado porcentaje de fracaso terapéutico además de provocar numerosos efectos secundarios <sup>166</sup>.
- Anfotericina B: Es un antibiótico macrólido poliénico que se utilizaba como antifúngico. La Anfotericina B ejerce su acción leishmanicida a través de su unión al ergosterol, principal esterol de membrana de hongos y kinetoplastidos. Esta unión provoca la desestabilización de la membrana y la muerte celular. El uso de este antibiótico está bastante generalizado aunque debido a que también muestra afinidad por el colesterol provoca efectos adversos, principalmente a nivel renal. Con el objetivo de reducir estos efectos adversos se desarrollaron las formulaciones lipídicas AmBisome®, Abelcet® y Amphocil®, las cuales mejoraron la biodisponibilidad del antibiótico <sup>167</sup>.

Tabla 9. Tratamiento farmacológico para los diferentes tipos de leishmaniasis

Fármaco	Tipo	Eficacia	Administración	Ventajas	Limitaciones	Coste
<b>Antimoniales pentavalentes:</b> -Estibogluconato sódico (Pentostam®) -Antimoniato de meglumina (Glucantime®)	LC LMC LV	35-95 % (depende de la región geográfica)	IV o IM	-Bajo precio -Se pueden combinar con Anfotericina B en ancianos y embarazadas	Complicaciones ventriculares en corazón y arritmias fatales. -Mialgia, pancreatitis y elevación de niveles de enzimas hepáticas. -Alta toxicidad en pacientes con HIV.	50-70 \$
<b>Anfotericina B (Fungizone®)</b>	LMC LV	>95 %	IM	Efectivo frente a parásitos resistentes a antimoniales pentavalentes	En forma deoxycolato requiere hospitalización, puede causar hipocalcemia, miocarditis, toxicidad renal y reacciones en el lugar de la administración.	≈100 \$
<b>Anfotericina B liposómica (AmBisome®), complejo lipídico (Abelcet®) y dispersión coloidal (Amphocil®)</b>	LMC LV	~95 %	IV	-No han aparecido resistencias. -Efectivo con perfil poco tóxico.	-Alto coste. -Toxicidad renal. -Necesita hospitalización y monitorización. -Fiebre y rigor durante la perfusión.	280 \$
<b>Miltefosina (Impavido®)</b>	LC LMC LV	94-97 %	VO	-Muy potente. -Primer tratamiento eficaz por VO para LV y LC	-Difícil seguimiento del tratamiento. -Elevada semivida de eliminación. -Alta toxicidad en hígado y riñones. -Complicaciones GI. -Teratogénico y abortivo. -Aparición de resistencias.	≈70 \$
<b>Sulfato de paromomicina (Paromomicina, Aminosidina o Humatin®)</b>	LC LV	-95 % en India; -46-85 % en África	LC: VT LV: IM	Bajo precio	-Ototoxicidad reversible. -Dolor en el sitio de inyección. -Alta hepatotoxicidad.	10 \$
<b>Pentamidina (Pentacarinat®)</b>	LMC LV	70-80 %	IM	Potencial uso en terapia combinada a baja dosis.	-Toxicidad renal. -Miocarditis. -Casos de DMID. -Hipoglucemia e hipotensión. -Fiebre.	≈100 \$
<b>Ketoconazol</b>	LC	-89 % sobre <i>L. mexicana</i> -76 % sobre <i>L. braziliensis</i>	VO	-Buena tolerabilidad. -Pocos RAM.	Alta variabilidad de resultados entre especies de <i>Leishmania</i> .	-
<b>Sitamaquina</b>	LV	89-100 %	VO	Buena tolerabilidad	-Glomerulonefritis -Vómitos y dolor abdominal - -Metahemoglobinemia	-
<b>Imiquimod</b>	LC	-	VT	-Activo combinado con antimoniales -Leves RAM.	-	-

- Miltefosina: Es un fosfolípido sintético que fue desarrollado como un antineoplásico. Se trata del primer fármaco aprobado por la FDA de administración por VO para el tratamiento de la leishmaniasis <sup>168</sup>.
- Paromomicina: Antibiótico de tipo aminoglucósido con actividad antibacteriana y que desde 2005 viene utilizándose para el tratamiento de la leishmaniasis <sup>169</sup>.
- Pentamidina: Fármaco de la clase de las diamidinas aromáticas de uso recomendado en caso de resistencia a antimoniales pentavalentes, principalmente en la India. Se emplea en terapias combinadas <sup>170</sup>.
- Ketoconazol: Pertenece al grupo de los azoles, antifúngicos orales inhibidores de la biosíntesis de ergosterol en hongos y conocidos por su buena actividad frente a *T. cruzi*. Se ha ensayado su eficacia frente a la LC donde se ha observado una clara relación entre la eficacia y la especie de *Leishmania* empleada. Ha demostrado ser eficaz en infecciones cutáneas causadas por *L. mexicana* <sup>171, 172</sup>.
- Sitamaquina: Químicamente es una aminoquinolina y se trata del primer fármaco desarrollado para tratar la LV y el segundo para administración por VO <sup>173</sup>.
- Imiquimod: Inmunofármaco que promueve la producción de citoquinas, lo cual induce la síntesis de óxido nítrico que promueve la destrucción del parásito. Se ha empleado en terapias combinadas con antimoniales y en forma de pomada frente a la LC <sup>174</sup>.

## 2.9. Tratamiento combinado de fármacos

Dada la necesidad de encontrar nuevos tratamientos eficaces y el lento desarrollo de nuevas entidades químicas activas, la OMS recomienda el uso de terapias combinadas para el tratamiento de la leishmaniasis. El uso de un tratamiento combinado de fármacos con diferente estructura química y diana terapéutica puede proporcionar importantes ventajas frente a la monoterapia. Una de las principales ventajas es la reducción de los periodos de tratamiento y de las dosis de fármaco empleadas. Este hecho es clave ya que permitiría reducir los efectos secundarios sobre los pacientes y facilitaría en gran medida el poder completar el periodo de tratamiento establecido reduciéndose así la aparición de resistencias. Las principales terapias combinadas identificadas y utilizadas en el tratamiento de la LV y la LC hasta el momento se muestran en la **Tabla 10** <sup>175-178</sup>. Dadas las importantes limitaciones que muestran los fármacos empleados en el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis es urgente la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Debido a todos los factores que se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un tratamiento eficaz

frente a la leishmaniasis diferentes expertos a nivel mundial, comandados por el DNDi, definieron el TPP para la LV y la LC que se muestra en la **Tabla 11** <sup>179</sup>.

**Tabla 10.** Terapia combinada para el tratamiento de la LV y LC

TERAPIA COMBINADA	
LV	LC
-Estibogluconato sódico/Paromomicina -Anfotericina B liposomal/Paromomicina -Anfotericina B liposomal/Miltefosina -Miltefosina/Paromomicina -Pentamidina/Alopurinol	-Paromomicina/Cloruro de metilbencetonio -Imiquimod/Antimoniato de meglumina

**Tabla 11.** Target Product Profile para la LV y la LC <sup>179</sup>

Criterios	LV		LC	
	Fármaco ideal	Fármaco aceptable	Fármaco ideal	Fármaco aceptable
Especie de <i>Leishmania</i>	Todas	<i>L. donovani</i>	Todas	<i>L. tropica</i> o <i>L. braziliensis</i>
Distribución	Todas las áreas	India o África	-	-
Eficacia	>95 %	>90 %	>95 %	60 % <i>L. tropica</i> 70 % <i>L. braziliensis</i>
Seguridad y tolerabilidad	Ninguna RAM que requiera seguimiento médico.	Una visita de supervisión médica a mitad o final de tratamiento.	Todas las RAM < grado 1 sin necesidad de seguimiento. Bien tolerado.	Sin RAM importantes, únicamente atención médica primaria. Bien tolerado en >95 % de los pacientes
Resistencia	Activo frente a cepas resistentes			
Vía de administración	VO o IM depot	VO o IM depot	VT o VO	No VP o bajas dosis si es VP
Plan de tratamiento	-VO: 1/día durante 10 días. -IM: 3 inyecciones en 10 días.	VO: 2/día durante <10 días. IM: >3 inyecciones durante 10 días.	-VT: 14 días -VO: <7 días	-VT: 28 días. VO: 2/día durante 28 días. -VP: 3 inyecciones
Tipo de paciente	Inmunocompetentes e inmunodeprimidos	Inmunocompetentes	Inmunocompetentes e inmunodeprimidos	Inmunocompetentes
Contraindicado en	Ninguna	Embarazo/lactancia	Ninguna	Embarazo/niños < 9 meses
Interacciones	Ninguna, compatible con terapias combinadas	Ninguna con terapias frente a malaria, TB o HIV	-	-
Estabilidad	3 años en zona climática 4	> 2 años en las condiciones de la región de destino	Estable a Tª ambiente y al menos 3 años a 37°C	2 años a 4-8°C
Coste	< 10 \$	< 80 \$	5 \$	50 \$

## 2.10. Ensayos clínicos frente a leishmaniasis

En la **Tabla 12** se describen algunos de los ensayos clínicos más recientes, iniciados a partir del 2013, mostrados por el Clinical Trials.gov y el DNDi, muchos de ellos todavía en desarrollo, que se están llevando a cabo con el objetivo de desarrollar nuevas moléculas activas y seguras, así como la mejora de las formulaciones de las ya existentes frente a las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis <sup>128, 180</sup>.

Tabla 12. Situación de los ensayos clínicos más recientes

Ensayo clínico	Fase	Tratamiento	Tipo	Descripción/Objetivo	Estado del estudio
Anfoleish (NCT01845727)	I/II	Anfotericina B tópica 3 %	LC	Determinar seguridad y estudiar eficacia de Anfotericina B 3% en crema en diferentes regímenes.	Estudio completado en 2016 pendiente de resultados
Nueva terapia combinada de termoterapia + Miltefosina (NCT02687971)	II	Miltefosina + termoterapia	LC	Ensayo de eficacia y seguridad de una terapia combinada de termoterapia local (50°C/30 segundos) y Miltefosina (2,5mg/kg/día) durante 21 días en Perú y Colombia	Se encuentra en fase de reclutamiento. Se prevé que el estudio finalice en 2018
Evaluación del 18-Metoxicoronaridina (NCT03084952)	II	18-Metoxicoronaridina	LC	Evaluar la eficacia, seguridad y tolerancia del 18-Metoxicoronaridina como candidato para tratar la LC en comparación con el Glucantime	Se encuentra en fase de reclutamiento
Anfotericina B liposomal tópica (NCT02656797)	II	Anfotericina B tópica 0,4 % gel liposomal	LC	Comparar los tratamientos con gel placebo y con gel de Anfotericina B liposomal frente a LC causada por las especies <i>L. major</i> y <i>L. tropica</i>	Ensayo pendiente de reclutar pacientes. Se prevé que el estudio finalice en 2020
Estudio comparativo del tratamiento con WR279,396 y con Paromomicina sola (NCT01790659)	III	WR279,396 (crema 15 % Paromomicina + 0,5 % Gentamicina)	LC	Estudiar eficacia y seguridad del tratamiento con WR279,396 crema tópica y con crema tópica de Paromomicina sola para tratar la LC en Panamá	Resultados disponibles <sup>128</sup>
Estudio del tratamiento con altas dosis de Fluconazol (NCT01953744)	III	Fluconazol VO	LC	Comparar la respuesta terapéutica al fluconazol y al Antimoniato de Meglumina en pacientes con LC (causada por <i>L. guyanensis</i> y <i>L. braziliensis</i> )	Resultados disponibles <sup>181</sup>
Estudio de eficacia de Anfotericina Liposomal en LCD (NCT02025491)	III	Anfotericina B liposomal	LCD	Estudio de eficacia de Anfotericina B liposomal administrada por VI (3-5mg/kg/día) durante 7-14 días	Resultados publicados <sup>162</sup>
Combinación de Miltefosina y Pentoxifilina para el tratamiento de la LMC (NCT02530697)	II	Miltefosina/Pentoxifilina	LMC	Estudiar eficacia y seguridad de la combinación de miltefosina y pentoxifilina en comparación con la combinación de antimoniato de meglumina y pentoxifilina	Ensayo en proceso de reclutamiento. Se prevé que finalice en 2018
Tratamiento con Fexinidazol (NCT01980199)	II	Fexinidazol	LV	Determinar la eficacia del fexinidazol por VO en pacientes de Sudán con LV	Estudio completado en 2015 pendiente de resultados
Estudio farmacocinético y seguridad de Miltefosina en niños (NCT02431143)	II	Miltefosina	LV	Evaluar la farmacocinética y seguridad del tratamiento con dosis alométrica de miltefosina en niños con LV en África oriental	Estudio completado en 2016 pendiente de resultados
Ensayo de eficacia de Ambisome, administrado solo y en combinación con Miltefosina (NCT02011958)	III	Anfotericina B liposomal y Miltefosina	VIH/LV	Identificar un tratamiento seguro y efectivo mediante la administración de Ambisome solo y en combinación con Miltefosina en pacientes Etiópes VIH positivos	Se prevé que finalice en 2017
Miltefosina para niños con PKDL (NCT02193022)	III	Miltefosina	PKDL	Seguridad y eficacia de Miltefosina en el tratamiento de adolescentes y niños con PKDL en Bangladesh	Se prevé que finalice en Junio de 2018

### 3. Referencias bibliográficas

1. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. <http://www.who.int/chagas/en/> (13.03.16).

2. WHO. Chagas Disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (06.06.16).
3. WHO. Statement – Chagas disease in Europe. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/integrated\\_media/integrated\\_media\\_chagas\\_statement/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_chagas_statement/en/) (04.06.16).
4. WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1> (06.06.16).
5. WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf) (06.06.16).
6. Steverding, D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors* **2014**, 7.
7. Coura, J. R.; Dias, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104 Suppl 1, 31-40.
8. Gourbiere, S.; Dorn, P.; Tripet, F.; Dumonteil, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* **2012**, 108, 190-202.
9. Villalba, R.; Fornes, G.; Alvarez, M. A.; Roman, J.; Rubio, V.; Fernandez, M.; Garcia, J. M.; Vinals, M.; Torres, A. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis* **1992**, 14, 594-5.
10. Cimo, P. L.; Luper, W. E.; Scouros, M. A. Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. *Tex Med* **1993**, 89, 48-50.
11. Leiby, D. A.; Lenes, B. A.; Tibbals, M. A.; Tames-Olmedo, M. T. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med* **1999**, 341, 1237-9.
12. Wendel, S. Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control? *Acta Trop* **2010**, 115, 28-34.
13. Schmunis, G. A.; Cruz, J. R. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev* **2005**, 18, 12-29.
14. Kirchhoff, L. V.; Paredes, P.; Lomeli-Guerrero, A.; Paredes-Espinoza, M.; Ron-Guerrero, C. S.; Delgado-Mejia, M.; Pena-Munoz, J. G. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion* **2006**, 46, 298-304.
15. Moscatelli, G.; Moroni, S.; Garcia-Bournissen, F.; Ballering, G.; Bisio, M.; Freilij, H.; Altcheh, J. Prevention of congenital Chagas through treatment of girls and women of childbearing age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2015**, 110, 507-9.
16. Carlier, Y.; Truyens, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop* **2015**, 151, 103-15.
17. Perez-Lopez, F. R.; Chedraui, P. Chagas disease in pregnancy: a non-endemic problem in a globalized world. *Arch Gynecol Obstet* **2010**, 282, 595-9.
18. Norman, F. F.; Lopez-Velez, R. Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis* **2013**, 19, 1561-6.
19. Ferreira, C. S.; Martinho, P. C.; Amato Neto, V.; Cruz, R. R. B. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **2001**, 43, 161-162.
20. Toso M, A.; Vial U, F.; Galanti, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile* **2011**, 139, 258-266.
21. Herwaldt, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* **2001**, 14, 659-88, table of contents.
22. Franco-Paredes, C.; Von, A.; Hidron, A.; Rodríguez-Morales, A. J.; Tellez, I.; Barragán, M.; Jones, D.; Náquira, C. G.; Mendez, J. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC International Health and Human Rights* **2007**, 7, 1-6.
23. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/chagas/en/> (08.06.16).
24. WHO. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf) (15.06.16).
25. WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. 2010. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf) (10.08.16).
26. Garzón Duque, M. Carga de la enfermedad. In *Revista CES Salud Pública*, 2012; Vol. 3, pp 289-295.

27. DNDi. American Trypanosomiasis. Chagas disease. [http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2009/10/DNDi\\_Chagas\\_Disease\\_Info\\_Card.pdf](http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2009/10/DNDi_Chagas_Disease_Info_Card.pdf) (15.05.16).
28. Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet* **2010**, 375, 1388-402.
29. Sosa-Estani, S.; Segura, E. L. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2015**, 110, 289-98.
30. Pinazo, M. J.; Gascon, J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop* **2015**, 151, 16-20.
31. ISGlobal. Instituto de Salud Global. Barcelona. <http://www.isglobal.org/es/enfermedad-de-chagas> (20.05.16).
32. Bern, C.; Montgomery, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* **2009**, 49, e52-4.
33. Pehrson, P. O.; Wahlgren, M.; Bengtsson, E. Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old child. *Scand J Infect Dis* **1981**, 13, 307-8.
34. Basile, L.; Jansa, J. M.; Carlier, Y.; Salamanca, D. D.; Angheben, A.; Bartoloni, A.; Seixas, J.; Van Gool, T.; Canavate, C.; Flores-Chavez, M.; Jackson, Y.; Chiodini, P. L.; Albajar-Vinas, P.; Working Group on Chagas, D. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill* **2011**, 16.
35. Eurosurveillance. Europe's journal on infectious disease epidemiology, prevention and control. Special edition: Chagas disease in Europe. <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/es/v14n01/v14n01.pdf> (12.06.16).
36. Schmunis, G. A.; Yadon, Z. E. Chagas disease: a Latin America health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* **2010**, 115.
37. Gascon, J.; Bern, C.; Pinazo, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* **2010**, 115, 22-7.
38. Munoz, J.; Gomez i Prat, J.; Gallego, M.; Gimeno, F.; Trevino, B.; Lopez-Chejade, P.; Ribera, O.; Molina, L.; Sanz, S.; Pinazo, M. J.; Riera, C.; Posada, E. J.; Sanz, G.; Portus, M.; Gascon, J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* **2009**, 111, 51-5.
39. Piron, M.; Verges, M.; Munoz, J.; Casamitjana, N.; Sanz, S.; Maymo, R. M.; Hernandez, J. M.; Puig, L.; Portus, M.; Gascon, J.; Sauleda, S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion* **2008**, 48, 1862-8.
40. Vinyeta, P. La enfermedad de Chagas en España. In *Ars Pharmaceutica*, 2009.
41. Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H.; de Souza, W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**, 6, e1749.
42. Moreno, S. N.; Docampo, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol* **2009**, 56, 208-13.
43. Docampo, R.; Moreno, S. N. J. The acidocalcisome. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, 114, 151-159.
44. Souza, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104 Suppl 1, 89-100.
45. De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* **2002**, 8, 269-85.
46. de Souza, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1999**, 94 Suppl 1, 17-36.
47. Souza, W. d. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, 104, 89-100.
48. Martinez Diaz, R. A. Variabilidad intraespecífica en *Trypanosoma cruzi* y ensayo de nuevos métodos para el cribado farmacológico. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 1996.
49. Torres Pastor, E. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina como potenciales agentes antichagásicos. Universidad de Navarra, Pamplona-Navarra, 2013.
50. Vargas Vasquez, F. R. Epidemiología molecular de la *Tripanosomiasis Americana (Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli)* en la región Norte y nororiental del Perú. Universidad de Granada, Granada, 2005.
51. Esch, K. J.; Petersen, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews* **2013**, 26, 58-85.



52. Tyler, K. M.; Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* **2001**, *31*, 472-81.
53. Castro, D. P.; Seabra, S. H.; Garcia, E. S.; de Souza, W.; Azambuja, P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol* **2007**, *117*, 201-7.
54. Tyler, K. M.; Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* **2001**, *31*, 472-481.
55. Yoshida, N.; Cortez, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem* **2008**, *47*, 82-91.
56. de Souza, W.; de Carvalho, T. M.; Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* **2010**, 2010.
57. Bern, C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 1882.
58. Pena, S. D.; Machado, C. R.; Macedo, A. M. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, *104* Suppl 1, 108-14.
59. Flint, J. E.; Schechter, M.; Chapman, M. D.; Miles, M. A. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1984**, *78*, 193-202.
60. Messenger, L. A.; Miles, M. A.; Bern, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2015**, *13*, 995-1029.
61. Tibayrenc, M.; Ayala, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* **1991**, *7*, 228-32.
62. Souto, R. P.; Fernandes, O.; Macedo, A. M.; Campbell, D. A.; Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **1996**, *83*, 141-52.
63. Kawashita, S. Y.; Sanson, G. F.; Fernandes, O.; Zingales, B.; Briones, M. R. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol* **2001**, *18*, 2250-9.
64. Tibayrenc, M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitol Today* **1998**, *14*, 323-9.
65. Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G.; Second Satellite, M. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 1051-4.
66. Brisse, S.; Barnabe, C.; Tibayrenc, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* **2000**, *30*, 35-44.
67. Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.; Sturm, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* **2012**, *12*, 240-253.
68. Ramirez, J. D.; Hernandez, C.; Montilla, M.; Zambrano, P.; Florez, A. C.; Parra, E.; Cucunuba, Z. M. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health* **2014**, *61*, 477-9.
69. Pinto, C. M.; Kalko, E. K.; Cottontail, I.; Wellinghausen, N.; Cottontail, V. M. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol* **2012**, *12*, 1328-32.
70. Guhl, F.; Ramirez, J. D. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect Genet Evol* **2013**, *20*, 148-54.
71. Tibayrenc, M.; Ward, P.; Moya, A.; Ayala, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 115-9.
72. Sturm, N. R.; Campbell, D. A. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* **2010**, *115*, 35-43.
73. Ramirez, J. D.; Guhl, F.; Rendon, L. M.; Rosas, F.; Marin-Neto, J. A.; Morillo, C. A. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4*, e899.

74. Lima, L.; Espinosa-Alvarez, O.; Ortiz, P. A.; Trejo-Varon, J. A.; Carranza, J. C.; Pinto, C. M.; Serrano, M. G.; Buck, G. A.; Camargo, E. P.; Teixeira, M. M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* **2015**, *151*, 166-77.
75. Tomasini, N.; Diosque, P. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 403-13.
76. Cominetti, M. C.; Csordas, B. G.; Cunha, R. C.; Andreotti, R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **2014**, *47*, 747-55.
77. Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.; Sturm, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* **2012**, *12*, 240-53.
78. Guhl, F.; Ramirez, J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop* **2011**, *119*, 1-4.
79. Franco, J.; Ferreira, R. C.; lenne, S.; Zingales, B. ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benzimidazole resistance: gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. *Infect Genet Evol* **2015**, *31*, 198-208.
80. Bontempi, I. A.; Bizai, M. L.; Ortiz, S.; Manattini, S.; Fabbro, D.; Solari, A.; Diez, C. Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. *Infection, Genetics and Evolution* **2016**, *43*, 123-129.
81. Buscaglia, C. A.; Campo, V. A.; Frasc, A. C.; Di Noia, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4*, 229-36.
82. Bern, C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis* **2012**, *25*, 450-7.
83. Lattes, R.; Lasala, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient. *Clin Microbiol Infect* **2014**, *20*, 300-9.
84. Dutra, W. O.; Menezes, C. A.; Villani, F. N.; da Costa, G. C.; da Silveira, A. B.; Reis, D.; Gollob, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, *104* Suppl 1, 208-18.
85. Kierszenbaum, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* **2005**, *21*, 513-6.
86. Hyland, K. V.; Engman, D. M. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol* **2006**, *22*, 101-2; author reply 103.
87. Dutra, W. O.; Gollob, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* **2008**, *21*, 287-92.
88. Bern, C.; Martin, D. L.; Gilman, R. H. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol* **2011**, *75*, 19-47.
89. Chin-Hong, P. V.; Schwartz, B. S.; Bern, C.; Montgomery, S. P.; Kontak, S.; Kubak, B.; Morris, M. I.; Nowicki, M.; Wright, C.; Ison, M. G. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. *Am J Transplant* **2011**, *11*, 672-80.
90. Schijman, A. G.; Bisio, M.; Orellana, L.; Sued, M.; Duffy, T.; Mejia Jaramillo, A. M.; Cura, C.; Auter, F.; Veron, V.; Qvarnstrom, Y.; Deborggraeve, S.; Hajar, G.; Zulantay, I.; Lucero, R. H.; Velazquez, E.; Tellez, T.; Sanchez Leon, Z.; Galvao, L.; Nolder, D.; Monje Rumi, M.; Levi, J. E.; Ramirez, J. D.; Zorrilla, P.; Flores, M.; Jercic, M. I.; Crisante, G.; Anez, N.; De Castro, A. M.; Gonzalez, C. I.; Acosta Viana, K.; Yachelini, P.; Torrico, F.; Robello, C.; Diosque, P.; Triana Chavez, O.; Aznar, C.; Russomando, G.; Buscher, P.; Assal, A.; Guhl, F.; Sosa Estani, S.; DaSilva, A.; Britto, C.; Luquetti, A.; Ladzins, J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**, *5*, e931.
91. Gomes, M. L.; Galvao, L. M.; Macedo, A. M.; Pena, S. D.; Chiari, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* **1999**, *60*, 205-10.
92. Estados Unidos aprueba el benzimidazol para el tratamiento de niños con la enfermedad de Chagas. <https://www.dndi.org/2017/media-centre/langues-press-releases/fda-approves-benzimidazole-chagas-children-es/> (09.10.17).

93. FDA. Aprobación del Benznidazol por la FDA. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/209570lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf) (06.11.17).
94. Urbina, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* **2010**, 115, 55-68.
95. Bern, C.; Montgomery, S. P.; Herwaldt, B. L.; Rassi, A., Jr.; Marin-Neto, J. A.; Dantas, R. O.; Maguire, J. H.; Acquatella, H.; Morillo, C.; Kirchhoff, L. V.; Gilman, R. H.; Reyes, P. A.; Salvatella, R.; Moore, A. C. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* **2007**, 298, 2171-81.
96. PMFarma. Comunidad Profesional del Sector Farmacéutico. Chemo trabaja en el registro para Latinoamérica y EEUU de tratamiento para el Chagas. <http://argentina.pmfarma.com/noticias/11980-chemo-trabaja-en-el-registro-para-latinoamerica-y-eeuu-de-tratamiento-para-el-chagas.html> (14.08.16).
97. DNDi. Chagas disease project. <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/> (01.09.17).
98. Bern, C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* **2015**, 373, 456-66.
99. CDC. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. Parásitos-Enfermedad de Chagas. Tratamiento antiparasitario. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html> (04.08.17).
100. Perez-Molina, J. A.; Perez-Ayala, A.; Moreno, S.; Fernandez-Gonzalez, M. C.; Zamora, J.; Lopez-Velez, R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **2009**, 64, 1139-47.
101. Tornheim, J. A.; Lozano Beltran, D. F.; Gilman, R. H.; Castellon, M.; Solano Mercado, M. A.; Sullca, W.; Torrico, F.; Bern, C. Improved completion rates and characterization of drug reactions with an intensive Chagas disease treatment program in rural Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, 7, e2407.
102. Jackson, Y.; Alirol, E.; Getaz, L.; Wolff, H.; Combesure, C.; Chappuis, F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis* **2010**, 51, e69-75.
103. Mejía-Jaramillo, A. M.; Fernández, G. J.; Montilla, M.; Nicholls, R. S.; Triana-Chávez, O. Sensibilidad al benznidazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *2012* **2012**, 32, 10.
104. DNDi. Chagas Disease target product profile. <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-target-product-profile/> (10.08.16).
105. Chatelain, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen* **2015**, 20, 22-35.
106. Ribeiro, I.; Sevcsik, A. M.; Alves, F.; Diap, G.; Don, R.; Harhay, M. O.; Chang, S.; Pecoul, B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, 3, e484.
107. El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frascch, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L. H.; Huang, Y. T.; Kindlund, E.; Ktingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarteton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **2005**, 309, 409-415.
108. García-Torres, I.; Pérez-Montfort, R. Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de los fármacos contra la enfermedad de chagas. *REB* **2011**, 30 (2), 68-81.
109. Beaulieu, C.; Isabel, E.; Fortier, A.; Massé, F.; Mellon, C.; Méthot, N.; Ndao, M.; Nicoll-Griffith, D.; Lee, D.; Park, H.; Black, W. C. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20, 7444-7449.
110. DNDi. K777 (Chagas). <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/k777/> (02.09.16).
111. Tomas, A. M.; Miles, M. A.; Kelly, J. M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem* **1997**, 244, 596-603.

112. Neres, J.; Brewer, M. L.; Ratier, L.; Botti, H.; Buschiazzi, A.; Edwards, P. N.; Mortenson, P. N.; Charlton, M. H.; Alzari, P. M.; Frasc, A. C.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase from in silico screening. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 589-96.
113. Neres, J.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov Today* **2008**, *13*, 110-7.
114. Kim, J. H.; Ryu, H. W.; Shim, J. H.; Park, K. H.; Withers, S. G. Development of new and selective *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors from sulfonamide chalcones and their derivatives. *Chembiochem* **2009**, *10*, 2475-9.
115. Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 311-318.
116. Olmo, F.; Escobedo-Orteg, J.; Palma, P.; Sanchez-Moreno, M.; Mejia-Jaramillo, A.; Triana, O.; Marin, C. Specific primers design based on the superoxide dismutase b gene for *Trypanosoma cruzi* as a screening tool: Validation method using strains from Colombia classified according to their discrete typing unit. *Asian Pac J Trop Med* **2014**, *7*, 854-9.
117. Olmo, F.; Urbanova, K.; Rosales, M. J.; Martin-Escolano, R.; Sanchez-Moreno, M.; Marin, C. An in vitro iron superoxide dismutase inhibitor decreases the parasitemia levels of *Trypanosoma cruzi* in BALB/c mouse model during acute phase. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2015**, *5*, 110-6.
118. Miller, A. F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* **2012**, *586*, 585-95.
119. Maccari, G.; Jaeger, T.; Moraca, F.; Biava, M.; Flohe, L.; Botta, M. A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21*, 5255-8.
120. Manta, B.; Comini, M.; Medeiros, A.; Hugo, M.; Trujillo, M.; Radi, R. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1830*, 3199-216.
121. Couto, M.; Sanchez, C.; Davila, B.; Machin, V.; Varela, J.; Alvarez, G.; Cabrera, M.; Celano, L.; Aguirre-Lopez, B.; Cabrera, N.; de Gomez-Puyou, M. T.; Gomez-Puyou, A.; Perez-Montfort, R.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M. 3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-*Trypanosoma cruzi* Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies. *Molecules* **2015**, *20*, 14595-610.
122. Michels, P. A.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1763*, 1463-77.
123. Tielens, A. G. M.; van Hellemond, J. J. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends in Parasitology* **2009**, *25*, 482-490.
124. Bringaud, F.; Riviere, L.; Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* **2006**, *149*, 1-9.
125. Garzoni, L. R.; Caldera, A.; Meirelles Mde, N.; de Castro, S. L.; Docampo, R.; Meints, G. A.; Oldfield, E.; Urbina, J. A. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* **2004**, *23*, 273-85.
126. Bouzahzah, B.; Jelicks, L. A.; Morris, S. A.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B. Risedronate in the treatment of Murine Chagas' disease. *Parasitol Res* **2005**, *96*, 184-7.
127. Urbina, J. Nuevas drogas para el tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas. <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md5/md508/urbina.htm> (24.09.16).
128. ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health. <https://clinicaltrials.gov/> (08.10.17).
129. DNDi. Paediatric dosage form of Benznidazole (Chagas). <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/paediatric-benznidazole/> (04.10.17).
130. Molina, I.; Gomez i Prat, J.; Salvador, F.; Trevino, B.; Sulleiro, E.; Serre, N.; Pou, D.; Roure, S.; Cabezoz, J.; Valerio, L.; Blanco-Grau, A.; Sanchez-Montalva, A.; Vidal, X.; Pahissa, A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 1899-908.
131. Morillo, C. A.; Waskin, H.; Sosa-Estani, S.; Del Carmen Bangher, M.; Cuneo, C.; Milesi, R.; Mallagray, M.; Apt, W.; Beloscar, J.; Gascon, J.; Molina, I.; Echeverria, L. E.; Colombo, H.; Perez-Molina, J. A.; Wyss, F.; Meeks, B.; Bonilla, L. R.; Gao, P.; Wei, B.; McCarthy, M.; Yusuf, S.; Investigators, S.-C. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol* **2017**, *69*, 939-947.

132. Sales Junior, P. A.; Molina, I.; Fonseca Murta, S. M.; Sanchez-Montalva, A.; Salvador, F.; de Oliveira, R. C.; Carneiro, C. M. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg* **2017**.
133. DNDi. Azoles E1224. <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/azoles-e1224/> (28.09.16).
134. Population Health Research Institute. Health through knowledge. <http://www.phri.ca/> (12.09.16).
135. Morillo, C. A.; Marin-Neto, J. A.; Avezum, A.; Sosa-Estani, S.; Rassi, A., Jr.; Rosas, F.; Villena, E.; Quiroz, R.; Bonilla, R.; Britto, C.; Guhl, F.; Velazquez, E.; Bonilla, L.; Meeks, B.; Rao-Melacini, P.; Pogue, J.; Mattos, A.; Lazdins, J.; Rassi, A.; Connolly, S. J.; Yusuf, S.; Investigators, B. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* **2015**, 373, 1295-306.
136. Marin-Neto, J. A.; Rassi, A., Jr.; Morillo, C. A.; Avezum, A.; Connolly, S. J.; Sosa-Estani, S.; Rosas, F.; Yusuf, S.; Investigators, B. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* **2008**, 156, 37-43.
137. Marin-Neto, J. A.; Rassi, A.; Avezum, A.; Mattos, A. C.; Rassi, A.; Morillo, C. A.; Sosa-Estani, S.; Yusuf, S.; Investigators, B. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease (vol 104, Suppl 1, pg 319, 2009). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, 104.
138. INP. Instituto Nacional de Parasitología. INP-Dr. Mario Fatała Chaben. Ministerio de Salud. Presidencia de la República. <http://www.anlis.gov.ar/inp/> (12.08.16).
139. Urbina, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol* **2015**, 62, 149-56.
140. Altcheh, J.; Moscatelli, G.; Mastrantonio, G.; Moroni, S.; Giglio, N.; Marson, M. E.; Ballering, G.; Bisio, M.; Koren, G.; Garcia-Bournissen, F. Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, 8, e2907.
141. Soy, D.; Aldasoro, E.; Guerrero, L.; Posada, E.; Serret, N.; Mejia, T.; Urbina, J. A.; Gascon, J. Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, 59, 3342-9.
142. Cordis. Servicio de Información Comunitario sobre investigación y desarrollo. Berenice Informe resumido. [http://cordis.europa.eu/result/rcn/153473\\_es.html](http://cordis.europa.eu/result/rcn/153473_es.html) (02.10.17).
143. Proyecto BERENICE. [www.berenice-project.eu](http://www.berenice-project.eu) (02.10.17).
144. DNDi. Fexinidazoles (Chagas). <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/> (06.10.17).
145. Gascon, J.; Vilasanjuan, R.; Lucas, A. The need for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2014**, 12, 393-5.
146. Chatelain, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J* **2017**, 15, 98-103.
147. Chatelain, E.; Konar, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Devel Ther* **2015**, 9, 4807-23.
148. Pinazo, M. J.; Thomas, M. C.; Bustamante, J.; Almeida, I. C.; Lopez, M. C.; Gascon, J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2015**, 110, 422-32.
149. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010, WHO Technical Report Series 949. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf) (08.10.16).
150. Dey, A.; Singh, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol* **2006**, 24, 165-70.
151. WHO. Leishmaniasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (08.12.16).
152. Suarez Rodriguez, B.; Isidoro Fernandez, B.; Santos Sanz, S.; Sierra Moros, M. J.; Molina Moreno, R.; Astray Mochales, J.; Amela Heras, C. [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Rev Esp Salud Publica* **2012**, 86, 555-64.
153. Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votycka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, 10, e0004349.
154. Herrador, Z.; Gherasim, A.; Jimenez, B. C.; Granados, M.; San Martin, J. V.; Aparicio, P. Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997-

- 2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, 9, e0003594.
155. Gramiccia, M.; Gradoni, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* **2005**, 35, 1169-80.
156. Dawit, G.; Girma, Z.; Simenew, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology & Parasitology* **2013**, 4, 1-7.
157. Shaw, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1994**, 89, 471-8.
158. Esch, K. J.; Petersen, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev* **2013**, 26, 58-85.
159. Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Rodrigues, J. C.; Crepaldi, P. H.; Pimenta, P. F.; de Souza, W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog* **2013**, 9, e1003594.
160. OPS. Leishmaniasis en las Américas: Recomendaciones para el tratamiento. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22226&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&Itemid=270) (10.12.16).
161. Zijlstra, E. E.; Musa, A. M.; Khalil, E. A.; el-Hassan, I. M.; el-Hassan, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **2003**, 3, 87-98.
162. Machado, P. R.; Rosa, M. E.; Guimaraes, L. H.; Prates, F. V.; Queiroz, A.; Schriefer, A.; Carvalho, E. M. Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis* **2015**, 61, 945-9.
163. Croft, S. L.; Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect* **2011**, 17, 1478-83.
164. Hunter, W. N.; Alphey, M. S.; Bond, C. S.; Schuttelkopf, A. W. Targeting metabolic pathways in microbial pathogens: oxidative stress and anti-folate drug resistance in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans* **2003**, 31, 607-10.
165. Sundar, S.; Chatterjee, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **2006**, 123, 345-52.
166. Roberts, W. L.; McMurray, W. J.; Rainey, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 1076-82.
167. Bern, C.; Adler-Moore, J.; Berenguer, J.; Boelaert, M.; den Boer, M.; Davidson, R. N.; Figueras, C.; Gradoni, L.; Kafetzis, D. A.; Ritmeijer, K.; Rosenthal, E.; Royce, C.; Russo, R.; Sundar, S.; Alvar, J. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **2006**, 43, 917-24.
168. Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **2007**, 5, 873-82.
169. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* **2007**, 356, 2571-81.
170. Ouellette, M.; Drummel-Smith, J.; Papadopolou, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **2004**, 7, 257-66.
171. Saenz, R. E.; Paz, H.; Berman, J. D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* **1990**, 89, 147-55.
172. Navin, T. R.; Arana, B. A.; Arana, F. E.; Berman, J. D.; Chajon, J. F. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* **1992**, 165, 528-34.
173. Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg* **2005**, 73, 1005-11.
174. van Seters, M.; van Beurden, M.; ten Kate, F. J.; Beckmann, I.; Ewing, P. C.; Eijkemans, M. J.; Kagie, M. J.; Meijer, C. J.; Aaronson, N. K.; Kleinjan, A.; Heijmans-Antonissen, C.; Zijlstra, F. J.; Burger, M. P.; Helmerhorst, T. J. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. *N Engl J Med* **2008**, 358, 1465-73.
175. Sundar, S.; Sinha, P. K.; Rai, M.; Verma, D. K.; Nawin, K.; Alam, S.; Chakravarty, J.; Vaillant, M.; Verma, N.; Pandey, K.; Kumari, P.; Lal, C. S.; Arora, R.; Sharma, B.; Ellis, S.; Strub-Wourgaft, N.; Balasegaram, M.; Olliaro, P.; Das, P.; Modabber, F. Comparison of short-course multidrug

- treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* **2011**, 377, 477-86.
176. van Griensven, J.; Balasegaram, M.; Meheus, F.; Alvar, J.; Lynen, L.; Boelaert, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **2010**, 10, 184-94.
177. El-Sayed, M.; Anwar, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2010**, 24, 335-40.
178. Al-Mutairi, N.; Alshiltawy, M.; El Khalawany, M.; Joshi, A.; Eassa, B. I.; Manchanda, Y.; Gomaa, S.; Darwish, I.; Rijhwani, M. Tropical medicine rounds: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapson, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. *Int J Dermatol* **2009**, 48, 862-9.
179. DNDi. Target product profile. Target Product Profile for Visceral Leishmaniasis. Target Product Profile for Cutaneous Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/leish-target-product-profile/> (04.12.16).
180. DNDi. DNDi Clinical trials. Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/2016/clinical-trials/clinical-trials-leish/> (10.10.16).
181. Prates, F. V.; Dourado, M. E.; Silva, S. C.; Schriefer, A.; Guimaraes, L. H.; Brito, M. D.; Almeida, J.; Carvalho, E. M.; Machado, P. R. Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis* **2017**, 64, 67-71.





## **ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**



Han transcurrido más de 100 años desde la descripción de la EC y de la leishmaniasis y todavía no se dispone de un tratamiento completamente eficaz. En ambas enfermedades los fármacos comercializados presentan importantes limitaciones que incluyen la alta variabilidad en el grado de eficacia, los efectos adversos, la aparición de cepas resistentes, el alto coste y la complicada dosificación <sup>1</sup>. Estos inconvenientes ponen de manifiesto la urgente necesidad de obtener nuevas moléculas activas frente a estos tripanosomátidos que mejoren la eficacia y seguridad de los tratamientos actualmente empleados.

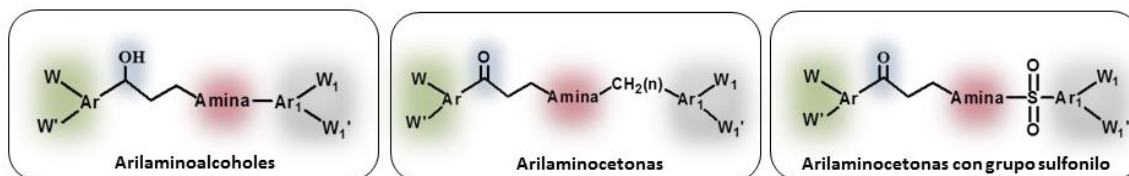
En los últimos años, la estrategia de reposicionamiento de fármacos se ha convertido en una herramienta muy empleada en la búsqueda y desarrollo de nuevos tratamientos. Esta estrategia consiste en encontrar un nuevo uso terapéutico a moléculas con una actividad biológica conocida. Este procedimiento permite reducir el tiempo y el coste del desarrollo de medicamentos con respecto al proceso tradicional de descubrimiento de fármacos, que puede durar muchos años y tener un coste inasumible en el marco de las ETDs. Esta estrategia ha ofrecido buenos resultados y como se muestra en la **Tabla 13** ha permitido identificar moléculas con buena actividad frente a tripanosomátidos <sup>2-4</sup>.

**Tabla 13.** Fármacos con actividad leishmanicida y tripanocida identificados mediante reposicionamiento

Fármaco	Indicación inicial	Nuevo uso terapéutico	Fármaco	Indicación inicial	Nuevo uso terapéutico
Miltefosina	Cáncer de pulmón <sup>5</sup>	LV <sup>6</sup>	Itraconazol	Antifúngico	EC <sup>2</sup>
Anfotericina B	Antifúngico <sup>7</sup>	LV <sup>8</sup>	Ketoconazol	Antifúngico	EC y LC <sup>2,9</sup>
Paromomicina	Antibiótico amebicida	LV y LC <sup>10</sup>	Clotrimazol	Antifúngico	EC <sup>2</sup>

En este sentido, nuestro grupo de investigación lleva más de una década trabajando en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica frente a diferentes patologías. Como parte del proyecto de desarrollo de nuevos compuestos frente a tripanosomátidos y aplicando la estrategia de reposicionamiento de moléculas se evaluaron 29 derivados pertenecientes a la librería de compuestos del grupo frente a epimastigotes de la cepa Tulahuen 2 de *T. Cruzi* de <sup>11-15</sup>. Esta evaluación se llevó a cabo en colaboración con el Grupo de Química Médica de la Universidad de la República de Uruguay y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 14** (resultados no publicados). Los compuestos presentaban como núcleo central de su estructura una arilaminocetona o un arilaminoalcohol (**Figura 30**). La selección de este tipo de esqueleto químico se basó en la importancia de las bases de Mannich como farmacóforos con un elevado potencial en el campo de la química médica y su amplio espectro de actividades biológicas <sup>16, 17</sup>. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía de moléculas derivadas de bases de Mannich con actividad anti-inflamatoria <sup>18</sup>, anticancerosa <sup>19, 20</sup>, antibacteriana <sup>21</sup>, antifúngica <sup>22</sup>,

antituberculosa <sup>23</sup> y antimalárica <sup>24</sup>. Además, se han descrito bases de Mannich con actividad biológica frente a cepas multiresistentes de *T. brucei* <sup>25</sup> así como con actividad inhibitoria frente a TRasa de *T. cruzi* <sup>26</sup>. Los compuestos de tipo arilaminocetona y arilaminoalcohol seleccionados incluían una elevada variabilidad estructural en cuanto a la naturaleza de la amina, sistemas aromáticos (Ar y Ar<sub>1</sub>) y tipo de sustituyentes introducidos sobre estos anillos (W/W' y/o W<sub>1</sub>/W<sub>1</sub>').



**Figura 30.** Estructura general de los derivados de bases de Mannich evaluados

Por la experiencia previa del grupo se sabía que los derivados del tipo arilaminoalcohol presentaban una buena actividad biológica frente al protozoo parásito *Plasmodium falciparum* <sup>15</sup>. Este conocimiento llevó al grupo a considerar este tipo de estructuras y a sus precursores arilaminocetonas como moléculas prometedoras frente a protozoos parásitos como *T. cruzi* y *Leishmania*. Además, entre los derivados seleccionados se incluyeron compuestos que poseían un grupo sulfonilo (**Figura 30**). La presencia del grupo sulfonilo es frecuente en nuevos derivados activos frente a kinetoplastidos, fundamentalmente formando parte de sulfonamidas. Entre estos derivados destacan los inhibidores de cistein proteasas <sup>27-29</sup>.

Como se puede ver en la **Tabla 14**, los compuestos presentaban diferentes tipos de anillos aromáticos de interés en química médica en la posición Ar, tales como benzo[*b*]tiofeno, benceno o naftaleno. El sistema del anillo de benzo[*b*]tiofeno ha sido reconocido desde hace años como una estructura óptima para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas. Diferentes derivados de benzo[*b*]tiofeno han mostrado actividad antiinflamatoria, analgésica y antibacteriana <sup>30, 31</sup>. Además, se ha publicado el potencial uso de los derivados de benzo[*b*]tiofeno en la búsqueda de nuevos agentes antikinetooplástidos, encontrándose derivados con buena actividad antileishmania <sup>32</sup> y con actividad inhibitoria frente a TRasa de *T. brucei* <sup>33</sup>. Por otro lado, la actividad frente a *Leishmania* de diferentes derivados conteniendo el anillo de naftaleno ha sido descrita en la bibliografía por lo que se consideró una estructura interesante en el desarrollo de nuevos derivados antitripanosomátidos <sup>34, 35</sup>.

Los compuestos seleccionados mostraban en posición Ar<sub>1</sub> un sistema aromático o un sistema heterocíclico alifático. Como anillo aromático los derivados presentaban naftaleno o benceno con o sin espaciador alifático. El heterocíclico alifático presente en 2 de los compuestos evaluados era la morfolina (**Tabla 14**). La presencia de este heterocíclico en los derivados seleccionados se consideró interesante debido a los buenos resultados de actividad biológica

mostrados por derivados de morfolina frente a tripanosomátidos y que han sido publicados tanto por nuestro grupo de trabajo como por otros investigadores<sup>36,37</sup>.

En cuanto a los sustituyentes ( $W$ ,  $W'$ ,  $W_1$  y  $W_1'$ ) unidos a los sistemas aromáticos ( $Ar$  y  $Ar_1$ ) respectivamente se incluyeron sustituyentes tanto con carácter electroatrayente ( $F$ ,  $Cl$ ,  $CF_3$ ,  $NO_2$  y  $CN$ ) como electrodonante ( $OCH_3$ ) (**Tabla 14**).

Como se ha comentado, los compuestos seleccionados presentaban además variabilidad en cuanto al tipo de amina presente en la estructura (**Tabla 14**). Todos ellos incluían aminas alifáticas cíclicas (piperazina, homopiperazina, piperidina, 4-aminopiperidina o 3-aminopirrolidina) ampliamente utilizadas en moléculas biológicamente activas habiendo sido publicados varios ejemplos de agentes anti-tripanosomátidos<sup>38-41</sup>. De hecho, fármacos antifúngicos como el ketoconazol, itraconazol y pozaconazol que han mostrado buena actividad frente a kinetoplástidos presentan anillos de piperazina en su estructura<sup>9, 42-44</sup>.

Como se puede ver en la **Tabla 14**, dieciocho de los veintinueve compuestos evaluados frente a la cepa *Tulahuen 2 de T. cruzi* mostraron un valor de  $Cl_{50}$  menor o igual al fármaco de referencia Nfx ( $Cl_{50} = 7,7 \mu M$ ). Con los resultados obtenidos se llevó a cabo un estudio de relación estructura-actividad (SAR) (**Figura 31**), en el cual se obtuvieron las siguientes conclusiones:

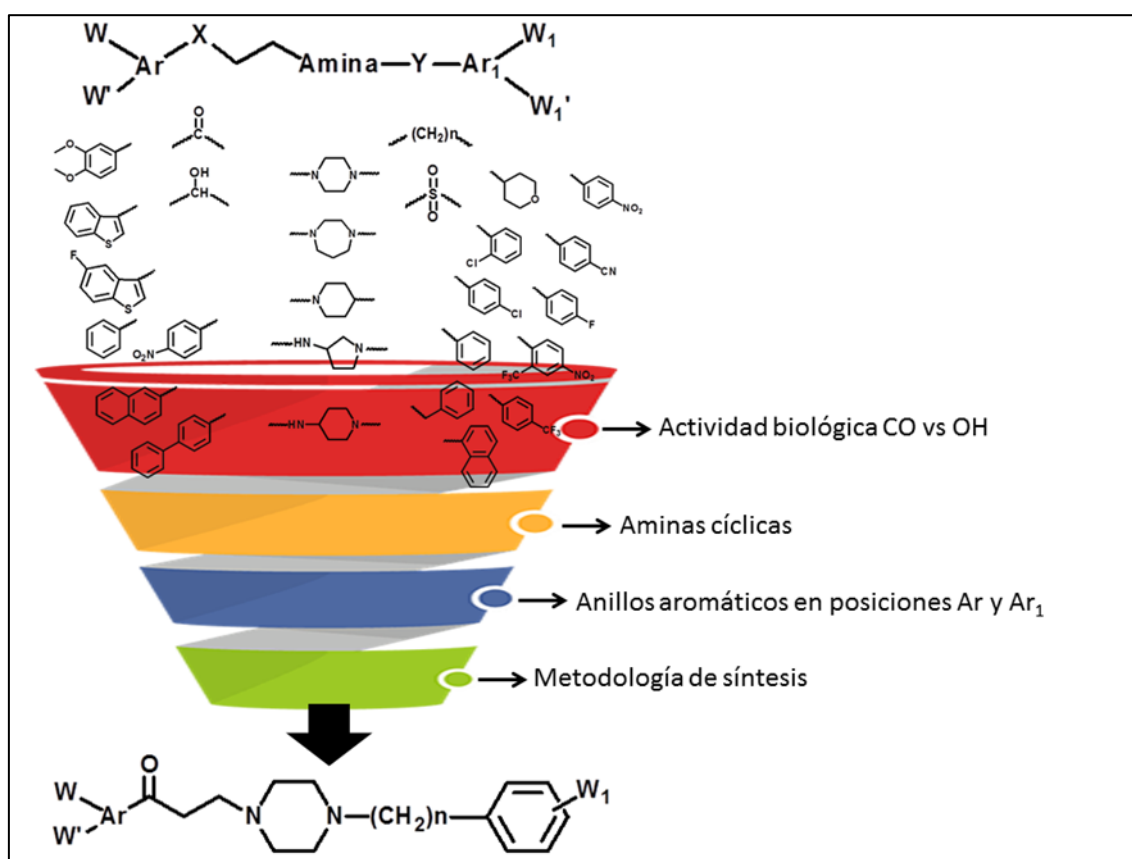
- Los arilaminoalcoholes que habían mostrado una elevada actividad frente a *Plasmodium falciparum*<sup>15</sup>, mostraron una actividad biológica claramente inferior frente a *T. cruzi* en comparación con las arilaminocetonas. Debido a estos resultados se decidió descartar los derivados de arilaminoalcohol para el diseño de nuevos derivados anti-kinetoplástidos.
- En cuanto a las aminas, se encontró que los derivados evaluados que contenían homopiperazina, piperazina y aminopirrolidina fueron los más activos. Además, en otros estudios que estaba realizando el grupo se detectó que algunos derivados que contenían en su estructura una amina cíclica unida a una amina alifática parecían mostrar mayor toxicidad *in vivo* (datos no publicados). Esta aparente toxicidad nos llevó a descartar la síntesis de nuevos derivados que contuviesen una aminopirrolidina en su estructura.
- En lo que respecta a los sistemas aromáticos en posición  $Ar$ , se observó que compuestos que contenían anillos de benzo[b]tiofeno, benceno y naftaleno mostraron buenos resultados de actividad *in vitro*. Estos datos indicaban que esta posición permitía una mayor flexibilidad a la hora de introducir diferentes anillos aromáticos tanto bicíclicos como monocíclicos.
- Los compuestos más activos presentaban en posición  $Ar_1$  un anillo de benceno mono o disustituido ( $W_1$  y/o  $W_1'$ ) con grupos electroatrayentes como  $F$ ,  $Cl$ ,  $CF_3$ ,  $NO_2$ .

**Tabla 14.** Compuestos evaluados frente a epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2

Compuesto	Cl <sub>50</sub> (μM)	Compuesto	Cl <sub>50</sub> (μM)
	7,1		5,8
	5,7		10,0
	5,2		20,4
	5,0		5,0
	13,3		>25,0
	8,5		7,7
	7,2		6,1
	6,4		9,0
	16,6		20,0
	17,5		6,1
	6,7		7,3
	9,6		6,4
	5,6		2,2
	5,4		10,7
	2,7	<b>Nifurtimox</b>	7,7

Cl<sub>50</sub>: Concentración que inhibe el 50 % del crecimiento del parásito.

Además del estudio SAR se llevó a cabo un estudio desde el punto de vista de la metodología sintética (**Figura 31**). Considerando que en el proceso de descubrimiento de fármacos frente a las ETDs es importante que las nuevas moléculas se obtengan por rutas de síntesis sencillas y de bajo coste se tuvo en cuenta la disponibilidad y el coste de los reactivos de partida así como la sencillez de la ruta de síntesis para la obtención de una elevada variabilidad de compuestos. Este estudio nos llevó a descartar arilaminocetonas con grupo sulfonilo como posibles líderes para futuras series ya que su obtención requiere de un proceso sintético y de purificación complejos lo cual influye en la disminución del rendimiento. En cuanto a las aminas se decidió mantener constante la piperazina en lugar de la homopiperazina debido a su alta variabilidad y disponibilidad comercial. Por lo tanto, como resultado del estudio SAR y del análisis desde el punto de vista de la metodología sintética se llegó a establecer la estructura general para el diseño de las series que se presentan en esta memoria, la cual, se muestra en la **Figura 31**.



**Figura 31.** Proceso de diseño para la obtención de la estructura general de las bases de Mannich de tipo arilaminocetona propuestas como nuevos agentes tripanocidas y leishmanicidas

### Referencias bibliográficas

1. Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet* **2010**, 375, 1388-1402.
2. Kaiser, M.; Maser, P.; Tadoori, L. P.; Ioset, J. R.; Brun, R. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLoS One* **2015**, 10, e0135556.

3. Andrews, K. T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2014**, *4*, 95-111.
4. Charlton, R. L.; Rossi-Bergmann, B.; Denny, P. W.; Steel, P. G. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology* **2017**, 1-18.
5. Smorenburg, C. H.; Seynaeve, C.; Bontenbal, M.; Planting, A. S.; Sindermann, H.; Verweij, J. Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs* **2000**, *11*, 825-8.
6. Dorlo, T. P.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de Vries, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **2012**, *67*, 2576-97.
7. Ostrosky-Zeichner, L.; Marr, K. A.; Rex, J. H.; Cohen, S. H. Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin Infect Dis* **2003**, *37*, 415-25.
8. Bern, C.; Adler-Moore, J.; Berenguer, J.; Boelaert, M.; den Boer, M.; Davidson, R. N.; Figueras, C.; Gradoni, L.; Kafetzis, D. A.; Ritmeijer, K.; Rosenthal, E.; Royce, C.; Russo, R.; Sundar, S.; Alvar, J. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **2006**, *43*, 917-24.
9. Saenz, R. E.; Paz, H.; Berman, J. D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* **1990**, *89*, 147-55.
10. Ben Salah, A.; Ben Messaoud, N.; Guedri, E.; Zaatour, A.; Ben Alaya, N.; Bettaieb, J.; Gharbi, A.; Belhadj Hamida, N.; Boukthir, A.; Chlif, S.; Abdelhamid, K.; El Ahmadi, Z.; Louzir, H.; Mokni, M.; Morizot, G.; Buffet, P.; Smith, P. L.; Kopydlowski, K. M.; Kreishman-Deitrick, M.; Smith, K. S.; Nielsen, C. J.; Ullman, D. R.; Norwood, J. A.; Thorne, G. D.; McCarthy, W. F.; Adams, R. C.; Rice, R. M.; Tang, D.; Berman, J.; Ransom, J.; Magill, A. J.; Grogl, M. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 524-32.
11. Oficialdegui, A. M.; Martinez, J.; Perez, S.; Heras, B.; Irurzun, M.; Palop, J. A.; Tordera, R.; Lasheras, B.; del Rio, J.; Monge, A. Design, synthesis and biological evaluation of new 3-[(4-aryl)piperazin-1-yl]-1-arylpropane derivatives as potential antidepressants with a dual mode of action: serotonin reuptake inhibition and 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonism. *Farmaco* **2000**, *55*, 345-53.
12. Martinez-Esparza, J.; Oficialdegui, A. M.; Perez-Silanes, S.; Heras, B.; Orus, L.; Palop, J. A.; Lasheras, B.; Roca, J.; Mourelle, M.; Bosch, A.; Del Castillo, J. C.; Tordera, R.; Del Rio, J.; Monge, A. New 1-aryl-3-(4-aryl)piperazin-1-yl)propane derivatives, with dual action at 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptors and serotonin transporter, as a new class of antidepressants. *J Med Chem* **2001**, *44*, 418-28.
13. Perez-Silanes, S.; Berrade, L.; Garcia-Sanchez, R. N.; Mendoza, A.; Galiano, S.; Perez-Solorzano, B. M.; Nogal-Ruiz, J. J.; Martinez-Fernandez, A. R.; Aldana, I.; Monge, A. New 1-aryl-3-substituted propanol derivatives as antimalarial agents. *Molecules* **2009**, *14*, 4120-35.
14. Berrade, L.; Aisa, B.; Ramirez, M. J.; Galiano, S.; Guccione, S.; Moltzau, L. R.; Levy, F. O.; Nicoletti, F.; Battaglia, G.; Molinaro, G.; Aldana, I.; Monge, A.; Perez-Silanes, S. Novel benzo[b]thiophene derivatives as new potential antidepressants with rapid onset of action. *J Med Chem* **2011**, *54*, 3086-90.
15. Mendoza, A.; Perez-Silanes, S.; Quiliano, M.; Pabon, A.; Galiano, S.; Gonzalez, G.; Garavito, G.; Zimic, M.; Vaisberg, A.; Aldana, I.; Monge, A.; Deharo, E. Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure-activity relationships. *Exp Parasitol* **2011**, *128*, 97-103.
16. Bala, S.; Sharma, N.; Kajal, A.; Kamboj, S.; Saini, V. Mannich bases: an important pharmacophore in present scenario. *Int J Med Chem* **2014**, *2014*, 191072.
17. Roman, G. Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. *Eur J Med Chem* **2015**, *89*, 743-816.
18. Koksai, M.; Gokhan, N.; Kupeli, E.; Yesilada, E.; Erdogan, H. Analgesic and antiinflammatory activities of some new Mannich bases of 5-nitro-2-benzoxazolinones. *Arch Pharm Res* **2007**, *30*, 419-24.
19. Ivanova, Y.; Momekov, G.; Petrov, O.; Karaivanova, M.; Kalcheva, V. Cytotoxic Mannich bases of 6-(3-aryl-2-propenoyl)-2(3H)-benzoxazolones. *Eur J Med Chem* **2007**, *42*, 1382-7.
20. Gul, H. I.; Vepsalainen, J.; Gul, M.; Erciyas, E.; Hanninen, O. Cytotoxic activities of mono and bis Mannich bases derived from acetophenone against Renca and Jurkat cells. *Pharm Acta Helv* **2000**, *74*, 393-8.



21. Ashok, M.; Holla, B. S.; Poojary, B. Convenient one pot synthesis and antimicrobial evaluation of some new Mannich bases carrying 4-methylthiobenzyl moiety. *Eur J Med Chem* **2007**, *42*, 1095-101.
22. Gul, H. I.; Ojanen, T.; Vepsalainen, J.; Gul, M.; Erciyas, E.; Hanninen, O. Antifungal activity of some mono, bis and quaternary Mannich bases derived from acetophenone. *Arzneimittelforschung* **2001**, *51*, 72-5.
23. Sriram, D.; Banerjee, D.; Yogeewari, P. Efavirenz Mannich bases: synthesis, anti-HIV and antitubercular activities. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2009**, *24*, 1-5.
24. Roy, S.; Chetia, D.; Rudrapal, M.; Prakash, A. Synthesis and antimalarial activity study of some new Mannich bases of 7-chloro-4-aminoquinoline. *Med Chem* **2013**, *9*, 379-83.
25. Wenzel, I. N.; Wong, P. E.; Maes, L.; Muller, T. J.; Krauth-Siegel, R. L.; Barrett, M. P.; Davioud-Charvet, E. Unsaturated Mannich bases active against multidrug-resistant *Trypanosoma brucei* strains. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 339-51.
26. Lee, B.; Bauer, H.; Melchers, J.; Ruppert, T.; Rattray, L.; Yardley, V.; Davioud-Charvet, E.; Krauth-Siegel, R. L. Irreversible inactivation of trypanothione reductase by unsaturated Mannich bases: a divinyl ketone as key intermediate. *J Med Chem* **2005**, *48*, 7400-10.
27. Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Farady, C. J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K. C.; Caffrey, C. R.; Legac, J.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Craik, C. S.; Rosenthal, P. J.; Brinen, L. S. Vinyl Sulfones as Antiparasitic Agents and a Structural Basis for Drug Design. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 25697-25703.
28. Martinez-Mayorga, K.; Byler, K. G.; Ramirez-Hernandez, A. I.; Terrazas-Alvares, D. E. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 890-898.
29. Bocanegra-Garcia, V.; Villalobos-Rocha, J. C.; Noguera-Torres, B.; Lemus-Hernandez, M. E.; Camargo-Ordonez, A.; Rosas-Garcia, N. M.; Rivera, G. Synthesis and Biological Evaluation of New Sulfonamide Derivatives as Potential Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. *Medicinal Chemistry* **2012**, *8*, 1039-1044.
30. Fakhr, I. M. I.; Radwan, M. A. A.; El-Batran, S.; El-Salam, O.; El-Shenawy, S. M. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo b thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 1718-1725.
31. Isloor, A. M.; Kalluraya, B.; Sridhar Pai, K. Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[b]thiophene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 825-830.
32. Bonano, V. I.; Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Miguel, D. C.; Jones, S. A.; Dodge, J. A.; Uliana, S. R. Discovery of synthetic Leishmania inhibitors by screening of a 2-arylbenzothiophene library. *Chem Biol Drug Des* **2014**, *83*, 289-96.
33. Patterson, S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Frearson, J. A.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G.; Fairlamb, A. H. Synthesis and Evaluation of 1-(1-(Benzo b thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) Analogues as Inhibitors of Trypanothione Reductase. *Chemmedchem* **2009**, *4*, 1341-1353.
34. Manzano, J. I.; Cochet, F.; Boucherle, B.; Gomez-Perez, V.; Boumendjel, A.; Gamarro, F.; Peuchmaur, M. Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *123*, 161-170.
35. Mori-Yasumoto, K.; Izumoto, R.; Fuchino, H.; Ooi, T.; Agatsuma, Y.; Kusumi, T.; Satake, M.; Sekita, S. Leishmanicidal activities and cytotoxicities of bisnaphthoquinone analogues and naphthol derivatives from *Burman Diospyros burmanica*. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 5215-9.
36. Kuettel, S.; Zambon, A.; Kaiser, M.; Brun, R.; Scapozza, L.; Perozzo, R. Synthesis and evaluation of antiparasitic activities of new 4- 5-(4-Phenoxyphenyl)-2H-pyrazol-3-yl morpholine derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 5833-5839.
37. Pérez-Silanes, S.; Torres, E.; Arbilla, L.; Varela, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Azqueta, A.; Moreno-Viguri, E. Synthesis and biological evaluation of quinoxaline di-N-oxide derivatives with in vitro trypanocidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 903-906.
38. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; O'Shea, I. P.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M. 3-Nitrotriazole-based piperazines as potent antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *103*, 325-334.
39. Papadopoulou, M. V.; Trunz, B. B.; Bloomer, W. D.; McKenzie, C.; Wilkinson, S. R.; Prasittichai, C.; Brun, R.; Kaiser, M.; Torreele, E. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-Based Aliphatic and Aromatic Amines as Anti-Chagasic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 8214-8223.

40. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Kaiser, M.; Chatelain, E.; Ioset, J.-R. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 6600-6607.
41. Corona, P.; Gibellini, F.; Cavalli, A.; Saxena, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Luciani, R.; Paglietti, G.; Guerrieri, D.; Nerini, E.; Gupta, S.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Ferrari, S.; Costi, P. M. Structure-Based Selectivity Optimization of Piperidine-Pteridine Derivatives as Potent Leishmania Pteridine Reductase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 8318-8329.
42. Al-Mutairi, N.; Alshiltawy, M.; El Khalawany, M.; Joshi, A.; Eassa, B. I.; Manchanda, Y.; Gomaa, S.; Darwish, I.; Rijhwani, M. Tropical medicine rounds: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapson, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. *Int J Dermatol* **2009**, *48*, 862-9.
43. El-Sayed, M.; Anwar, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2010**, *24*, 335-40.
44. Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 311-318.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Tras una extensa revisión bibliográfica y teniendo presente la experiencia de nuestro grupo investigador, se establece la siguiente hipótesis de trabajo:

Las bases de Mannich, bajo distintas funcionalizaciones seleccionadas presentes en compuestos con conocida actividad antiparasitaria, constituyen un núcleo estructural que debe conferir a dichas moléculas actividad frente a kinetoplastidos.

El objetivo principal de esta tesis doctoral es identificar y desarrollar nuevos derivados de bases de Mannich de tipo arilamina para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. Estas moléculas deben ser más efectivas y menos tóxicas que las actualmente utilizadas y permitir un tratamiento accesible para todos los afectados. Para poder alcanzar este objetivo principal se proponen los siguientes objetivos específicos:

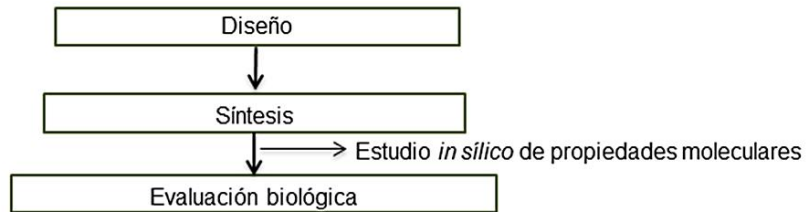
1. Diseño de los nuevos derivados de bases de Mannich de tipo arilamina con potencial actividad tripanocida y leishmanicida.
2. Síntesis y purificación de los derivados propuestos.
3. Caracterización estructural de los nuevos compuestos sintetizados
4. Estudio *in silico* de propiedades moleculares de los compuestos.
5. Evaluación de la eficacia *in vitro* de los compuestos frente a *T. cruzi* y *Leishmania spp.*  
Evaluación de la citotoxicidad y determinación del IS frente a *T. cruzi* y *Leishmania spp.*
6. Screening de genotoxicidad de los compuestos mediante el test de cribado SOS/umu.
7. Ensayo de infectividad *in vitro* frente a *T. cruzi* y *Leishmania spp* de los compuestos líderes.
8. Evaluación de la eficacia *in vivo* frente a *T. cruzi* de los compuestos líderes en ratones BALB/c.
9. Estudio del posible mecanismo de acción de los compuestos frente a *T. cruzi* y *Leishmania spp*:
  - Estudio de inhibición de la enzima superóxido dismutasa.
  - Estudio del metabolismo energético a través de la evaluación de metabolitos excretados.
  - Estudio de la inhibición de la ruta de biosíntesis de esteroides.
  - Estudio de la inhibición de la enzima cruzipaina.
10. Estudio de docking de los compuestos líderes sobre la superóxido dismutasa.
11. Estudio de mutagenicidad de los compuestos líderes en test de Ames.
12. Estudio de las propiedades farmacocinéticas (PK) de los compuestos líderes.



# **DISEÑO EXPERIMENTAL**







**Enfermedad de Chagas**

**In vitro**

- Actividad en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes en cepas *SN3*, *Arequipa* y *Tulahuen*.
- Citotoxicidad en células Vero.
- Índice de selectividad.
- Genotoxicidad SOS/umu.
- Test de infectividad.

**In vivo**

- Estudio en ratones BALB/c.
- Eficacia en fase aguda.
- Eficacia tras inmunosupresión.
- Efecto curativo en órganos diana.

**Mecanismo de acción**

- Dianas estudiadas:
  - Superóxido dismutasa.
  - Metabolismo energético.
  - Cruzipaina.
  - Ruta de biosíntesis de esteroides.
    - Validación método GC-MS.

**Toxicidad y PK**

- Mutagenicidad: test de Ames.
- Perfil farmacocinético.

**Leishmaniasis**

**In vitro**

- Actividad en promastigotes y amastigotes en cepas *L. infantum*, *L. Braziliensis* y *L. Donovanii*.
- Citotoxicidad en Macrófagos J744.2.
- Índice de selectividad.
- Test de infectividad.

**Mecanismo de acción**

- Dianas estudiadas:
  - Superóxido dismutasa.
  - Metabolismo energético.



## **RESULTADOS**



**PUBLICACIÓN 1: *In vitro* and in vivo anti-Trypanosoma cruzi activity of new arylamine Mannich base-type derivatives**

Reimpreso con permiso del J. Med. Chem. 2016, 59, 10929–10945

Reprinted with permission from J. Med. Chem. 2016, 59, 10929–10945

DOI: [10.1021/acs.jmedchem.6b00784](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00784)

© 2016 American Chemical Society

Moreno-Viguri E, et al. *In vitro* and in vivo anti-Trypanosoma cruzi activity of new arylamine Mannich base-type derivatives. [Journal of Medicinal Chemistry](#), 2016, 59(24): 10929-10945. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00784>

**PUBLICACIÓN 2: Second generation of Mannich Base type derivatives with *in vivo* activity against *Trypanosoma cruzi*.**

**(Artículo en redacción)**





Second generation of Mannich base type derivatives with *in vivo* activity  
against *Trypanosoma cruzi*.

Mery Santivañez-Veliz, Elsa Moreno-Viguri, Silvia Pérez-Silanes. Universidad de Navarra, Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Instituto de Salud Tropical, Pamplona 31008, Spain.

Rubén Martín-Escolano, Manuel Sánchez-Moreno. Departamento de Parasitología, Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA), Hospitales Universitarios De Granada/Universidad de Granada, Granada, Spain

Amaya Azqueta. Universidad de Navarra, Department of Pharmacology and Toxicology, Pamplona 31008, Spain.

Nuria Cirauqui. Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-900, Brazil

Los ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo* han sido realizados por Rubén Martín-Escolano, doctorando del Departamento de Parasitología del Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA) y formarán parte de su tesis doctoral.

ABSTRACT.

KEY WORDS: arylaminoketone, Mannich Bases, Superoxide dismutase, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease.

**(Artículo en redacción)**

## INTRODUCTION

Chagas disease (CD) is a chronic parasitosis caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) parasite protozoan, which is transmitted by hematophagous insects from the *Reduviidae* family. It is a complex vector-born zoonosis, including more than 180 species of vertebrates from different orders both domestic and wild as possible hosts. CD is endemic in 21 American countries<sup>1-3</sup>; however, CD has become a public health concern in non-endemic countries, mainly in United States, Canada and some European countries due to the appearance of non-vector transmission through blood transfusions, organ transplants and congenital transmission associated with massive migratory movements<sup>4,5</sup>. According to WHO data, CD affects approximately 5.7 million people causing about 7,000 deaths annually and almost 70 million people are at risk of infection<sup>6,7</sup>. The disease also causes approximately 0.6 million disability adjusted life years with further economic depression of the affected areas.

The infection rates have improved in recent years thanks to improved living conditions, better access to health systems and control programs implementation to prevent vector and transfusional transmission<sup>8</sup>. Nevertheless, CD is still considered a neglected tropical disease (NTD) since health interventions and R&D are still inadequate to needs<sup>9</sup>.

The progress in the control of infection transmission methods has not been accompanied by progress in developing new treatments for the disease. This fact is due to different factors such as lack of knowledge in the pathophysiology of the disease, the high biological and genetic polymorphism that the parasite presents depending on the geographical region and lack of interest from pharmaceutical companies. In addition, experimental tools available for *in vitro* and *in vivo* testing have had so far a low predictive value<sup>10-14</sup>. As a consequence, all the most promising nitroimidazoles, as posaconazole or ravuconazole, have not offered good results in clinical trials and their development has been stopped<sup>15-17</sup>.

For all these reasons, no effective chemotherapy is available nowadays and only two drugs developed in the 60s, Nifurtimox (NFX, Lampit®, Bayer) and Benznidazole (BZN, Abarax®, Elea Laboratories and Lafepe Benznidazol®, Lafepe Laboratories) are available nowadays. Both drugs are not approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the adult patients treatment and present important limitations such as low efficacy during the chronic phase of the disease, different activity against various genetic lineages of *T. cruzi*, numerous side effects on patients and complicated

treatment dosage. Based on its relative better toxicity profile and accumulated experience, BZN is considered the current standard of treatment and, this year, the FDA has approved its use to treat CD in children 2 to 12 years of age<sup>18, 19</sup>. However, it remains inefficient in the chronic phase of the disease and its toxicity is unacceptable<sup>20, 21</sup>.

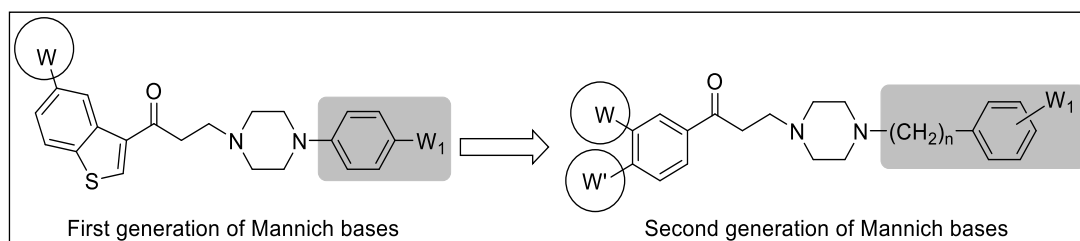
These important limitations highlight the need for further research of new, more effective and specific drugs against CD. In recent years, interest in the disease has increased and important advances have been made in the field of molecular biology and genomics of *T. cruzi*, and in the CD pathophysiology. As a result, more research groups and pharmaceutical companies are investing in the development of new drugs. However, it has not yet succeeded in developing a drug for CD that fulfills the target product profile proposed by DNDi<sup>22, 23</sup>.

Mannich bases are considered important pharmacophores with high potential in the field of medical chemistry and have shown a wide spectrum of biological activities<sup>24, 25</sup> as anti-inflammatory<sup>26</sup>, anticancer<sup>27, 28</sup>, antibacterial<sup>29</sup>, antifungal<sup>30</sup>, antituberculosis<sup>31</sup> and antimalarial activities<sup>32</sup>. In addition, Mannich bases with biological activity against *T. brucei* multiresistant strains<sup>33</sup> as well as with inhibitory activity against *T. cruzi* TRase have also been described<sup>34</sup>.

In a previous study, our group identified new Mannich base-type derivatives that showed high *in vitro* activity against different life cycle stages and parasite strains of *T. cruzi*<sup>35</sup>. The lead compounds showed high selectivity indexes (SI), curative activity during the acute phase of the disease and prevented from the parasitemia reactivation after an immunosuppressive treatment showing curative rates by PCR higher than BZN. In addition, those compounds were not mutagenic nor genotoxic<sup>35</sup>.

The simplicity and cost-effectiveness of the synthetic methodologies used in the drug discovery process against NTD play a key role. With this idea in mind, we designed a second generation of Mannich bases by a modification of the previously identified lead compounds<sup>35</sup> and taking into account the availability and cost of the reagents, as well as the use of a simple synthetic route (**Figure 1**). The benzothiophene ring has been substituted by a mono or di-substituted benzene ring with different electronic character substituents. We decided to keep the piperazine scaffold as constant in the general chemical skeleton considering that the incorporation of cyclic amines is widely used in the search for biologically active molecules and previous studies of the group confirmed the interest of this amine. Several examples of anti-trypanosomatid agents based on

cyclic amines have been reported<sup>35-39</sup> and antifungal drugs with anti-kinetoplastid activity, such as ketoconazole, itraconazole or posaconazole, present piperazine rings in their structure<sup>40-43</sup>. This design allowed us to increase the chemical variability of the arylaminoketone series with a cost reduction and synthetic simplicity criterion.

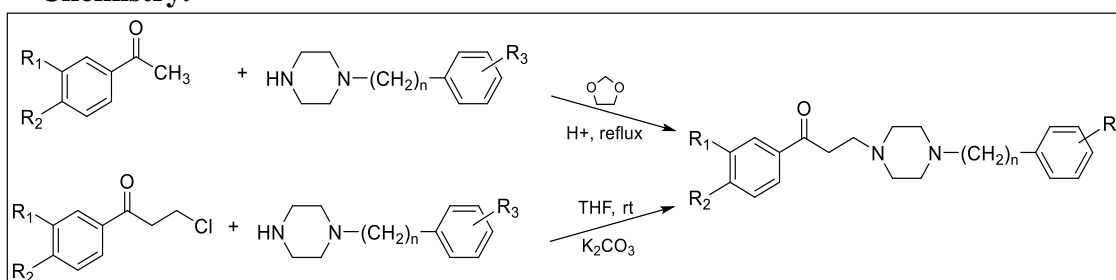


**Figure 1.** Design of the new series of arylaminoketone Mannich Base type derivatives.

Herein, we present the synthesis, *in vitro* anti-*T. cruzi* activity and cytotoxicity of a second generation of arylaminoketone Mannich base derivatives. SI higher than 30 and non genotoxicity in the SOS/umu screening test have been established as the cut-off to further evaluate the compounds in a BALB/c mice model in order to determine their ability to reduce blood parasitemia. The possible mechanism of action of the new compounds has been studied in terms of Fe-Superoxide dismutase (Fe-SOD) inhibition and the variation in the excreted metabolites pattern.

## RESULTS AND DISCUSSION

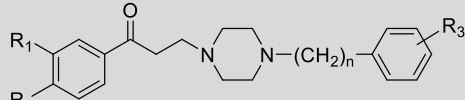
### Chemistry.



**Figure 2.** Synthesis of new arylaminoketone derivatives.

Forty four out of forty nine compounds (**2-17**, **22-49**) were obtained by Mannich reaction where the corresponding ketone was condensed with the appropriate arylamine in acid medium using 1,3-dioxolane as formaldehyde generator and as solvent. Four out of forty nine compounds (**18-21**) were obtained by an aliphatic nucleophilic substitution in which the corresponding piperazine was condensed with a primary alkyl halide in presence of  $K_2CO_3$  as base and THF as solvent.

**Table 1.** Structure and molecular properties of the new compounds calculated with the DataWarrior program <sup>44</sup>.

Comp					Molecular properties					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	R <sub>3</sub>	MW <sup>b</sup>	clogP <sup>c</sup>	clogS <sup>d</sup>	PSA <sup>e</sup>	HBA <sup>f</sup>	HBD <sup>g</sup>
1 <sup>a</sup>	H	H	0	4-F	313.4	0.8	-3.4	24.7	3	1
2	H	H	0	4-CF <sub>3</sub>	363.4	1.6	-3.9	24.7	3	1
3	H	CH <sub>3</sub>	0	4-F	327.4	1.2	-3.8	24.7	3	1
4	H	CH <sub>3</sub>	0	4-CF <sub>3</sub>	377.4	1.9	-4.2	24.7	3	1
5	H	CH <sub>3</sub>	0	4-Cl	343.9	1.7	-4.2	24.7	3	1
6	H	CH <sub>3</sub>	0	4-NO <sub>2</sub>	354.4	1.5	-3.9	70.5	6	1
7	H	OCH <sub>3</sub>	0	4-F	343.4	0.7	-3.4	34.0	4	1
8	H	OCH <sub>3</sub>	0	4-CF <sub>3</sub>	393.4	1.5	-3.9	34.0	4	1
9	H	OCH <sub>3</sub>	0	4-Cl	359.9	1.3	-3.9	34.0	4	1
10	H	OCH <sub>3</sub>	0	4-NO <sub>2</sub>	370.4	1.1	-3.6	79.8	7	1
11	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	0	4-F	373.4	0.7	-3.4	43.2	5	1
12	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	0	4-CF <sub>3</sub>	423.4	1.4	-3.9	43.2	5	1
13	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	0	4-Cl	389.9	1.2	-3.9	43.2	5	1
14	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	0	4-NO <sub>2</sub>	400.4	1.0	-3.6	89.0	8	1
15	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	1	3-F	373.4	0.7	-3.5	43.2	5	1
16	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	1	H	355.5	0.6	-3.1	43.2	5	1
17	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	1	3-CH <sub>3</sub>	369.5	0.9	-3.5	43.2	5	1
18	H	F	0	2-OCH <sub>3</sub>	327.4	1.2	-3.8	24.7	3	1
19	H	F	0	2-F	331.4	0.9	-3.7	24.7	3	1
20	H	F	0	4-OCH <sub>3</sub>	343.4	0.8	-3.4	34.0	4	1
21	H	F	0	4-NO <sub>2</sub>	358.4	1.2	-3.9	70.6	6	1
22	H	Br	0	4-F	392.3	1.6	-4.2	24.7	3	1
23	H	Br	0	4-CF <sub>3</sub>	442.3	2.3	-4.7	24.7	3	1
24	H	Br	0	4-Cl	408.7	2.1	-4.7	24.7	3	1
25	H	Br	0	4-NO <sub>2</sub>	419.3	1.9	-4.4	70.6	6	1
26	Br	F	0	4-F	410.3	1.7	-4.6	24.7	3	1
27	Br	F	0	4-CF <sub>3</sub>	460.3	2.4	-5.0	24.7	3	1
28	Br	F	0	4-Cl	426.7	2.2	-5.0	24.7	3	1
29	Br	F	0	4-NO <sub>2</sub>	437.3	2.0	-4.7	70.6	6	1
30	F	F	0	4-F	349.3	1.0	-4.0	24.7	3	1
31	F	F	0	4-CF <sub>3</sub>	399.4	1.8	-4.5	24.7	3	1
32	F	F	0	4-Cl	365.8	1.5	-4.5	24.7	3	1
33	F	F	0	4-NO <sub>2</sub>	376.4	1.3	-4.2	70.6	6	1
34	Cl	F	0	4-F	365.8	1.5	-4.5	24.7	3	1
35	Cl	F	0	4-CF <sub>3</sub>	415.8	2.3	-4.9	24.7	3	1
36	Cl	F	0	4-Cl	382.3	2.1	-4.9	24.7	3	1
37	Cl	F	0	4-NO <sub>2</sub>	392.8	1.8	-4.6	70.6	6	1
38	F	Cl	0	4-F	365.8	1.5	-4.5	24.7	3	1
39	F	Cl	0	4-CF <sub>3</sub>	415.8	2.3	-4.9	24.7	3	1
40	F	Cl	0	4-Cl	382.3	2.1	-4.9	24.7	3	1
41	F	Cl	0	4-NO <sub>2</sub>	392.8	1.8	-4.6	70.6	6	1
42	H	CF <sub>3</sub>	0	4-F	381.4	1.7	-4.2	24.7	3	1
43	H	CF <sub>3</sub>	0	4-CF <sub>3</sub>	413.4	2.3	-4.6	24.7	3	1
44	H	CF <sub>3</sub>	0	4-Cl	397.8	2.2	-4.6	24.7	3	1
45	H	CF <sub>3</sub>	0	4-NO <sub>2</sub>	408.4	2.0	-4.3	70.6	6	1
46	H	OCF <sub>3</sub>	0	4-F	397.4	1.9	-4.4	34.0	4	1
47	H	OCF <sub>3</sub>	0	4-CF <sub>3</sub>	447.4	2.7	-4.9	34.0	4	1
48	H	OCF <sub>3</sub>	0	4-Cl	413.9	2.4	-4.9	34.0	4	1
49	H	OCF <sub>3</sub>	0	4-NO <sub>2</sub>	424.4	2.2	-4.6	79.8	7	1

<sup>a</sup>: Previously published. <sup>b</sup>Total Molecular Weight (g/mol). <sup>c</sup>Logarithm of the partition coefficient between n-octanol and water. <sup>d</sup>Logarithm of the solubility measured in mol/L. <sup>e</sup>Polar Surface Area (Å<sup>2</sup>). <sup>f</sup>Number of hydrogen-bond acceptors. <sup>g</sup>Number of hydrogen-bond donors.

The synthetic methodology to obtain the compound **1** was previously described <sup>45</sup>. Therefore 48 new derivatives have been synthesized by a simple, fast and economically affordable methodology (**Table 1**).

The *in silico* study results of some relevant molecular properties related to the drug-likeness of the compounds are shown in **Table 1**. It can be observed that all compounds fulfill the Lipinski “rule of five”, with a molecular weight lower than 500 g/mol, an estimated partition coefficient (logP) lower than 5, a number of hydrogen-bond acceptors lower than 10, and less than 5 hydrogen-bond donors. Moreover, the Polar Surface Area (PSA) and aqueous solubility (logS) values anticipate good oral bioavailability, being the first lower than 140 Å<sup>2</sup>, and the second similar or higher than -4.

#### ***In vitro* Trypanocidal Evaluation.**

The *in vitro* biological activity of the 49 compounds was evaluated against Arequipa, SN3 and Tulahuén strains. These strains belong to different DTUs and differ in terms of geographical location, main biological cycle, vector, host or tropism. The use of these strains allowed studying the compounds response to parasites from different phylogenetic lineages. The used methodology for this test is described in the experimental section.

The *in vitro* activity of all compounds and BZN (reference drug) against the epimastigote form of *T. cruzi* was evaluated. The epimastigote form is considered appropriate for preliminary studies. As it has been described as a transient form between the intracellular and extracellular phase of the *T. cruzi* life cycle in mammals and its accessibility and lower manipulation risk facilitate its use in preliminary stages of drug discovery. As shown in **Table 2**, the IC<sub>50</sub> value was calculated after 72 hours of exposure in a concentration range of 0.1 to 100 µM. In general, compounds showed activity values similar to BZN, standing out compounds **7** and **9** with IC<sub>50</sub> values <10 µM in the 3 strains. In addition, the cytotoxicity of all derivatives in Vero cells was evaluated. Most of the compounds showed better cytotoxicity values than BZN (23.2 µM). In fact, 21 out of 49 derivatives showed cytotoxicity values greater than 100 µM. Compounds **6**, **9**, **10**, **26**, **29** and **30** were the least cytotoxic derivatives with IC<sub>50</sub> values greater than 250 µM. Once this data were obtained it was established that only the compounds with a SI greater than 10 would be selected for evaluation in the intra and extracellular forms of *T. cruzi*. In this way compounds **6**, **7**, **9**, **10**, **29** and **30** were

evaluated in the three forms of the parasite in those strains in which this requirement was fulfilled.

**Table 2.** *In vitro* activity, cytotoxicity and selectivity index for compounds on the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* Strains.

Comp	Activity IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>			Toxicity IC <sub>50</sub> Vero cells (µM) <sup>b</sup>	Selectivity Index <sup>c</sup>		
	Arequipa	SN3	Tulahuén		Arequipa	SN3	Tulahuén
<b>BZN</b>	16.9 ± 1.8	36.2 ± 2.4	19.7 ± 1.7	23.2 ± 2.1	1.4	0.6	1.2
<b>1</b>	65.7 ± 5.7	32.9 ± 2.9	94.1 ± 7.9	13.4 ± 1.4	0.2 (0)	0.4 (1)	0.1 (0)
<b>2</b>	12.8 ± 1.3	16.2 ± 1.5	24.9 ± 3.1	15.7 ± 1.7	1.2 (1)	1.0 (2)	0.6 (1)
<b>3</b>	43.5 ± 4.8	78.8 ± 6.7	25.0 ± 2.1	55.4 ± 4.2	1.3 (1)	0.7 (1)	2.2 (2)
<b>4</b>	14.2 ± 1.7	17.6 ± 1.5	22.5 ± 2.3	139.7 ± 12.4	9.8 (7)	7.9 (12)	6.2 (5)
<b>5</b>	31.7 ± 2.9	26.0 ± 2.4	29.5 ± 3.1	183.8 ± 157	5.8 (4)	7.1 (11)	6.2 (5)
<b>6</b>	28.4 ± 3.1	18.2 ± 1.4	46.2 ± 4.5	234.6 ± 17.8	8.3 (6)	12.9 (20)	5.1 (4)
<b>7</b>	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2	55.0 ± 4.9	40.2 (29)	27.9 (44)	30.2 (26)
<b>8</b>	72.9 ± 6.7	32.3 ± 3.5	44.0 ± 4.9	135.2 ± 11.0	1.9 (1)	4.2 (7)	3.1 (3)
<b>9</b>	9.5 ± 0.8	6.3 ± 0.5	7.3 ± 0.6	300.0 ± 24.1	31.5 (23)	47.8 (75)	40.9 (35)
<b>10</b>	31.6 ± 0.3	22.0 ± 0.2	37.4 ± 0.4	587.2 ± 37.6	18.6 (14)	26.7 (42)	15.7 (13)
<b>11</b>	153.8 ± 14.2	61.5 ± 6.7	103.3 ± 9.4	174.8 ± 16.8	1.1 (1)	2.8 (4)	1.7 (1)
<b>12</b>	59.0 ± 6.2	27.8 ± 3.2	33.9 ± 3.1	242.5 ± 21.0	4.1 (3)	8.7 (14)	7.2 (6)
<b>13</b>	90.3 ± 8.9	43.9 ± 4.5	36.6 ± 3.8	185.4 ± 14.8	2.1 (1)	4.2 (7)	5.1 (4)
<b>14</b>	94.5 ± 9.7	173.6 ± 19.8	104.9 ± 11.2	105.2 ± 8.9	1.1 (1)	0.6 (1)	1.0 (1)
<b>15</b>	49.0 ± 5.1	48.0 ± 5.0	40.8 ± 4.5	22.4 ± 3.8	0.5 (0)	0.5 (1)	0.6 (0)
<b>16</b>	29.5 ± 3.0	55.2 ± 6.1	46.2 ± 4.1	47.5 ± 5.7	1.6 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)
<b>17</b>	19.4 ± 2.1	24.1 ± 2.4	28.4 ± 2.4	52.0 ± 4.9	2.7 (2)	2.2 (3)	1.8 (2)
<b>18</b>	58.3 ± 4.9	40.5 ± 3.4	45.6 ± 3.8	24.0 ± 2.7	0.4 (0)	0.6 (1)	0.5 (0)
<b>19</b>	37.9 ± 3.7	52.6 ± 6.0	53.5 ± 5.1	49.5 ± 3.9	1.3 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)
<b>20</b>	24.5 ± 2.1	22.2 ± 2.0	38.9 ± 3.4	31.9 ± 3.4	1.3 (1)	1.4 (2)	0.8 (1)
<b>21</b>	65.8 ± 5.9	54.5 ± 4.2	78.1 ± 6.8	110.5 ± 13.4	1.7 (1)	2.0 (3)	1.4 (1)
<b>22</b>	22.5 ± 2.7	56.8 ± 6.1	49.5 ± 4.5	99.5 ± 7.4	4.4 (3)	1.8 (3)	2.0 (2)
<b>23</b>	30.0 ± 2.8	28.3 ± 3.2	28.5 ± 3.1	78.8 ± 6.8	2.6 (2)	2.8 (4)	2.8 (2)
<b>24</b>	42.5 ± 3.9	26.4 ± 2.7	20.9 ± 1.7	52.1 ± 6.2	1.2 (1)	2.0 (3)	2.5 (2)
<b>25</b>	27.2 ± 3.1	39.7 ± 4.0	46.2 ± 3.8	79.8 ± 8.1	2.9 (2)	2.0 (3)	1.7 (1)
<b>26</b>	38.8 ± 3.7	42.4 ± 4.3	41.4 ± 3.4	352.1 ± 40.0	9.1 (7)	8.3 (13)	8.5 (7)
<b>27</b>	46.6 ± 4.1	20.8 ± 2.3	25.6 ± 2.1	66.8 ± 8.1	1.4 (1)	3.2 (5)	2.6 (2)
<b>28</b>	26.6 ± 2.7	35.1 ± 3.1	30.6 ± 2.4	205.9 ± 17.0	7.7 (6)	5.9 (9)	6.7 (6)
<b>29</b>	36.5 ± 3.4	37.5 ± 4.0	19.1 ± 1.5	256.2 ± 22.8	7.0 (5)	6.8 (11)	13.4 (11)
<b>30</b>	21.4 ± 2.0	37.6 ± 4.2	65.5 ± 6.1	385.2 ± 31.9	18.0 (13)	10.3 (16)	5.9 (5)
<b>31</b>	33.4 ± 3.0	28.8 ± 2.4	54.1 ± 5.1	14.0 ± 1.1	0.4 (0)	0.5 (1)	0.3 (0)
<b>32</b>	15.4 ± 1.2	13.7 ± 1.1	46.2 ± 4.2	86.2 ± 7.8	5.6 (4)	6.3 (10)	1.9 (2)
<b>33</b>	85.2 ± 7.8	160.1 ± 14.8	53.1 ± 4.9	122.3 ± 13.8	1.4 (1)	0.8 (1)	2.3 (2)
<b>34</b>	25.3 ± 2.4	41.6 ± 3.8	37.1 ± 3.1	185.1 ± 21.6	7.3 (5)	4.5 (7)	5.0 (4)
<b>35</b>	21.6 ± 1.9	45.0 ± 4.2	29.0 ± 2.5	74.5 ± 8.7	3.4 (3)	1.7 (3)	2.6 (2)
<b>36</b>	45.5 ± 4.1	29.5 ± 3.4	29.1 ± 2.9	114.2 ± 12.9	2.5 (2)	3.9 (6)	3.9 (3)
<b>37</b>	34.2 ± 3.1	51.0 ± 4.5	41.5 ± 3.8	115.7 ± 11.0	3.4 (2)	2.3 (4)	2.8 (2)
<b>38</b>	39.5 ± 3.8	75.3 ± 6.4	46.2 ± 5.1	105.2 ± 9.1	2.7 (2)	1.4 (2)	2.3 (2)
<b>39</b>	27.6 ± 2.4	49.1 ± 4.2	66.7 ± 6.1	74.3 ± 6.9	2.7 (2)	1.5 (2)	1.1 (1)
<b>40</b>	42.0 ± 3.9	51.6 ± 5.4	55.5 ± 5.1	174.8 ± 15.6	4.2 (3)	3.4 (5)	3.2 (3)
<b>41</b>	23.8 ± 2.7	32.4 ± 3.4	15.5 ± 1.2	89.2 ± 7.4	3.8 (3)	2.8 (4)	5.7 (5)
<b>42</b>	36.9 ± 3.8	66.4 ± 5.9	60.3 ± 5.4	28.5 ± 3.1	0.8 (1)	0.4 (1)	0.5 (0)
<b>43</b>	24.3 ± 2.3	34.7 ± 3.8	43.0 ± 4.8	49.2 ± 3.8	2.0 (1)	1.4 (2)	1.1 (1)
<b>44</b>	52.7 ± 5.4	38.2 ± 4.1	39.1 ± 4.2	54.2 ± 5.0	1.0 (1)	1.4 (2)	1.4 (1)
<b>45</b>	13.5 ± 1.1	20.0 ± 1.4	15.1 ± 1.8	75.7 ± 6.9	5.6 (4)	3.8 (6)	5.0 (4)
<b>46</b>	85.4 ± 8.1	27.6 ± 2.8	52.6 ± 5.8	70.3 ± 7.2	0.8 (1)	2.5 (4)	1.3 (1)
<b>47</b>	51.2 ± 4.9	38.4 ± 3.7	86.3 ± 7.5	64.9 ± 5.7	1.3 (1)	1.7 (3)	0.8 (1)
<b>48</b>	42.2 ± 4.0	34.1 ± 3.9	61.8 ± 5.1	95.6 ± 8.6	2.3 (2)	2.8 (4)	1.5 (1)
<b>49</b>	41.1 ± 3.4	95.0 ± 8.7	52.1 ± 6.0	93.2 ± 7.4	2.3 (2)	1.0 (2)	1.8 (2)

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> = the concentration required to give 50% inhibition, calculated by linear regression analysis at the concentrations employed (0.2–1000.0 µM). Results are averages of four separate determinations.

<sup>b</sup>Towards Vero cells after 72 h of culture (1–4000 µM). <sup>c</sup>Selectivity index = IC<sub>50</sub> Vero cells/IC<sub>50</sub> epimastigote form of parasite. In brackets: number of times that compound exceeds the reference drug SI (on epimastigote form of *T. cruzi*).

As shown in **Table 3**, compounds **6**, **29** and **30** kept an activity pattern against the amastigote and trypomastigote forms similar to that shown against the epimastigote form. It should be noted that compounds **9** and **10** were more active against circulating trypomastigote form than against the epimastigote and amastigote in the 3 strains. This behavior was also observed for derivative **7** except in the Arequipa strain, where the intracellular form was more sensitive than the extracellular form.

**Table 3.** *In vitro* activity and cytotoxicity for selected compounds (**6**, **7**, **9**, **10**, **29** and **30**) on extra and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* Strains.

Comp	Activity IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> <i>T. cruzi</i> Arequipa strain			Activity IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> <i>T. cruzi</i> SN3 strain			Activity IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> <i>T. cruzi</i> Tulahuén strain			Toxicity IC <sub>50</sub> Vero Cell (μM) <sup>b</sup>
	Epim. forms	Amast. forms	Trypom. forms	Epim. forms	Amast. forms	Trypom. forms	Epim. Forms	Amast. Forms	Trypom. forms	
BZN	16.9 ± 1.8	8.3 ± 0.7	12.4 ± 1.1	36.2 ± 2.4	16.6 ± 1.4	36.1 ± 3.1	19.7 ± 1.7	10.0 ± 0.8	15.1 ± 1.3	23.2 ± 2.1
<b>6</b>	28.4 ± 3.1	Nd	nd	18.2 ± 1.4	24.0 ± 2.7	25.3 ± 2.1	46.2 ± 4.5	nd	nd	234.6 ± 17.8
<b>7</b>	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	3.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	55.0 ± 4.9
<b>9</b>	9.5 ± 0.8	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	6.3 ± 0.5	5.8 ± 0.5	3.9 ± 0.4	7.3 ± 0.6	3.8 ± 0.3	2.9 ± 0.3	300.0 ± 24.1
<b>10</b>	31.6 ± 0.3	29.4 ± 0.3	11.7 ± 0.1	22.0 ± 0.2	30.5 ± 0.3	3.1 ± 0.3	37.4 ± 0.4	33.6 ± 0.3	14.5 ± 0.1	587.2 ± 37.6
<b>29</b>	36.5 ± 3.4	Nd	nd	37.5 ± 4.0	nd	nd	19.1 ±1.5	38.7 ± 3.4	32.1 ± 2.8	256.2 ± 22.8
<b>30</b>	21.4 ± 2.0	28.3 ± 2.7	31.6 ± 3.0	37.6 ± 4.2	51.1 ± 5.5	42.2 ± 4.1	65.5 ± 6.1	nd	nd	385.2 ± 31.9

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> = the concentration required to give 50% inhibition, calculated by linear regression analysis at the concentrations employed (0.2–1000.0 μM). Results are averages of four separate determinations.

<sup>b</sup>Towards Vero cells after 72 h of culture (1–4000 μM).

As shown in **Table 4** the SI of the six most active compounds were calculated. The selectivity values were clearly higher than BZN selectivity in all parasitic forms of the evaluated strains. It was established that those compounds showing a SI greater than 30 in any of the assayed parasite forms would continue with the *in vitro* and the *in vivo* further studies and mechanism of action studies. Compounds **7**, **9** and **10** met this requirement and were considered for the following evaluation stages. Compounds **9** and **10** improved on 118 and 291 times respectively, the SI value presented by the BZN in the trypomastigote form of SN3 strain.

The high selectivity values obtained for the hit compounds of the second generation of Mannich bases confirm the excellent activity results shown by the lead compounds of the first generation previously published<sup>35</sup>. This appears to demonstrate that this family of compounds is very interesting in the search for new agents against *T. cruzi*.

Regarding to the structure of compounds **7**, **9** and **10**, it should be noted that all of them present the methoxy donor group at the R<sub>2</sub> position.



**Table 4.** Selectivity Index for selected compounds (**6**, **7**, **9**, **10**, **29** and **30**) on extra- and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* Strains

Comp.	Selectivity index <i>T. cruzi</i> Arequipa strain <sup>a</sup>			Selectivity index <i>T. cruzi</i> SN3 strain <sup>a</sup>			Selectivity index <i>T. cruzi</i> Tulahuén strain <sup>a</sup>		
	Epim. forms	Amast. forms	Trypom. forms	Epim. forms	Amast. forms	Trypom. forms	Epim. Forms	Amast. Forms	Trypom. forms
BZN	1.4	2.8	1.9	0.6	1.4	0.6	1.2	2.3	1.5
<b>6</b>	8.3 (6)	nd	nd	12.9 (20)	9.8 (7)	9.3 (15)	5.1 (4)	nd	nd
<b>7</b>	40.2 (29)	88.7 (32)	49.1 (26)	27.9 (44)	17.6 (13)	39.9 (62)	30.2 (26)	34.6 (15)	47.4 (31)
<b>9</b>	31.5 (23)	82.4 (29)	89.6 (48)	47.8 (75)	51.5 (37)	76.1 (118)	40.9 (35)	78.7 (34)	102.7 (67)
<b>10</b>	18.6 (14)	20.0 (7)	50.4 (27)	26.7 (4)	19.2 (14)	187.0 (291)	15.7 (13)	17.5 (8)	40.6 (26)
<b>29</b>	7.0 (5)	nd	nd	6.8 (11)	nd	nd	13.4 (11)	6.6 (3)	8.0 (5)
<b>30</b>	18.0 (13)	13.6 (5)	12.2 (6)	10.3 (16)	7.5 (5)	9.1 (14)	5.9 (5)	nd	nd

<sup>a</sup>Selectivity index = IC<sub>50</sub> Vero cells/(IC<sub>50</sub> extracellular and intracellular form of parasite. In brackets: number of times that compound exceeds the reference drug SI (on extracellular and intracellular forms of *T. cruzi*)

The analysis of the *in vitro* activity results allowed establishing some interesting structure-activity relationships. As mentioned, the three lead compounds present a methoxy group in the R<sub>2</sub> position. Regarding the substituents used in the R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> positions, when the obtained results for the methoxy monosubstituted series (compounds **7-10**) were compared with those obtained for the methoxy disubstituted homologous series (compounds **11-14**), it was observed that the presence of two methoxy groups greatly decreased the *in vitro* activity. Likewise, it can be seen that the replacement of hydrogen by fluorine caused an *in vitro* activity decrease and/or a cytotoxicity increase, which was reflected in the low SI shown by compounds substituted with OCF<sub>3</sub> in the R<sub>2</sub> position (compounds **46-49**) compared to those shown by the methoxy monosubstituted series (compounds **7-10**). Furthermore, it was observed that in general the presence of a CF<sub>3</sub> group in the R<sub>3</sub> position led to a clear cytotoxicity increase and/or *in vitro* activity decrease. This was clearly seen when the obtained values for compounds **8**, **27**, **31**, **35** and **39** were compared with its homologous compounds results of their same series.

#### ***In vitro* genotoxicity screening - SOS/umu assay.**

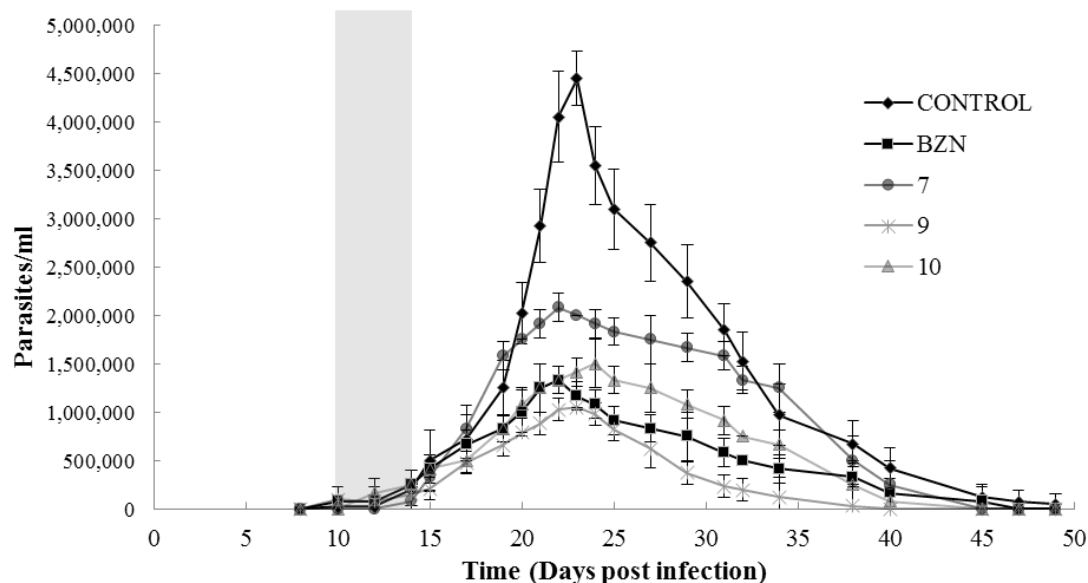
To improve the compound selection process and select the safest and the most effective compounds in the drug discovery process, the SOS/umu genotoxicity assay is a useful screening tool to determine what compounds will be candidates for further studies. The three most active compounds in the *in vitro* evaluation (compounds **7**, **9** and **10**) were included in the SOS/umu genotoxicity assay in order to explore their genotoxicity. The concentrations used in the assay were previously determined in a toxicity study in the test system. All assessed compounds were non-genotoxic with or

without metabolic activation in the tested conditions (supp. Material). However, BZN showed *in vitro* genotoxicity with and without metabolic activation. The obtained results confirm the promising profile of these series.

***In Vivo* Anti-*T.cruzi* Activity in BALB/c Albino Female Mice.**

Taking into account the good selectivity values presented by compounds **7**, **9** and **10** in comparison with the reference drug and considering that none of them showed genotoxic capacity, we decided to carry out an *in vivo* test to study its action on parasitemia during the acute phase. The study was performed in female BALB/c mice, which were intraperitoneally infected with Arequipa strain metacyclic trypomastigotes ( $5 \times 10^5$ ). After confirming the infection, the mice were treated with doses of 20 mg/kg/day from the 10th day for five consecutive days (10-14 p.i.). The parasitemia was measured every three days for 40 days and its value was expressed as parasites/mL. The parasitemia levels during the acute phase in treated mice with compounds **7**, **9** and **10**, those treated with BZN and the untreated group are shown in Figure x. All compounds showed a clear decrease in parasitemia compared to the control group. Compound **9** was the most active since it showed a greater decrease in blood levels of parasites than the reference drug during the whole acute phase. In addition, it has been able to reduce these levels to an undetectable parasitemia before day 40. The data obtained for the three compounds indicate a potent activity in the acute phase of the disease, at the end of which the parasites were eliminated or their number was reduced to undetectable levels by the detection technique employed.

NOTE: Further discussion cannot be carried out at this moment as the study on the chronic phase of the disease and final tests after immunosuppression with CP are ongoing.



**Figure X.** Parasitemia in murine model of acute Chagas disease: (-◆-) control (untreated), (-■-) BZN, (-●-) compound **7**, (-×-) compound **9** and (-▲-) compound **10**. In all cases, compounds were orally administered using, for each compound, 100 mg/kg of body mass. Treatment days are represented in grey. Values constitute means of six mice  $\pm$  standard deviation.

**Inhibitory Effect on the *T. cruzi* Fe-SOD Enzyme.** *Ongoing.*

**Metabolite excretion.** *Ongoing.*

**Docking study of xxx in the *T. cruzi* Fe-SOD and the human CuZn-SOD enzymes.** *Ongoing.*

CONCLUSIONS

EXPERIMENTAL SECTION

CHEMISTRY

**General methods.** The chemical reagents used for the synthesis were acquired from, Panreac Química, Sigma-Aldrich Química, Acros Organics and Alfa Aesar companies. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel 0.2 mm layer (Alugram SIL G/UV254). Synthesis of new compounds was detected at 254 and 360 nm. Flash chromatography was performed on a CombiFlash<sup>®</sup>RF (Teledyne Isco, Lincoln, USA) instrument with Silica RediSep<sup>®</sup> columns using a phase normal gradient. The chemical characterization of new compounds was done by infrared spectra (IR), proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR), carbon nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C NMR) and elemental microanalyses (CHN). IR spectra were performed on a Nicolet Nexus FTIR (Thermo Madison, EEUU) using KBr pellets. IR absorption pics signals (cm<sup>-1</sup>) were

expressed as strong (s), medium (m) and weak (w). NMR spectrum of the new compounds dissolved in DMSO- $d_6$  or  $CDCl_3$  were determined on a Bruker 400 Ultrashield using tetramethylsilane (TMS) as reference on  $\delta$  scale. NMR spectra exhibit chemical shifts (ppm), coupling constant ( $J$ ) expressed in Hertz (Hz) and multiplicity. The obtained multiplicity were described as singlet (s), bs (broad singlet), doublet (d), doublet of doublets (dd), doublet of doublet doublets (ddd), triplet (t), quadruplet (q) and multiplet (m). In some cases, 2D NMR assays were carried out to get peaks assignment (COSY, HMBC and HMQC). The purity of the new compounds was  $\geq 96\%$  and it was performed on a CHN-900 elemental analyzer (Leco, TresCantos, Spain). The elemental analysis of C, H, N of the previously vacuum-dried compounds were within  $\pm 0.4$  respect to theoretical value. Melting point was carried out with a Mettler FP82 + FP80 (Greifensee, Switzerland).

### Synthesis.

Compound **1** was previously reported<sup>45</sup>.

**General method A: procedure for the synthesis of compound 2-17 and 22-50 by Mannich reaction:** The corresponding methyl ketone (5 mmol), and the appropriate arylamine (5 mmol) were dissolved in 1,3-dioxolane (3 mL). Then, HCl 37% was added until acid pH and the mixture was heated under reflux. TLC was used to monitor the product formation (15 - 120 min). Then, NaOH 2M was added until alkaline pH. The obtained product was extracted with DCM. The organic phase was washed with water, dried with anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered off and concentrated under reduced pressure. The obtained product purification was carried out by different methods such as precipitation, washing with solvents, re-crystallization or Flash chromatography (gradient of DCM : methanol). The desired products were precipitated with the appropriate solvent (diethyl ether, DCM, hexane, ethyl acetate, ethanol, methanol, water or a mixture of them).

**1-phenyl-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (2).** Yield: 51%. mp: 105-106 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1681 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1104 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1067 (s,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.98 (dd, 2H,  $H_2 + H_6$ ,  $J_{2,3} = 8.4$  Hz,  $J_{2,4} = 1.3$  Hz); 7.61-7.55 (m, 1H,  $H_4$ ); 7.51-7.45 (m, 4H,  $H_3 + H_5 + H_{3'} + H_{5'}$ ); 6.92 (d, 2H,  $H_2' + H_6'$ ,  $J_{2',3'} = 8.7$  Hz); 3.35-3.29 (m, 4H,  $4H_p$ ); 3.29-3.23 (m, 2H, CO- $CH_2$ ); 2.99-2.90 (m, 2H,  $CH_2-N$ ); 2.76-2.65 (m, 4H,  $4H_p$ ).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.65; 153.06; 136.71; 133.28; 128.67 (2C); 128.03 (2C); 126.38 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.66 (q,  $J^1 =$

270.6 Hz); 120.69 (q,  $J^2 = 28.8$  Hz); 114.60 (2C); 52.95; 52.87 (2C); 47.74 (2C); 35.96. Anal. Calc. for  $C_{20}H_{21}F_3N_2O$ : C 66.29%, H 5.84%, N 7.73%. Found: C 66.27%, H 6.23%, N 7.82%.

**3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)propan-1-one (3).** Yield: 5%. mp: 91-92 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1674 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1134 (m,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.89 (d, 2H,  $H_2 + H_6$ ,  $J_{2-3} = 7.9$  Hz); 7.33 (d, 2H,  $H_3 + H_5$ ,  $J_{3-2} = 7.9$  Hz); 7.03 (dd, 2H,  $H_3' + H_5'$ ,  $J_{3'-F} = 9.8$  Hz,  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 6.93 (dd, 2H,  $H_2' + H_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.7$  Hz); 3.18 (t, 2H, CO- $CH_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 3.08-3.00 (m, 4H,  $4H_p$ ); 2.71 (t, 2H,  $CH_2-N$ ,  $J = 7.1$  Hz); 2.58-2.53 (m, 4H,  $4H_p$ ); 2.37 (s, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.82; 155.97 (d,  $J^1 = 235.3$  Hz); 147.93 (d,  $J^4 = 1.5$  Hz); 143.53; 134.27; 129.27 (2C); 128.11 (2C); 117.07 (2C, d,  $J^3 = 7.6$  Hz); 115.24 (2C, d,  $J^2 = 21.8$  Hz); 52.91, 52.67 (2C); 48.94 (2C); 35.67; 21.14. Anal. Calc. for  $C_{20}H_{23}FN_2O$ : C 73.59%, H 7.10%, N 8.58%. Found: C 73.64%, H 7.07%, N 8.33%.

**1-(4-methylphenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (4).** Yield: 22%. mp: 110-111 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1676 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1335 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1114 (s,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.89 (d, 2H,  $H_2+H_6$ ,  $J_{2-3} = 8.1$  Hz); 7.49 (d, 2H,  $H_3' + H_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 7.33 (d, 2H,  $H_3 + H_5$ ,  $J_{3-2} = 8.0$  Hz); 7.05 (d, 2H,  $H_2' + H_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.7$  Hz); 3.27-3.22 (m, 4H,  $4H_p$ ); 3.20 (t, 2H, CO- $CH_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.72 (t, 2H,  $CH_2-N$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.59-2.52 (m, 4H,  $4H_p$ ); 2.37 (s, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.14; 152.73; 143.00; 133.75; 128.75 (2C); 127.62 (2C); 125.64 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.51 (q,  $J^1 = 270.4$  Hz); 117.31 (q,  $J^2 = 31.9$  Hz); 113.65 (2C); 52.34; 51.87 (2C); 46.39 (2C); 35.10; 20.65. Anal. Calc. for  $C_{21}H_{23}F_3N_2O$ : C 67.01%, H 6.16%, N 7.44%. Found: C 67.40%, H 6.14%, N 7.46%.

**3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)propan-1-one (5).** Yield: 4%. mp: 91-92 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1679 (s,  $\nu_{C=O}$ ).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.89 (d, 2H,  $H_2 + H_6$ ,  $J_{2-3} = 8.0$  Hz); 7.33 (d, 2H,  $H_3 + H_5$ ,  $J_{3-2} = 7.9$  Hz); 7.21 (d, 2H,  $H_3' + H_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 8.6$  Hz); 6.93 (d, 2H,  $H_2' + H_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz); 3.19 (t, 2H, CO- $CH_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 3.12-3.07 (m, 4H,  $4H_p$ ); 2.71 (t, 2H,  $CH_2-N$ ,  $J = 6.8$  Hz); 2.58-2.52 (m, 4H,  $4H_p$ ); 2.37 (s, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.67; 149.75; 143.41; 134.21; 129.18 (2C); 128.51 (2C); 128.04 (2C); 122.18; 116.71 (2C); 52.85; 52.46 (2C); 47.92 (2C); 35.62; 21.08. Anal. Calc. for  $C_{20}H_{23}ClN_2O$ : C 70.06%, H 6.76%, N 8.17%. Found: C 69.85%, H 6.60%, N 8.05%.

**1-(4-methylphenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (6).** Yield: 44%. mp: 140-141 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1675 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1484 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1321 (s,  $\nu_{N-O}$ ).  $^1H$

NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.13 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>',  $J_{3'-2'} = 9.4$  Hz); 7.89 (d, 2H, **H**<sub>2</sub> + **H**<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.2$  Hz); 7.29 (d, 2H, **H**<sub>3</sub> + **H**<sub>5</sub>,  $J_{3-2} = 8.1$  Hz); 6.83 (d, 2H, **H**<sub>2</sub>' + **H**<sub>6</sub>',  $J_{2'-3'} = 9.4$  Hz); 3.46-3.41 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>); 3.21 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.2$  Hz); 2.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.3$  Hz); 2.69-2.65 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>); 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.41; 154.74; 144.07; 138.35; 134.26; 129.31 (2C); 128.10 (2C); 125.89 (2C); 112.58 (2C); 53.00; 52.66 (2C); 46.91 (2C); 35.98; 21.62. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 67.97%, H 6.56%, N 11.89%. Found: C 68.04%, H 6.40%, N 11.73%.

**3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-one**

**dihydrochloride (7)**. Yield: 5%. mp: 165-166°C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 2364 (s, HCl); 1671 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1069 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1024 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 11.18-10.67 (bs, 2H, 2HCl); 8.02 (d, 2H, **H**<sub>2</sub> + **H**<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.9$  Hz); 7.14-7.08 (m, 4H, **H**<sub>3</sub> + **H**<sub>5</sub> + **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>'); 7.05 (dd, 2H, **H**<sub>2</sub>' + **H**<sub>6</sub>',  $J_{2'-3'} = 8.9$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.7$  Hz); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.80-3.70 (m, 2H, 2**H**<sub>p</sub>); 3.70-3.61 (m, 4H, 2**H**<sub>p</sub> + CO-CH<sub>2</sub>); 3.56-3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N); 3.25-3.06 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 195.24; 163.81; 156.58 (d,  $J^I = 236.7$  Hz); 146.36 (d,  $J^I = 1.8$  Hz); 131.24 (2C); 127.63; 117.83 (2C, d,  $J^3 = 7.7$  Hz); 115.49 (2C, d,  $J^2 = 22.0$  Hz); 114.25 (2C); 55.71; 54.35; 45.95 (2C); 45.70 (2C); 42.15. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·2HCl: C 57.84%, H 6.07%, N 6.74%. Found: C 58.14%, H 6.05%, N 6.36%.

**1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one**

**hydrochloride (8)**. Yield: 12%. mp: 184-185°C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 2444 (s, HCl); 1671 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1168 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1114 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1072 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 11.44-11.24 (bs, 1H, HCl); 8.01 (d, 2H, **H**<sub>2</sub> + **H**<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.8$  Hz); 7.57 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>',  $J_{3'-2'} = 8.8$  Hz); 7.17 (d, 2H, **H**<sub>2</sub>' + **H**<sub>6</sub>',  $J_{2'-3'} = 8.7$  Hz); 7.09 (d, 2H, **H**<sub>3</sub> + **H**<sub>5</sub>,  $J_{3-2} = 8.9$  Hz); 4.09-3.98 (m, 2H, 2**H**<sub>p</sub>); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.73-3.61 (m, 4H, 2**H**<sub>p</sub> + CO-CH<sub>2</sub>); 3.48 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 6.9$  Hz); 3.33-3.12 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 194.90; 163.47; 151.95; 130.33 (2C); 128.81; 126.25 (2C, q,  $J^3 = 3.8$  Hz); 124.75 (q,  $J^I = 270.4$  Hz); 119.02 (q,  $J^2 = 32.0$  Hz); 114.88 (2C); 113.94 (2C); 55.56; 50.79; 50.44 (2C); 44.23 (2C); 32.31. Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·HCl: C 58.81%, H 5.64%, N 6.53%. Found: C 58.74%, H 5.67%, N 6.35%.

**3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-one (9)**

Yield: 10%. mp: 79-80 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1669 (s,  $\nu_{C=O}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.98 (d, 2H, **H**<sub>2</sub> + **H**<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.6$  Hz); 7.22 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>',  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 7.04 (d, 2H, **H**<sub>3</sub> + **H**<sub>5</sub>,  $J_{3-2} = 8.6$  Hz); 6.94 (d, 2H, **H**<sub>2</sub>' + **H**<sub>6</sub>',  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz); 3.85 (s,

3H, OCH<sub>3</sub>); 3.17 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.1$  Hz); 3.14-3.07 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>); 2.71 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.0$  Hz); 2.59-2.52 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.47; 163.00; 149.74; 130.23 (2C); 129.62; 128.49 (2C); 122.16; 116.68 (2C); 113.78 (2C); 55.44; 52.95; 52.46 (2C); 47.90 (2C); 35.33. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C 66.94%, H 6.46%, N 7.81%. Found: C 66.95%, H 6.79%, N 7.97%.

**1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (10).**

Yield: 49%. mp: 130-131 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1669 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1491 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1326 (s,  $\nu_{N-O}$ ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.10 (d, 2H, H<sub>3'</sub> + H<sub>5'</sub>,  $J_{3'-2'} = 9.4$  Hz); 7.95 (d, 2H, H<sub>2</sub> + H<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.8$  Hz); 6.94 (d, 2H, H<sub>3</sub> + H<sub>5</sub>,  $J_{3-2} = 8.9$  Hz); 6.80 (d, 2H, H<sub>2'</sub> + H<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 9.4$  Hz); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.44-3.40 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>); 3.17 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.3$  Hz); 2.89 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.2$  Hz); 2.71-2.60 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.28; 163.53; 154.74; 138.33; 130.27 (2C); 129.81; 125.88 (2C); 113.75 (2C); 112.57 (2C); 55.46; 53.10; 52.67 (2C); 46.91 (2C); 35.75. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C 65.03%, H 6.28%, N 11.37%. Found: C 65.27%, H 6.30%, N 11.47%.

**1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (11).**

Yield: 50%. mp: 132-133 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1665 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1162 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1136 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.68 (d, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5} = 8.4$  Hz); 7.47 (s, 1H, H<sub>2</sub>); 7.08-6.99 (m, 3H, H<sub>5</sub> + H<sub>3'</sub> + H<sub>5'</sub>); 6.92 (dd, 2H, H<sub>2'</sub> + H<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.6$  Hz); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.17 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.1$  Hz); 3.07-3.01 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>); 2.71 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.1$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.52; 155.97 (d,  $J^1 = 235.5$  Hz); 152.93, 148.47; 147.81 (d,  $J^4 = 1.9$  Hz); 129.58; 122.61; 116.94 (2C, d,  $J^3 = 7.6$  Hz); 115.13 (2C, d,  $J^2 = 21.8$  Hz); 110.75; 110.13; 55.64; 55.42; 53.08; 52.63 (2C); 48.87 (2C); 35.28. Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 67.72%, H 6.77%, N 7.52%. Found: C 67.90%, H 6.73%, N 7.46%.

**1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (12).** Yield: 9%. mp: 94-95 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1673 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1163 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1116 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.68 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5} = 8.4$  Hz,  $J_{6-2} = 0.9$  Hz); 7.51-7.45 (m, 3H, H<sub>2</sub> + H<sub>3'</sub> + H<sub>5'</sub>); 7.08-7.01 (m, 3H, H<sub>5</sub> + H<sub>2'</sub> + H<sub>6'</sub>); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.27-3.22 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>); 3.18 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.1$  Hz); 2.72 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.1$  Hz); 2.60-2.53 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.50; 153.18; 152.94; 148.47; 129.57; 126.05 (2C, q,  $J^3 = 3.8$  Hz); 124.93 (q,  $J^1 = 270.3$  Hz); 122.63; 117.69 (q,  $J^2 = 32.1$  Hz); 114.04 (2C);

110.74; 110.12; 55.65; 55.42; 53.05; 52.36 (2C); 46.88 (2C); 35.25. Anal. Calc. for  $C_{22}H_{25}F_3N_2O_3$ : C 62.55%, H 5.96%, N 6.63%. Found: C 62.69%, H 5.91%, N 6.53%.

**3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-one (13).**

Yield: 15%. mp: 126-127 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1663 (s,  $\nu_{C=O}$ ).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.68 (dd, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.4$  Hz,  $J_{6-2} = 2.0$  Hz); 7.46 (d, 1H,  $H_2$ ,  $J_{2-6} = 1.9$  Hz); 7.21 (d, 2H,  $H_3+H_5$ ,  $J_{3-2} = 9.0$  Hz); 7.06 (d, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-6} = 8.5$  Hz); 6.93 (d, 2H,  $H_2+H_6$ ,  $J_{2-3} = 9.1$  Hz); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.18 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.0$  Hz); 3.14-3.06 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>); 2.71 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.0$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.54; 152.95; 149.74; 148.48; 129.59; 128.50 (2C); 122.63; 122.17; 116.69 (2C); 110.77; 110.15; 55.66; 55.44; 53.07; 52.49 (2C); 47.92 (2C); 35.27. Anal. Calc. for  $C_{21}H_{25}ClN_2O_3$ : C 64.86%, H 6.48%, N 7.20%. Found: C 64.57%, H 6.45%, N 7.15%.

**1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (14).**

Yield: 12%. mp: 175-176 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1664 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1419 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1317 (s,  $\nu_{N-O}$ ).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.05 (d, 2H,  $H_3 + H_5$ ,  $J_{3-2} = 8.8$  Hz); 7.69 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.0$  Hz); 7.47 (s, 1H,  $H_2$ ); 7.10-6.99 (m, 3H,  $H_5 + H_2 + H_6$ ); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.50-3.40 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>); 3.20 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 6.5$  Hz); 2.73 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 6.2$  Hz); 2.61-2.53 (m, 4H, 4H<sub>p</sub>).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.53; 154.69; 153.00; 148.52; 136.78; 129.59; 125.67 (2C); 122.69; 112.55 (2C); 110.80; 110.15; 55.70; 55.48; 52.95; 52.24 (2C); 46.25 (2C); 35.23. Anal. Calc. for  $C_{21}H_{25}N_3O_5$ : C 63.14%, H 6.31%, N 10.52%. Found: C 63.07%, H 6.63%, N 10.61%.

**1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-(3-fluorobenzyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (15).**

Yield: 9%. mp: 88-89 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1668 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1177 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1151 (s,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.60 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 7.9$  Hz); 7.53 (s, 1H,  $H_2$ ); 7.35-7.19 (m, 1H,  $H_5$ ); 7.13-7.03 (m, 2H,  $H_4 + H_2$ ); 7.00-6.83 (m, 2H,  $H_6 + H_5$ ); 3.95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.51 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-benzyl); 3.22-3.11 (m, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 2.92-2.81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N); 2.74-2.32 (m, 8H, 8H<sub>p</sub>).  $^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.59; 162.87 (d,  $J^1 = 245.9$  Hz); 153.22; 148.97; 140.88 (d,  $J^3 = 6.9$  Hz); 130.07; 129.56 (d,  $J^3 = 8.3$  Hz); 124.49 (d,  $J^4 = 2.6$  Hz); 122.64; 115.68 (d,  $J^2 = 21.2$  Hz); 113.86 (d,  $J^2 = 21.1$  Hz); 109.99; 109.92; 62.31; 56.03; 55.93; 53.35; 53.16 (2C); 52.91 (2C); 35.67. Anal. Calc. for  $C_{22}H_{27}FN_2O_3$ : C 68.37%, H 7.04%, N 7.25%. Found: C 68.76%, H 7.15%, N 7.35%.



**3-(4-benzylpiperazin-1-yl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-one (16).** Yield: 3%. mp: 64-65 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1674 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.61 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6,5} = 8.6$  Hz,  $J_{6,2} = 2.2$  Hz); 7.51 (d, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2,6} = 2.0$  Hz); 7.34-7.30 (m, 4H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $\mathbf{H}_3$ ,  $\mathbf{H}_5$ ,  $\mathbf{H}_6$ ); 7.30-7.27 (m, 1H,  $\mathbf{H}_4$ ); 6.89 (d, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5,6} = 8.4$  Hz); 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.93 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.56 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-benzyl}$ ); 3.34-3.20 (m, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ); 3.05-2.83 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 2.82-2.43 (m, 8H,  $8\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 182.38; 151.33; 149.04; 140.97; 128.33 (2C); 128.32 (2C); 128.31; 120.28; 120.27; 110.01; 109.99; 58.16; 56.10; 56.00; 47.82; 47.81 (2C); 37.45 (2C); 29.70. Anal. Calc. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 71.71%, H 7.66%, N 7.60%. Found: C 71.35%, H 7.80%, N 7.72%.

**1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-(3-methylbenzyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (17).** Yield: 3%. mp: 81-82 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  1668 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.59 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6,5} = 8.4$  Hz,  $J_{6,2} = 1.8$  Hz); 7.51 (d, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2,6} = 1.7$  Hz); 7.19 (t, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J = 7.5$  Hz); 7.13 (s, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ); 7.10 (d, 1H,  $\mathbf{H}_4$ ,  $J_{4,5} = 7.6$  Hz); 7.06 (d, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6,5} = 7.4$  Hz); 6.88 (d, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5,6} = 8.4$  Hz); 3.94 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.48 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Benzyl}$ ); 3.15 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 7.5$  Hz); 2.88-2.80 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.5$  Hz); 2.69-2.38 (m, 8H,  $8\mathbf{H}_p$ ); 2.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.65; 153.22; 148.97; 137.83; 137.78; 130.10; 129.89; 128.03; 127.76; 126.28; 122.64; 110.02; 109.94; 63.03; 56.04; 55.95; 53.41; 53.18 (2C); 53.01 (2C); 35.72; 21.35. Anal. Calc. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 72.22%, H 7.91%, N 7.32%. Found: C 72.02%, H 8.02%, N 7.22%.

**1-(4-bromophenyl)-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (22).** Yield: 3%. mp: 98-99 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1682 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1142 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1066 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.83 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2,3} = 8.3$  Hz); 7.61 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3,2} = 8.3$  Hz); 7.00-6.91 (m, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ); 6.94-6.83 (m, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ); 3.18 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 6.8$  Hz); 3.15-3.08 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ); 2.89 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 6.6$  Hz); 2.72-2.62 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.95; 157.16 (d,  $J^1 = 238.8$  Hz); 147.84 (d,  $J^4 = 2.1$  Hz); 135.55; 131.94 (2C); 129.53 (2C); 128.32; 117.81 (2C, d,  $J^3 = 7.6$  Hz); 115.48 (2C, d,  $J^2 = 22.1$  Hz); 53.25 (2C); 52.94; 50.12 (2C); 36.24. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{BrFN}_2\text{O}$ : C 58.32%, H 5.15%, N 7.16%. Found: C 58.22%, H 5.38%, N 7.10%.

**1-(4-bromophenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (23).** Yield: 10%. mp: 117-118 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1685 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1142 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1104 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1068 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.84 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2,3} =$

8.4 Hz); 7.62 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.4$  Hz); 7.47 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 8.6$  Hz); 6.92 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.6$  Hz); 3.33-3.24 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 3.19 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.89 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 7.2$  Hz); 2.70-2.63 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.87; 153.17; 135.53; 131.97 (2C); 129.53 (2C); 128.37; 126.36 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.69 (q,  $J^1 = 270.4$  Hz); 120.51 (q,  $J^2 = 32.1$  Hz); 114.50 (2C); 52.96 (2C); 52.93; 47.93 (2C); 36.25. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrF}_3\text{N}_2\text{O}$ : C 54.44, H 4.57%, N 6.35%. Found: C 54.26%, H 4.58%, N 6.10%.

**1-(4-bromophenyl)-3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (24).** Yield: 27%. mp: 120-121 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1681 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.93 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.3$  Hz); 7.74 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.4$  Hz); 7.21 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 8.8$  Hz); 6.93 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz); 3.23 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 7.0$  Hz); 3.14-3.05 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 2.72 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 7.0$  Hz); 2.58-2.52 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.41; 149.71; 135.64; 131.65; 129.94 (2C); 128.48 (2C); 127.11 (2C); 122.15; 116.67 (2C); 52.60; 52.42 (2C); 47.88 (2C); 35.78. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{BrClN}_2\text{O}$ : C 55.97%, H 4.94%, N 6.87%. Found: C 56.36%; H 4.92%, N 6.82%.

**1-(4-bromophenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (25).** Yield: 62%. mp: 133-134 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1683 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1483 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1319 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.10 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 9.5$  Hz); 7.83 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.7$  Hz); 7.61 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.7$  Hz); 6.80 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 9.5$  Hz); 3.44-3.37 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 3.17 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.88 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 7.2$  Hz); 2.67-2.62 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.71; 154.73; 138.45; 135.50; 131.96; 129.50 (2C); 128.38 (2C); 125.88 (2C); 112.63 (2C); 52.82; 52.68 (2C); 46.96 (2C); 36.20. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}_3$ : C 54.56%, H 4.82%, N 10.05%. Found: C 54.24%, H 4.95%, N 10.01%.

**1-(3-bromo-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (26).** Yield: 12%. mp: 92-93 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1680 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1190 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1141 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.32 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2-F} = 6.8$  Hz,  $J_{2-6} = 1.9$  Hz); 8.06 (ddd, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6-5} = 8.7$  Hz,  $J_{6-F} = 5.0$  Hz,  $J_{6-2} = 2.2$  Hz); 7.54 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5-F} = 10.3$  Hz,  $J_{5-6} = 8.5$  Hz); 7.04 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ,  $J_{3'-F} = 10.0$  Hz,  $J_{3'-2'} = 8.9$  Hz); 6.94 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 9.2$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.7$  Hz); 3.27 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 3.09-2.99 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 2.71 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 7.0$  Hz); 2.61-2.53 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 196.98; 160.95 (d,  $J^1 = 251.8$  Hz); 155.86 (d,  $J^1 = 235.3$  Hz); 147.82 (d,  $J^4 = 2.0$  Hz); 134.71 (d,  $J^3 = 3.4$  Hz); 133.49 (d,  $J^4 = 1.1$  Hz);

129.86 (d,  $J^3 = 8.8$  Hz); 116.96 (d,  $J^2 = 22.7$  Hz); 116.94 (2C, d,  $J^3 = 7.6$  Hz); 115.11 (d,  $J^2 = 21.6$  Hz); 108.58 (2C, d,  $J^2 = 21.4$  Hz); 52.57 (2C); 52.51; 48.85 (2C); 35.84. Anal. Calc. for  $C_{19}H_{19}BrF_2N_2O$ : C 55.76%, H 4.68%, N 6.84%. Found: C 55.62%, H 4.92%, N 6.64%.

**1-(3-bromo-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (27)**. Yield: 5%. mp: 101-102 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1680 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1144 (m,  $\nu_{C-F}$ ); 1112 (m,  $\nu_{C-F}$ ); 1068 (m,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.32 (dd, 1H,  $H_2$ ,  $J_{2-F} = 6.8$  Hz,  $J_{2-6} = 1.5$  Hz); 8.06 (ddd, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.3$  Hz,  $J_{6-F} = 4.6$  Hz,  $J_{6-2} = 1.5$  Hz); 7.54 (dd, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-F} = 9.5$  Hz,  $J_{5-6} = 8.7$  Hz); 7.49 (d, 2H,  $H_3$  +  $H_5$ ,  $J_{3-2} = 8.6$  Hz); 7.06 (d, 2H,  $H_2$  +  $H_6$ ,  $J_{2-3} = 8.6$  Hz); 3.33-3.20 (m, 6H, CO- $CH_2$  + 4 $H_p$ ); 2.71 (t, 2H,  $CH_2-N$ ,  $J = 7.0$  Hz); 2.60-2.53 (m, 4H, 4 $H_p$ ).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 196.96; 160.97 (d,  $J^1 = 252.1$  Hz); 153.17; 134.71 (d,  $J^3 = 3.4$  Hz); 133.52 (d,  $J^4 = 0.9$  Hz); 129.88 (d,  $J^3 = 8.7$  Hz); 126.03 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.91 (q,  $J^1 = 270.6$  Hz); 117.69 (q,  $J^2 = 32.0$  Hz); 116.98 (d,  $J^2 = 22.8$  Hz); 114.04 (2C); 108.59 (d,  $J^2 = 21.6$  Hz); 52.48; 52.28 (2C); 46.87 (2C); 35.81. Anal. Calc. for  $C_{20}H_{19}BrF_4N_2O$ : C 52.30%, H 4.17%, N 6.10%. Found: C 52.08%; H 4.29%, N 6.04%.

**1-(3-bromo-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (28)**. Yield: 16%. mp: 107-108 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1687 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1133 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1098 (s,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.20 (dd, 1H,  $H_2$ ,  $J_{2-F} = 6.6$  Hz,  $J_{2-6} = 2.1$  Hz); 7.92 (ddd, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.5$  Hz,  $J_{6-F} = 4.7$  Hz,  $J_{6-2} = 2.1$  Hz); 7.23-7.17 (m, 3H,  $H_5$  +  $H_3$  +  $H_5$ ); 6.83 (d, 2H,  $H_2$  +  $H_6$ ,  $J_{2-3} = 9.0$  Hz); 3.20-3.13 (m, 6H, CO- $CH_2$  + 4 $H_p$ ); 2.88 (t, 2H,  $CH_2-N$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.69-2.63 (m, 4H, 4 $H_p$ ).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 196.24; 162.00 (d,  $J^1 = 255.6$  Hz); 149.77; 134.34 (d,  $J^3 = 3.5$  Hz); 133.98 (d,  $J^4 = 1.2$  Hz); 129.18 (d,  $J^3 = 8.4$  Hz); 128.91 (2C); 124.56; 117.21 (2C); 116.70 (d,  $J^2 = 22.9$  Hz); 109.79 (d,  $J^2 = 21.5$  Hz); 53.10 (2C); 52.86; 49.10 (2C); 36.27. Anal. Calc. for  $C_{19}H_{19}BrClFN_2O$ : C 53.60%, H 4.50%, N 6.58%. Found: C 53.85%, H 4.69%, N 6.46%.

**1-(3-bromo-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (29)**. Yield: 30%. mp: 129-130 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1682 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1487 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1332 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1136 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1116 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1096 (s,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.31 (dd, 1H,  $H_2$ ,  $J_{2-F} = 6.7$  Hz,  $J_{2-6} = 1.7$  Hz); 8.09-8.00 (m, 3H,  $H_6$  +  $H_3$  +  $H_5$ ); 7.52 (dd, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-F} = 10.0$  Hz,  $J_{5-6} = 8.6$  Hz); 7.02 (d, 2H,  $H_2$  +  $H_6$ ,  $J_{2-3} = 9.4$  Hz); 3.48-3.38 (m, 4H, 4 $H_p$ ); 3.27 (t, 2H, CO- $CH_2$ ,  $J = 7.0$  Hz); 2.72 (t, 2H,  $CH_2-N$ ,  $J = 7.0$  Hz); 2.59-2.52 (m, 4H, 4 $H_p$ ).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.83; 161.92 (d,  $J^1$

= 252.0 Hz); 155.58; 137.68; 135.61 (d,  $J^3 = 3.4$  Hz); 134.47 (d,  $J^4 = 1.4$  Hz); 130.83 (d,  $J^3 = 8.8$  Hz); 126.56 (2C); 117.94 (d,  $J^2 = 22.8$  Hz); 113.45 (2C); 109.56 (d,  $J^2 = 21.6$  Hz); 53.29; 53.10 (2C); 47.14 (2C); 36.71. Anal. Calc. for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 52.31%, H 4.39%, N 9.63%. Found: C 51.92%, H 4.56%, N 9.55%.

**1-(3,4-difluorophenyl)-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one dihydrochloride (30).** Yield: 2%. mp: 148-149 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 2363 (s, HCl); 1689 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1166 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1101 (m,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 10.96-10.51 (bs, 2HCl); 8.08 (ddd, 1H, **H**<sub>2</sub>,  $J_{2-F3} = 10.8$  Hz,  $J_{2-F4} = 7.9$  Hz,  $J_{2-6} = 1.9$  Hz); 7.97-7.89 (m, 1H, **H**<sub>6</sub>); 7.66 (ddd, 1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-F4} = 11.8$  Hz,  $J_{5-6} = 8.2$  Hz,  $J_{5-F3} = 4.3$  Hz); 7.10 (dd, 2H, **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>',  $J_{3'-F} = 10.3$  Hz,  $J_{3'-2'} = 8.8$  Hz); 7.03 (dd, 2H, **H**<sub>2</sub>' + **H**<sub>6</sub>',  $J_{2'-3'} = 9.2$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.7$  Hz); 3.82-3.56 (m, 4H, CO-CH<sub>2</sub> + 2**H**<sub>p</sub>); 3.55-3.45 (m, 2H, 2**H**<sub>p</sub>); 3.25-3.02 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-N + 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 194.51 (d,  $J^4 = 1.7$  Hz); 156.91 (d,  $J^1 = 237.1$  Hz); 152.81 (dd,  $J^1 = 254.0$  Hz,  $J^2 = 13.1$  Hz); 149.46 (dd,  $J^1 = 247.8$  Hz,  $J^2 = 12.9$  Hz); 146.30 (d,  $J^4 = 2.0$  Hz); 133.45 (dd,  $J^3 = 7.0$  Hz,  $J^4 = 3.0$  Hz); 125.88 (dd,  $J^4 = 3.5$  Hz,  $J^3 = 8.0$  Hz); 118.06 (d,  $J^2 = 19.3$  Hz); 117.93 (2C, d,  $J^3 = 7.8$  Hz); 117.39 (d,  $J^2 = 17.3$  Hz); 115.46 (2C, d,  $J^2 = 22$  Hz); 50.71 (2C); 50.32; 46.16 (2C); 32.94. Anal. Calc. for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.2HCl: C 54.17%, H 5.02%, N 6.65%. Found: C 53.79%, H 5.12%, N 6.46%.

**1-(3,4-difluorophenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (31).** Yield: 27%. mp: 93-94 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1687 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1161 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1113 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1069 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.06 (ddd, 1H, **H**<sub>2</sub>,  $J_{2-F3} = 10.2$  Hz,  $J_{2-F4} = 7.7$  Hz,  $J_{2-6} = 1.5$  Hz); 7.97-7.86 (m, 1H, **H**<sub>6</sub>); 7.61 (ddd, 1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-F4} = 11.7$  Hz,  $J_{5-6} = 8.2$  Hz,  $J_{5-F3} = 4.2$  Hz); 7.49 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>',  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 7.06 (d, 2H, **H**<sub>2</sub>' + **H**<sub>6</sub>',  $J_{2'-3'} = 8.6$  Hz); 3.31-3.21 (m, 6H, CO-CH<sub>2</sub> + 4**H**<sub>p</sub>); 2.72 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.1$  Hz); 2.61-2.53 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.06; 153.18; 152.49 (dd,  $J^1 = 253.3$  Hz,  $J^2 = 12.8$  Hz); 149.40 (dd,  $J^1 = 247.5$  Hz,  $J^2 = 13.0$  Hz); 134.39-134.09 (m); 126.05 (2C, q,  $J^3 = 3.5$  Hz); 125.71 (dd,  $J^4 = 3.3$  Hz,  $J^3 = 7.7$  Hz); 124.93 (q,  $J^1 = 270.4$  Hz); 117.86 (d,  $J^2 = 31.9$  Hz); 117.82 (q,  $J^2 = 17.6$  Hz); 117.29 (d,  $J^2 = 17.7$  Hz); 114.06 (2C); 52.51; 52.30 (2C); 46.87 (2C); 35.78. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O: C 60.30%, H 4.81%, N 7.03%. Found: C 59.95%, H 5.19%, N 7.07%.

**3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(3,4-difluorophenyl)propan-1-one (32).** Yield: 21%. mp: 83-84 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1685 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1158 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1131 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1103 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.09-7.98 (m, 1H, **H**<sub>2</sub>); 7.93-7.85 (m, 1H, **H**<sub>6</sub>); 7.64-7.54 (m, 1H, **H**<sub>5</sub>); 7.20 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>' + **H**<sub>5</sub>',  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 6.92 (d,

2H,  $\mathbf{H}_2$  +  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.8$  Hz); 3.24 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 6.9$  Hz); 3.14-3.05 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 2.71 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 6.9$  Hz); 2.60-2.51 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.03; 152.45 (dd,  $J^1 = 253.3$  Hz,  $J^2 = 12.9$  Hz); 149.70; 149.36 (dd,  $J^1 = 247.4$  Hz,  $J^2 = 13.1$  Hz); 134.17 (dd,  $J^3 = 4.2$  Hz,  $J^4 = 3.5$  Hz); 128.46 (2C); 125.66 (dd,  $J^3 = 7.8$  Hz,  $J^4 = 3.5$  Hz); 122.14; 117.77 (d,  $J^2 = 17.6$  Hz); 117.23 (dd,  $J^2 = 17.4$  Hz,  $J^3 = 1.1$  Hz); 116.65 (2C); 52.51; 52.41 (2C); 47.87 (2C); 35.78. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}$ : C 62.55%, H 5.25%, N 7.68%. Found: C 62.94%, H 5.33%, N 7.48%.

**1-(3,4-difluorophenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (33).**

Yield: 16%. mp: 148-149 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1684 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1485 (m,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1321 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1111 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1095 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.09-7.98 (m, 3H,  $\mathbf{H}_3$  +  $\mathbf{H}_5$  +  $\mathbf{H}_2$ ); 7.92-7.85 (m, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ); 7.64-7.54 (m, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ); 7.02 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2$  +  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 9.3$  Hz); 3.47-3.39 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 3.25 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 6.9$  Hz); 2.72 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 6.9$  Hz); 2.59-2.51 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.01; 154.64; 152.49 (dd,  $J^1 = 253.3$  Hz,  $J^2 = 12.9$  Hz); 149.39 (dd,  $J^1 = 247.5$  Hz,  $J^2 = 13.1$  Hz); 136.75; 134.25-134.13 (m); 125.75-125.65 (m); 125.61 (2C); 117.81 (d,  $J^2 = 17.7$  Hz); 117.28 (d,  $J^2 = 17.6$  Hz); 112.52 (2C); 52.37; 52.14 (2C); 46.19 (2C); 35.72. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$ : C 60.79%, H 5.10%, N 11.19%. Found: C 60.63%, H 5.06%, N 10.99%.

**1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (34).**

Yield: 18%. mp: 79-80 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1680 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1170 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1140 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1059 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.19 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2-F} = 7.2$  Hz,  $J_{2-6} = 2.1$  Hz); 8.02 (ddd, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6-5} = 8.5$  Hz,  $J_{6-F} = 4.8$  Hz,  $J_{6-2} = 2.1$  Hz); 7.56 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5-F} = 10.0$  Hz,  $J_{5-6} = 8.9$  Hz); 7.02 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_3$  +  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-F} = 9.8$  Hz,  $J_{3-2} = 8.9$  Hz); 6.93 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_2$  +  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 9.2$  Hz,  $J_{2-F} = 4.7$  Hz); 3.25 (t, 2H, CO- $\mathbf{CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 3.06-3.02 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 2.71 (t, 2H,  $\mathbf{CH}_2$ -N,  $J = 7.1$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.03; 159.90 (d,  $J^1 = 253.7$  Hz); 155.86 (d,  $J^1 = 235.5$  Hz); 147.82 (d,  $J^4 = 1.6$  Hz); 134.39 (d,  $J^4 = 3.5$  Hz); 130.61; 129.20 (d,  $J^3 = 8.7$  Hz); 120.12 (d,  $J^2 = 18.2$  Hz); 117.16 (d,  $J^2 = 21.4$  Hz); 116.93 (2C, d,  $J^3 = 7.5$  Hz); 115.11 (2C, d,  $J^2 = 21.9$  Hz); 52.57 (2C); 52.50; 48.85 (2C); 35.84. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}$ : C 62.55%, H 5.25%, N 7.68%. Found: C 62.68%, H 5.08%, N 7.60%.

**1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (35).** Yield: 6%. mp: 97-98 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1683 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1162 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1069 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.20 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2-F}$

= 7.1 Hz,  $J_{2-6} = 1.7$  Hz); 8.02 (ddd, 1H, **H**<sub>6</sub>,  $J_{6-5} = 8.0$  Hz,  $J_{6-F} = 4.6$  Hz,  $J_{6-2} = 1.9$  Hz); 7.57 (dd, 1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-F} = 10.3$  Hz,  $J_{5-6} = 8.8$  Hz); 7.48 (d, 2H, **H**<sub>3'</sub> + **H**<sub>5'</sub>,  $J_{3'-2'} = 8.5$  Hz); 7.05 (d, 2H, **H**<sub>2'</sub> + **H**<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 8.6$  Hz); 3.30-3.22 (m, 6H, CO-CH<sub>2</sub> + 4**H**<sub>p</sub>); 2.72 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 6.9$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ ppm: 197.01; 159.91 (d,  $J^I = 253.3$  Hz); 153.15; 134.39 (d,  $J^I = 3.6$  Hz); 130.63; 129.20 (d,  $J^3 = 8.7$  Hz); 126.02 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.90 (q,  $J^I = 270.3$  Hz); 120.12 (d,  $J^2 = 18.2$  Hz); 117.67 (q,  $J^2 = 32.1$  Hz); 117.18 (d,  $J^2 = 21.4$  Hz); 114.02 (2C); 52.46; 52.27 (2C); 46.85 (2C); 35.81. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O: C 57.91%, H 4.62%, N 6.75%. Found: C 57.70%, H 5.00%, N 6.51%.

**1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one**

(**36**). Yield: 19%. mp: 103-104 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1686 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1195 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1135 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1059 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 8.05 (dd, 1H, **H**<sub>2</sub>,  $J_{2-F} = 7.1$  Hz,  $J_{2-6} = 2.2$  Hz); 7.88 (ddd, 1H, **H**<sub>6</sub>,  $J_{6-5} = 8.5$  Hz,  $J_{6-F} = 4.6$  Hz,  $J_{6-2} = 2.2$  Hz); 7.23 (dd, 1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-F} = 9.5$  Hz,  $J_{5-6} = 8.6$  Hz); 7.19 (d, 2H, **H**<sub>3'</sub> + **H**<sub>5'</sub>,  $J_{3'-2'} = 9.6$  Hz); 6.83 (d, 2H, **H**<sub>2'</sub> + **H**<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 9.6$  Hz); 3.18-3.14 (m, 6H, CO-CH<sub>2</sub> + 4**H**<sub>p</sub>); 2.88 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.2$  Hz); 2.69-2.64 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 196.32; 161.05 (d,  $J^I = 257.2$  Hz); 149.77; 134.00 (d,  $J^I = 3.6$  Hz); 131.01; 128.92 (2C); 128.38 (d,  $J^3 = 8.3$  Hz); 124.58; 121.90 (d,  $J^2 = 18.3$  Hz); 117.22 (2C); 116.86 (d,  $J^2 = 21.8$  Hz); 53.10 (2C); 52.86; 49.10 (2C); 36.25. Anal. Calc. for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>O: C 59.85%, H 5.02%, N 7.35%. Found: C 60.08%, H 5.19%, N 7.14%.

**1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one**

(**37**). Yield: 14%. mp: 124-125 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1683 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1322 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1248 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1100 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1060 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 8.13 (d, 2H, **H**<sub>3'</sub> + **H**<sub>5'</sub>,  $J_{3'-2'} = 9.4$  Hz); 8.06 (dd, 1H, **H**<sub>2</sub>,  $J_{2-F} = 7.0$  Hz,  $J_{2-6} = 2.1$  Hz); 7.90 (ddd, 1H, **H**<sub>6</sub>,  $J_{6-5} = 8.4$  Hz,  $J_{6-F} = 4.5$  Hz,  $J_{6-2} = 2.1$  Hz); 7.26 (dd, 1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-F} = 9.8$  Hz,  $J_{5-6} = 8.5$  Hz); 6.83 (d, 2H, **H**<sub>2'</sub> + **H**<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 9.4$  Hz); 3.48-3.41 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>); 3.20 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.0$  Hz); 2.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.0$  Hz); 2.72-2.64 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 196.07; 161.08 (d,  $J^I = 257.3$  Hz); 154.69; 134.48; 133.90 (d,  $J^I = 3.7$  Hz); 130.99 (d,  $J^3 = 1.1$  Hz); 128.38 (d,  $J^3 = 8.4$  Hz); 125.90 (2C); 121.93 (d,  $J^2 = 18.3$  Hz); 116.90 (d,  $J^2 = 21.7$  Hz); 112.67 (2C); 52.71, 52.68 (2C); 46.91 (2C); 36.16. Anal. Calc. for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClFN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 58.24%, H 4.89%, N 10.72%. Found: C 57.89%, H 4.95%, N 10.63%.

**1-(4-chloro-3-fluorophenyl)-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one**

(**38**). Yield: 7%. mp: 101-102 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1685 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1170 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1140

(s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1063 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.74 (d, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2-F} = 9.7$  Hz); 7.70 (d, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6-5} = 8.7$  Hz); 7.51 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5-6} = 8.1$  Hz,  $J_{5-F} = 7.6$  Hz); 6.95 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_3$  +  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-F} = 9.5$  Hz,  $J_{3-2} = 8.5$  Hz); 6.87 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_2$  +  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.6$  Hz,  $J_{2-F} = 4.3$  Hz); 3.17 (t, 2H, CO- $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 3.14-3.08 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 2.89 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.1$  Hz); 2.72-2.62 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 196.71 (d,  $J^f = 1.3$  Hz); 158.17 (d,  $J^f = 251.1$  Hz); 157.17 (d,  $J^f = 238.9$  Hz); 147.82 (d,  $J^f = 2.1$  Hz); 137.03 (d,  $J^3 = 5.2$  Hz); 130.96; 126.53 (d,  $J^2 = 18.0$  Hz); 124.34 (d,  $J^3 = 3.7$  Hz); 117.83 (2C, d,  $J^3 = 7.8$  Hz); 115.95 (d,  $J^2 = 22.0$  Hz); 115.49 (2C, d,  $J^2 = 22.2$  Hz); 53.24 (2C); 52.83; 50.10 (2C); 36.34. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}$ : C 62.55%; H 5.25%, N 7.68%. Found: C 62.58%, H 5.23%, N 7.56%.

**1-(4-chloro-3-fluorophenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (39).** Yield: 7%. mp: 117-118 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1684 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1164 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1117 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1068 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7.74 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2-F} = 9.5$  Hz,  $J_{2-6} = 1.9$  Hz); 7.70 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6-5} = 8.3$  Hz,  $J_{6-2} = 2.0$  Hz); 7.52 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5-6} = 8.2$  Hz,  $J_{5-F} = 7.2$  Hz); 7.47 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3$  +  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.9$  Hz); 6.91 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2$  +  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.8$  Hz); 3.31-3.25 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 3.17 (t, 2H, CO- $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.89 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.68-2.63 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 196.64 (d,  $J^f = 1.4$  Hz); 158.19 (d,  $J^f = 251.1$  Hz); 153.16; 137.02 (d,  $J^3 = 5.2$  Hz); 130.99; 126.59 (d,  $J^2 = 17.7$  Hz); 126.36 (2C, q,  $J^3 = 3.8$  Hz); 124.68 (q,  $J^f = 270.7$  Hz); 124.34 (d,  $J^3 = 3.7$  Hz); 120.55 (q,  $J^2 = 32.8$  Hz); 115.96 (d,  $J^2 = 22.0$  Hz); 114.52 (2C); 52.96 (2C); 52.82; 47.93 (2C); 36.36. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClF}_4\text{N}_2\text{O}$ : C 57.91%, H 4.62%, N 6.75%. Found: C 57.73%, H 4.71%, N 6.74%.

**1-(4-chloro-3-fluorophenyl)-3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (40).** Yield: 42%. mp: 123-124 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1685 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1167 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1138 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1065 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.00 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_2$ ,  $J_{2-F} = 10.0$  Hz,  $J_{2-6} = 1.5$  Hz); 7.86 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{6-5} = 8.4$  Hz,  $J_{6-2} = 1.4$  Hz); 7.77 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{5-F} = 8.3$  Hz,  $J_{5-6} = 7.9$  Hz); 7.22 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3$  +  $\mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.9$  Hz); 6.94 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2$  +  $\mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 9.0$  Hz); 3.26 (t, 2H, CO- $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 3.13-3.07 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ); 2.72 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.0$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H, 4 $\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.53; 157.27 (d,  $J^f = 248.1$  Hz); 149.79; 137.46 (d,  $J^3 = 5.5$  Hz); 131.10; 128.58 (2C); 125.19 (d,  $J^f = 3.5$  Hz); 124.63 (d,  $J^2 = 17.8$  Hz); 122.27; 116.78 (2C); 116.11 (d,  $J^2 = 21.8$  Hz); 52.54; 52.48 (2C); 47.96 (2C); 35.99. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}$ : C 59.85%, H 5.02%, N 7.35%. Found: C 59.76%, H 5.16%, N 7.27%.

**1-(4-chloro-3-fluorophenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one**

**(41).** Yield: 50%. mp: 135-136 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1679 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1311 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1249 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1138 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1115 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1067 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.04 (d, 2H, **H**<sub>3'</sub> + **H**<sub>5'</sub>,  $J_{3'-2'} = 9.2$  Hz); 7.99 (dd, 1H, **H**<sub>2</sub>,  $J_{2-F} = 10.0$  Hz,  $J_{2-6} = 1.1$  Hz); 7.86 (dd, 1H, **H**<sub>6</sub>,  $J_{6-5} = 8.0$  Hz,  $J_{6-2} = 1.2$  Hz); 7.77 (dd, 1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-F} = 8.6$  Hz,  $J_{5-6} = 7.8$  Hz); 7.03 (d, 2H, **H**<sub>2'</sub> + **H**<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 9.3$  Hz); 3.48-3.38 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>); 3.27 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.0$  Hz); 2.73 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.0$  Hz); 2.58-2.52 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.33; 157.19 (d,  $J^1 = 248.1$  Hz); 154.63; 137.35 (d,  $J^3 = 5.4$  Hz); 136.74; 131.01; 125.61 (2C); 125.10 (d,  $J^3 = 3.6$  Hz); 124.55 (d,  $J^2 = 17.7$  Hz); 116.07 (d,  $J^2 = 21.8$  Hz); 112.50 (2C); 52.32; 52.15 (2C); 46.19 (2C); 35.87. Anal. Calc. for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClFN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 58.24%, H 4.89%, N 10.72%. Found: C 58.00%, H 5.11%, N 10.66%.

**3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propan-1-one**

**(42).** Yield: 12%. mp: 68-69 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1691 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1168 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1129 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1066 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.07 (d, 2H, **H**<sub>2</sub> + **H**<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.1$  Hz); 7.74 (d, 2H, **H**<sub>3</sub> + **H**<sub>5</sub>,  $J_{3-2} = 8.1$  Hz); 6.96 (dd, 2H, **H**<sub>3'</sub> + **H**<sub>5'</sub>,  $J_{3'-F} = 10.0$  Hz,  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 6.87 (dd, 2H, **H**<sub>2'</sub> + **H**<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 9.0$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.6$  Hz); 3.24 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>,  $J = 7.2$  Hz); 3.15-3.08 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>); 2.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.2$  Hz); 2.72-2.63 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.02; 157.18 (d,  $J^1 = 238.9$  Hz); 147.84 (d,  $J^4 = 2.2$  Hz); 139.50 (q,  $J^5 = 1.2$  Hz); 134.42 (q,  $J^2 = 32.6$  Hz); 128.33 (2C); 125.72 (2C, q,  $J^3 = 3.8$  Hz); 123.54 (q,  $J^1 = 272.6$  Hz); 117.83 (2C, d,  $J^3 = 7.6$  Hz); 115.15 (2C, d,  $J^2 = 22.0$  Hz); 53.26, 52.85 (2C); 50.14 (2C); 36.65. Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O: C 63.15%, H 5.30%, N 7.36%. Found: C 63.25%, H 5.64%, N 7.23%.

**1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (43).** Yield: 7%. mp: 89-90 °C. IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1694 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1167 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1134 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1114 (s,  $\nu_{C-F}$ ); 1068 (s,  $\nu_{C-F}$ ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.07 (d, 2H, **H**<sub>2</sub> + **H**<sub>6</sub>,  $J_{2-3} = 8.1$  Hz); 7.75 (d, 2H, **H**<sub>3</sub> + **H**<sub>5</sub>,  $J_{3-2} = 8.2$  Hz); 7.48 (d, 2H, **H**<sub>3'</sub> + **H**<sub>5'</sub>,  $J_{3'-2'} = 8.9$  Hz); 6.92 (d, 2H, **H**<sub>2'</sub> + **H**<sub>6'</sub>,  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz); 3.30-3.21 (m, 6H, CO-CH<sub>2</sub> + 4**H**<sub>p</sub>); 2.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N,  $J = 7.2$  Hz); 2.71-2.61 (m, 4H, 4**H**<sub>p</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.95; 153.16 (q,  $J^5 = 1.4$  Hz); 139.46 (q,  $J^5 = 1.1$  Hz); 134.46 (q,  $J^2 = 32.6$  Hz); 128.34 (2C); 126.36 (2C, q,  $J^3 = 3.6$  Hz); 125.75 (2C, q,  $J^3 = 3.6$  Hz); 124.69 (q,  $J^1 = 270.7$  Hz); 123.53 (q,  $J^1 = 272.6$  Hz); 120.55 (q,  $J^2 = 32.5$  Hz); 114.52 (2C); 52.96; 52.81 (2C); 47.93 (2C); 36.62. Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O: C 58.60%, H 4.68%, N 6.51%. Found: C 58.76%, H 4.94%, N 6.73%.



**3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propan-1-one (44).** Yield: 3%. mp: 88-89 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1688 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1173 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1126 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1065 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.07 (d, 2H,  $\text{H}_2 + \text{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.1$  Hz); 7.74 (d, 2H,  $\text{H}_3 + \text{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.2$  Hz); 7.20 (d, 2H,  $\text{H}_3' + \text{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 9.1$  Hz); 6.83 (d, 2H,  $\text{H}_2' + \text{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 9.1$  Hz); 3.24 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 3.19-3.14 (m, 4H,  $4\text{H}_p$ ); 2.91 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.70-2.64 (m, 4H,  $4\text{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.00; 149.77; 139.47 (q,  $J^5 = 1.4$  Hz); 134.45 (q,  $J^2 = 32.7$  Hz); 128.94 (2C); 128.34 (2C); 125.74 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.63; 123.54 (q,  $J^1 = 273.0$  Hz); 117.25 (2C); 53.11; 52.82 (2C); 49.11(2C); 36.61. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}$ : C 60.53%, H 5.08%, N 7.06%. Found: C 60.52%, H 5.40%, N 6.82%.

**3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propan-1-one (45).** Yield: 29%. mp: 103-104 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1686 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1597 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1311 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1163 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1137 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1115 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.10 (d, 2H,  $\text{H}_3' + \text{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 9.4$  Hz); 8.07 (d, 2H,  $\text{H}_2 + \text{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.8$  Hz); 7.74 (d, 2H,  $\text{H}_3 + \text{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.2$  Hz); 6.81 (d, 2H,  $\text{H}_2' + \text{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 9.5$  Hz); 3.44-3.39 (m, 4H,  $4\text{H}_p$ ); 3.24 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 2.91 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.1$  Hz); 2.68-2.63 (m, 4H,  $4\text{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.81; 154.72, 139.38 (q,  $J^5 = 1.2$  Hz); 138.42; 134.45 (q,  $J^2 = 32.7$  Hz); 128.31 (2C); 125.89 (2C); 125.73 (2C, q,  $J^3 = 3.8$  Hz); 123.49 (q,  $J^1 = 272.7$  Hz); 112.63 (2C); 52.69 (3C); 46.93 (2C); 36.57. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$ : C 58.96%, H 4.95%, N 10.31%. Found: C 58.71%, H 4.94%, N 10.22%.

**3-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)propan-1-one dihydrochloride (46).** Yield: 12%. mp: 163-164 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 2361 (s, HCl); 1688 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1172 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 11.33-10.91 (bs, 2H, 2HCl); 8.17 (d, 2H,  $\text{H}_2 + \text{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.7$  Hz); 7.58 (d, 2H,  $\text{H}_3 + \text{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.7$  Hz); 7.11 (dd, 2H,  $\text{H}_3' + \text{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 9.3$  Hz,  $J_{3'-F} = 8.8$  Hz); 7.05 (dd, 2H,  $\text{H}_2' + \text{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 9.2$  Hz,  $J_{2'-F} = 4.7$  Hz); 3.80-3.71 (m, 4H,  $2\text{H}_p + \text{CO-CH}_2$ ); 3.69-3.61 (m, 2H,  $2\text{H}_p$ ); 3.55-3.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 3.27-3.07 (m, 4H,  $4\text{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 195.43; 156.62 (d,  $J^1 = 236.8$  Hz); 151.79 (m); 146.32 (d,  $J^4 = 1.1$  Hz); 134.77; 130.54 (2C); 120.83 (2C); 119.85 (q,  $J^1 = 257.5$  Hz); 117.91 (2C, d,  $J^3 = 7.7$  Hz); 115.46 (2C, d,  $J^2 = 22.0$  Hz); 50.79 (2C); 50.42; 46.16 (2C); 32.96. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ : C 51.19%, H 4.73%, N 5.97%. Found: C 51.24%, H 4.85%, N 5.84%.

**1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (47).** Yield: 22%. mp: 66-67 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1694 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ );

1177(s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1110 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1068 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.14 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.7$  Hz); 7.55-7.47 (m, 4H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5 + \mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ); 7.06 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.5$  Hz); 3.30-3.21 (m, 6H, CO- $\text{CH}_2 + 4\mathbf{H}_p$ ); 2.73 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.0$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.06; 153.23; 151.50 (q,  $J^3 = 1.7$  Hz); 135.57; 130.48 (2C); 126.11 (2C, q,  $J^3 = 3.7$  Hz); 124.99 (q,  $J^1 = 270.3$  Hz); 120.73 (2C); 119.90 (q,  $J^1 = 257.7$  Hz); 117.79 (q,  $J^2 = 32.0$  Hz); 114.11 (2C); 52.60; 52.35 (2C); 46.93 (2C); 35.90. Anal. Calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_2$ : C 56.50%, H 4.52%, N 6.28%. Found: C 56.54%, H 4.76%, N 6.27%.

**3-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)propan-1-one (48)**. Yield: 8%. mp: 69-70 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1685 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1174 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1103 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.13 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.6$  Hz); 7.50 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.3$  Hz); 7.21 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 8.8$  Hz); 6.93 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 8.8$  Hz); 3.26 (t, 2H, CO- $\text{CH}_2$ ,  $J = 6.8$  Hz); 3.15-3.05 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ); 2.72 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 6.9$  Hz); 2.59-2.52 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.94; 151.38 (q,  $J^3 = 1.5$  Hz); 149.71; 135.51; 130.38 (2C); 128.46 (2C); 122.15; 120.63 (2C); 116.66 (2C); 119.82 (q,  $J^1 = 257.5$  Hz); 52.55; 52.42 (2C); 47.88 (2C); 35.86. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2$ : C 58.19%, H 4.88%, N 6.79%. Found: C 57.81%, H 4.98%, N 6.53%.

**3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)-1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)propan-1-one (49)**. Yield: 35%. mp: 100-101 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1684 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1326 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1243 (s,  $\nu_{\text{N-O}}$ ); 1170 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1113 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.14 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.7$  Hz); 8.05 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3' + \mathbf{H}_5'$ ,  $J_{3'-2'} = 9.4$  Hz); 7.52 (d, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-2} = 8.5$  Hz); 7.04 (d, 2H,  $\mathbf{H}_2' + \mathbf{H}_6'$ ,  $J_{2'-3'} = 9.6$  Hz); 3.48-3.41 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ); 3.28 (t, 2H, CO- $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 2.74 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.1$  Hz); 2.59-2.53 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 198.00; 154.71; 151.50 (q,  $J^3 = 1.5$  Hz); 136.82; 135.54; 130.47 (2C); 125.69 (2C); 120.73 (2C); 119.90 (q,  $J^1 = 257.6$  Hz); 112.58 (2C); 52.46; 52.21 (2C); 46.25 (2C); 35.85. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ : C 56.74%, H 4.76%, N 9.92%. Found: C 56.98%, H 4.73%, N 9.99%.

**General method B: procedure for the synthesis of compounds 18-21 by nucleophilic substitution:** The corresponding alkyl halide (10 mmol), the appropriate piperazine (15 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 mmol) were dissolved in 40 mL of THF and kept under stirring at room temperature for 72 hours. The product formation was checked out by TLC. The product was extracted with DCM. The organic extract was washed with

water, filtered off, dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under reduced pressure. The obtained product was purified by precipitation with diethyl ether or by Flash chromatography.

**1-(4-fluorophenyl)-3-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (18).**

Yield: 3%. mp: 62-63 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1677 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1155 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1136 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.01 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.9$  Hz,  $J_{2-F} = 5.4$  Hz); 7.14 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-F} = 10.4$  Hz,  $J_{3-2} = 8.5$  Hz); 7.01 (ddd, 1H,  $\mathbf{H}_{3'}$ ,  $J_{3'-4'} = 8.0$  Hz,  $J_{3'-5'} = 6.6$  Hz,  $J_{3'-6'} = 2.5$  Hz); 6.96-6.89 (m, 2H,  $\mathbf{H}_4 + \mathbf{H}_5'$ ); 6.86 (dd, 1H,  $\mathbf{H}_{6'}$ ,  $J_{6'-5'} = 8.0$  Hz,  $J_{6'-4'} = 1.2$  Hz); 3.86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.28 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 3.21-3.10 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ); 2.99 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.86-2.74 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.13; 165.80 (d,  $J^1 = 254.9$  Hz); 152.22; 140.92; 133.20 (d,  $J^4 = 3.2$  Hz); 130.70 (2C, d,  $J^3 = 9.4$  Hz); 123.14; 120.99; 118.27; 115.75 (2C, d,  $J^2 = 21.8$  Hz); 111.18; 55.36; 53.37 (2C); 53.02 (2C); 50.22, 35.77. Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_2$ : C 70.15%, H 6.77%, N 8.18%. Found: C 69.87%, N 7.05% H 7.89%.

**1-(4-fluorophenyl)-3-(4-(2-fluorophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (19).**

Yield: 2% mp: 65-66%. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1678 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1152 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1137 (s,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.02 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.9$  Hz,  $J_{2-F} = 5.4$  Hz); 7.15 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-F} = 9.5$  Hz,  $J_{3-2} = 8.6$  Hz); 7.09-6.91 (m, 4H,  $\mathbf{H}_{3'} - \mathbf{H}_{6'}$ ); 3.31 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 3.23-3.15 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ); 3.02 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.87-2.75 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 196.88; 165.84 (d,  $J^1 = 255.1$  Hz); 155.68 (d,  $J^1 = 245.9$  Hz); 139.65 (2C, d,  $J^3 = 8.4$  Hz); 133.10 (d,  $J^3 = 3.0$  Hz); 130.72 (d,  $J^2 = 9.4$  Hz); 124.48 (d,  $J^4 = 3.6$  Hz); 122.77 (d,  $J^3 = 7.9$  Hz); 119.00 (d,  $J^4 = 2.9$  Hz); 116.13 (d,  $J^2 = 20.7$  Hz); 115.79 (2C, d,  $J^2 = 21.9$  Hz); 53.19 (2C); 52.92 (2C); 49.97, 35.62. Anal. Calc. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{F}_2\text{O}$ : C 69.07%, H 6.10%, N 8.48%. Found: C 69.20%, H 6.49%, N 8.23%.

**1-(4-fluorophenyl)-3-(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (20).**

Yield: 18%. mp: 85-86 °C. IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 1681 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1152 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ); 1131 (m,  $\nu_{\text{C-F}}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.00 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_6$ ,  $J_{2-3} = 8.8$  Hz,  $J_{2-F} = 5.4$  Hz); 7.14 (dd, 2H,  $\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}_5$ ,  $J_{3-F} = 10.0$  Hz,  $J_{3-2} = 8.6$  Hz); 6.90 (d, 2H,  $\mathbf{H}_{3'} + \mathbf{H}_{5'}$ ,  $J_{3'-2'} = 9.1$  Hz); 6.84 (d, 2H,  $\mathbf{H}_{2'} + \mathbf{H}_{6'}$ ,  $J_{2'-3'} = 9.1$  Hz); 3.77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.21 (t, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 3.14-3.06 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ); 2.90 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $J = 7.3$  Hz); 2.73-2.64 (m, 4H,  $4\mathbf{H}_p$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.40; 165.76 (d,  $J^1 = 254.7$  Hz); 153.84; 145.57; 133.30 (d,  $J^4 = 2.8$  Hz); 130.66 (2C, d,  $J^3 = 9.4$  Hz); 118.23 (2C); 115.74 (2C, d,  $J^2 = 21.9$  Hz); 114.40 (2C); 55.54; 53.37 (2C); 53.06; 50.58 (2C); 36.15.

Anal. Calc. for  $C_{20}H_{23}FN_2O_2$ : C 70.15%, H 6.77%, N 8.18%. Found: C 70.19%, H 7.06%, N 7.98%.

**1-(4-fluorophenyl)-3-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)propan-1-one (21).** Yield: 12%. mp: 136-137 °C. IR (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 1674 (s,  $\nu_{C=O}$ ); 1486 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1320 (s,  $\nu_{N-O}$ ); 1115 (s,  $\nu_{C-F}$ ).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 8.11 (d, 2H,  $H_{3'}$  +  $H_{5'}$ ,  $J_{3'-2'} = 8.7$  Hz); 8.00 (dd, 2H,  $H_2$  +  $H_6$ ,  $J_{2-3} = 8.5$  Hz,  $J_{2-F} = 5.5$  Hz); 7.15 (dd, 2H,  $H_3$  +  $H_5$ ,  $J_{3-F} = 9.5$  Hz,  $J_{3-2} = 8.4$  Hz); 6.81 (d, 2H,  $H_{2'}$  +  $H_{6'}$ ,  $J_{2'-3'} = 8.9$  Hz); 3.46-3.38 (m, 4H,  $4H_p$ ); 3.19 (t, 2H, CO- $CH_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 2.90 (t, 2H,  $CH_2$ -N,  $J = 7.1$  Hz); 2.69-2.62 (m, 4H,  $4H_p$ ).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 197.12; 165.79 (d,  $J^1 = 255.2$  Hz); 154.75; 138.49; 133.25 (d,  $J^1 = 3.0$  Hz); 130.63 (2C, d,  $J^3 = 9.3$  Hz); 125.90 (2C); 115.77 (2C, d,  $J^2 = 21.9$  Hz); 112.65 (2C); 52.90; 52.71 (2C); 46.99 (2C); 36.15. Anal. Calc. for  $C_{19}H_{20}FN_3O_3$ : C 63.85%, H 5.64%, N 11.76%. Found: C 63.46%, H 5.98%, N 11.38%.

## BIOLOGY

### ***In vitro* Trypanocidal Evaluation**

#### **Parasite Strain Culture.**

Three different *T. cruzi* strains were evaluated in this work: *T. cruzi* SN3 strain (IRHOD/CO/2008/SN3, DTU I), isolated from domestic *Rhodnius prolixus* from Guajira, Colombia<sup>46</sup>; *T. cruzi* Arequipa strain (MHOM/Pe/2011/ Arequipa, DTU V), isolated from Human from Arequipa, Peru; and *T. cruzi* Tulahuen strain (TINF/CH/1956/Tulahuen, DTU VI) isolated from Tulahuen, Chile.

Epimastigote culture forms were grown at 28°C in RPMI (Gibco®) with 10% (v/v) fetal bovine serum (heat-inactivated), 0.5% (w/v) trypticase (BBL) and 0.03 M hemin<sup>47</sup>.

#### ***In vitro* activity assays: Epimastigote Forms (Extracellular Forms)**

*T. cruzi* epimastigotes (strains SN3, Arequipa and Tulahuen) were collected in the exponential growth phase by centrifugation at 400 g for 10 min. The compounds to be tested and the reference drug (BZN) were dissolved in DMSO (Panreac, Barcelona, Spain) at a concentration of 0.01% (v/v) and assayed as nontoxic or inhibitory effects on parasite growth. Trypanocidal activity was determined with the method described by Rolón et al<sup>48</sup>, with certain modifications in our lab. The assays were performed in microtiter plates (96-well plates) by seeding the parasites at  $5 \times 10^5$   $mL^{-1}$ , and after the addition of the compounds at dosages of 100 to 0.2  $\mu M$ , cultured at 200- $\mu L$ /well

volumes at 28°C. Growth controls and BZN were also included. After 48 h of incubation, 20 µL (0.125 mg·mL<sup>-1</sup>) of Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich) was added and the plates were incubated for a further 24 h. Finally, 5 µL (10% w/v) of sodium dodecyl sulfate (SDS) were added and, after 10 min, the trypanocidal activity of the compounds on the plates was assessed by absorbance measurement (Sunrise, TECAN) at 570 and 600 nm<sup>49</sup>. The trypanocidal effect was determined using GraphPad Prism and it is expressed as IC<sub>50</sub>, i.e. the concentration required to result in 50% inhibition. Each drug concentration was tested in triplicate of four separate determinations.

### **Cell culture and Cytotoxicity test on Vero cells**

Vero cells (EACC number 84113001) from monkey kidney were grown in humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C in RPMI (Gibco®) with 10% (v/v) fetal bovine serum (heat-inactivated)<sup>50</sup>.

Vero cells were collected first by trypsinization and then by centrifugation at 400 g for 10 min. The compounds to be tested and the reference drug (BZN) were dissolved in DMSO (Panreac, Barcelona, Spain) at a concentration of 0.01% (v/v) and assayed as nontoxic or inhibitory effects on cells growth. Cytotoxicity against Vero cells was assessed using microtiter plates (96-well plates) by seeding the cells at 1.25 × 10<sup>4</sup> mL<sup>-1</sup>, and after the addition of the compounds at dosages of 1000 to 1 µM, cultured at 200-µL/well volumes. Growth controls and BZN were also included. After 48 h of incubation, 20 µL (0.125 mg·mL<sup>-1</sup>) of Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich) was added and the plates were incubated for a further 24 h. Finally, 5 µL (10% w/v) of sodium dodecyl sulfate (SDS) were added and, after 10 minutes, the trypanocidal activity of the compounds on the plates was assessed by absorbance measurement (Sunrise, TECAN) at 570 and 600 nm<sup>49</sup>. The trypanocidal effect was determined using GraphPad Prism and is expressed as IC<sub>50</sub>, i.e. the concentration required to result in 50% inhibition. Each drug concentration was tested in triplicate of four separate determinations.

### ***In vitro* activity assays: Amastigote Forms (Intracellular Forms) - Infected cells.**

Vero cells (EACC number 84113001) from monkey kidney were grown in humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C in RPMI (Gibco®) with 10% (v/v)

fetal bovine serum (heat-inactivated) <sup>50</sup> and were collected first by trypsinization and then by centrifugation at 400 g for 10 min.

The assays were performed in microtiter plates (24-well plates) by seeding the Vero cells at  $1 \times 10^4$  well with rounded coverslips on the bottom. 24 h later the cells were infected with culture-derived trypomastigotes of *T. cruzi* (strains SN3, Arequipa and Tulahuen) at a multiplicity of infection (MOI) ratio of 10:1 during 24 h. The non-phagocytosed parasites were removed by washing, and after the addition of the compounds at dosages of 100 to 0.2  $\mu\text{M}$ , cultured at 500-  $\mu\text{L}$ /well volumes in humidified 95% air, 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 37°C. Growth controls and BZN were also included. The compounds to be tested and the reference drug (BZN) were dissolved in DMSO (Panreac, Barcelona, Spain) at a concentration of 0.01% (v/v) and assayed as nontoxic or inhibitory effects on cells and parasite growth. After 72 h of incubation, the trypanocidal effect was assessed on the basis of number of amastigotes and infected cells in treated and untreated cultures in metanol-fixed and Giemsa-stained preparations. The number of amastigotes and infected cells was established by analyzing 500 host cells distributed in randomly chosen microscopic fields. The trypanocidal effect was determined using GraphPad Prism and is expressed as  $\text{IC}_{50}$ , i.e. the concentration required to result in 50% inhibition. Each drug concentration was tested in triplicate of four separate determinations.

#### **Transformation of epimastigotes to metacyclic forms.**

*T. cruzi* strains SN3, Arequipa and Tulahuen were grown as epimastigote forms at 28°C. Metacyclic trypomastigotes (aged epimastigote cultures) were induced by culturing a 7-day-old culture of epimastigote forms in Grace's Insect Medium (Gibco®) with 10% (v/v) fetal bovine serum (heat-inactivated) at 28°C for 7 days <sup>51</sup>. Then, the parasites were harvested by centrifugation at 400 g for 10 min and incubated at a density of  $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$  in TAU medium (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 8 mM phosphate buffer, pH 6.0) for 2 h at 28°C. Thereafter, the parasites were incubated at a density of  $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  in TAU3AAG medium (TAU supplemented with 10 mM L-proline, 50 mM L-sodium glutamate, 2 mM L-sodium aspartate and 10 mM D-glucose) for 4 days at 28°C <sup>52</sup>. Subsequently, this metacyclic trypomastigotes were used to infect Vero cells in <sup>53</sup>humidified 95% air, 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 37°C in RPMI (Gibco®) with 10% (v/v) fetal bovine serum (heat-inactivated) for 5 to 7 days <sup>53</sup>.

Finally, the culture-derived trypomastigotes were collected by centrifugation at 3000 g for 5 min and used to infect Balb/c albino mice.

### ***In vitro* activity assays: Trypomastigote Forms (Extracellular Forms)**

*T. cruzi* blood trypomastigotes (strain SN3, Arequipa and Tulahuén) were obtained by cardiac puncture from Balb/c albino mice during the parasitaemia peak after infection and diluted with RPMI (Gibco®) with 10% (v/v) fetal bovine serum (heat-inactivated). Trypanocidal activity was determined with the method described by Faundez et al.<sup>54</sup>, with certain modifications in our lab. The assays were performed in microtiter plates (96-well plates) by seeding the parasites at  $2 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>, and after the addition of the compounds at dosages of 50 to 0.2  $\mu$ M, cultured at 200  $\mu$ L/well volumes in humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Growth controls and BZN were also included. The compounds to be tested and the reference drug (BZN) were dissolved as above. After 24 hours of incubation, 20  $\mu$ L (0.125 mg·mL<sup>-1</sup>) of Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich) was added and the plates were incubated for 4 h. Finally, 5  $\mu$ L (10% w/v) of sodium dodecyl sulfate (SDS) were added and, after 10 min, the trypanocidal activity of the compounds on the plates was assessed by absorbance measurement (Sunrise, TECAN) at 570 and 600 nm<sup>49</sup>. The trypanocidal effect was determined using GraphPad Prism and is expressed as IC<sub>50</sub>, i.e. the concentration required to result in 50 % inhibition. Each drug concentration was tested in triplicate of four separate determinations.

### ***In vitro* genotoxicity screening- SOS/umu assay.**

*Bacteria:* *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 was purchased from the German Collection for Microorganisms and Cell cultures (DSMZ). *Chemicals:* ampicillin, DMSO, dextrose, KCl,  $\beta$ -mercaptoethanol, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, *o*-nitrophenol- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), and SDS were purchased from Sigma-Aldrich. *Biological:* Bactotryptone was purchased from BD and the external metabolic activation system (rat S9 mix) Mutazyme™ was purchased from Moltox.

*Reagents preparation:* Bactotryptone (10 g), dextrose (2 g) and NaCl (5 g) were dissolved in 1 L of water to prepare TGA culture media for growing bacteria; it was sterilized for 20 minutes at 121°C. B-buffer was prepared dissolving KCl (0.75 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.25g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (20.18 g), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (5.5 g), SDS (1.0 g)

and  $\beta$ -mercaptoethanol (2.7 mL) in 1 L of water. The pH was adjusted to 7.0. To prepare the stop reagent  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (106 g) was dissolved in 1 L of water. Phosphate buffer was prepared dissolving  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.186 g) and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.460 g) in 100 mL water and adjusting at pH 7.0. ONPG solution was obtained dissolving ONPG (45 mg) in 10 mL of phosphate buffer previously prepared.

*SOS/umu assay:* The genotoxicity screening by SOS/umu assay was performed in accordance to previously described methods taking into account some adjustments<sup>55, 56</sup>. With the aim of obtaining a bacterial exponential growth, *S. typhimurium TAI535/pSK1002* was pre-incubated overnight at 37°C with stirring in TGA culture media with ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) before incubate them in TGA medium without ampicillin in the same conditions during 2 hours at an optimal density (absorbance of 0.15-0.4 at 600 nm). With the purpose of assess the possible genotoxic effects of any metabolite, this assay was carried out in presence and absent of rat S9 mix. Positive and negatives controls were evaluated in each assay; 2-aminofluorene (2-AF) and 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO) were used as positive controls in the presence and absence of S9 mix respectively and DMSO was used as solvent control. Procedure: A stock solution of each compound at 40 mg/mL in DMSO was prepared (for a final testing concentration of 1 mg/mL). Then 11 serial dilutions at half concentration were prepared in a 96-well plate by mixing 10  $\mu\text{L}$  of each concentration with 10  $\mu\text{L}$  of DMSO. Plate A: The final volume per well was 10  $\mu\text{L}$  of each concentration of the compound (controls) and 70  $\mu\text{L}$  of water were added. After that, plates B were prepared as follow. Plate B1 (for the assay with S9 mix): 10  $\mu\text{L}$  S9 mix, then 25  $\mu\text{L}$  of each previously prepared compound and 90  $\mu\text{L}$  of bacterial exponential growth were added to each well. Plate B2 (for the assay without S9 mix): 10  $\mu\text{L}$  PBS, then 25  $\mu\text{L}$  of each previously prepared compound and 90  $\mu\text{L}$  of bacterial exponential growth were added to each well. Plates B1 and B2 were incubated at 37°C with stirring for 4 hours. Absorbance at 600 nm ( $\text{Abs}_{600}$ ) was measured after the incubation to check the toxicity of the compounds. The compounds toxicity on *S. typhimurium TAI535/pSK1002* was determined according to:

$$\text{Survival percentage} = (\text{Abs}_{600} \text{ of each concentration assessed} / \text{Abs}_{600} \text{ media of negative control}) * 100$$

Subsequently, the  $\beta$ -galactosidase activity expressed as relative units (RU) was determinate in two additional 96-well plates (plates C). Plate C1: 150  $\mu\text{L}$  of ONPG solution and 30  $\mu\text{L}$  of the contents of each well of plate B1 were added to each well.



Plate C2: 150  $\mu$ L of ONPG solution and 30  $\mu$ L of the contents of each well of plate B2 were added to each well. Plates C1 and C2 were incubated at 28°C with stirring for 30 minutes, protecting them from the light. After the incubation time, 120  $\mu$ L of stop reagent was added and absorbance at 420 nm (Abs<sub>420</sub>) was measured immediately. The  $\beta$ -galactosidase activity (RU) and the induction factor (IF) were determined according to:

RU= Abs<sub>420</sub>/Abs<sub>600</sub> of each concentration assessed.

IF= RU of each concentration assessed/ (media Abs<sub>420</sub>/media Abs<sub>600</sub> of negative control).

The assay is considered valid if the positive controls (calculated for both positive controls) reached an IF  $\geq 2$  under established assay conditions. Well in which compound precipitation was observed, were discarded from assay. So, a compound was considered genotoxic if exhibit an IF  $\geq 2$  at non cytotoxic concentration with a bacterial survival percentage  $\geq 80\%$  in any of the conditions evaluated (with or without metabolic activation), showing a dose-response relationship.

### ***In vivo* Trypanocidal Activity Assays**

#### **Mice**

These experiments were approved by the University of Granada Ethics Committee on Animal Experimentation (RD53/2013) and performed under the rules and principles of the international guide for biomedical research in experimental animals.

Female BALB/c mice (8-10 weeks old and 20-25 g) were used to perform these experiments, maintained under standard conditions (12 h dark/light cycle and 22 $\pm$ 3°C temperature) and provided with water and standard chow *ad libitum*.

#### **Mice infection and Treatment**

Groups of six mice were infected via intraperitoneal (i.p.) inoculation with 5 x 10<sup>5</sup> bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* Arequipa strain (obtained from previously infected mice with metacyclic trypomastigotes) in 0.2 mL PBS.

The mice were divided as follow: 0, negative control group (uninfected and untreated); I, positive control group (infected and untreated); II, Bzn group (infected and treated with BZN); III, study group (infected and treated with the compounds under study).

BZN and the compounds under study were prepared at 2 mg mL<sup>-1</sup> as an aqueous suspension vehicle containing 5% (v/v) DMSO and 0.5% (w/v) hydroxypropyl methylcellulose<sup>57</sup>.

Drugs were administered by oral route (~200 µL) once day for 5 consecutive days, and vehicle only was administered to negative and positive control groups. Therefore, doses of 20 mg·kg<sup>-1</sup> per day were administered for 5 consecutive days. The administration of the tested compounds was initiated on the 10<sup>th</sup> day post-infection (once the infection was confirmed) for the mice treated in acute phase and on the 75<sup>th</sup> day post-infection (it is established that the animals entered the chronic phase of the experiment) for the mice treated in chronic phase.

### **Parasitemia levels in acute phase treatment**

Peripheral blood of each mice treated in acute phase was obtained from the mandibular vein (5 µL samples) and diluted to 1:100 in PBS. The number of bloodstream trypomastigotes (parasitemia levels) was quantified every 2 or 3 days from 7<sup>th</sup> day post-infection until the day the parasitemia was not detected. This counting was performed using a Neubauer chamber, and the number of bloodstream trypomastigotes found was expressed as parasites/mL<sup>58</sup>.

### **Cyclophosphamide-induced Immunosuppression**

After 100<sup>th</sup> day post-infection, the groups of mice treated, in acute and chronic phase and whose parasitemia levels were significantly decreased, were submitted for a maximum of 3 cycles of immunosuppression with cyclophosphamide monohydrate (CP) (ISOPAC®) as follow: 1 i.p injection by 4 consecutive days with a dose of 200 mg kg<sup>-1</sup> per day, followed by 3 days off<sup>57</sup>. The efficacy of such an immunosuppression procedure for assessing cryptic infection was verified by the high parasitemia in chronically untreated mice.

Within 1 week after the last CP injection, parasitemia was evaluated according the procedure described for parasitemia levels in acute phase to quantify the presence or absence of bloodstream trypomastigotes as reactivation rate.

### **Organs DNA extraction, PCR and electrophoresis**

After cyclophosphamide-induced immunosuppression, mice were bled out, under gaseous anesthesia (CO<sub>2</sub>), via heart puncture and blood was collected.

Thanks to our previous *in vivo* studies with *T. cruzi* Arequipa strain, we observed that his tropism occurs in the following organs: adipose, bone marrow, brain, esophagus, heart, lung, muscle, spleen and stomach. Therefore, these 9 organs were harvested and immediately perfused with pre-warmed PBS to avoid contamination of tissue with blood trypomastigotes. In addition, spleens were weighed to evaluate inflammation of these organs in different groups of mice. Finally, these target organs were thawed and grinded using a Potter-Elvehjem and DNA extraction was performed using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) <sup>58</sup>.

Polymerase chain reactions (PCR) were carried out based on the published sequence of enzyme superoxide dismutase *T. cruzi* CL Brenner (GenBank accession No. XM\_808937) according to two primers designed in our laboratory (unpublished data), that allow the detection of *T. cruzi* DNA in different biological samples. This primers amplifies a fragment belonging to superoxide dismutase gene b of *T. cruzi* of approximately 300 pairs of bases (pb). The amplifications were performed in Thermal Cycler TM MyCycler thermal cycler (BioRad) with the following reaction mixture: 1  $\mu$ L of DMSO, 200 nM iSODd, 200 nM iSODr, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 0.1% Triton X-100, 100 mM of each dNTP, 0.5 U of Taq DNA polymerase, 1  $\mu$ g of DNA, and HPLC water, with a final volume of 20  $\mu$ L; and with the following routine: 95°C/3 min, 30 cycles of 95°C/30 s, 55.5°C/45 s, 72°C/30 s, and 72°C/7 min.

Lastly, the amplification products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gel during 90 min at 90 V, containing 1:10000 of GelRed nucleic acid gel stain.

### **ELISA tests**

Serum samples were obtained 2 days after treatment, 1 day before immunosuppression and on the day of necropsy for the mice treated in acute phase, and 2 days after treatment and on the day of necropsy (sera post-immunosuppression) for the mice treated in chronic phase.

To obtain the serum, blood was incubated in a glass tube for 2 hours at 37 °C in order to allow clotting and then 16 h at 4°C for the retraction of the clot. The serum was collected and centrifugated at 2700 g for 20 min at 4°C. The serum was used for ELISA and biochemical analysis as explained further on in this paper. SOD from the parasites, extracted and purified as described subsequently, was used as antigen fraction.

Circulating antibodies in serum against *T. cruzi* Arequipa strain were qualitatively and quantitatively evaluated using an ELISA. The serum from whole blood was diluted to 1:80 in PBS and all the serum samples were analyzed in triplicate in polystyrene 96-well microtiter plates. Absorbance was read at 492 nm using a microplate reader (Sunrise, TECAN). Mean and standard deviations of the optical densities of the negative control sera were used to calculate the cut off value (mean plus three times the standard deviation)<sup>58</sup>.

#### **Toxicity tests by biochemical analysis**

Serum samples were obtained 2 days after treatment and on the day of necropsy (sera post-immunosuppression) both for mice treated in acute phase as in chronic phase.

These sera were sent to the Biochemical service in the University of Granada, where a series of parameters were measured using commercial kits from Cromakit® by BS-200 Chemistry Analyzer Shenzhen Mindray (Bio-medical Electronics Co., LTD).

Mean value and standard deviation were calculated using the levels obtained for different populations of sera ( $n = 15$ ,  $n = 6$ ), and the confidence interval for the mean normal populations were also calculated based on a confidence level of 95% ( $100 \times (1 - \alpha) = 100 \times (1 - 0.05)$ ).

#### **Studies of the mechanism of action. Ongoing.**

#### **Docking study. Ongoing.**

#### **FINANCIAL SUPPORT**

This work has been carried out with the financial support of Fundación Caja Navarra (Project n. 70314), Fundación María Francisca de Roviralta, FIMA (Fundación para la Investigación Médica Aplicada; Project ISTUN-API-2011/01) and from the former Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) and now from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (project Consolider Ingenio CSD2010-00065). MJ is indebted to the University of Navarra for a grant. R.M-E. is grateful for a FPU Grant (FPU14/01537) from the Ministry of Education of Spain. AA thanks the Ministerio de Economía y Competitividad ('Ramón y Cajal' programme, 2013) of the Spanish Government for personal support.

## ASSOCIATED CONTENT

**Supporting Information.**

- S1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of newly synthesized compounds.
- S2. Results of the SOS/umu screening test.
- S3.  $^1\text{H}$  NMR spectra of the excretion products obtained after centrifugation of *T. cruzi* culture supernatants of epimastigotes.

## REFERENCES

- Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet* **2010**, 375, 1388-402.
- Coura, J. R.; Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* **2010**, 115, 5-13.
- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/chagas/en/> (08.06.16).
- Schmunis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2007**, 102 Suppl 1, 75-85.
- Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M. J.; Montgomery, S. P. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* **2011**, 24, 655-81.
- WHO. Weekly epidemiological record. <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf>
- Coura, J. R.; Dias, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104 Suppl 1, 31-40.
- WHO. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf) (15.06.16).
- Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E.; Franco-Paredes, C.; Ault, S. K.; Periago, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**, 2, e300.
- Osorio, L.; Rios, I.; Gutierrez, B.; Gonzalez, J. Virulence factors of Trypanosoma cruzi: who is who? *Microbes Infect* **2012**, 14, 1390-402.
- Teixeira, A. R.; Nascimento, R. J.; Sturm, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2006**, 101, 463-91.
- Messenger, L. A.; Miles, M. A.; Bern, C. Between a bug and a hard place: Trypanosoma cruzi genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2015**, 13, 995-1029.
- Teixeira, A. R.; Hecht, M. M.; Guimaro, M. C.; Sousa, A. O.; Nitz, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* **2011**, 24, 592-630.
- Flavia Nardy, A.; Freire-de-Lima, C. G.; Morrot, A. Immune Evasion Strategies of Trypanosoma cruzi. *J Immunol Res* **2015**, 2015, 178947.
- Chatelain, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen* **2015**, 20, 22-35.
- Molina, I.; Salvador, F.; Sanchez-Montalva, A. [Update Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2016**, 34, 132-8.
- Molina, I.; Gomez i Prat, J.; Salvador, F.; Trevino, B.; Sulleiro, E.; Serre, N.; Pou, D.; Roure, S.; Cabezos, J.; Valerio, L.; Blanco-Grau, A.; Sanchez-Montalva, A.; Vidal, X.; Pahissa, A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* **2014**, 370, 1899-908.
- FDA. Aprobación del Benznidazol por la FDA. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/209570lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf) (06.11.17).
- Estados Unidos aprueba el benznidazol para el tratamiento de niños con la enfermedad de Chagas. <https://www.dndi.org/2017/media-centre/langues-press-releases/fda-approves-benznidazole-chagas-children-es/> (09.10.17).
- Urbina, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* **2010**, 115, 55-68.
- Rodrigues Coura, J.; de Castro, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2002**, 97, 3-24.
- DNDi. Chagas Disease target product profile. <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-target-product-profile/> (10.08.16).

23. Porras, A. I.; Yadon, Z. E.; Altcheh, J.; Britto, C.; Chaves, G. C.; Flevaud, L.; Martins-Filho, O. A.; Ribeiro, I.; Schijman, A. G.; Shikanai-Yasuda, M. A.; Sosa-Estani, S.; Stobbaerts, E.; Zicker, F. Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, *9*, e0003697.
24. Bala, S.; Sharma, N.; Kajal, A.; Kamboj, S.; Saini, V. Mannich bases: an important pharmacophore in present scenario. *Int J Med Chem* **2014**, *2014*, 191072.
25. Roman, G. Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. *Eur J Med Chem* **2015**, *89*, 743-816.
26. Koksall, M.; Gokhan, N.; Kupeli, E.; Yesilada, E.; Erdogan, H. Analgesic and antiinflammatory activities of some new Mannich bases of 5-nitro-2-benzoxazolinones. *Arch Pharm Res* **2007**, *30*, 419-24.
27. Ivanova, Y.; Momekov, G.; Petrov, O.; Karaivanova, M.; Kalcheva, V. Cytotoxic Mannich bases of 6-(3-aryl-2-propenoyl)-2(3H)-benzoxazolones. *Eur J Med Chem* **2007**, *42*, 1382-7.
28. Gul, H. I.; Vepsalainen, J.; Gul, M.; Erciyas, E.; Hanninen, O. Cytotoxic activities of mono and bis Mannich bases derived from acetophenone against Renca and Jurkat cells. *Pharm Acta Helv* **2000**, *74*, 393-8.
29. Ashok, M.; Holla, B. S.; Poojary, B. Convenient one pot synthesis and antimicrobial evaluation of some new Mannich bases carrying 4-methylthiobenzyl moiety. *Eur J Med Chem* **2007**, *42*, 1095-101.
30. Gul, H. I.; Ojanen, T.; Vepsalainen, J.; Gul, M.; Erciyas, E.; Hanninen, O. Antifungal activity of some mono, bis and quaternary Mannich bases derived from acetophenone. *Arzneimittelforschung* **2001**, *51*, 72-5.
31. Sriram, D.; Banerjee, D.; Yogeewari, P. Efavirenz Mannich bases: synthesis, anti-HIV and antitubercular activities. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2009**, *24*, 1-5.
32. Roy, S.; Chetia, D.; Rudrapal, M.; Prakash, A. Synthesis and antimalarial activity study of some new Mannich bases of 7-chloro-4-aminoquinoline. *Med Chem* **2013**, *9*, 379-83.
33. Wenzel, I. N.; Wong, P. E.; Maes, L.; Muller, T. J.; Krauth-Siegel, R. L.; Barrett, M. P.; Davioud-Charvet, E. Unsaturated Mannich bases active against multidrug-resistant *Trypanosoma brucei* strains. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 339-51.
34. Lee, B.; Bauer, H.; Melchers, J.; Ruppert, T.; Rattray, L.; Yardley, V.; Davioud-Charvet, E.; Krauth-Siegel, R. L. Irreversible inactivation of trypanothione reductase by unsaturated Mannich bases: a divinyl ketone as key intermediate. *J Med Chem* **2005**, *48*, 7400-10.
35. Moreno-Viguri, E.; Jimenez-Montes, C.; Martin-Escolano, R.; Santivañez-Veliz, M.; Martin-Montes, A.; Azqueta, A.; Jimenez-Lopez, M.; Zamora Ledesma, S.; Cirauqui, N.; Lopez de Cerain, A.; Marin, C.; Sanchez-Moreno, M.; Perez-Silanes, S. *In Vitro* and *in Vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of New Arylamine Mannich Base-Type Derivatives. *J Med Chem* **2016**, *59*, 10929-10945.
36. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; O'Shea, I. P.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M. 3-Nitrotriazole-based piperazines as potent antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *103*, 325-334.
37. Papadopoulou, M. V.; Trunz, B. B.; Bloomer, W. D.; McKenzie, C.; Wilkinson, S. R.; Prasittichai, C.; Brun, R.; Kaiser, M.; Torreale, E. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-Based Aliphatic and Aromatic Amines as Anti-Chagasic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 8214-8223.
38. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Kaiser, M.; Chatelain, E.; Ioset, J.-R. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 6600-6607.
39. Corona, P.; Gibellini, F.; Cavalli, A.; Saxena, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Luciani, R.; Paglietti, G.; Guerrieri, D.; Nerini, E.; Gupta, S.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Ferrari, S.; Costi, P. M. Structure-Based Selectivity Optimization of Piperidine-Pteridine Derivatives as Potent Leishmania Pteridine Reductase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 8318-8329.
40. Saenz, R. E.; Paz, H.; Berman, J. D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* **1990**, *89*, 147-55.
41. Al-Mutairi, N.; Alshiltawy, M.; El Khalawany, M.; Joshi, A.; Eassa, B. I.; Manchanda, Y.; Gomaa, S.; Darwish, I.; Rijhwani, M. Tropical medicine rounds: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapson, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. *Int J Dermatol* **2009**, *48*, 862-9.
42. El-Sayed, M.; Anwar, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2010**, *24*, 335-40.

43. Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, 104, 311-318.
44. Sander, T.; Freyss, J.; von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015**, 55, 460-473.
45. Martinez-Esparza, J.; Oficialdegui, A. M.; Perez-Silanes, S.; Heras, B.; Orus, L.; Palop, J. A.; Lasheras, B.; Roca, J.; Mourelle, M.; Bosch, A.; Del Castillo, J. C.; Tordera, R.; Del Rio, J.; Monge, A. New 1-aryl-3-(4-arylpiperazin-1-yl)propane derivatives, with dual action at 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptors and serotonin transporter, as a new class of antidepressants. *J Med Chem* **2001**, 44, 418-28.
46. Tellez-Meneses, J.; Mejia-Jaramillo, A. M.; Triana-Chavez, O. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from domestic and sylvatic vectors in Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. *Acta Trop* **2008**, 108, 26-34.
47. Kendall, G.; Wilderspin, A. F.; Ashall, F.; Miles, M. A.; Kelly, J. M. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *EMBO J* **1990**, 9, 2751-8.
48. Rolon, M.; Vega, C.; Escario, J. A.; Gomez-Barrío, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* **2006**, 99, 103-7.
49. Rampersad, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* **2012**, 12, 12347-60.
50. Pless-Petig, G.; Metzenmacher, M.; Turk, T. R.; Rauen, U. Aggravation of cold-induced injury in Vero-B4 cells by RPMI 1640 medium - identification of the responsible medium components. *BMC Biotechnol* **2012**, 12, 73.
51. Isola, E. L.; Lammel, E. M.; Gonzalez Cappa, S. M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp Parasitol* **1986**, 62, 329-35.
52. Cardoso, J.; Soares, M. J. In vitro effects of citral on *trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2010**, 105, 1026-32.
53. Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Thomas, N.; Morel, C. M.; Goldenberg, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* **1985**, 16, 315-27.
54. Faundez, M.; Pino, L.; Letelier, P.; Ortiz, C.; Lopez, R.; Seguel, C.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Morello, A.; Maya, J. D. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 126-30.
55. Oda, Y.; Nakamura, S.; Oki, I.; Kato, T.; Shinagawa, H. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* **1985**, 147, 219-29.
56. Reifferscheid, G.; Heil, J.; Oda, Y.; Zahn, R. K. A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutat Res* **1991**, 253, 215-22.
57. Francisco, A. F.; Jayawardhana, S.; Lewis, M. D.; White, K. L.; Shackelford, D. M.; Chen, G.; Saunders, J.; Osuna-Cabello, M.; Read, K. D.; Charman, S. A.; Chatelain, E.; Kelly, J. M. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. *Sci Rep* **2016**, 6, 35351.
58. Olmo, F.; Rotger, C.; Ramirez-Macias, I.; Martinez, L.; Marin, C.; Carreras, L.; Urbanova, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaur, G.; Sampedro, A.; Rosales, M. J.; Sanchez-Moreno, M.; Costa, A. Synthesis and biological evaluation of N,N'-squaramides with high in vivo efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease. *J Med Chem* **2014**, 57, 987-99.





**PUBLICACIÓN 3: *In vitro* antileishmanial activity and iron superoxide dismutase inhibition of arylamine Mannich base derivatives**

Reimpreso con permiso del Parasitology, Page 1 de 8

Reprinted with permission from Parasitology, Page 1 of 8

DOI: [10.1017/S0031182017001123](https://doi.org/10.1017/S0031182017001123)

© 2016 Cambridge University Press 2017

Martin-Montez A, et al. In vitro antileishmanial activity and iron superoxide dismutase inhibition of arylamine Mannich base derivatives. *Parasitology*, 2017, 144: 1783-1790.

**PUBLICACIÓN 4: Development, validation and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi***

Reimpreso con permiso del Journal of Chromatography B 1061-1062 (2017) 225-232  
Reprinted with permission from Journal of Chromatography B 1061-1062 (2017) 225-

232

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chromb.2017.07.031>

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved

Santivañez-Veliz M, et al. Development, validation and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*. [Journal of Chromatography B](#), 2017, 1061–1062: 225-232.  
<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.031>

**ESTUDIO 1: Evaluation of the inhibitory activity against cruzipain enzyme of some Mannich base type derivatives**



## Evaluation of the inhibitory activity against cruzipain enzyme of some Mannich base type derivatives

### Justification for the study

In the last two decades, as a consequence of the knowledge of the biochemistry, molecular biology and genome sequence of *T. cruzi*, there has been a great progress in the study of *T. cruzi* specific molecular targets. One of the most studied targets in the development of new drugs is cruzipain enzyme (CP).

CP is the major cysteine protease of *T. cruzi*. It is a specific enzyme that is present in all stages of *T. cruzi* life cycle. Its cellular location varies depending on the stage of the parasite. In the epimastigote stage, CP is located in the lysosomes while it is located in the lysosome and in the plasmatic membrane surface in the amastigote form. This protease is mainly involved in protein lysosomal digestion, both exogenous and endogenous, in the protection against host immune response, in the trypomastigote penetration in the mammalian host cell and also seems to play an important role in cell differentiation during the different stages of the life cycle of the parasite. Thus, this enzyme has a basic role in the viability, invasion and evasion against immune response <sup>1</sup>. For all these features, CP is an ideal therapeutic target for developing new drugs against *T. cruzi*.

With the idea of obtaining more information about the possible mechanism of action through which the Mannich bases derivatives carry out their activity, our group has selected some compounds with high *in vitro* activity against Tulahuen 2 strain epimastigotes of *T. cruzi* for the determination of their inhibitory capacity against CP. This study was carried out by Mery Santivañez in collaboration with Javier Varela and Laura Celano during a research stay in the year 2014 in the Department of Medicinal Chemistry of the Faculty of Sciences of the University of the Republic of Uruguay under the direction of Dr. Mercedes González.

The tested compounds have been named according to the assigned identification in the **Annex 1** of this thesis. A fast screening method of enzymatic inhibition by fluorescence spectrometric was used for the evaluation of the inhibitory capacity of the compounds against CP.

### Cruzipain inhibition assay

The purified CP was obtained to homogeneity from epimastigotes of the Tulahuen 2 strain (DTU Tc VI) by ConA-Sepharose affinity chromatography <sup>2</sup>. Buffer acetate 50 mM pH 5.5 was used as negative control. Compound ES64 dissolved in buffer was used as positive control. Tested compounds were dissolved in DMSO, at a concentration 10X the final dose per well. In

order to calculate the IC<sub>50</sub> value, doses of 100, 50, 25, 15, 10 and 5 µM per well were tested. The concentration of DMSO never exceeded 1% per well, controls contained the same solvent concentration. In each well of the plate: buffer (60 µL), DDT 50 mM previously prepared in buffer (10 µL) and CP (2.5 µM  $\epsilon = 58.285 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) previously diluted in buffer (10 µL) were incubated for 5 min after 1 min of shaking at 27 °C. Then, DMSO (10 µL) was added to negative control well, ES64 (10 µL) to positive control well and the compounds (10 µL) to their corresponding wells. The plates were incubated for 15 min and 30 min after 10 seconds of shaking at 27 °C. Then, fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride 100 µM (10 µL) was added. The fluorescence was measured at excitation (350 nm) and emission (460 nm) during 10 min at intervals of 3 seconds using a Varioskan Flash Spectrophotometer. Total enzyme activity (100 %) was calculated from the slope of the negative control. The slopes obtained in presence of inhibitors produced the percentage of remaining enzyme activity (X). The percentage of enzyme inhibition (Y) was determined from the difference (Y=100 %-X). Assays were done in duplicate<sup>3</sup>.

## Results and discussion

**Table 1** shows the IC<sub>50</sub> values against Tulahuen 2 epimastigotes obtained by a previously described method for the nineteen compounds and Bzn<sup>4</sup>. The IC<sub>50</sub> values obtained in the CP inhibition assay for all the tested compounds and for the positive control ES64 are also shown. The chemical structures of the tested compounds are included in the **Annex 1** of this thesis. The nineteen evaluated compounds were selected based on their high *in vitro* activity against the Tulahuen 2 strain since all of them had IC<sub>50</sub> values lower than Bzn. Compounds with an IC<sub>50</sub> lower than 70 µM after 15 minutes incubation were also tested after 30 minutes incubation in the CP inhibition assay. Ten out of nineteen evaluated compounds (**1**, **8**, **14**, **17**, **51**, **53**, **63**, **64**, **67** and **70**) showed IC<sub>50</sub> values between 9.3 µM and 55.8 µM after 30 minutes incubation. For all the compounds, the inhibitory activity increased after 30 minutes incubation with respect to the obtained values after 15 minutes incubation. Meanwhile, ES64, a well-known irreversible protease inhibitor, showed the same inhibitory activity in both times. This behavior seems to suggest that compounds exhibit a modest slow-binding inhibitory activity on CP<sup>5</sup>. It is noteworthy that the compound showing the best cruzipain value inhibition is the derivative **70**, which structure presents an arylaminoketone with a sulphonyl group. This is interesting since the main described CP inhibitors are derivatives with a sulphone group<sup>6</sup>.



**Table 1.** *In vitro* activity against epimastigotes and inhibition of cruzipain in Tulahuen 2 strain epimastigotes.

Code	IC <sub>50</sub> (μM) epimastigotes	IC <sub>50</sub> (μM) cruzipain		Code	IC <sub>50</sub> (μM) epimastigotes	IC <sub>50</sub> (μM) cruzipain	
		15 min	30 min			15 min	30 min
<b>1</b>	1.6	32.5 ± 2.2	23.7 ± 2.2	<b>41</b>	2.1 ± 0.6	90.87 ± 0.1	Nd
<b>3</b>	1.2	>100	Nd	<b>44</b>	1.4 ± 0.5	>100	Nd
<b>7</b>	0.5 ± 0.1	>100	Nd	<b>51</b>	0.5 ± 0.1	46.2 ± 2.3	34.6 ± 1.8
<b>8</b>	2.1 ± 0.9	34.3 ± 3.8	22.7 ± 1.8	<b>53</b>	1.2 ± 0.2	37.1 ± 2.9	25.9 ± 1.1
<b>11</b>	5.9 ± 0.1	>100	Nd	<b>60</b>	1.4 ± 0.5	>100	Nd
<b>12</b>	6.3 ± 0.5	86.3 ± 0.5	Nd	<b>63</b>	1.5 ± 0.1	35.8 ± 0.1	29.1 ± 0.1
<b>14</b>	1.5 ± 0.4	32.1 ± 2.5	23.1 ± 2.9	<b>64</b>	1.3 ± 0.5	38.3 ± 1.0	25.3 ± 1.3
<b>17</b>	1.6 ± 0.6	69.4 ± 0.2	55.8 ± 0.1	<b>67</b>	0.6 ± 0.2	44.0 ± 2.4	29.8 ± 0.1
<b>18</b>	3.2 ± 0.5	>100	Nd	<b>70</b>	5.0 ± 0.6	20.5 ± 1.9	9.3 ± 0.9
<b>34</b>	1.1 ± 0.3	93.9 ± 0.1	Nd	<b>Bzn</b>	8.0 ± 0.1	Nd	Nd
<b>ES64</b>	Nd	1.8x10 <sup>-3</sup> ± 0.1	1.8x10 <sup>-3</sup> ± 0.5				

Nd: Not determinated

A direct relationship between the IC<sub>50</sub> value on Tulahuen 2 strain and the inhibitory activity on CP was not observed. Therefore, the high *in vitro* activities against *T. cruzi* shown by these compounds cannot be explained only by their activity against CP.

According to previously obtained results by our group <sup>7</sup>, compound **67** demonstrated some inhibitory activity on the CYP51 enzyme activity of the *T. cruzi* sterol biosynthesis pathway (SBP) on Tulahuen 2 and Y strains. These results suggest that compound **67** could be classified as symbiotic agent due to its modest inhibitory activities against an enzyme of the SBP and against the CP, targets belonging to different biochemical pathways of *T. cruzi* <sup>8</sup>.

These findings are interesting because compounds with multi-target effect may offer advantages in terms of efficacy and toxicity compared to drugs used in combined therapies. Besides, its ability to inhibit different enzymes makes them less vulnerable to developed resistance by the parasite. Also, the multi-target effect is the basis of drug repurposing strategy, which is giving good results in the last years in the process of drug discovery against different diseases <sup>9</sup>. So, multi-target effect agents are considered of great interest in the search for new multifactorial diseases treatments, such as the EC.

## References

- García-Torres, I.; Pérez-Montfort, R. Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de los fármacos contra la enfermedad de chagas. *REB* **2011**, 30 (2), 68-81.
- Gerpe, A.; Alvarez, G.; Benitez, D.; Boiani, L.; Quiroga, M.; Hernandez, P.; Sortino, M.; Zacchino, S.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-Trypanosoma cruzi activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 7500-7509.
- Couto, M.; Sanchez, C.; Davila, B.; Machin, V.; Varela, J.; Alvarez, G.; Cabrera, M.; Celano, L.; Aguirre-Lopez, B.; Cabrera, N.; de Gomez-Puyou, M. T.; Gomez-Puyou, A.; Perez-Montfort, R.; Cerecetto, H.;

- Gonzalez, M. 3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-Trypanosoma cruzi Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies. *Molecules* **2015**, *20*, 14595-610.
4. Benitez, D.; Cabrera, M.; Hernandez, P.; Boiani, L.; Lavaggi, M. L.; Di Maio, R.; Yaluff, G.; Serna, E.; Torres, S.; Ferreira, M. E.; Vera de Bilbao, N.; Torres, E.; Perez-Silanes, S.; Solano, B.; Moreno, E.; Aldana, I.; Lopez de Cerain, A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Monge, A. 3-Trifluoromethylquinoxaline N,N'-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-T. cruzi agents and mechanism of action studies. *J Med Chem* **2011**, *54*, 3624-36.
  5. Copeland, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem Anal* **2005**, *46*, 1-265.
  6. Tomas, A. M.; Miles, M. A.; Kelly, J. M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem* **1997**, *244*, 596-603.
  7. Santivanez-Veliz, M.; Moreno-Viguri, E.; Perez-Silanes, S.; Varela, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Lizarraga, E. Development, validation and application of a GC-MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2017**, *1061-1062*, 225-232.
  8. Carlos Alberto Manssour, F.; Eliezer, J. B. New Insights for Multifactorial Disease Therapy: The Challenge of the Symbiotic Drugs. *Current Drug Therapy* **2008**, *3*, 1-13.
  9. Talevi, A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective. *Frontiers in Pharmacology* **2015**, *6*.

## **ESTUDIO 2: Evaluación del perfil farmacocinético de los compuestos líderes**



## Estudio de Farmacocinética de los compuestos líderes

### Justificación del estudio

Para que un compuesto pueda avanzar en su desarrollo y ser tenido en cuenta para su estudio en ensayos clínicos es necesario conocer su perfil farmacocinético. Se ha realizado un estudio farmacocinético para la determinación de la biodisponibilidad de los compuestos líderes **4**, **7** y **29** (Figura 1) (Los códigos BT.16, BT.80 y BT.61 del Reporte de farmacocinética se corresponden con los compuestos **4**, **7** y **29** respectivamente según la identificación asignada en el Anexo 1 de esta tesis).

Este estudio ha sido realizado por Julen Oyarzábal y Ander Estella, miembros del grupo de investigación de “Small molecules” del Departamento de Terapias moleculares del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). La selección de estos compuestos se ha basado en los excelentes resultados de eficacia mostrados por los compuestos tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*, así como en su baja citotoxicidad y ausencia de genotoxicidad. Además, mediante un estudio *in silico* de diferentes propiedades moleculares relacionadas con el “druglikeness” se ha predicho una buena biodisponibilidad oral para los tres compuestos <sup>1</sup>.

El estudio se ha llevado a cabo por vía intravenosa (IV) y oral (VO) a dosis de 10 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente.

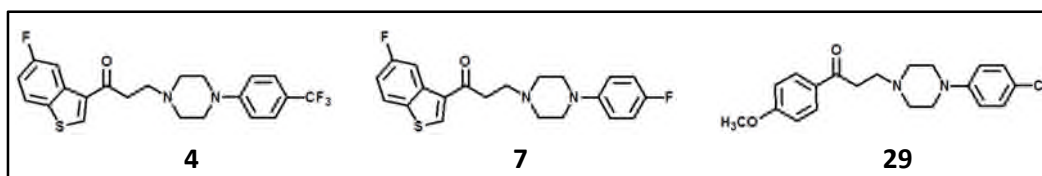


Figura 1. Compuestos líderes evaluados

### Interpretación de los resultados

El compuesto **29** ha presentado una biodisponibilidad oral muy baja, concretamente del 1,56 %. En el estudio por vía oral se ha observado un debilitamiento y una disminución de la movilidad de los ratones durante las primeras doce horas, tras las cuales se han recuperado. Este efecto no se ha observado en los ratones tratados por vía IV. Este comportamiento pudiera estar relacionado con algún proceso de biotransformación del compuesto a nivel hepático, gástrico o intestinal en su recorrido hasta la circulación sistémica generando algún metabolito tóxico. Analizando la estructura química del compuesto, existe la posibilidad de que el grupo metoxi haya sufrido una reacción de desmetilación generándose un metabolito de tipo fenol. Este tipo de reacción es muy frecuente en la fase I del metabolismo de fármacos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* y

considerando que se trata de uno de los compuestos líderes, nos llevaría a pensar que el metabolito generado presenta una elevada actividad biológica. Es destacable también la rápida absorción oral que presenta este compuesto ya que ocurre antes de transcurrir los quince primeros minutos tras la administración.

Los compuestos **4** y **7** han presentado una biodisponibilidad del 92,84 % y 38,76 % respectivamente. Estos valores cumplen con el valor mínimo del 20 % recomendado por la OMS a través de su Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR) <sup>2</sup>. Considerando los valores de  $CI_{50}$  de estos compuestos frente a tripomastigotes de la cepa Arequipa (13,9  $\mu$ M y 0,3  $\mu$ M respectivamente) y las concentraciones de compuesto en plasma a las 24 horas tras la administración oral (6,3  $\mu$ M y 1,7  $\mu$ M respectivamente) se observa como el compuesto **7** mostraría un mejor perfil farmacocinético ya que a pesar de alcanzar una menor concentración plasmática que el compuesto **4**, este valor supera en más de cinco veces su valor de  $CI_{50}$ . Además, el compuesto **7** presenta valores de IS muy superiores a los ofrecidos por el compuesto **4**, aumentando de esta forma el rango de seguridad del compuesto.

Los compuestos **4** y **7** presentan estructuras químicas y propiedades moleculares *in silico* muy similares, sin embargo, se observa una gran diferencia en cuanto a la biodisponibilidad oral. Como se ha observado en la administración por vía IV existe una gran diferencia en las concentraciones plasmáticas presentadas por ambos compuestos a los cinco minutos de la administración (13,8  $\mu$ M y 6,5  $\mu$ M respectivamente), a pesar de haber sido administrada la misma dosis (10 mg/kg). Esta misma diferencia se observa también en la administración por VO. Relacionando estas observaciones con los buenos resultados de actividad *in vivo* obtenidos para estos derivados tanto en modelos de fase aguda como en modelos de fase crónica se pudiera plantear la posibilidad de que el compuesto **4** sea más activo en la fase aguda ya que desde el comienzo de la administración se encontraría una elevada concentración de compuesto libre para actuar frente a los tripomastigotes sanguíneos.

### **Conclusiones**

Los compuestos **4** y **7** han mostrado valores de biodisponibilidad por encima del 35% cumpliendo de esta forma el valor mínimo propuesto por la OMS. Teniendo en cuenta su perfil farmacocinético y su actividad, ambos compuestos han sido seleccionados para ser evaluados en un modelo *in vivo* de bioluminiscencia desarrollado por el Dr. J. Kelly en la London School of Hygiene and Tropical Medicine. Las diferencias observadas en su perfil farmacocinético así como de actividad en el modelo *in vivo* justifican que se estudie también la combinación de ambos compuestos.

### Referencias bibliográficas

1. Moreno-Viguri, E.; Jimenez-Montes, C.; Martin-Escolano, R.; Santivañez-Veliz, M.; Martin-Montes, A.; Azqueta, A.; Jimenez-Lopez, M.; Zamora Ledesma, S.; Cirauqui, N.; Lopez de Cerain, A.; Marin, C.; Sanchez-Moreno, M.; Perez-Silanes, S. *In Vitro* and *in Vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of New Arylamine Mannich Base-Type Derivatives. *J Med Chem* **2016**, 59, 10929-10945.
2. Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, R.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. Advancing drug innovation for neglected diseases-criteria for lead progression. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, 3, e440.

REPORT

**BT-16, BT-61 and BT-80 DETERMINATION IN MOUSE**  
**PLASMA – PHARMACOKINETIC STUDY AND**  
**BIOAVAILABILITY DETERMINATION**



**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017Report date: July 26<sup>th</sup> 2017**INDEX**

<b>1. Method validation.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Calibration results.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 BT-16 in plasma.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 BT-61 in plasma.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 BT-80 in plasma.....</b>	<b>6</b>
<b>3. PK analysis.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Methods.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 Plasma sample preparation.....</b>	<b>7</b>
<b>3.3 PK results.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3.1. PK of BT-16.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3.2. PK of BT-61.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3.3. PK of BT-80.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4. Simulations.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4.1. BT-16.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4.2. BT-61.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4.3. BT-80.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Conclusions.....</b>	<b>14</b>

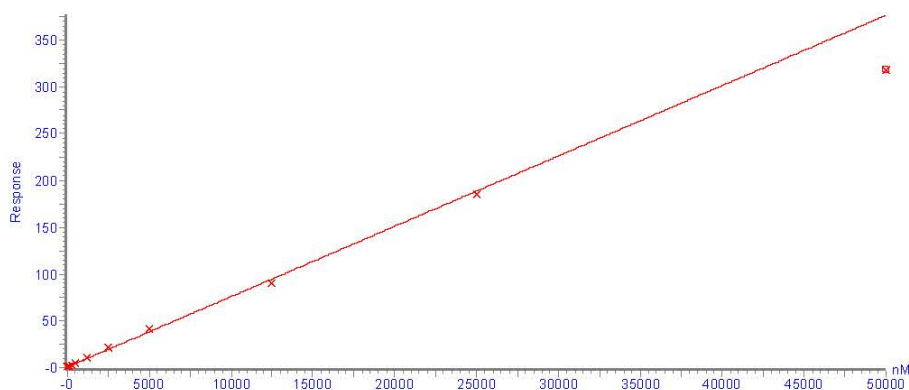
**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**1. Method development****Table S1.** Summary of the UPLC-MS/MS method used to analyze BT-16, BT-61 and BT-80 in mouse plasma.

<b>General Information</b>	<b>Description</b>																								
Analytes	BT-16, BT-61, BT-80																								
<b>Sample Processing</b>	<b>Description</b>																								
Volume of Sample / Homogenate	20 µL																								
Volume of Precipitating Solution (MeOH w/ 3% formic acid + 100nM Tolbutamide IS )	200 µL																								
Volume to 96-well plate	180 µL																								
<b>UPLC Conditions</b>	<b>Description/Setting</b>																								
UPLC System	Acquity UPLC system (Waters, Manchester, UK)																								
Column	ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7µm (2.1 x 50 mm)																								
Solvents	Solvent A: Water + 0.1% formic acid Solvent B: MeOH + 0.1% formic acid																								
Mobile Phase	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Flow Rate (mL/min)</th> <th>% Solvent A</th> <th>% Solvent B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>0.600</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.50</td> <td>0.600</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>2.70</td> <td>0.600</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>2.80</td> <td>0.600</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>0.600</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	% Solvent A	% Solvent B	0.00	0.600	95	5	2.50	0.600	5	95	2.70	0.600	5	95	2.80	0.600	95	5	5.00	0.600	95	5
Time (min)	Flow Rate (mL/min)	% Solvent A	% Solvent B																						
0.00	0.600	95	5																						
2.50	0.600	5	95																						
2.70	0.600	5	95																						
2.80	0.600	95	5																						
5.00	0.600	95	5																						
Injection Volume	5 µL																								
Elution type	Gradient																								
Flow rate	0.600 mL/min																								
Column temperature	45 °C																								
Autosampler temperature	10 °C																								
<b>MS/MS Detection</b>	<b>Description</b>																								
MS System	Xevo-TQ tandem mass spectrometer (ESI+)																								
<i>m/z</i> transitions	BT-16: 437.22>243.11 (Quantifier); 437.22>144.96 (Qualifier) BT-61: 359.11>209.09 (Quantifier); 359.11>165.99 (Qualifier) BT-80: 387.22>193.08 (Quantifier); 387.22>150.05 (Qualifier) Tolbutamide (IS): 271.2>155.0																								

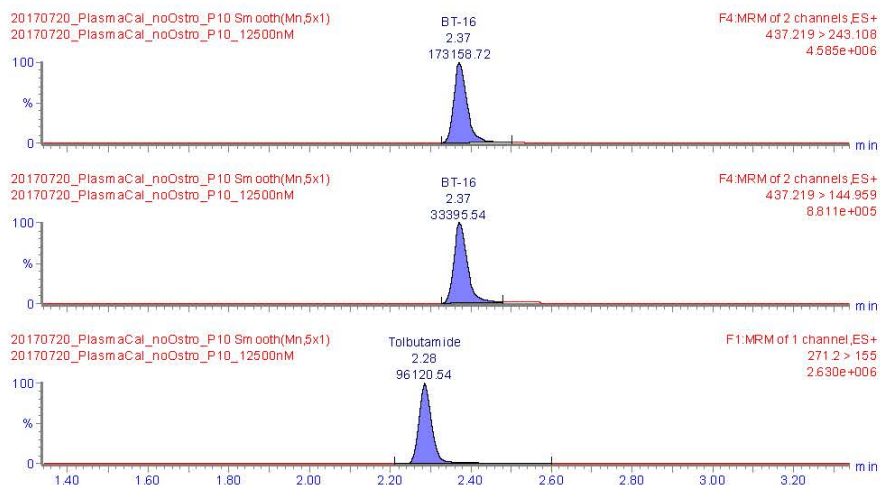
**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**2. Calibration results****2.1. BT-16 in plasma**

Quantify Compound Summary Report						
Printed Fri Jul 21 10:58:16 2017						
Compound 1: BT-16						
Name	Type	Conc. (nM)	RT	Area	nM	%CV
20170720_PlasmaCal_noOstro_P1	Standard	5	2.35	1131.978	4.34	-13.2
20170720_PlasmaCal_noOstro_P2	Standard	31.25	2.36	1526.218	27.546	-11.9
20170720_PlasmaCal_noOstro_P3	Standard	62.5	2.37	1944.541	54.971	-12
20170720_PlasmaCal_noOstro_P4	Standard	125	2.36	2899.151	120.984	-3.2
20170720_PlasmaCal_noOstro_P5	Standard	250	2.37	4742.812	248.941	-0.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P6	Standard	500	2.38	9033.918	555.224	11
20170720_PlasmaCal_noOstro_P7	Standard	1250	2.37	21065.162	1410.421	12.8
20170720_PlasmaCal_noOstro_P8	Standard	2500	2.38	41207.621	2834.299	13.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P9	Standard	5000	2.38	79503.031	5503.501	10.1
20170720_PlasmaCal_noOstro_P10	Standard	12500	2.37	173158.719	11889.178	-4.9
20170720_PlasmaCal_noOstro_P11	Standard	25000	2.37	334540.813	24574.344	-1.7

Compound name: BT-16  
 Correlation coefficient  $r = 0.998286$ ,  $r^2 = 0.996574$   
 Calibration curve:  $0.0075245 * x + 0.613607$   
 Response type: Internal Std (Ref4), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



\*Data point of 50000nM was excluded as the %CV was higher than +/- 15%

**Typical peaks:**

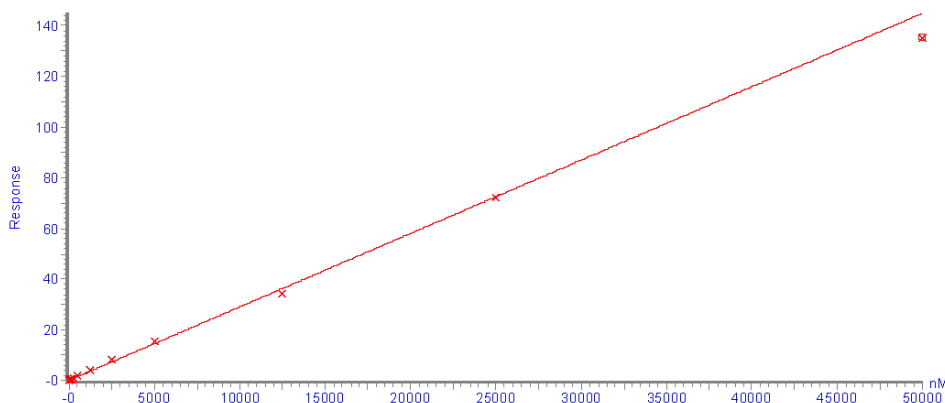
**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**

Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017

**2.2. BT-61 in plasma**

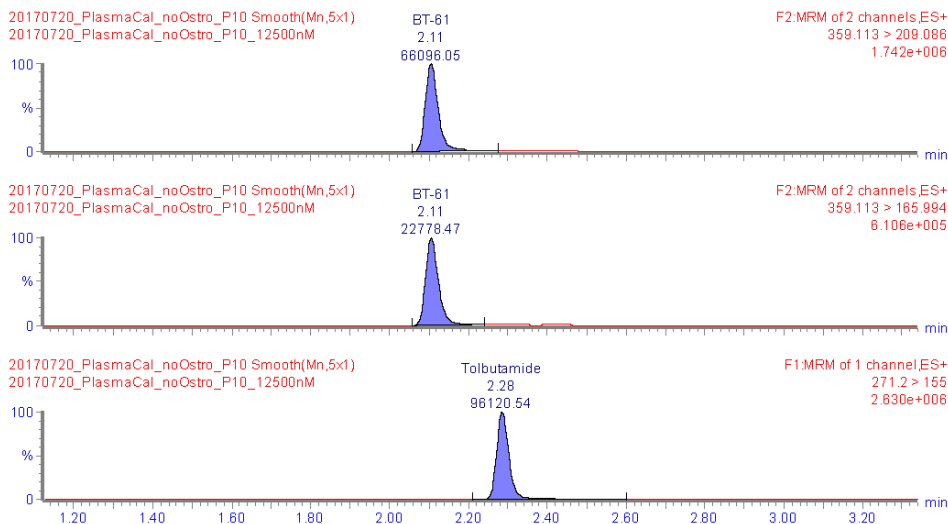
Quantify Compound Summary Report						
Printed Fri Jul 21 11:04:25 2017						
Compound 2: BT-61						
Name	Type	Conc. (nM)	RT	Area	nM	%CV
20170720_PlasmaCal_noOstro_P1	Standard	5	2.1	181.579	4.582	-8.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P2	Standard	31.25	2.09	317.152	27.686	-11.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P3	Standard	62.5	2.1	477.776	55.935	-10.5
20170720_PlasmaCal_noOstro_P4	Standard	125	2.09	847.602	122.629	-1.9
20170720_PlasmaCal_noOstro_P5	Standard	250	2.1	1560.547	251.312	0.5
20170720_PlasmaCal_noOstro_P6	Standard	500	2.1	3093.019	535.223	7
20170720_PlasmaCal_noOstro_P7	Standard	1250	2.1	7736.069	1392.347	11.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P8	Standard	2500	2.11	15399.664	2799.912	12
20170720_PlasmaCal_noOstro_P9	Standard	5000	2.11	29524.617	5357.54	7.2
20170720_PlasmaCal_noOstro_P10	Standard	12500	2.11	66096.055	11840.472	-5.3
20170720_PlasmaCal_noOstro_P11	Standard	25000	2.11	129866.391	24836.112	-0.7

Compound name: BT-61  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998748$ ,  $r^2 = 0.997498$   
 Calibration curve:  $0.00289612 * x + 0.0903976$   
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



\*Data point of 5000nM was excluded as the %CV was higher than +/- 15%

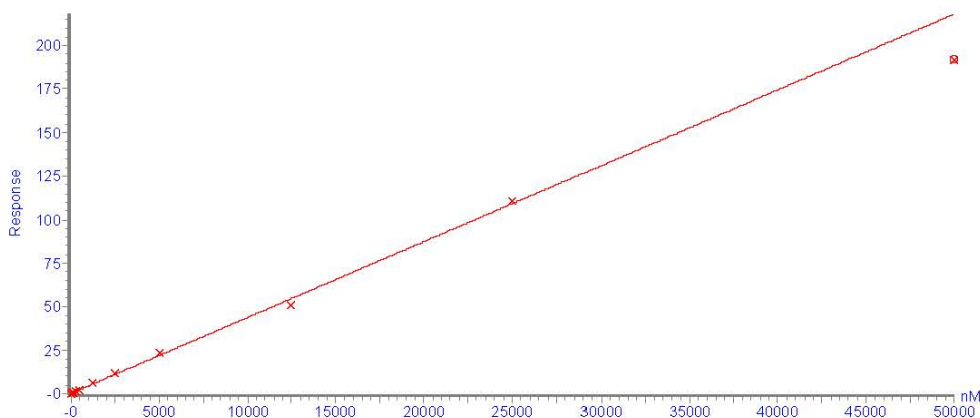
**Typical peaks:**



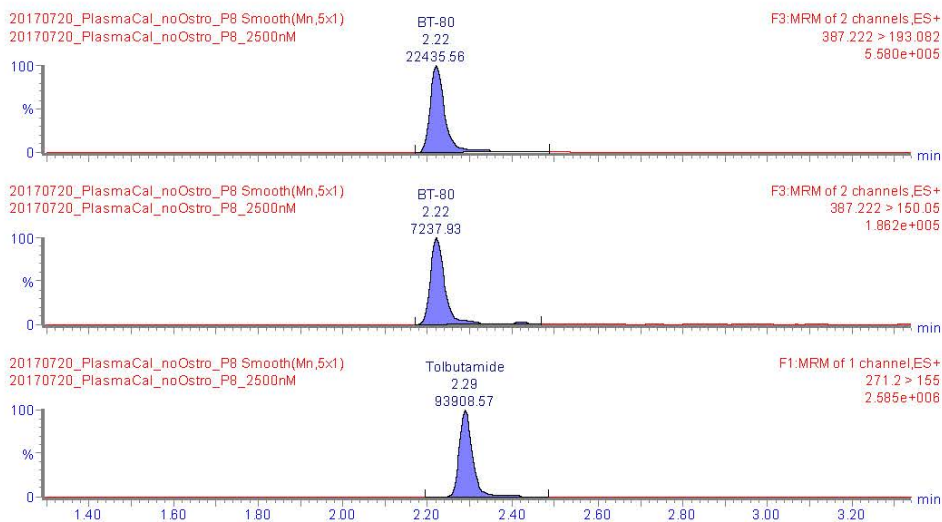
**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**2.3. BT-80 in plasma samples**

Quantify Compound Summary Report						
Printed Fri Jul 21 11:08:11 2017						
Compound 3: BT-80						
Name	Type	Conc. (nM)	RT	Area	nM	%Dev
20170720_PlasmaCal_noOstro_P1	Standard	5	2.2	329.849	5.15	3
20170720_PlasmaCal_noOstro_P2	Standard	31.25	2.21	570.266	32.306	3.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P3	Standard	62.5	2.21	784.016	56.951	-8.9
20170720_PlasmaCal_noOstro_P4	Standard	125	2.2	1250.961	112.777	-9.8
20170720_PlasmaCal_noOstro_P5	Standard	250	2.21	2318.076	240.723	-3.7
20170720_PlasmaCal_noOstro_P6	Standard	500	2.22	4475.29	506.358	1.3
20170720_PlasmaCal_noOstro_P7	Standard	1250	2.21	11256.195	1337.822	7
20170720_PlasmaCal_noOstro_P8	Standard	2500	2.22	22435.559	2701.721	8.1
20170720_PlasmaCal_noOstro_P9	Standard	5000	2.23	43801.852	5272.327	5.4
20170720_PlasmaCal_noOstro_P10	Standard	12500	2.22	97434.734	11586.581	-7.3
20170720_PlasmaCal_noOstro_P11	Standard	25000	2.22	199769.094	25371.033	1.5

Compound name: BT-80  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998808$ ,  $r^2 = 0.997617$   
 Calibration curve:  $0.00436002 * x + 0.165862$   
 Response type: Internal Std ( Ref 4 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



\*Data point of 5000nM was excluded as the %CV was higher than +/- 15%

**Typical peaks:**

**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**3. PK analysis****3.1 PK study design**

Pharmacokinetic studies were performed at two different concentrations: 10mg/kg (iv) and 100mg/kg (oral) in C57BL/6J mice (n=5 per group), for the further determination of the bioavailability of each compound. Pharmacokinetic parameters were estimated by fitting the experimental data to a non-compartmental model (NCA) using Winnonlin software for pharmacokinetic analysis. The parameters are: Area Under the Curve computed to the last observation (AUC<sub>last</sub>); half-life of the product ( $t_{1/2}$ ); clearance (Cl) and volume of distribution (V<sub>z</sub>). Bioavailability (F) is calculated using the following formula:

$$F = \left( AUC_{oral} / AUC_{iv} \right) \times \left( Dose_{iv} / Dose_{oral} \right)$$

**For the intravenous administration:**

A stock solution of each compound was prepared by dissolving 2.5mg in 100  $\mu$ L of DMSO for solubilization. Then, a mixture of 100  $\mu$ L Tween 20 and 800  $\mu$ L of saline (NaCl 0.9%) was added to obtain the final stock solution at a concentration of 2.5 mg/mL. Each mouse received an intravenous administration of 100  $\mu$ L through the tail vein, and blood was sampled at 5min, 1h, 2h, 5, 8h and 24h after injection. Animals were then euthanized. Blood was centrifuged at 3500rpm for 10min to separate the plasma, which was then kept at -80°C until analysis was performed.

**For the oral administration:**

A stock solution of each compound was prepared by dissolving 20mg in 160  $\mu$ L of DMSO for solubilization. Then, a mixture of 160  $\mu$ L Tween 20 and 1280  $\mu$ L of saline (NaCl 0.9%) was added to obtain the final stock solution at a concentration of 12.5 mg/mL. Each mouse received an oral administration of 200  $\mu$ L through oral gavage, and blood was sampled at 15min, 1h, 2h, 5, 8h and 24h after injection. Animals were then euthanized. Blood was centrifuged at 3500rpm for 10min to separate the plasma, which was then kept at -80°C until analysis was performed.

**3.2. Plasma sample preparation**

Bioanalytical analysis was done by thawing plasma samples to room temperature. Quantification was achieved by external calibration using matrix-matched standards. Concentrations were calculated using a weighted least-squares linear regression ( $W = 1/x$ ). Calibration standards were prepared by adding 20  $\mu$ L of diluted solutions of BT-16, BT-61 and BT-80 (made in a mixture of methanol and water, 50:50, v:v) to aliquots of 20  $\mu$ L of blank plasma. The calibration standard and sample preparation is as follows: 200  $\mu$ L of 3% formic acid in methanol were added to 20  $\mu$ L of plasma to precipitate the proteins. The mixture was then vortex-agitated for 5 min and centrifuged at 13200 rpm for 20 min at 4° C. 180  $\mu$ L of the resulting supernatants were transferred to a 96-well plate and a 5  $\mu$ L aliquot was injected into the LC-MS/MS system for analysis, using the conditions shown in Table S1 above. The back-calculated concentration for all standards fell within  $\pm 15\%$  of nominal. QC samples all fell within  $\pm 15\%$  of nominal. A set of calibration standards prepared in plasma was placed at the beginning of each run. Sample concentrations for final reporting were calculated by regression using the set of standards.

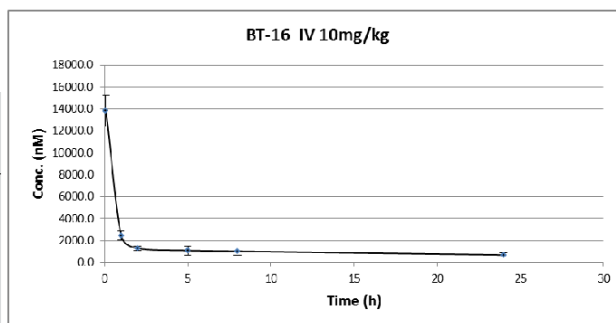
**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**

Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017

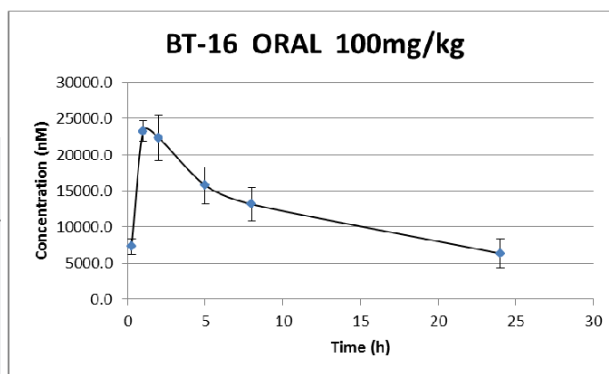
**3.3. Results**

**3.3.1. PK of BT-16**

SUMMARY RESULTS BT-16 IV 10mg/kg			
Mean concentrations			
Time (h)	Mean (nM)	SD (nM)	RSD (%)
0.083	13844.7	1430.9	10.3
1	2438.6	384.2	15.8
2	1295.3	188.4	14.5
5	1091.9	421.5	38.6
8	1019.3	333.4	32.7
24	697.5	160.4	23.0



SUMMARY RESULTS BT-16 Oral 100mg/kg			
Mean concentrations			
Time (h)	Mean (nM)	SD (nM)	RSD (%)
0.25	7290.2	1081.9	14.8
1	23273.7	1405.5	6.0
2	22360.5	3185.6	14.2
5	15777.0	2534.6	16.1
8	13156.4	2365.1	18.0
24	6333.0	2006.0	31.7



**Non-compartmental analysis**

Parameter	BT-16 IV 10mg/kg	
	Mean	SD
AUClast (nM*h)	30924.7	3536.4
T 1/2 (h)*	37.936	14.481
Cl (L/h)**	0.009	0.003
Vss (L)**	0.441	0.102
Norm. Vss (L/kg)	17.629	
Norm. Cl (L/h·kg)	0.351	

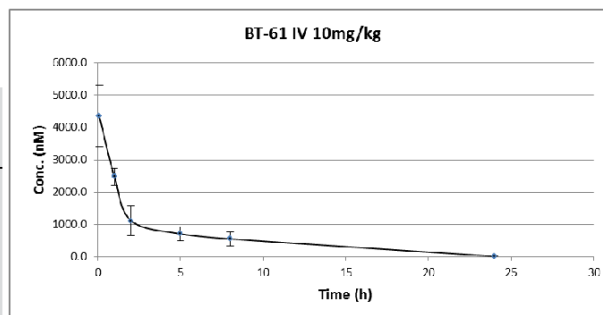
Parameter	BT-16 Oral 100mg/kg	
	Mean	SD
AUClast (nM*h)	287108.9	48160.1
T 1/2 (h)*	13.699	2.061
Cl/F (L/h)**	0.013	0.004
Vz/F (L)**	0.264	0.036
Norm. Vz/F (L/kg)	10.550	
Norm. Cl/F (L/h·kg)	0.513	

Bioavailability of BT-16 = 0.9284 (92.84%)

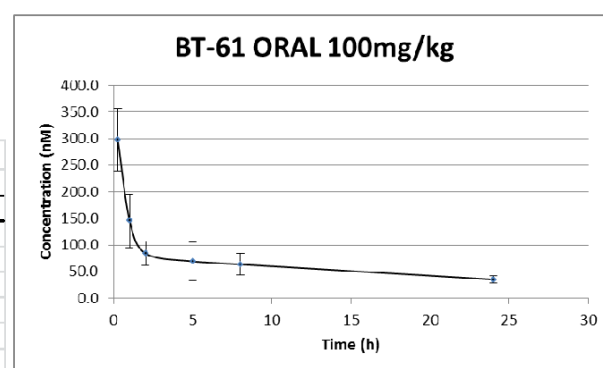
**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**3.3.2. PK of BT-61**

\*Mice were weak and not very mobile after the oral administration of the compound at 100mg/kg

SUMMARY RESULTS BT-61 IV 10mg/kg			
Mean concentrations			
Time (h)	Mean (nM)	SD (nM)	RSD (%)
0.083	4360.1	950.8	21.8
1	2490.6	257.8	10.4
2	1119.6	472.2	42.2
5	713.2	209.2	29.3
8	554.9	212.3	38.3
24	18.1	0.5	3.0



SUMMARY RESULTS BT-61 Oral 100mg/kg			
Mean concentrations			
Time (h)	Mean (nM)	SD (nM)	RSD (%)
0.25	297.7	58.6	19.7
1	145.4	49.8	34.3
2	84.4	22.8	27.0
5	69.4	36.3	52.3
8	63.8	20.6	32.2
24	35.4	6.7	19.0



The oral absorption of the compound is very low but it seems to happen really fast. The entire absorbable fraction was absorbed before the first 15 minutes post-administration. After 15 minutes, all we can see is distribution and elimination.

**Non-compartmental analysis**

Parameter	BT-61 IV 10mg/kg		Parameter	BT-61 Oral 100mg/kg	
	Mean	SD		Mean	SD
AUClast (nM*h)	9805.1	431.1	AUClast (nM*h)	1532.5	125.4
T 1/2 (h)*	3.703	0.326	T 1/2 (h)*	20.25	9.57
Cl (L/h)**	0.062	0.005	Cl/F (L/h)**	2.79	0.74
Vss (L)**	0.332	0.049	Vz/F (L)**	74.32	17.05
Norm. Vss (L/kg)	13.260		Norm. Vz/F (L/kg)	2972.61	
Norm. Cl (L/h·kg)	2.475		Norm. Cl/F (L/h·kg)	111.73	

Pharmacokinetic profile is different when administered orally. A first-pass metabolism might be possible, yielding a toxic compound. The fact that the dose could be too high for this compound should be considered.

**Bioavailability of BT-61 = 0.0156 (1.56%)**

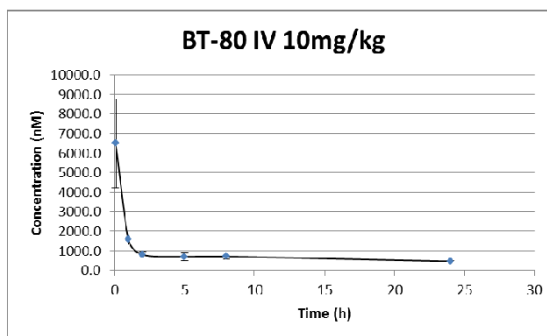


**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**

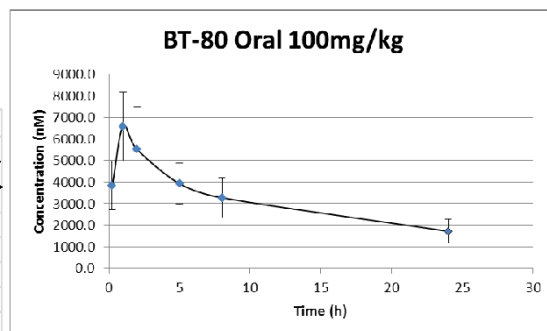
Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017

**3.3.3. PK of BT-80**

SUMMARY RESULTS BT-80 IV 10mg/kg			
Mean concentrations			
Time (h)	Mean (nM)	SD (nM)	RSD (%)
0.083	6504.9	2271.4	34.9
1	1576.8	244.9	15.5
2	793.5	144.4	18.2
5	697.3	200.2	28.7
8	703.3	149.5	21.3
24	463.0	29.1	6.3



SUMMARY RESULTS BT-80 Oral 100mg/kg			
Mean concentrations			
Time (h)	Mean (nM)	SD (nM)	RSD (%)
0.25	3843.2	1128.5	29.4
1	6574.3	1595.6	24.3
2	5509.5	1961.7	35.6
5	3919.8	953.4	24.3
8	3266.1	931.0	28.5
24	1705.9	559.5	32.8



**Non-compartmental analysis**

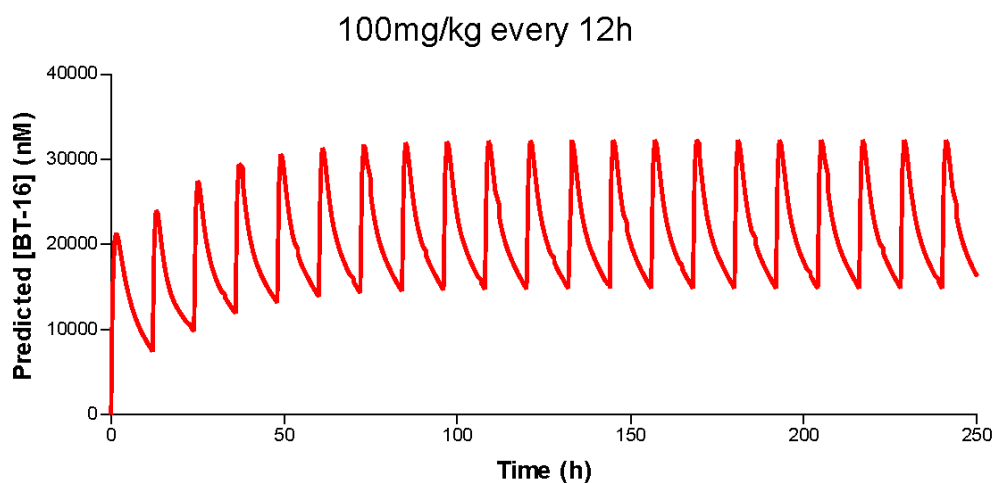
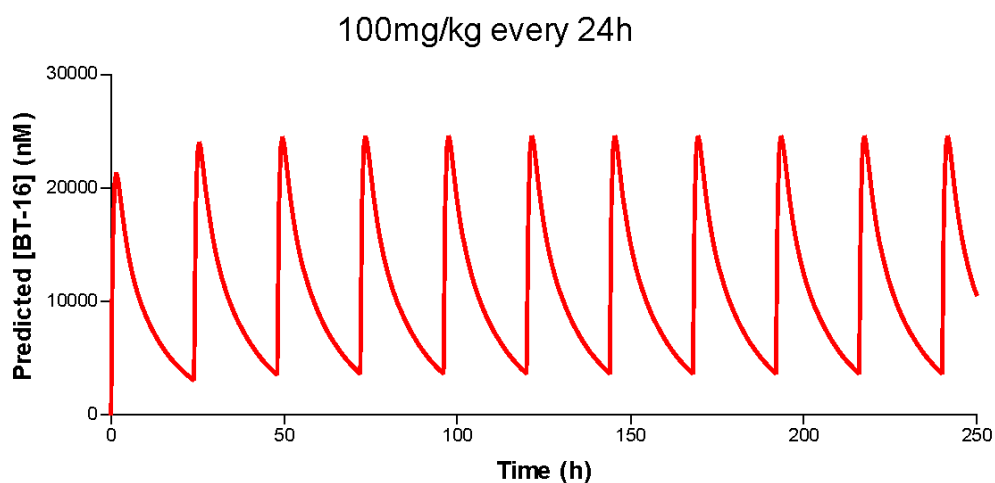
Parameter	BT-80 IV 10mg/kg	
	Mean	SD
AUClast (nM*h)	19090.8	3868.9
T 1/2 (h)*	33.283	10.173
Cl (L/h)**	0.016	0.001
Vss (L)**	0.751	0.212
Norm. Vss (L/kg)	30.023	
Norm. Cl (L/h·kg)	0.630	

Parameter	BT-80 Oral 100mg/kg	
	Mean	SD
AUClast (nM*h)	74005.5	14788.6
T 1/2 (h)*	15.562	4.734
Cl/F (L/h)**	0.059	0.012
Vz/F (L)**	1.298	0.363
Norm. Vz/F (L/kg)	51.925	
Norm. Cl/F (L/h·kg)	2.378	

**Bioavailability of BT-80 = 0.3876 (38.76%)**

**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**3.4. Simulations**

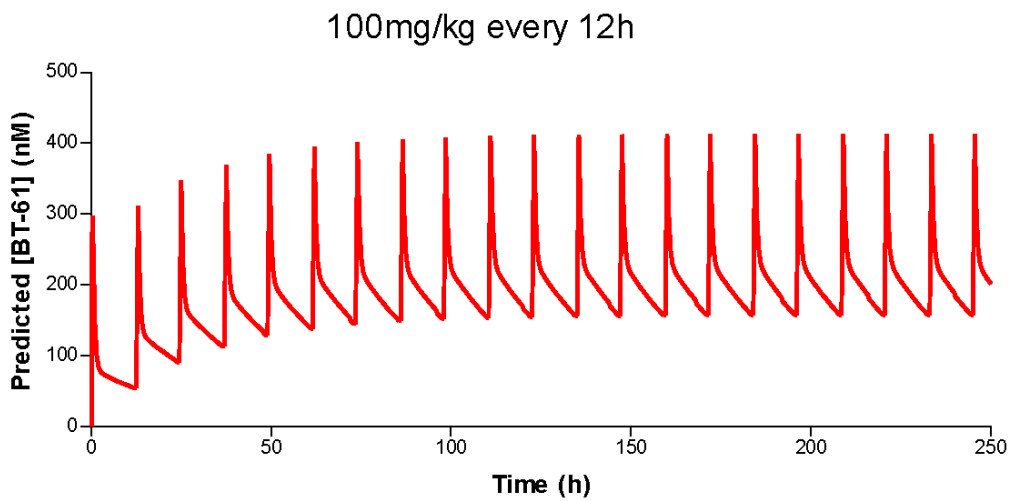
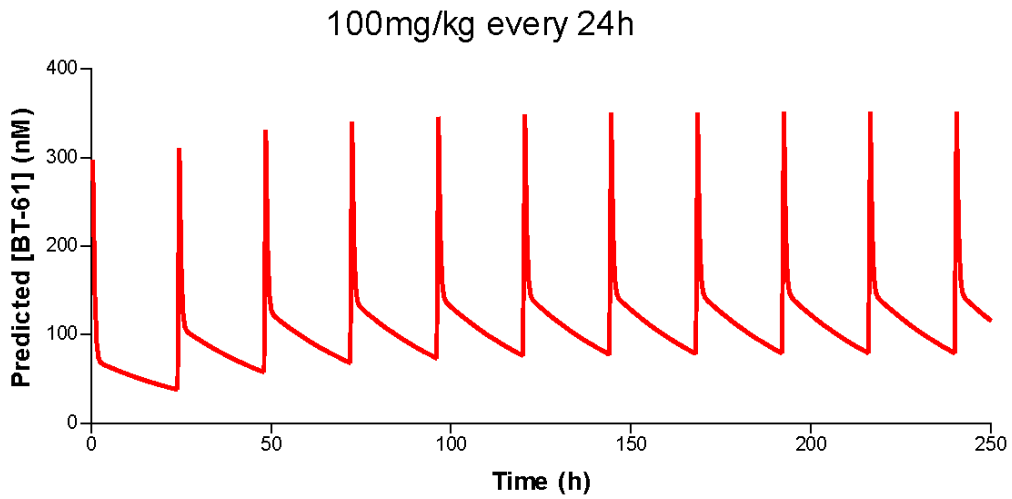
*In silico* simulations of daily oral administration of 100 mg/kg for 10 days were calculated with WinNonLin software.

**3.4.1. BT-16**

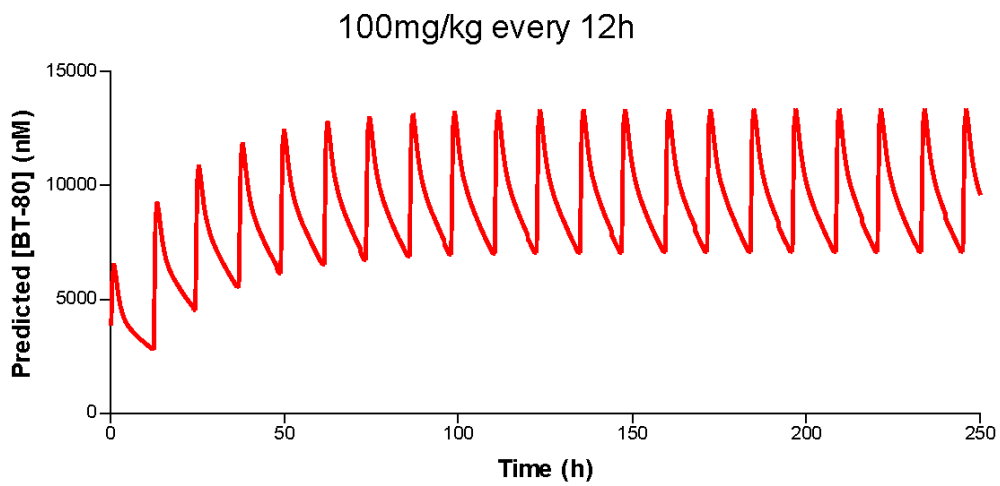
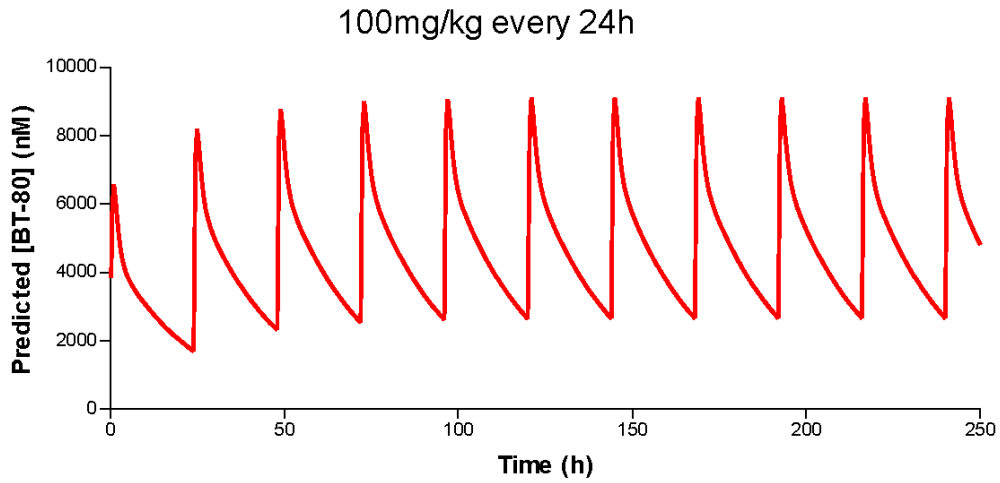
BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability

Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017

**3.4.2. BT-61**



**3.4.3. BT-80**



**BT-16, BT-61 and BT-80 PK study and bioavailability**Date: Jul. 26<sup>th</sup> 2017**4. Conclusions**

The UPLC-MS/MS methods for the quantitation of the compounds BT-16, BT-61 and BT-80 have been successfully developed. Linearity from 5 nM to 25000 nM was achieved.

The pharmacokinetic profiles are similar in either administration route, with the exception of the BT-61 over the oral route. In general, compounds show a slow elimination from the organism (low clearance values) with low distribution to tissues (low volume of distribution). As it was mentioned earlier, a very intense first-pass effect might be possible for BT-61 over the oral route which could produce a toxic metabolite. The fact that the dose could be too high for this compound should be also considered.

Simulations show that BT-16 reaches a maximum concentration after day 3 of nearly 25000 nM when administered once daily (every 24 h) and a maximum concentration of around 30000 nM, also after day 3, when administered twice daily (every 12 h). BT-61 reaches a maximum concentration after day 4 of nearly 350 nM when administered once daily (every 24 h) and a maximum concentration of around 400 nM, also after day 4, when administered twice daily (every 12 h). BT-80 reaches a maximum concentration after day 3 of nearly 9000 nM when administered once daily (every 24 h) and a maximum concentration of around 13000 nM, also after day 3, when administered twice daily (every 12 h).

Pharmacokinetic studies reveal that the bioavailabilities of the three compounds are very different from each other.

<b>Compound</b>	<b>Oral Bioavailability</b>
BT-16	92.84%
BT-61	1.56%
BT-80	38.76%

Furthermore, compound BT-61 affected the behavior of mice when it was administered orally at a concentration of 100 mg/kg. Mice were weak and not mobile during the first 12 h post-administration. However, they recovered mobility after 24 h. This should be taken into consideration for further multiple administration studies.



## **DISCUSIÓN**





Los compuestos se nombran de acuerdo a la identificación asignada en el Anexo 1 de esta memoria con la finalidad de facilitar la lectura de la discusión y conclusiones.

La EC y la Leishmaniasis son dos parasitosis transmitidas por vectores y causadas por protozoos de la familia *Trypanosomatidae*. A pesar de los esfuerzos por controlarlas realizados en los últimos veinticinco años, los datos epidemiológicos siguen siendo preocupantes<sup>1,2</sup>. Esta situación se debe en gran medida a la falta de un tratamiento eficaz, ya que hasta la fecha no se han conseguido desarrollar nuevos fármacos que cumplan con los requisitos mínimos descritos en el Target Product Profile de cada una de estas parasitosis<sup>3,4</sup>. El desarrollo de fármacos para tratar estas tripanosomiasis se ve obstaculizado por las complejas características fisiopatológicas que ambas enfermedades presentan, así como por la diversidad genética y los complejos mecanismos biológicos de adaptación y defensa que desarrolla el parásito. A esto se suma la falta de protocolos y criterios de selección estandarizados en el proceso de evaluación y determinación de compuestos líderes, la falta de biomarcadores selectivos y la poca novedad en el diseño y obtención de nuevos tipos de moléculas químicas.

#### Enfermedad de Chagas

Ante esta situación de necesidad en la obtención e identificación de agentes tripanocidas, tras una extensa revisión bibliográfica y teniendo en cuenta la experiencia del grupo investigador se ha aplicado una estrategia de reposicionamiento de moléculas como punto de partida para el **diseño de los derivados** que se presentan en esta memoria. Tras la aplicación de esta estrategia sobre la librería de compuestos del grupo se seleccionaron diferentes derivados de bases de Mannich, conocidos farmacóforos que presentan una amplia variedad de actividades biológicas. Los compuestos seleccionados poseían una elevada variabilidad de sustituyentes y mostraron excelentes resultados de eficacia y toxicidad *in vitro*. A partir de estos resultados se llevó a cabo un estudio de las relaciones estructura-actividad y de las posibles rutas de síntesis definiéndose las bases de Mannich de tipo arilaminocetona como estructura química general de los derivados que se presentan en esta tesis. Sobre esta estructura base se introdujeron una amplia variedad de sustituyentes con el objetivo de modificar diferentes parámetros moleculares como la polaridad, solubilidad, volumen o rigidez y estudiar así su influencia sobre la actividad y toxicidad.

Durante el desarrollo de la tesis **se sintetizaron sesenta y dos nuevos derivados** utilizando dos métodos sintéticos sencillos, de un solo paso y económicamente eficientes. De los sesenta y dos derivados, cincuenta y ocho se obtuvieron mediante la reacción de Mannich, mientras que los cuatro compuestos restantes, se sintetizaron vía sustitución nucleofílica. Para la

obtención de los cincuenta y ocho derivados sintetizados mediante la reacción de Mannich (**1, 4, 5, 7-9, 11, 14-20, 22-37 y 42-69**) se llevó a cabo una optimización de la reacción para cada compuesto mediante la modificación de la temperatura de reflujo, la cantidad de ácido clorhídrico adicionado y la cantidad de hidróxido sódico añadida. La optimización de este método de síntesis permitió obtener los nuevos derivados tras tiempos de reacción cortos y a partir de reactivos de partida asequibles. En los casos en los que no se pudo obtener el compuesto deseado mediante la reacción de Mannich y se disponía del correspondiente halogenuro de alquilo los derivados fueron sintetizados vía sustitución nucleofílica alifática (derivados **38-41**).

**Los nuevos derivados sintetizados se purificaron** utilizando procedimientos rutinarios como la extracción, lavados con disolventes de diferente polaridad, precipitación, recristalización y cromatografía flash. En alguno de los compuestos presentados fue necesaria la combinación de varias de estas técnicas para conseguir su purificación completa. La sencillez y el bajo coste de los métodos de síntesis y purificación utilizados han supuesto una interesante ventaja económica que pudiera despertar el interés de la industria farmacéutica de cara a un futuro escalado industrial. Es importante tener en cuenta que en el tratamiento de este tipo de enfermedades el aspecto económico es un punto clave ya que afectan a poblaciones con escasos recursos.

La **caracterización estructural** de los nuevos derivados se realizó mediante las técnicas analíticas instrumentales de espectroscopía de infrarrojo, punto de fusión y resonancia magnética nuclear de protón y carbono. En algunos casos fue necesario realizar estudios más profundos mediante técnicas de resonancia magnética bidimensional para la elucidación estructural inequívoca de los nuevos derivados. Para garantizar que los compuestos cumplieran con el grado de pureza exigido se empleó el análisis elemental CHN.

Se realizó un **estudio del “drug-likeness”** de las sesenta y nueve estructuras presentadas en esta memoria mediante un estudio *in silico* de algunas de sus propiedades moleculares. Todos los compuestos cumplieron con la regla del cinco de Lipinski, que en combinación con los buenos valores de PSA y logS sugerían una buena biodisponibilidad oral.

La evaluación de la **eficacia *in vitro* en *T. cruzi*** de los compuestos se llevó a cabo frente a las diferentes formas del parásito en las cepas SN3, Arequipa y Tulahuen, pertenecientes a diferentes UDTs. Estas tres cepas presentan diferencias en cuanto a su localización geográfica, ciclo biológico, vector, hospedador o tropismo. Su uso permitió estudiar si los compuestos poseen actividad frente a parásitos de diferentes linajes filogenéticos<sup>5,6</sup>. Treinta y ocho de los sesenta y nueve compuestos presentaron valores de  $CI_{50}$  similares o inferiores al Bzn en el ensayo de eficacia. Asimismo, se evaluó su **citotoxicidad frente a células Vero** para poder

determinar su IS. Sesenta y tres derivados fueron claramente menos citotóxicos que el Bzn indicando que estas bases de Mannich, además de presentar una buena actividad frente a *T. cruzi*, destacaban por los excelentes resultados de citotoxicidad mostrados. Desde el punto de vista estructural los derivados de benzo[*b*]tiofeno fueron los compuestos que mejores resultados de citotoxicidad presentaron, destacando los compuestos **3, 4, 7 y 10** con valores de  $CI_{50}$  superiores a 750  $\mu$ M. En cuanto al IS calculado, los derivados de benzo[*b*]tiofeno **3, 4, 7 y 10** y los derivados **27, 29 y 30**, pertenecientes a la segunda generación de bases de Mannich en los que el anillo de benzo[*b*]tiofeno ha sido sustituido por un benceno, superaron en al menos cincuenta veces el valor mostrado por el Bzn en alguna de las cepas estudiadas. Cabe destacar que los derivados más selectivos de la segunda generación (**27, 29 y 30**) poseen un grupo metoxi en la posición  $R_2$  del anillo de benceno. Debido a estos elevados IS, estos siete compuestos fueron seleccionados para continuar con los siguientes estudios biológicos.

Para asegurar un cribado de compuestos basado en la eficacia y la seguridad se estudió la **genotoxicidad** de estos derivados mediante el test de SOS/umu. Este test se trata de un ensayo rápido y sencillo que ha permitido demostrar el perfil no genotóxico de los siete compuestos más activos tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica. Cabe mencionar que en este ensayo el fármaco de referencia Bzn, mostró genotoxicidad en las condiciones evaluadas.

Para profundizar en el conocimiento de la capacidad tripanocida de los compuestos **3, 4, 7 y 10**, se realizó un estudio *in vitro* en el que evaluó su **efecto sobre la infectividad y sobre la replicación intracelular de *T. cruzi*** en células Vero. Los compuestos exhibieron una marcada disminución de la tasa de infección de las células Vero expuestas al parásito respecto al fármaco de referencia Bzn. Asimismo, produjeron una clara disminución del número de amastigotes intracelulares y de la cantidad de tripomastigotes extracelulares, indicando un efecto inhibitorio sobre la replicación intracelular del parásito. De esta forma se confirmó la actividad antiparasitaria *in vitro* observada para estos compuestos en los ensayos preliminares.

Tomando como referencia los elevados IS y la ausencia de genotoxicidad, los compuestos **3, 4, 7, 10, 27, 29 y 30** fueron seleccionados para su **evaluación biológica *in vivo*** en ratones BALB/c albinos hembra infectados con tripomastigotes de la cepa Arequipa. En una primera etapa, se determinaron los niveles de parasitemia en los ratones durante los primeros cuarenta días post-infección (pi). Tras el tratamiento con los compuestos se observó una marcada reducción de la parasitemia, destacando los compuestos **4, 7 y 29** ya que fueron capaces de reducirla hasta niveles indetectables antes de la finalización de la fase aguda de la infección.

Posteriormente se evaluó la capacidad de los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** para evitar una **reactivación de la parasitemia** tras someter a los ratones a un periodo de inmunosupresión con ciclofosfamida. Para ello, se sometió a los ratones a una inmunosupresión química consiguiéndose así una reactivación de la parasitemia. Los grupos de ratones que fueron tratados con los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** a una dosis de 100 mg/kg no mostraron reactivación de la parasitemia. Además, el compuesto **7** fue capaz de impedir la reactivación también a una dosis de 50 mg/kg. Estos resultados revelan un significativo efecto de los cuatro derivados evaluados a la hora de evitar las potentes reactivaciones de la parasitemia que se producen en situaciones de inmunosupresión. (NOTA: Los datos finales de la evaluación *in vivo* de los compuestos **27**, **29** y **30** están siendo analizados en estos momentos y por ello no se incluyen en esta memoria. Debe mencionarse que el modelo de evaluación de la actividad *in vivo* ha sido modificado a lo largo del desarrollo del proyecto que se presenta en esta memoria. Por ello, tal y como se puede observar en las publicaciones 1 y 2 existen ciertas diferencias en las pautas de administración así como en los test realizados).

La no detección de parásitos en sangre durante la fase crónica de la EC no implica una desaparición definitiva del parásito del organismo. De hecho, en la mayor parte de los casos clínicos, se encuentra camuflado en los tejidos de sus órganos diana en forma de nidos de amastigotes capaces de provocar reactivaciones de la parasitemia en situaciones de inmunosupresión. Para comprobar si los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** son capaces de eliminar por completo los parásitos tisulares, se evaluó su **efecto curativo en ocho órganos diana** a una dosis de 100 mg/kg. Para ello, se estudió la posible presencia de ADN parasitario en los tejidos mediante PCR. En el grupo control no tratado se detectó una abundante presencia de ADN parasitario en los ocho órganos diana estudiados. En los ratones tratados con Bzn se observó que seis de los ocho órganos diana analizados estaban infectados. En cuanto a los grupos de ratones tratados con los cuatro derivados evaluados, aquellos que fueron tratados con los compuestos **4** y **7** ofrecieron las menores tasas de infección. Tras el tratamiento con el compuesto **4** no se detectó ADN parasitario en ninguno de los órganos diana, mientras que en el caso del compuesto **7** únicamente se detectó una ligera presencia de ADN de *T. cruzi* en dos de los órganos diana. Hay que tener en cuenta que incluso un resultado negativo en la PCR no es completamente concluyente para afirmar que se ha producido una cura completa. Sin embargo, la combinación de los resultados de este método con la ausencia de reactivación de la parasitemia tras la inmunosupresión permite obtener unos resultados útiles y consistentes para medir la carga parasitaria y analizar la efectividad real del tratamiento.

Teniendo en cuenta el gran potencial de actividad *in vitro* e *in vivo* mostrado por los compuestos **4** y **7**, se decidió explorar su **capacidad mutagénica** mediante el test de Ames.

Ambos compuestos resultaron no mutagénicos tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica. Por lo tanto, los compuestos **4** y **7** han sido considerados como candidatos muy interesantes para el desarrollo de un agente antichagásico.

### Leishmaniasis

Una vez demostrada la interesante actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *T. cruzi* y la ausencia de efectos genotóxicos de esta familia de compuestos se decidió ampliar el estudio de su actividad biológica evaluándolos frente a *Leishmania spp.* Este estudio se justifica considerando que *Leishmania* comparte numerosas similitudes bioquímicas con *T. cruzi* por pertenecer a la misma familia de parásitos. Además, existen en la bibliografía ejemplos como los antifúngicos derivados de azoles y los derivados de bisfosfonatos que han mostrado una alta eficacia frente a ambos kinetoplástidos<sup>7,8</sup>.

En primer lugar se evaluó la **actividad biológica *in vitro*** de los compuestos **1-20** frente a las formas extracelular e intracelular del parásito en las especies *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*. Además, se estudió su **citotoxicidad** en macrófagos murinos de la línea celular J774.2. Al igual que lo observado en la evaluación *in vitro* frente a *T. cruzi*, los derivados **3, 4, 7** y **10** mostraron resultados de selectividad que mejoran con amplitud el valor de **IS** presentado por el fármaco de referencia Glucantime. Al igual que lo observado en la Publicación 1, los derivados de benzo[b]tiofeno (**1-10**) han presentado los mejores datos de citotoxicidad, siendo los dos derivados que presentan el grupo bencilo en su estructura (**8** y **9**) los únicos con valores de  $CI_{50} < 150 \mu M$ . Este resultado parece indicar una influencia del anillo de benzo[b]tiofeno sobre este parámetro. Es interesante destacar que los mejores resultados de selectividad se han obtenido frente a las formas intracelulares de *L. infantum* y *L. donovani*, especies pertenecientes al complejo *L. donovani*, causante de la LV, manifestación más grave de la enfermedad. Los excelentes resultados de actividad *in vitro* y los elevados IS que han mostrado los derivados **3, 4, 7** y **10** nos llevaron a considerarlos como candidatos ideales para estudios biológicos más avanzados que permitan continuar con el proceso de desarrollo de fármacos frente a *Leishmania*.

Para profundizar en el conocimiento de la actividad antileishmania de los compuestos más activos (**3, 4, 7** y **10**), al igual que lo comentado anteriormente para *T. cruzi*, se evaluó el efecto sobre la **infectividad y la replicación intracelular** de amastigotes en macrófagos. Del mismo modo que en el ensayo en *T. cruzi* los cuatro compuestos disminuyeron notablemente la tasa de infección del parásito a la dosis del  $IC_{25}$  y la tasa de replicación intracelular de los amastigotes en comparación con el grupo control y el fármaco de referencia.

### Mecanismo de acción

Una vez comprobada la interesante actividad biológica de esta familia de compuestos se realizaron una serie de estudios para esclarecer el posible **mecanismo de acción** a través del cual desarrollan su actividad. Para ello, se ha estudiado la actividad de diferentes compuestos frente a cuatro dianas específicas de estos tripanosomátidos. En *T. cruzi* se han estudiado la enzima Fe-SOD, el metabolismo energético, la ruta de biosíntesis de esteroides y la cruzipaina; mientras que en *Leishmania* se han estudiado la enzima Fe-SOD y el metabolismo energético.

La **Fe-SOD** es una diana de interés en la búsqueda de nuevos derivados frente a kinetoplastidos ya que presenta diferencias en cuanto a sus características estructurales y bioquímicas con respecto a su enzima homóloga presente en humanos. Esta enzima, lleva a cabo una función fundamental ya que permite al parásito evitar el daño causado por las EROs formadas en las células inmunes como respuesta a la presencia del parásito. Se evaluó el efecto de los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** sobre la enzima **Fe-SOD de *T. cruzi*** de la cepa Arequipa y sobre la enzima CuZn-SOD humana para comprobar la selectividad por la forma parasitaria. Los cuatro derivados mostraron una actividad inhibitoria moderada frente a Fe-SOD destacando el compuesto **7** con cierta selectividad sobre la Fe-SOD parasitaria respecto a la CuZn humana. El compuesto **4** fue el menos activo frente a la enzima parasitaria a pesar de haber mostrado excelentes resultados en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Debido a esto, se debe considerar la posible participación de otros mecanismos de acción, no pudiéndose descartar la posibilidad de un mecanismo multidiana. Estos resultados experimentales se han conseguido explicar mediante un estudio de acoplamiento molecular *in silico* de los derivados frente a la enzima Fe-SOD mitocondrial parasitaria y frente a la enzima CuZn-SOD humana. Se observó que se producen interacciones electrostáticas entre los sustituyentes electroatrayentes flúor (compuestos **4** y **7**) y nitro (compuestos **3** y **10**) con los residuos polares Lys35, Gln68 y Asn117 presentes en el bolsillo hidrófobo al que se unen estos compuestos. Debido a que este bolsillo se localiza en la zona de unión entre los dos monómeros se propusieron como posibles mecanismos de inhibición el bloqueo del acceso del sustrato hasta el sitio activo o incluso una interrupción de la dimerización. Se observó que el compuesto **3** sufre interacciones electrostáticas entre el átomo de azufre y el residuo Asp53 y entre el grupo nitro y la Lys9 en el acoplamiento con CuZn-SOD humana lo que podría explicar la falta de selectividad observada en el ensayo experimental. También se ha evaluado la inhibición de estos cuatro compuestos sobre la enzima **Fe-SOD de *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani***. Los compuestos **3**, **4** y **7** han sido identificados como los más selectivos frente a la Fe-SOD parasitaria en las tres especies. Considerando los resultados obtenidos en *T. cruzi* y *Leishmania* cabe destacar como el compuesto **7** mantiene su actividad y selectividad frente a la Fe-SOD de ambos

kinetoplástidos, mientras que el compuesto **3**, que no ha presentado selectividad frente a la enzima de *T. cruzi* ha sido el compuesto más selectivo frente a la Fe-SOD de *Leishmania*.

Para seguir arrojando luz sobre el posible mecanismo de acción de los compuestos se ha evaluado su efecto sobre el **metabolismo energético** de *T. cruzi* y *Leishmania*. Los tripanosomátidos son incapaces de degradar completamente la glucosa hasta CO<sub>2</sub> y, como producto de esta incompleta oxidación excretan al medio moléculas provenientes de diferentes vías del metabolismo de la glucosa. Para evaluar el efecto de los compuestos **3, 4, 7** y **10** sobre este metabolismo en *T. cruzi* y *Leishmania* se cuantificaron el acetato, el succinato, la L-alanina y el D-lactato, principales productos de este catabolismo. Tras el tratamiento con los compuestos se produjo una alteración del catabolismo de la glucosa en ambos kinetoplástidos, la cual se evidenció con un claro aumento de la cantidad de succinato excretado en un rango del 16,1 al 251,3 %. Los datos obtenidos indican una posible alteración de las vías metabólicas en las que participa el succinato. Este aumento observado pudiera estar relacionado con una anomalía de la actividad mitocondrial que estaría ocasionada por el aumento de estrés oxidativo causado por la inhibición de la Fe-SOD mitocondrial. Esta relación se ha observado con mayor claridad en el comportamiento del compuesto **3** en *Leishmania* ya que ha sido el más selectivo frente a la Fe-SOD y a su vez produjo el mayor porcentaje de excreción de succinato.

Para seguir profundizando en los estudios del mecanismo de acción en *T. cruzi* se ha evaluado el posible efecto de ocho derivados de bases de Mannich sobre la **ruta de biosíntesis de esteroides en epimastigotes de *T. cruzi*** de las cepas Tulahuen 2 e Y. Los esteroides son un grupo de lípidos que forman parte de la membrana celular de *T. cruzi* y su presencia es esencial para mantener la viabilidad celular. Para estudiar el efecto de nuestros compuestos sobre esta ruta se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico que ha permitido el análisis simultáneo de escualeno, colesterol, ergosterol, lanosterol y 2,3-escualeno epóxido en epimastigotes de *T. cruzi* mediante cromatografía de Gases-Masas (GC-MS). El Terbinafine (Tbf), inhibidor utilizado como referencia, mostró una depleción de ergosterol y una acumulación de escualeno y lanosterol, tal y como se esperaba, ya que se trata de un conocido inhibidor de las enzimas escualeno-2,3-epoxidasa y CYP51. Este resultado demuestra que nuestro método reproduce los datos teóricos descritos en la bibliografía para este fármaco<sup>9,10</sup>. Se observaron diferencias en los resultados de acumulación y depleción de lípidos en función de la cepa utilizada. Esto pudiera estar relacionado con las diferencias genéticas y bioquímicas existentes entre las diferentes cepas de *T. cruzi*<sup>11</sup>. Todos los compuestos produjeron una depleción de ergosterol en la cepa Y, mostrando siete de ellos (**3, 12, 44, 51, 67, 70 y 71**) valores similares o incluso superiores Tbf. Por su parte, en la cepa Tulahuen 2 cinco de los ocho

compuestos (**3**, **41**, **44**, **67** y **71**) produjeron esta depleción, destacando los compuestos **67** y **71** ya que presentaron niveles similares al Tbf. Con los resultados obtenidos se han identificado posibles efectos inhibitorios sobre las enzimas escualeno-2,3-epoxidasa, CYP51 y enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis de isoprenoides. Concretamente el compuesto **3**, uno de los más activos frente a ambos kinetoplástidos, mostró una marcada acumulación de lanosterol, lo que indicaría una posible inhibición sobre CYP51 de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*.

Por último se ha llevado a cabo la evaluación de la inhibición frente a la **cruzipaína** aislada de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen 2. Esta enzima es la principal cisteína endopeptidasa y una de las dianas selectivas más estudiadas en este parásito. Diez de los diecinueve derivados evaluados (**1**, **8**, **14**, **17**, **51**, **53**, **63**, **64**, **67** y **70**) exhibieron valores de  $CI_{50}$  entre 9,3  $\mu$ M y 55,8  $\mu$ M. Todos los compuestos resultaron ser más activos a los 30 minutos de incubación que a los 15 minutos, lo que parece mostrar una ligera inhibición de unión lenta<sup>12</sup>. Debe resaltarse que compuestos **3** y **7** no provocaron actividad inhibitoria frente a esta enzima, lo que podría indicar que la elevada eficacia anti-*T. cruzi* de estos compuestos se debe a otro mecanismo de acción.

Tras haber realizado una recopilación de todos los resultados obtenidos se seleccionaron los derivados **4**, **7** y **29** como compuestos líderes de este trabajo. Para comprobar si estos compuestos pueden ser buenos candidatos para un futuro desarrollo clínico se estudió su **perfil farmacocinético**. Este estudio ha revelado que los compuestos **4** y **7** cumplen con el mínimo valor de biodisponibilidad por VO recomendado por la OMS. Cabe destacar el compuesto **4** con una biodisponibilidad superior al 90 %. El compuesto **29** presenta un perfil farmacocinético diferente con una muy baja biodisponibilidad pero, sin embargo, con una elevada actividad *in vivo*. Estos parámetros farmacocinéticos unidos a la estructura del compuesto parecen indicar que pudiera haber sufrido un efecto de primer paso con la formación de un metabolito activo y más tóxico que el compuesto original, por ello será necesario profundizar en el estudio del metabolismo de este compuesto. Por tanto, los compuestos **4** y **7** destacan como prometedores líderes para continuar su desarrollo como posibles agentes para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En resumen, la familia de derivados de bases de Mannich presentada ha demostrado poseer un gran potencial para el desarrollo de nuevos agentes frente a la EC y la leishmaniasis. Se han identificado compuestos con excelentes resultados de eficacia *in vitro* frente a ambos kinetoplástidos, con muy baja citotoxicidad frente a células mamíferas, no genotóxicos y no mutagénicos. Los compuestos líderes han demostrado poseer una elevada actividad *in vivo*



frente a *T. cruzi* en fase aguda. Además, presentaron una alta efectividad evitando la reactivación de la parasitemia en un modelo de inmunosupresión y un efecto curativo sobre los parásitos presentes en los órganos diana, lo cual demuestra su gran potencial durante la fase crónica de EC.

En cuanto a los estudios de mecanismo de acción realizados frente a las dianas específicas de *T. cruzi* y *Leishmania* los compuestos líderes poseen efecto inhibitorio frente a varias de ellas. Sin embargo, la potente eficacia de estos derivados frente a los kinetoplastidos no puede ser explicada por la actividad inhibitoria que muestran sobre una diana en concreto. Es por ello que se propone que los compuestos pudieran estar actuando a través de un efecto multidiana, lo cual puede ser de interés en el tratamiento de enfermedades de origen multifactorial como la EC y la leishmaniasis.

### Referencias bibliográficas

1. WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1> (06.06.16).
2. WHO. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **2017**, 557-572.
3. DNDi. Chagas Disease target product profile. <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-target-product-profile/> (10.08.16).
4. DNDi. Target product profile. Target Product Profile for Visceral Leishmaniasis. Target Product Profile for Cutaneous Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/leish-target-product-profile/> (04.12.16).
5. Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G.; Second Satellite, M. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104, 1051-4.
6. Brisse, S.; Barnabe, C.; Tibayrenc, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* **2000**, 30, 35-44.
7. Martin, M. B.; Grimley, J. S.; Lewis, J. C.; Heath, H. T., 3rd; Bailey, B. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Caldera, A.; Lira, R.; Urbina, J. A.; Moreno, S. N.; Docampo, R.; Croft, S. L.; Oldfield, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J Med Chem* **2001**, 44, 909-16.
8. Iniguez, E.; Sanchez, A.; Vasquez, M. A.; Martinez, A.; Olivas, J.; Sattler, A.; Sanchez-Delgado, R. A.; Maldonado, R. A. Metal-drug synergy: new ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and nontoxic to human or murine normal cells. *J Biol Inorg Chem* **2013**, 18, 779-90.
9. Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, 104, 311-318.
10. Couto, M.; Sanchez, C.; Davila, B.; Machin, V.; Varela, J.; Alvarez, G.; Cabrera, M.; Celano, L.; Aguirre-Lopez, B.; Cabrera, N.; de Gomez-Puyou, M. T.; Gomez-Puyou, A.; Perez-Montfort, R.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M. 3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-*Trypanosoma cruzi* Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies. *Molecules* **2015**, 20, 14595-610.
11. Mielniczki-Pereira, A. A.; Chiavegatto, C. M.; López, J. A.; Colli, W.; Alves, M. J. M.; Gadelha, F. R. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress,

- display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. *Acta Tropica* **2007**, 101, 54-60.
12. Copeland, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem Anal* **2005**, 46, 1-265.

## **CONCLUSIONES**



El desarrollo de este proyecto de investigación y el estudio de los resultados experimentales obtenidos han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. El uso de la reacción de Mannich ha demostrado ser adecuado para la síntesis de los compuestos diseñados de manera costo-efectiva debido a los reducidos tiempos de reacción y la elevada variabilidad estructural de reactivos.
2. Treinta y ocho de los sesenta y nueve compuestos presentan valores de  $CI_{50}$  inferiores al Benznidazol en alguno de los estadios de *Trypanosoma cruzi* en alguna de las cepas evaluadas.
3. Sesenta y dos compuestos muestran mejores resultados de citotoxicidad frente a células Vero que el Benznidazol mostrando once de ellos valores de  $CI_{50}$  superiores a 250  $\mu M$ . Los derivados de benzo[b]tiofeno **3**, **4**, **7** y **10** destacan con valores de  $CI_{50}$  en un rango entre 758,6  $\mu M$  y 2846,3  $\mu M$ . Desde un punto de vista estructural la presencia de un anillo de benzo[b]tiofeno conduce a una disminución de la citotoxicidad de los compuestos.
4. Diecinueve de los compuestos diseñados presentan índices de selectividad superiores a 10 frente a alguna de las formas de alguna de las cepas Arequipa, Tulahuen y SN3 analizadas. Los derivados **3**, **4**, **7**, **10**, **27**, **29** y **30** destacan con índices de selectividad de hasta más de tres mil veces el valor ofrecido por el Benznidazol. De esta forma se confirma el perfil prometedor de esta familia de compuestos como potenciales agentes tripanocidas.
5. La evaluación de la genotoxicidad mediante el test de SOS/umu ha demostrado el perfil no genotóxico de esta familia de compuestos. Se confirma el interés y la utilidad de este ensayo en el cribado preliminar de los compuestos.
6. Los compuestos **4**, **7** y **29** reducen la parasitemia hasta límites indetectables antes de alcanzar los 40 días post-infección. De esta manera se comprueba la eficacia de estos compuestos durante la infección aguda por *Trypanosoma cruzi* en ratón.
7. Los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** evitaron la reactivación de la parasitemia tras inmunosupresión y eliminaron la presencia de los parásitos en al menos la mitad de los órganos diana. Los compuestos **4** y **7** se postulan como los líderes ya que presentan un efecto curativo casi total en los ocho órganos diana estudiados.
8. Todos los compuestos evaluados *in vitro* frente a las especies *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani* muestran valores de  $CI_{50}$  inferiores al Glucantime en alguna de las tres cepas evaluadas.
9. Dieciocho de los veinte derivados mejoran el valor de citotoxicidad del Glucantime frente a macrófagos de la línea celular J774.2. Los derivados de benzo[b]tiofeno **3**, **4**, **7** y **10**, al igual que lo observado en células Vero, exhiben los mejores datos de citotoxicidad con valores de  $CI_{50}$  en un rango entre 693,9  $\mu M$  y 1753,8  $\mu M$ .

10. Los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** se consideran como los líderes de esta serie ya que poseen índices de selectividad de hasta 2337 veces el valor del fármaco de referencia Glucantime. Por lo tanto, se observa una correlación entre los resultados obtenidos frente a *Trypanosoma cruzi* y los obtenidos frente a *Leishmania* confirmando que la estrategia propuesta de ampliar el estudio de los compuestos frente a la leishmaniasis ha sido adecuada.
11. Los compuestos **3**, **4**, **7** y **10** muestran una moderada actividad inhibitoria frente a las enzimas Fe-SOD mitocondriales de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* y producen una alteración en el metabolismo de la glucosa. Esta modificación metabólica puede estar relacionada con una alteración mitocondrial provocada por la inhibición sobre la enzima Fe-SOD.
12. Se ha desarrollado y validado un método analítico de cromatografía de Gases-Masas que ha mejorado los límites de detección y cuantificación de escualeno, escualeno-2,3-epóxido, colesterol, ergosterol y lanosterol en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con respecto a los métodos descritos hasta el momento. Además, es la primera vez que se publican datos de validación del escualeno-2,3-epóxido. De esta manera se ha desarrollado una herramienta sencilla para el screening de posibles inhibidores de la ruta de biosíntesis de esteroides.
13. La aplicación del método cromatográfico validado a ocho compuestos ha permitido identificar posibles efectos inhibitorios sobre las enzimas escualeno-2,3-epoxidasa, CYP51 y enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis de isoprenoides.
14. Los estudios de mecanismo de acción realizados muestran que no existe una correlación entre la potente actividad biológica mostrada por los compuestos líderes **3**, **4**, **7** y **10**, y el efecto inhibitorio producido sobre cada una de las dianas estudiadas. El efecto moderado que se observa frente a diferentes dianas indica un posible mecanismo de acción multidiana, algo que puede resultar interesante en el tratamiento de enfermedades multifactoriales como la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.
15. El estudio del perfil farmacocinético de los compuestos líderes **4**, **7** y **29** muestra que los compuestos **4** y **7** poseen una biodisponibilidad del 92 y del 38 % respectivamente, cumpliendo el requisito propuesto por la OMS para ser candidatos a un futuro desarrollo clínico. El compuesto **29** muestra una baja biodisponibilidad a pesar de su elevada actividad *in vivo*, lo cual puede atribuirse a un posible efecto de primer paso.
16. Las bases de Mannich con núcleo central de tipo arilaminocetona se constituyen como una familia de compuestos con gran potencial en el desarrollo de nuevas moléculas con actividad tripanocida y leishmanicida.

## **CONCLUSIONS**





The development of this research project and the study of the experimental results obtained allowed us to reach the following conclusions:

1. The use of the Mannich reaction has proved to be suitable for the synthesis of the cost-effective designed compounds due to the reduced reaction times and the high structural variability of reagents.
2. Thirty-eight out of the sixty-nine compounds have lower  $IC_{50}$  values than Benznidazole in any of the *Trypanosoma cruzi* stages in any of the evaluated strains.
3. Sixty-two compounds show better cytotoxicity results on Vero cells than Benznidazole, showing eleven of them greater  $IC_{50}$  values than 250  $\mu$ M. The benzo[*b*]thiophene derivatives **3**, **4**, **7** and **10** stand out with  $IC_{50}$  values ranging from 758.6  $\mu$ M to 2846.3  $\mu$ M. From a structural point of view the presence of a benzo[*b*]thiophene ring leads to a decrease in the compounds cytotoxicity.
4. Nineteen of the designed compounds have higher selectivity indexes than 10 against to some of the forms of the Arequipa, Tulahuen or SN3 strains analyzed. Derivatives **3**, **4**, **7**, **10**, **27**, **29** and **30** stand out with selectivity indexes up to more than three thousand times the offered value by Benznidazole. These results confirm the promising profile of this family of compounds as potential trypanocidal agents.
5. Assessment of genotoxicity by the SOS/umu test has demonstrated the non-genotoxic profile of this family of compounds. The interest and usefulness of this assay in the preliminary screening of the compounds is confirmed.
6. Compounds **4**, **7** and **29** reduce the parasitemia bellow detectable limits before reaching 40 days post-infection. In this way, the efficacy of these compounds during acute mouse infection by *Trypanosoma cruzi* is confirmed.
7. Compounds **3**, **4**, **7** and **10** prevent the parasitemia reactivation after immunosuppression and eliminate the parasites presence in at least half of the target organs. Compounds **4** and **7** are postulated as the leaders since they have an almost total curative effect on the eight studied target organs.
8. All *in vitro* evaluated compounds against *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania donovani* show lower  $IC_{50}$  values than Glucantime in any of the parasite forms in any of the three evaluated strains.
9. Eighteen of the twenty derivatives improve the Glucantime cytotoxicity value on J774.2 macrophages cell line. The benzo[*b*]thiophene derivatives **3**, **4**, **7** and **10**, as observed in Vero cells, exhibit the best cytotoxicity data with  $IC_{50}$  values ranging from 693.9  $\mu$ M to 1753.8  $\mu$ M.

10. Compounds **3**, **4**, **7** and **10** are considered the leaders of this series since they have selectivity indexes up to 2337 times the value of the reference drug Glucantime. Therefore, a correlation between the results obtained against *Trypanosoma cruzi* and those obtained against *Leishmania* was observed, confirming that the proposed strategy of extending the study of the compounds against leishmaniasis has been adequate.
11. Compounds **3**, **4**, **7** and **10** show moderate inhibitory activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* mitochondrial Fe-SOD enzymes and produce an alteration in glucose metabolism. This metabolic modification may be related to a mitochondrial alteration caused by inhibition on the enzyme Fe-SOD.
12. An analytical method of Gas chromatography Mass spectrometry has been developed and validated. The new method has improved the detection and quantification limits of squalene, squalene-2,3-epoxide, cholesterol, ergosterol and lanosterol in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with respect to the described methods so far. In addition, this is the first time that validation data for squalene-2,3-epoxide have been published. In this way a simple tool has been developed for the screening of possible sterol biosynthetic pathway inhibitors.
13. The application of the validated chromatographic method to eight compounds has allowed to identify possible inhibitory effects on the enzymes squalene-2,3-epoxidase, CYP51 and enzymes belonging to the isoprenoid biosynthesis pathway.
14. Mechanism of action studies show that there is no correlation between the potent biological activity shown by the lead compounds **3**, **4**, **7** and **10**, and the inhibitory effect produced on each of the studied targets. The moderate effect observed in different targets indicates a possible multitarget mechanism of action, which may be interesting in the treatment of multifactorial diseases such as Chagas disease and leishmaniasis.
15. The study of the pharmacokinetic profile of the lead compounds **4**, **7** and **29** shows that compounds **4** and **7** possess a bioavailability of 92 and 38 % respectively, meeting the proposed requirement by the WHO to be candidates for future clinical development. Compound **29** shows a low bioavailability despite its high activity *in vivo*, which can be attributed to a possible first-pass effect.
16. Mannich bases with arylaminoketone-type central structure are constituted as a family of compounds with great potential in the development of new molecules with trypanocidal and leishmanicidal activity.

# **ANEXOS**



**ANEXO 1: Compuestos presentados en esta tesis**



Código tesis	Código publicación	Estructura	Código tesis	Código publicación	Estructura
1	Publicación 1: 1 Publicación 3: 1		20	Publicación 1: 20 Publicación 3: 20	
2	Publicación 1: 2 Publicación 3: 2		21	Publicación 2: 1	
3	Publicación 1: 3 Publicación 3: 3 Publicación 4: 1		22	Publicación 2: 2	
4	Publicación 1: 4 Publicación 3: 4		23	Publicación 2: 3	
5	Publicación 1: 5 Publicación 3: 5		24	Publicación 2: 4	
6	Publicación 1: 6 Publicación 3: 6		25	Publicación 2: 5	
7	Publicación 1: 7 Publicación 3: 7		26	Publicación 2: 6	
8	Publicación 1: 8 Publicación 3: 8		27	Publicación 2: 7	
9	Publicación 1: 9 Publicación 3: 9		28	Publicación 2: 8	
10	Publicación 1: 10 Publicación 3: 10		29	Publicación 2: 9	
11	Publicación 1: 11 Publicación 3: 11		30	Publicación 2: 10	
12	Publicación 1: 12 Publicación 3: 12 Publicación 4: 3		31	Publicación 2: 11	
13	Publicación 1: 13 Publicación 3: 13		32	Publicación 2: 12	
14	Publicación 1: 14 Publicación 3: 14		33	Publicación 2: 13	
15	Publicación 1: 15 Publicación 3: 15		34	Publicación 2: 14	
16	Publicación 1: 16 Publicación 3: 16		35	Publicación 2: 15	
17	Publicación 1: 17 Publicación 3: 17		36	Publicación 2: 16	
18	Publicación 1: 18 Publicación 3: 18		37	Publicación 2: 17	
19	Publicación 1: 19 Publicación 3: 19		38	Publicación 2: 18	

Código tesis	Código publicación	Estructura	Código tesis	Código publicación	Estructura
39	Publicación 2: 19		56	Publicación 2: 36	
40	Publicación 2: 20		57	Publicación 2: 37	
41	Publicación 2: 21 Publicación 4: 2		58	Publicación 2: 38	
42	Publicación 2: 22		59	Publicación 2: 39	
43	Publicación 2: 23		60	Publicación 2: 40	
44	Publicación 2: 24 Publicación 4: 7		61	Publicación 2: 41	
45	Publicación 2: 25		62	Publicación 2: 42	
46	Publicación 2: 26		63	Publicación 2: 43	
47	Publicación 2: 27		64	Publicación 2: 44	
48	Publicación 2: 28		65	Publicación 2: 45	
49	Publicación 2: 29		66	Publicación 2: 46	
50	Publicación 2: 30		67	Publicación 2: 47 Publicación 4: 5	
51	Publicación 2: 31 Publicación 4: 6		68	Publicación 2: 48	
52	Publicación 2: 32		69	Publicación 2: 49	
53	Publicación 2: 33		70	Librería grupo Publicación 4: 8	
54	Publicación 2: 34		71	Librería grupo Publicación 4: 4	
55	Publicación 2: 35				

**Publicación 1.** *In Vitro* and *in Vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of New Arylamine Mannich Base-Type Derivatives, *J Med Chem*, 59 (2016) 10929-10945.

**Publicación 2.** Second generation of Mannich base type derivatives with *in vivo* activity against *Trypanosoma cruzi* (Artículo en proceso de redacción).

**Publicación 3.** *In vitro* antileishmanial activity and iron superoxide dismutase inhibition of arylamine Mannich base derivatives. *Parasitology*, (2017) 1-8.

**Publicación 4.** Development, validation and application of a GC-MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1061-1062 (2017) 225-232.



## **ANEXO 2: Futuros planes de trabajo del proyecto de investigación**



## Anexo 2: Futuros planes de trabajo del proyecto de investigación

Una vez cumplido el plan de trabajo planteado en esta tesis y haber identificado los derivados **4**, **7** y **29** como los compuestos líderes, el grupo de trabajo, dentro del proyecto de investigación en enfermedad de Chagas, continuará con estudios de profundización con estos tres compuestos.

Respecto a los derivados **4** y **7** se tiene previsto realizar un estudio de la pauta de administración en la London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM). Para ello se realizará un ensayo *in vivo* en un modelo corto con una dosis de administración de 20 mg/Kg y una frecuencia de administración de doce horas durante un periodo de cinco días. En función de los resultados que se obtengan se optimizará la pauta de administración y se realizará un estudio en un modelo más completo.

Se ha propuesto también el estudio de estos compuestos en terapias combinadas, evaluando por un lado la actividad biológica mostrada por una combinación de los compuestos **4** y **7**, y por otro, la combinación de cada uno de estos derivados con el Bzn.

Además, se propone un estudio sobre la biodistribución de estos compuestos hacia los diferentes órganos para obtener una mayor información acerca del origen del diferente perfil farmacocinético y de actividad que presentan.

Para el compuesto **29** se propone llevar a cabo la síntesis de su derivado análogo con un grupo hidroxilo en lugar del grupo metoxi, propuesto como metabolito para este compuesto tras el estudio farmacocinético. Se propone también llevar a cabo un estudio de estabilidad en microsomas hepáticos del compuesto **29** y de su análogo sintetizado y proceder a una identificación de los metabolitos generados. En caso de identificar el derivado con el grupo hidroxilo como uno de los principales metabolitos del derivado **29** se propondrá la evaluación biológica. Los resultados obtenidos se compararían con los obtenidos para el compuesto **29** y poder estudiar de esta forma si este último estaría actuando como un profármaco.



**ANEXO 3: Material suplementario de la Publicacines 1 y de la Publicación 2**



***In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new arylamine Mannich base-type derivatives.**

Elsa Moreno-Viguri,<sup>†,‡</sup> Carmen Jimenez Montes,<sup>§,‡</sup> Rubén Martín-Escolano,<sup>§</sup> Mery Santivañez-Veliz,<sup>†</sup> Alvaro Martín-Montes,<sup>§</sup> Amaya Azqueta,<sup>¶,‡</sup> Marina Jimenez-Lopez,<sup>§</sup> Salvador Zamora Ledesma,<sup>§</sup> Nuria Cirauqui,<sup>‡</sup> Adela López de Ceráin,<sup>¶,‡</sup> Clotilde Marín,<sup>§</sup> Manuel Sánchez-Moreno,<sup>§,\*</sup> Silvia Pérez-Silanes<sup>†,\*</sup>

Table of contents

Compounds characterization. Representative <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR spectra.	S2
Figure S28. <sup>1</sup> H NMR spectra of the excretion products obtained after centrifugation of <i>T. cruzi</i> culture supernatants of epimastigotes	S16

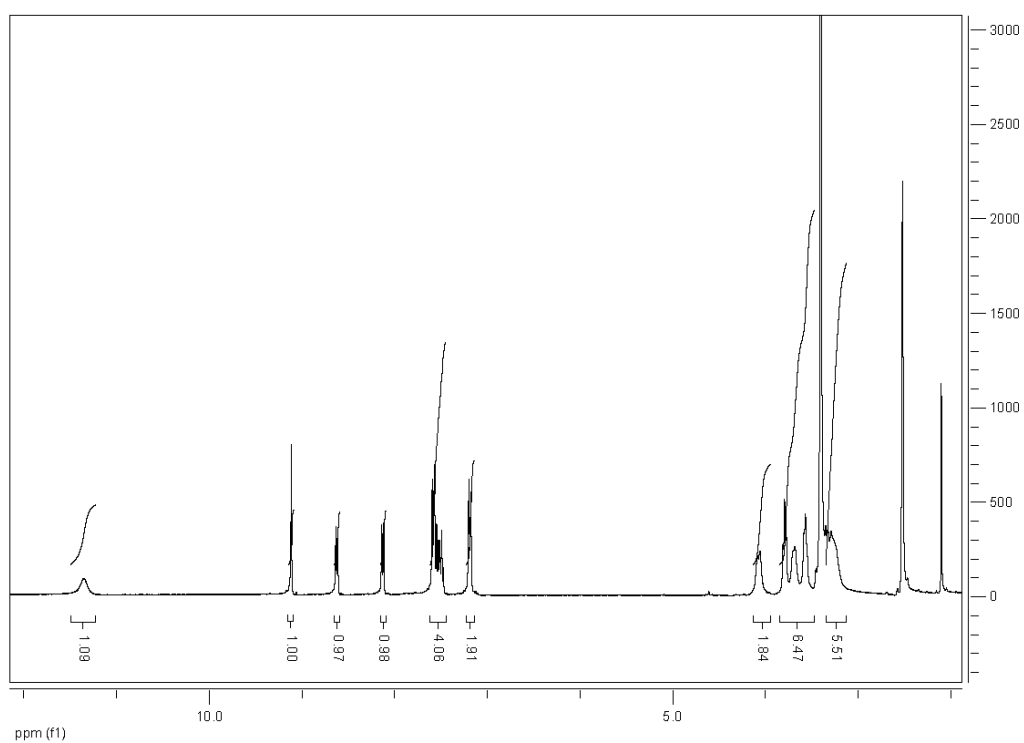


Figure S1.  $^1\text{H}$  NMR of compound 1.

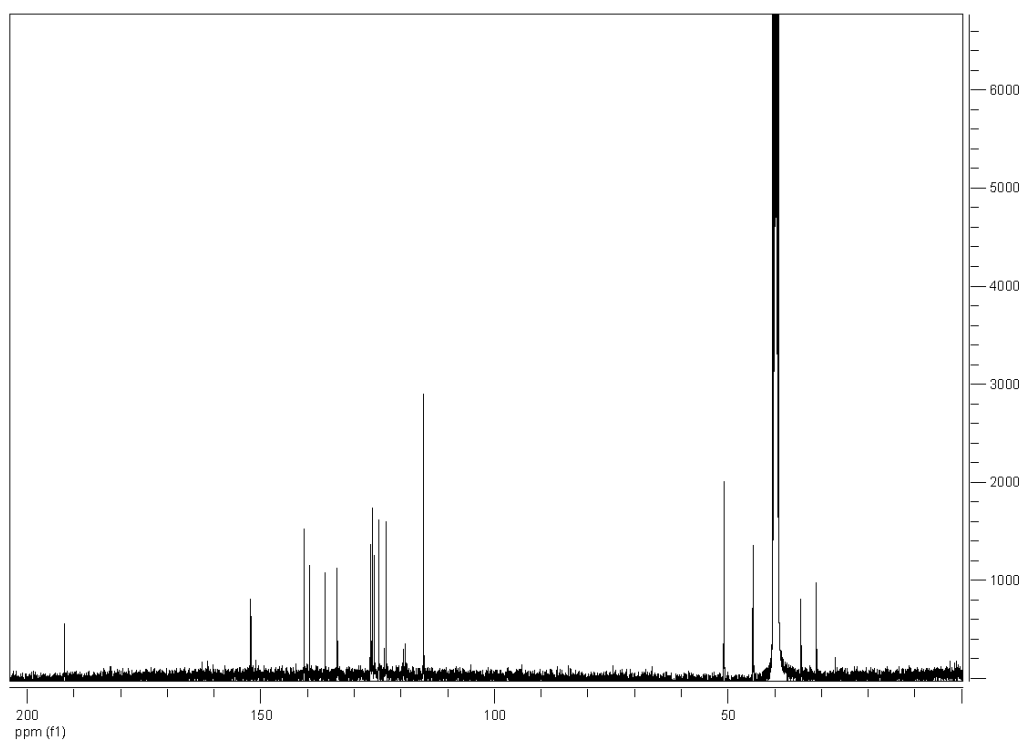


Figure S2.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 1.



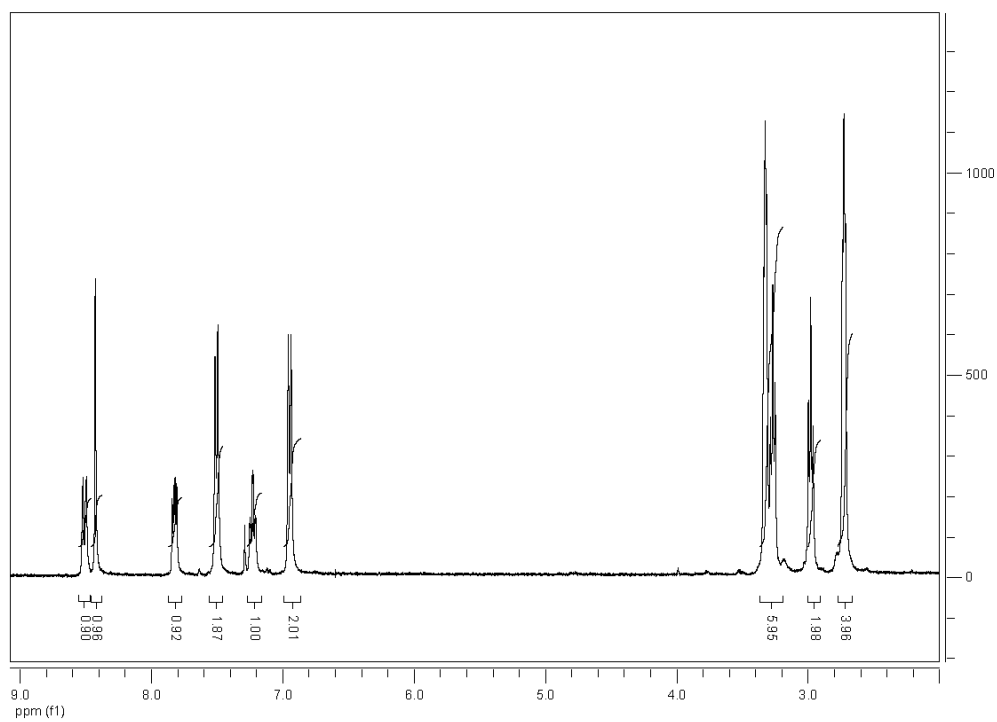


Figure S3.  $^1\text{H}$  NMR of compound 4.

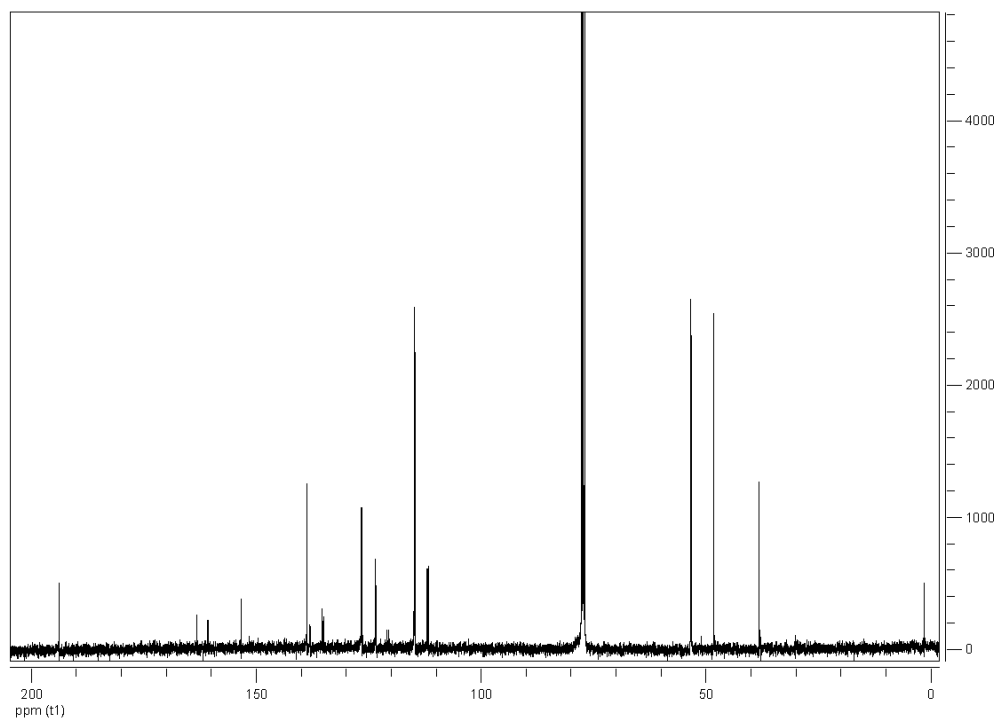


Figure S4.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 4.

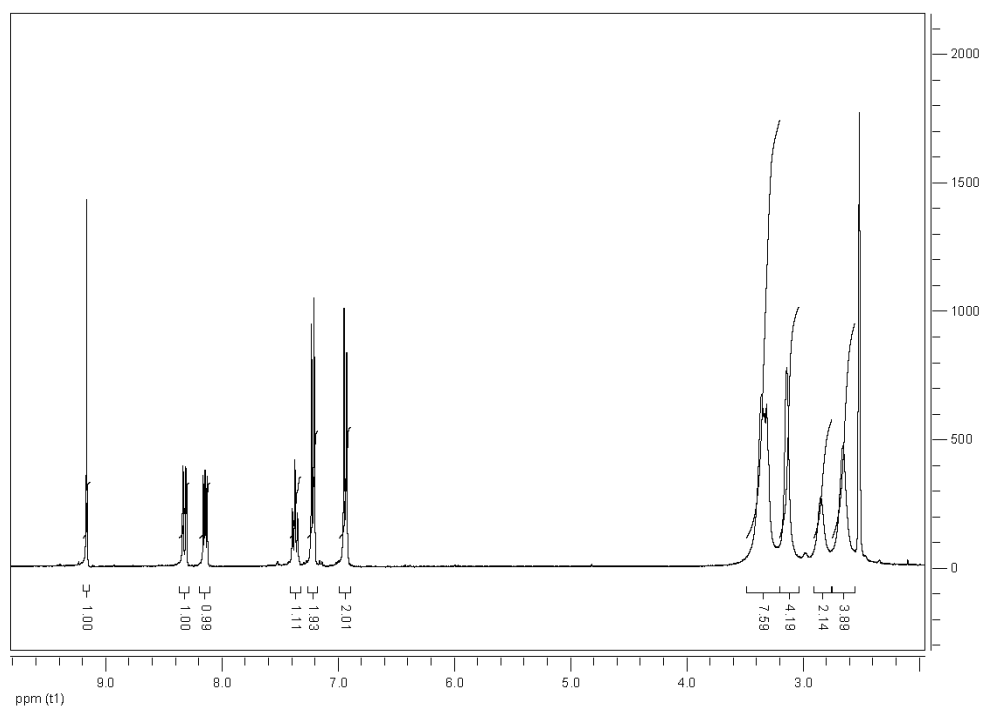


Figure S5.  $^1\text{H}$  NMR of compound 5.

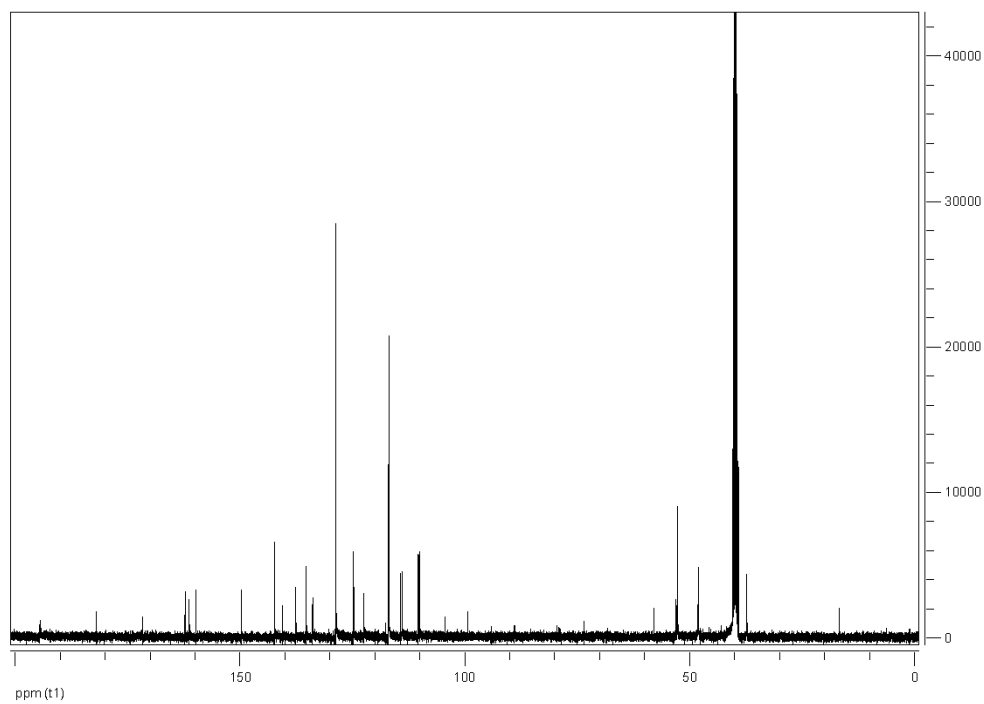


Figure S6.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 5.

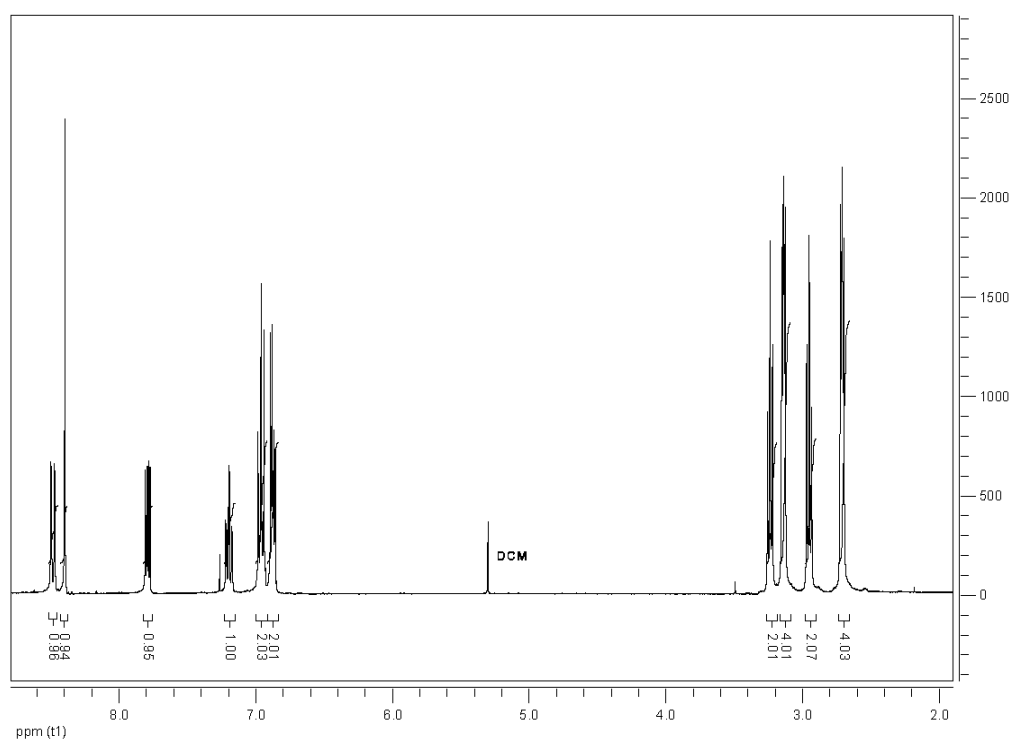


Figure S7.  $^1\text{H}$  NMR of compound 7.

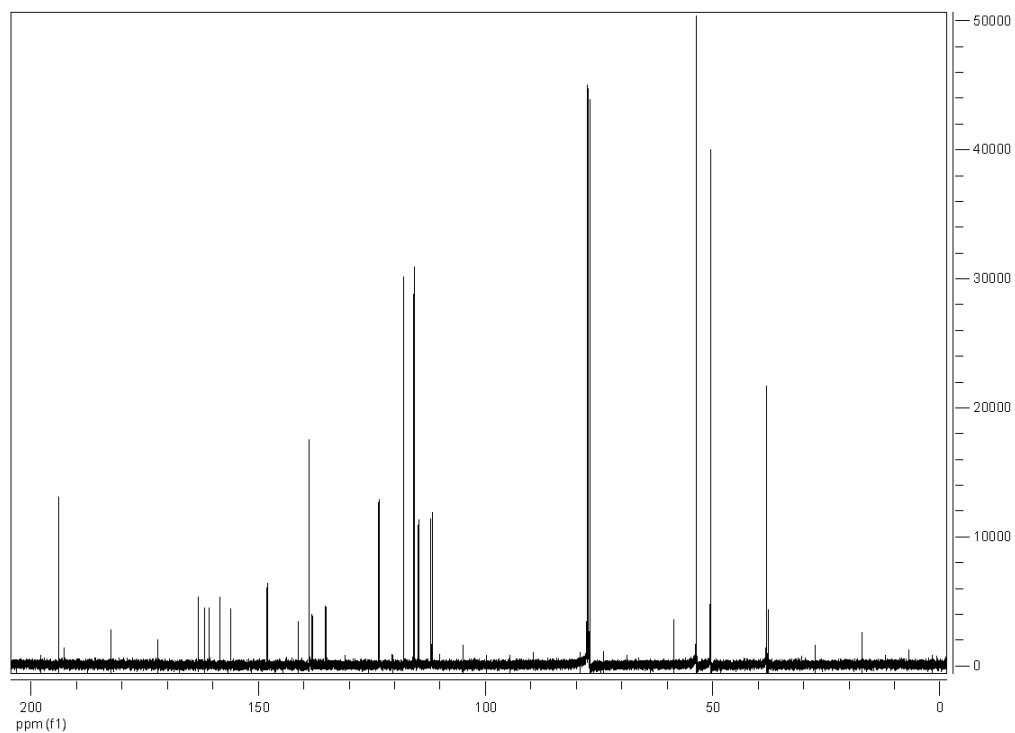


Figure S8.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 7.

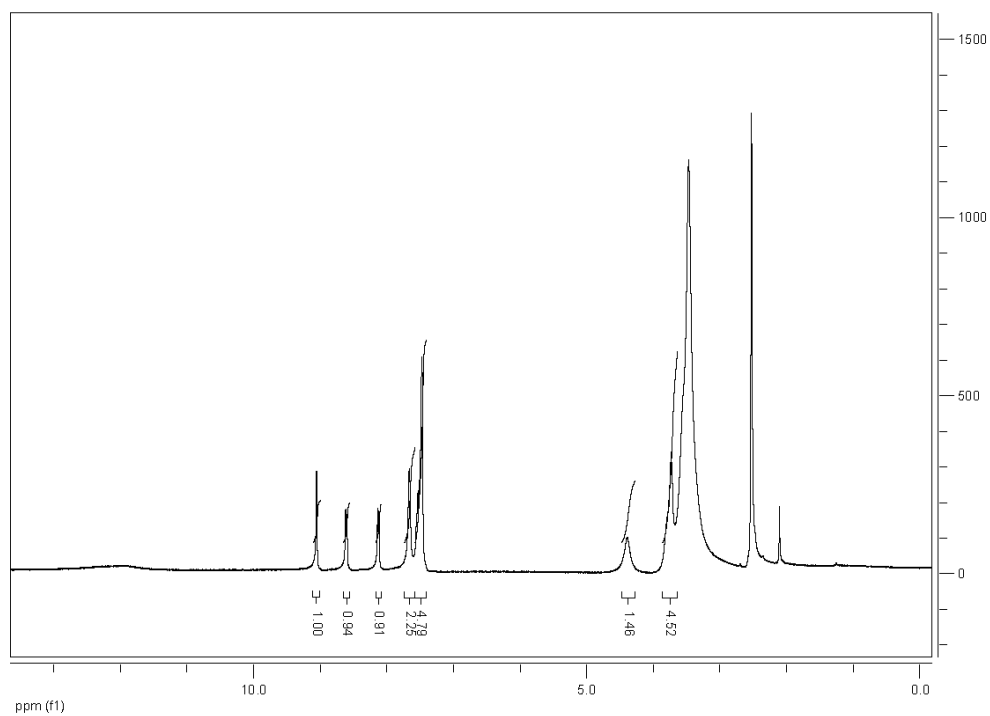


Figure S9.  $^1\text{H}$  NMR of compound 8.

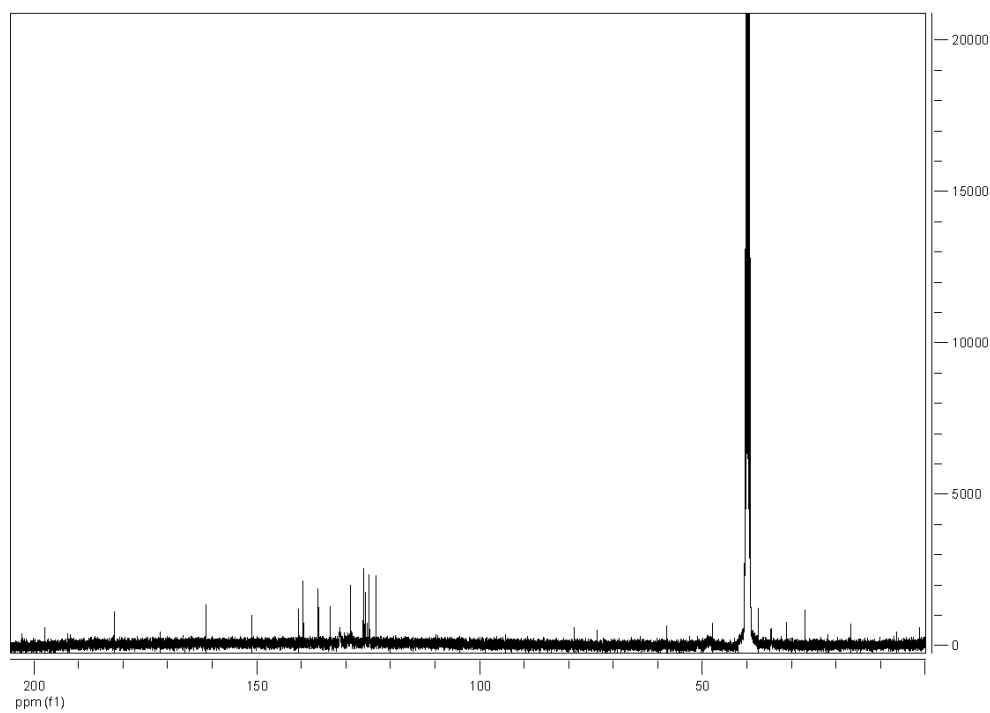
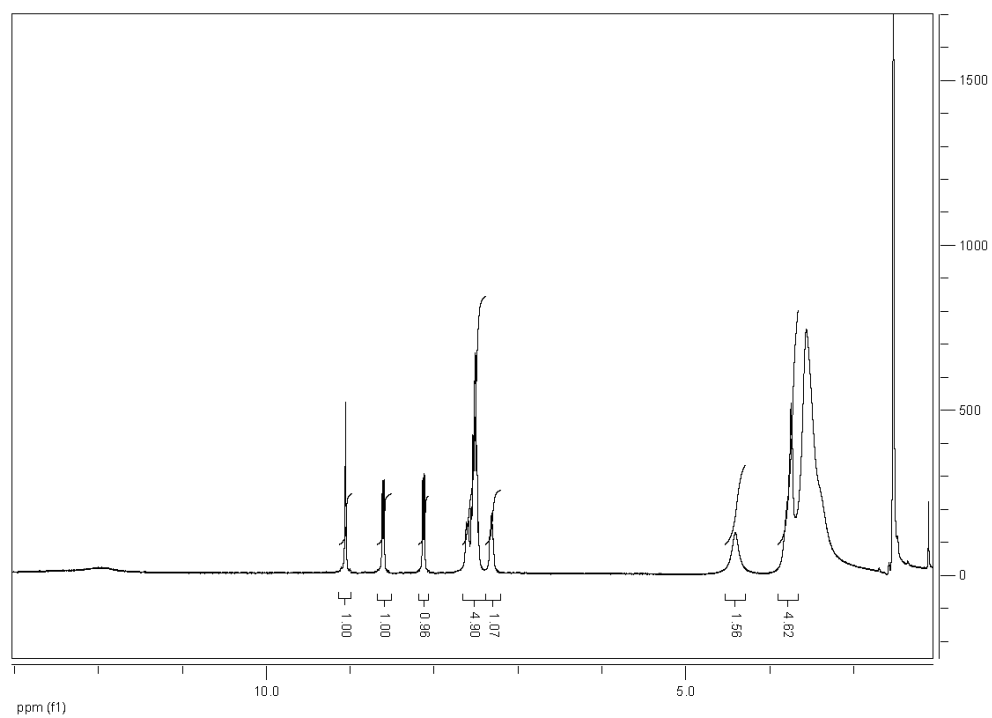


Figure S10.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 8.



**Figure S11.**  $^1\text{H}$  NMR of compound **9**.

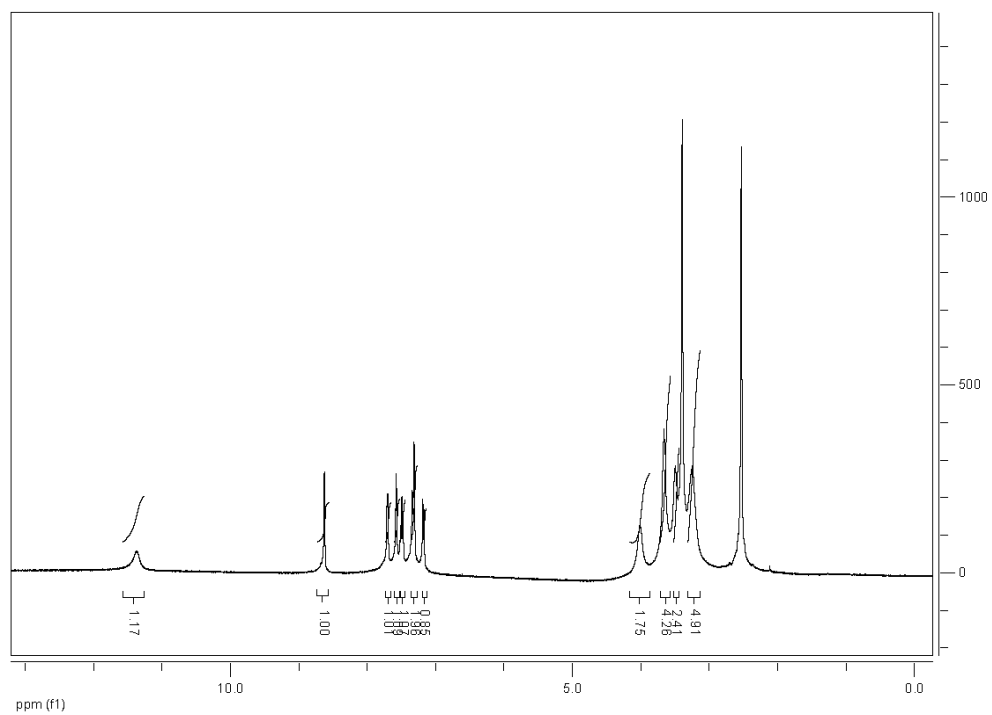


Figure S12.  $^1\text{H}$  NMR of compound 11.

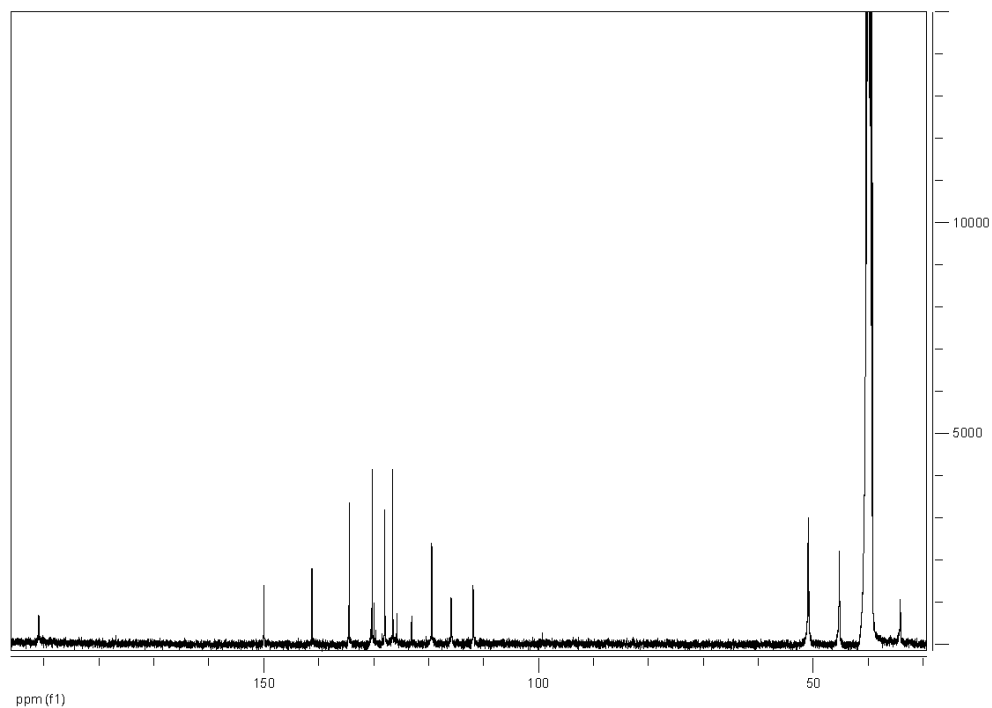


Figure S13.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 11.

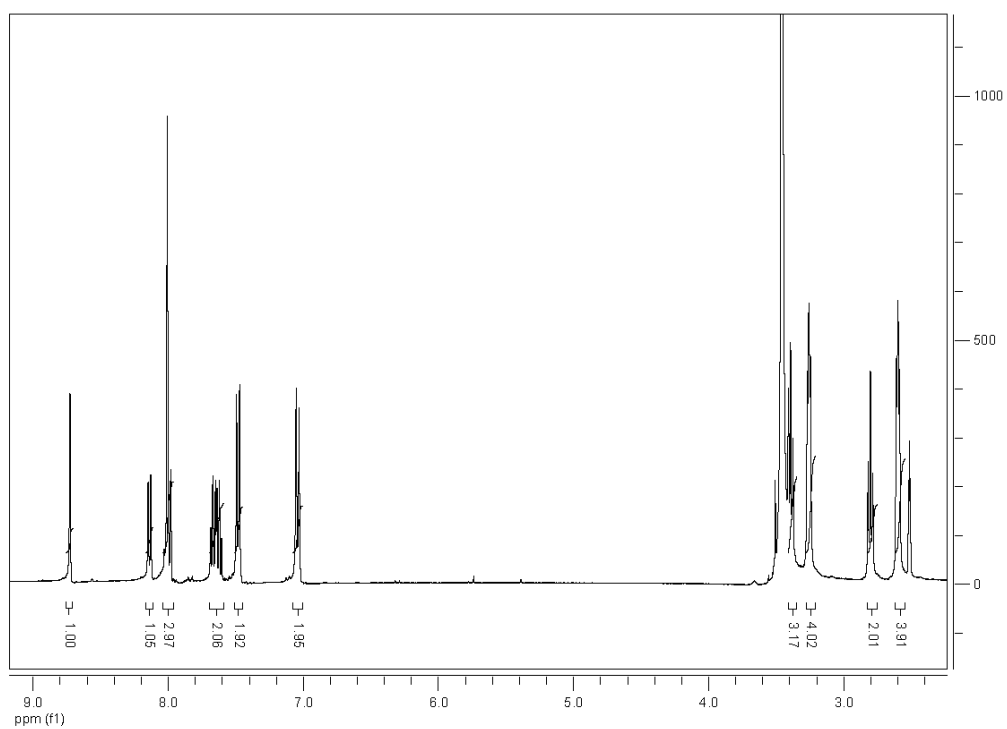


Figure S14.  $^1\text{H}$  NMR of compound 14.

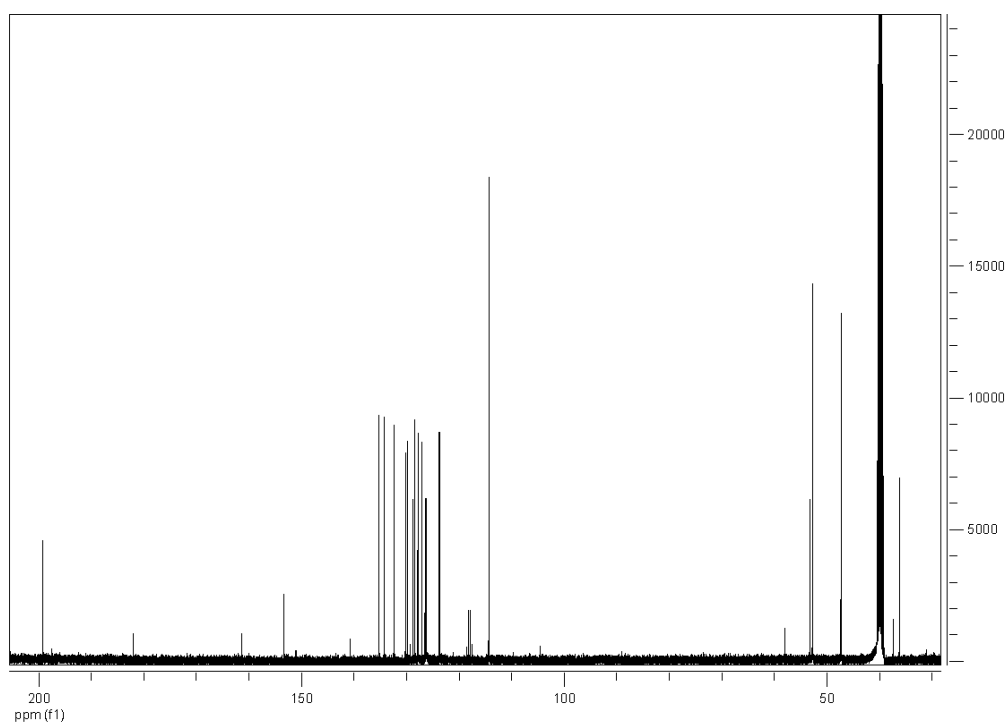


Figure S15.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 14.

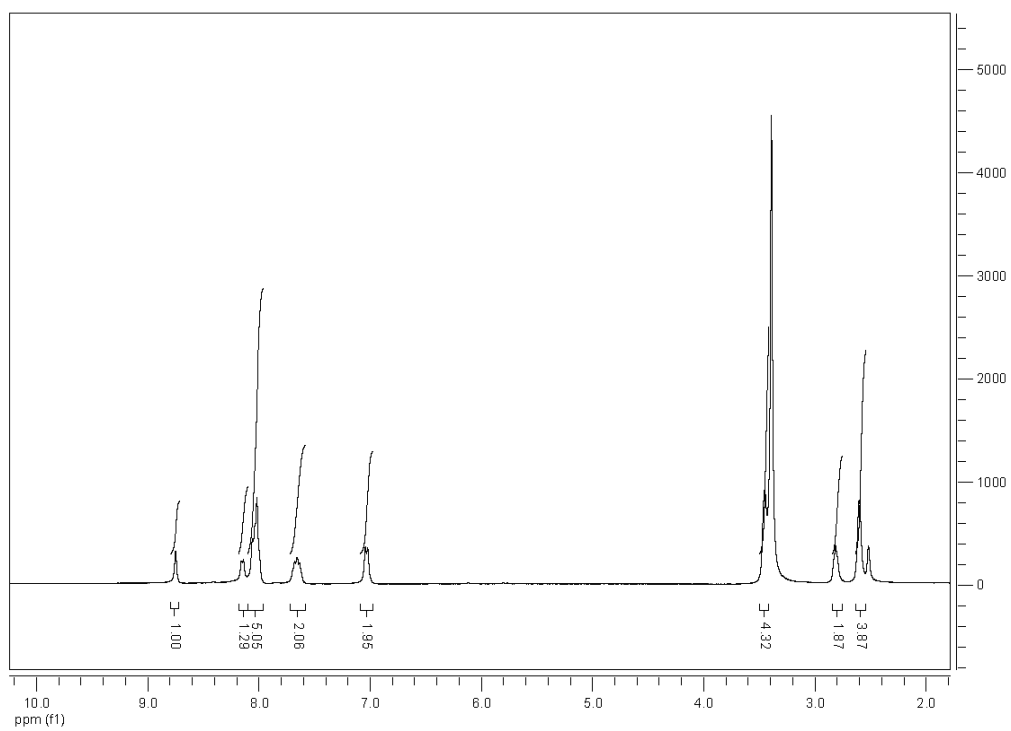


Figure S16.  $^1\text{H}$  NMR of compound 15.

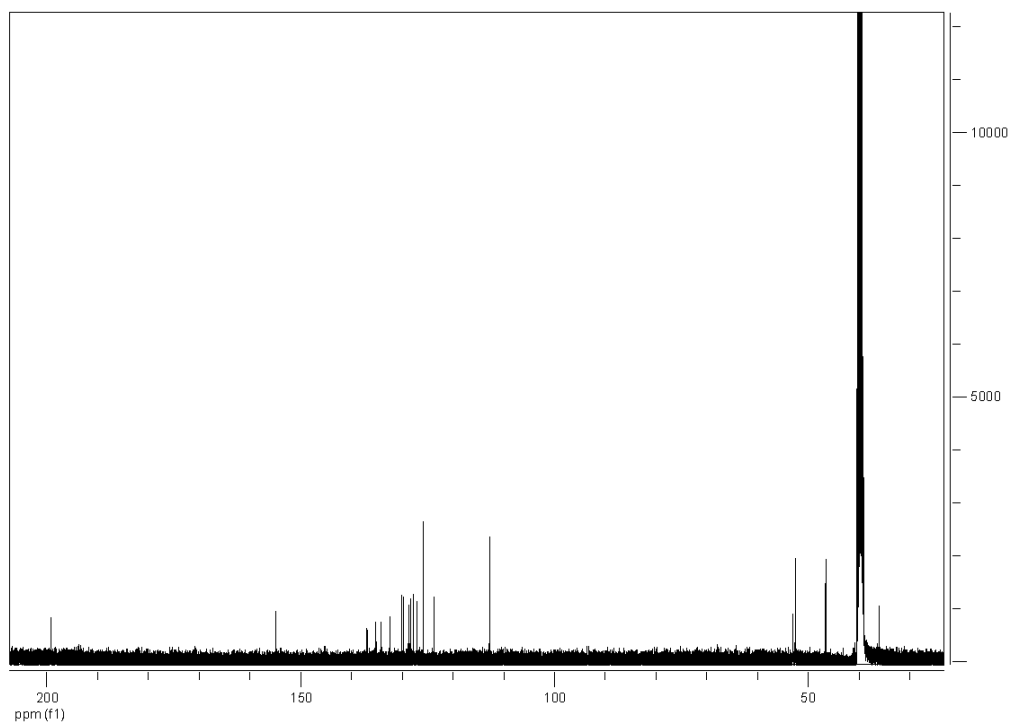


Figure S17.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 15.



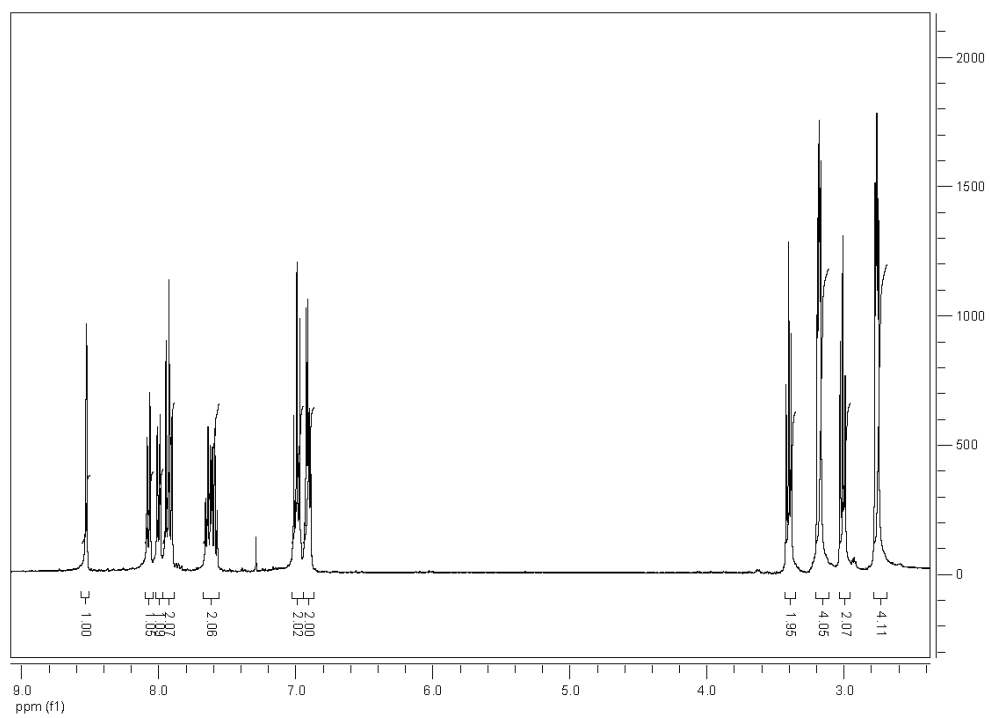


Figure S18.  $^1\text{H}$  NMR of compound 16.

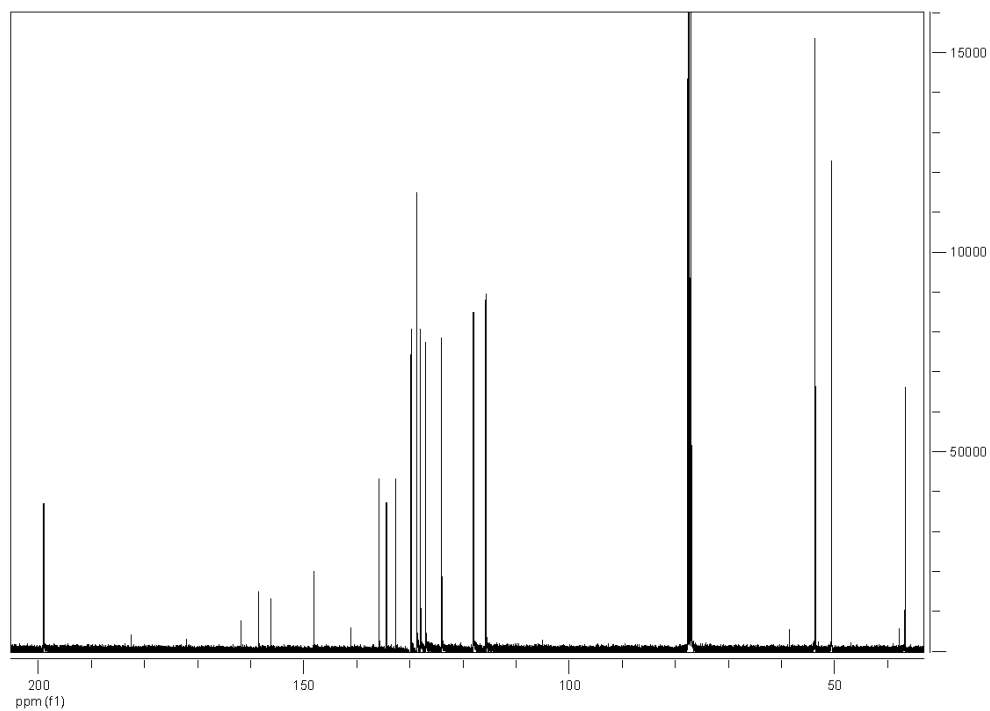


Figure S19.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 16.

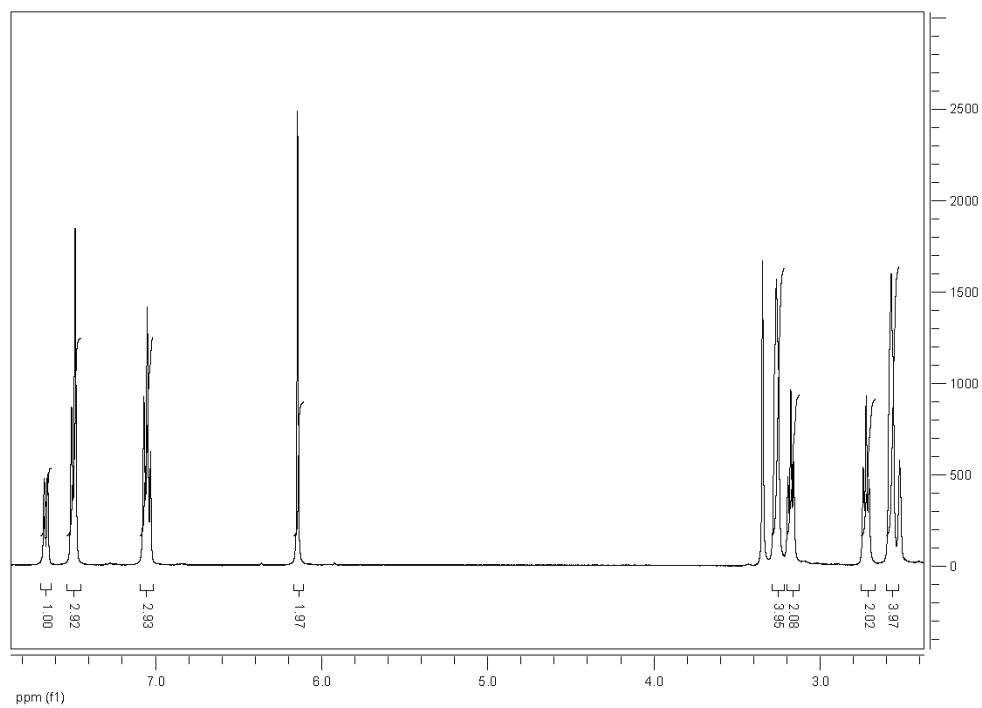


Figure S20.  $^1\text{H}$  NMR of compound 17.

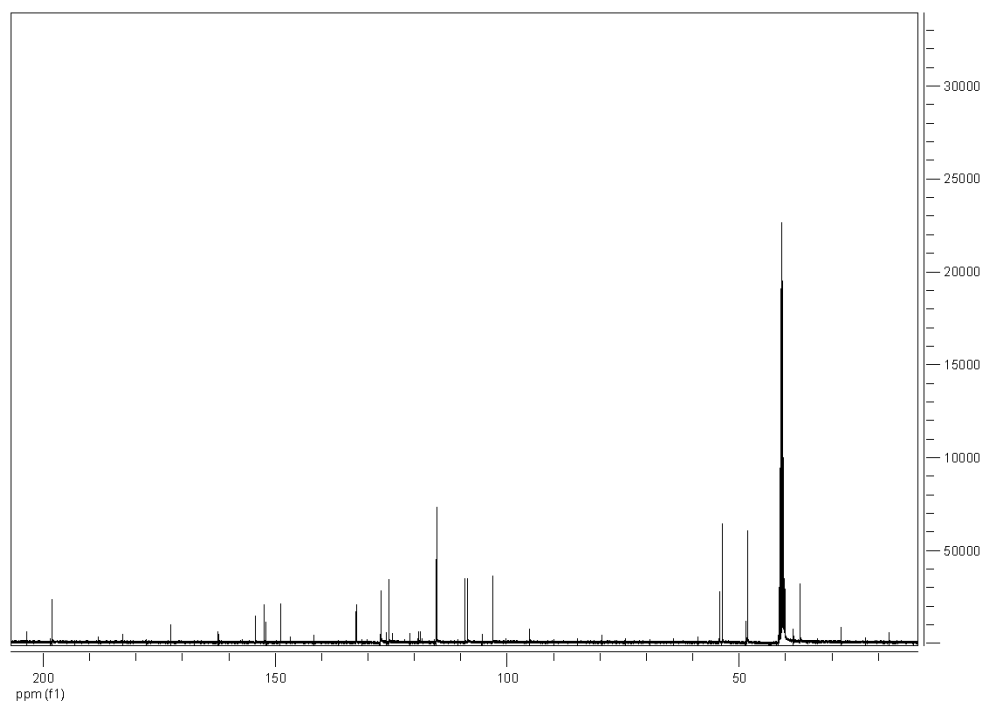


Figure S21.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 17.

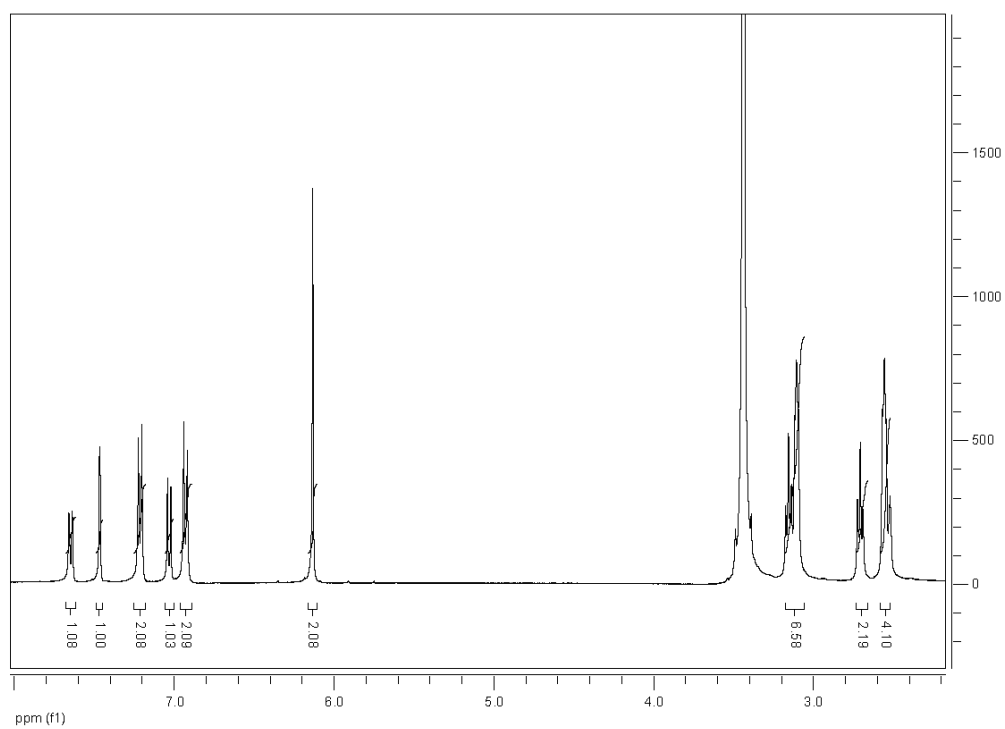


Figure S22.  $^1\text{H}$  NMR of compound 18.

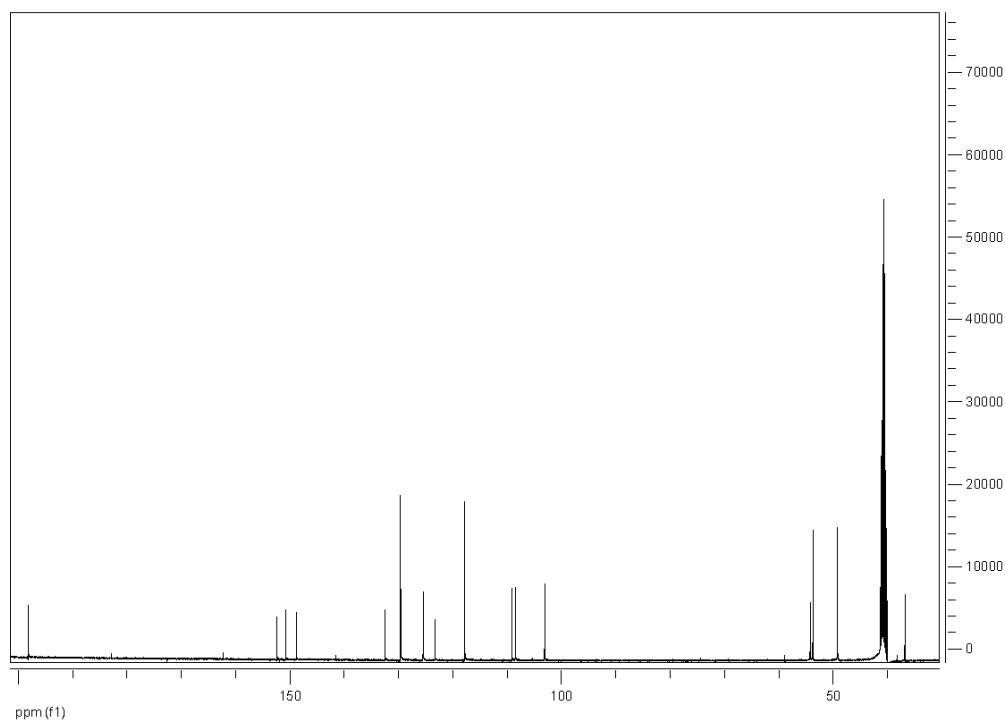


Figure S23.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 18.

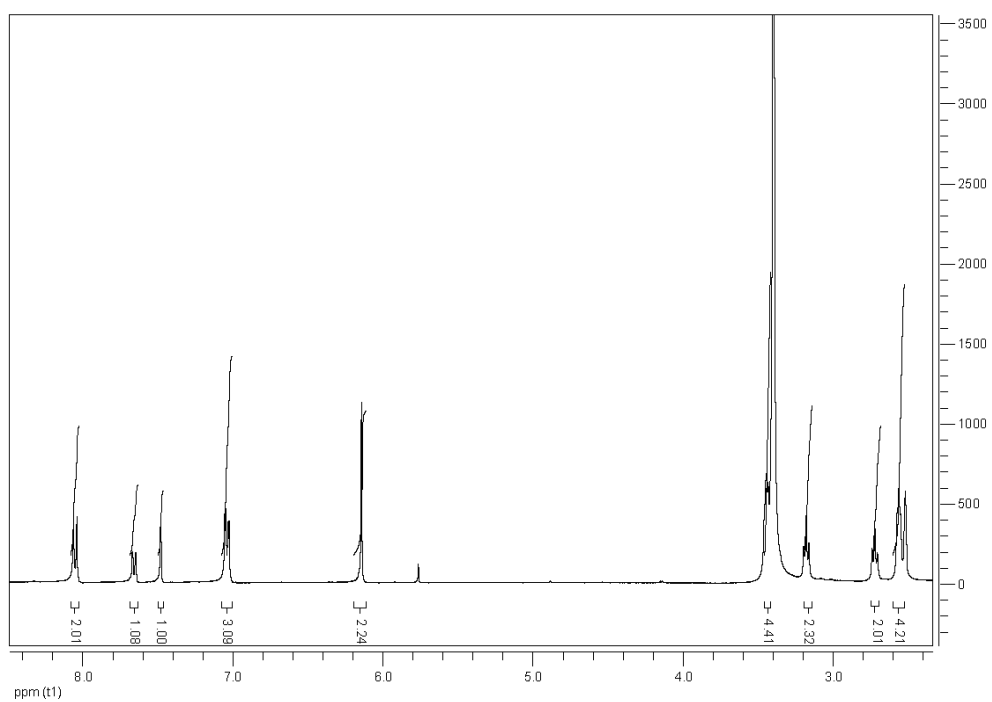


Figure S24.  $^1\text{H}$  NMR of compound 19.

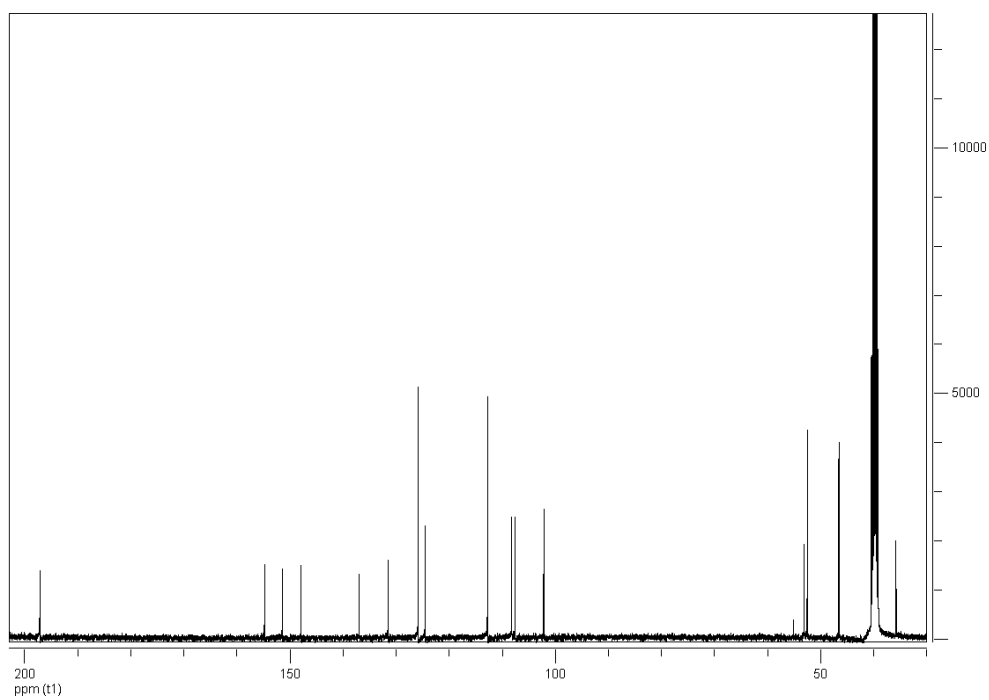


Figure S25.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 19.

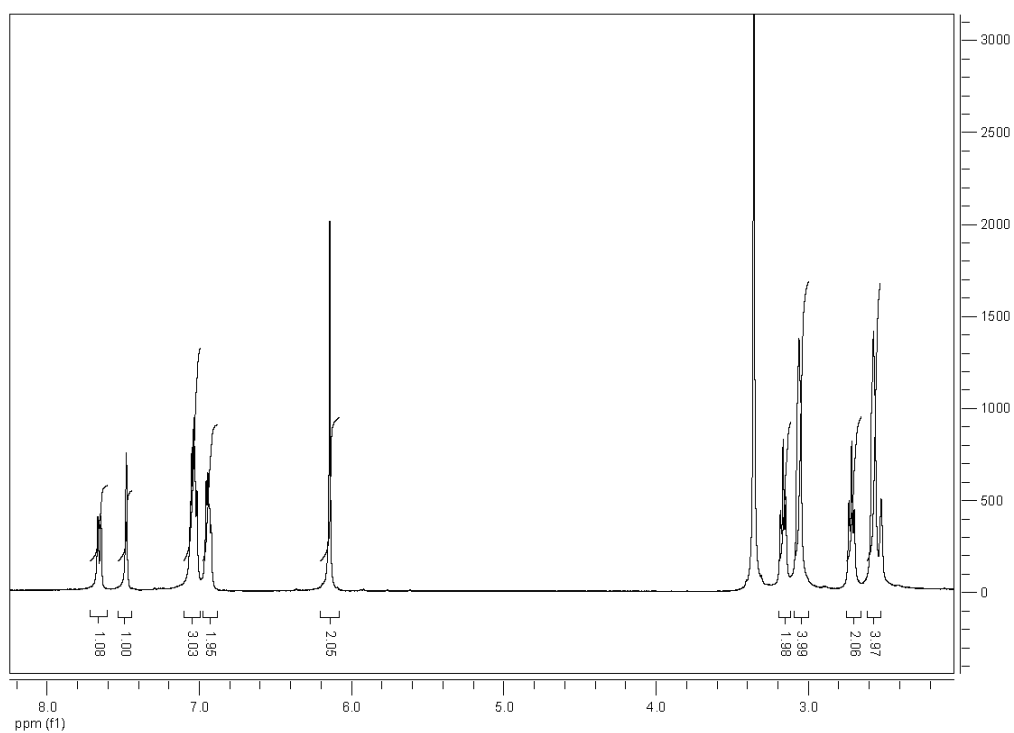


Figure S26.  $^1\text{H}$  NMR of compound 20.

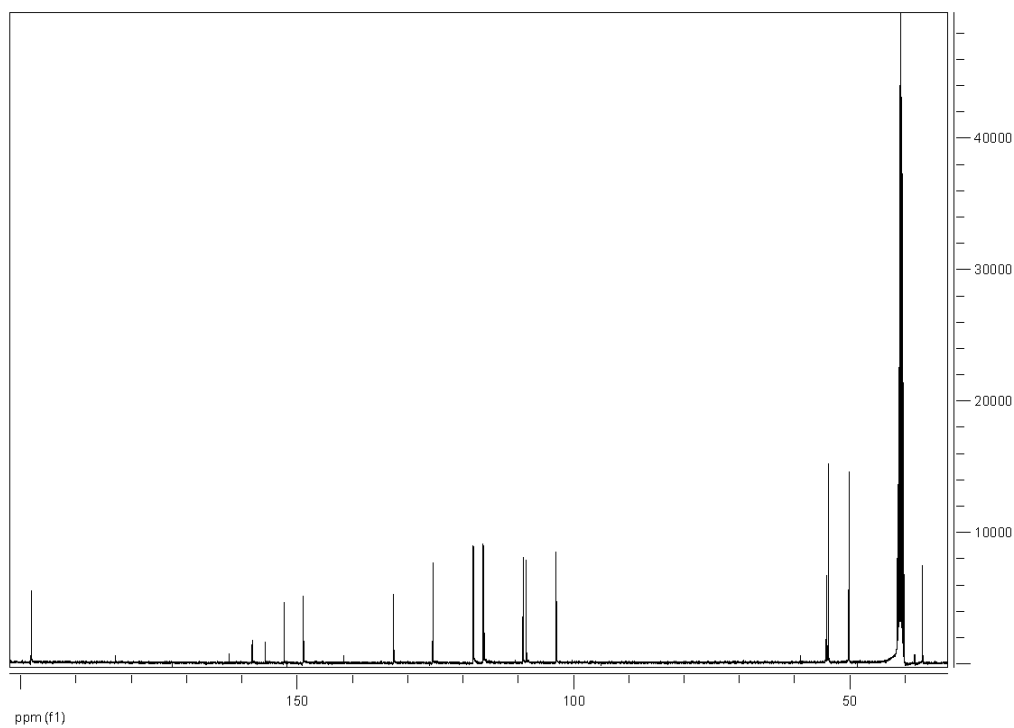
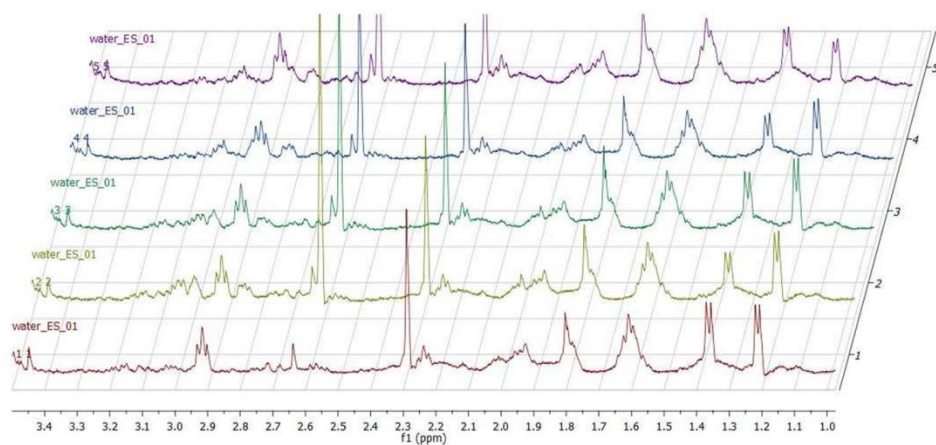


Figure S27.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 20.



**Figure S28.** <sup>1</sup>H NMR spectra of the excretion products obtained after centrifugation of *T. cruzi* culture supernatants of epimastigotes

Second generation of Mannich base type derivatives with *in vivo* activity  
against *Trypanosoma cruzi*.

S1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of newly synthesized compounds.

S2. Data of the SOS/umu screening test.

$^1\text{H}$  NMR spectra of the excretion products obtained after centrifugation of *T. cruzi* culture supernatants of epimastigotes.

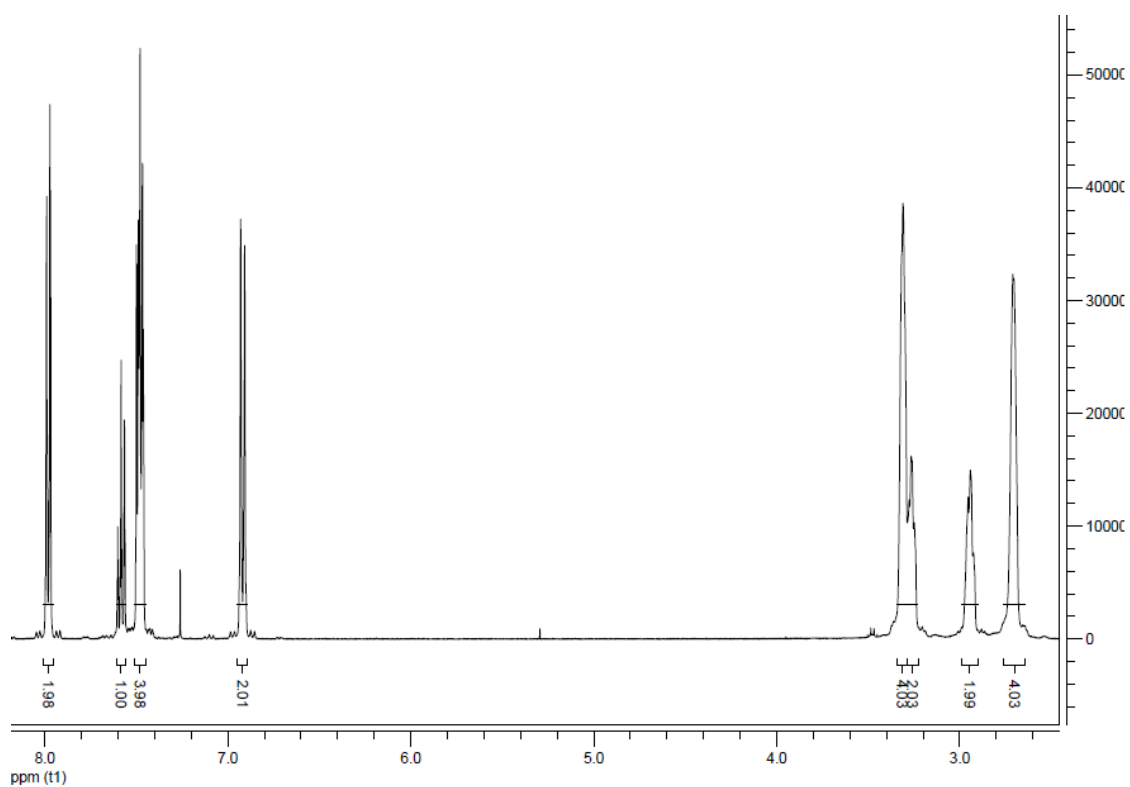


Figure 1.  $^1\text{H}$  NMR of compound 2.

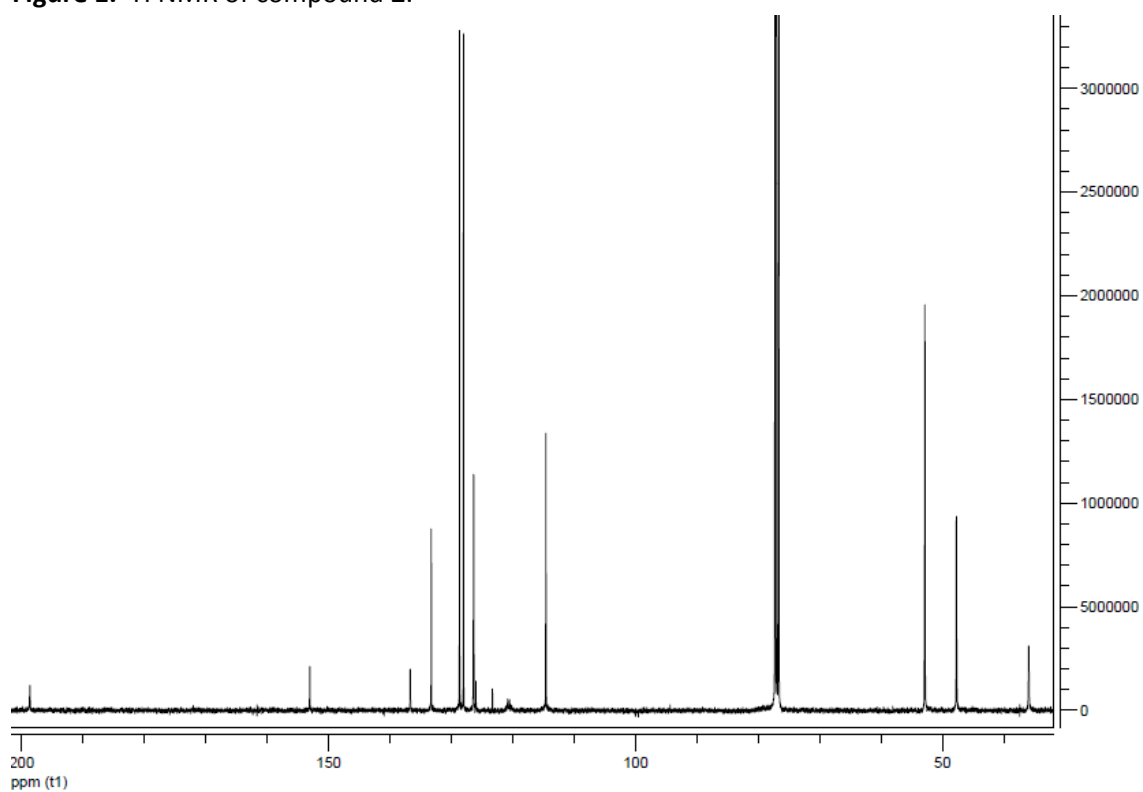
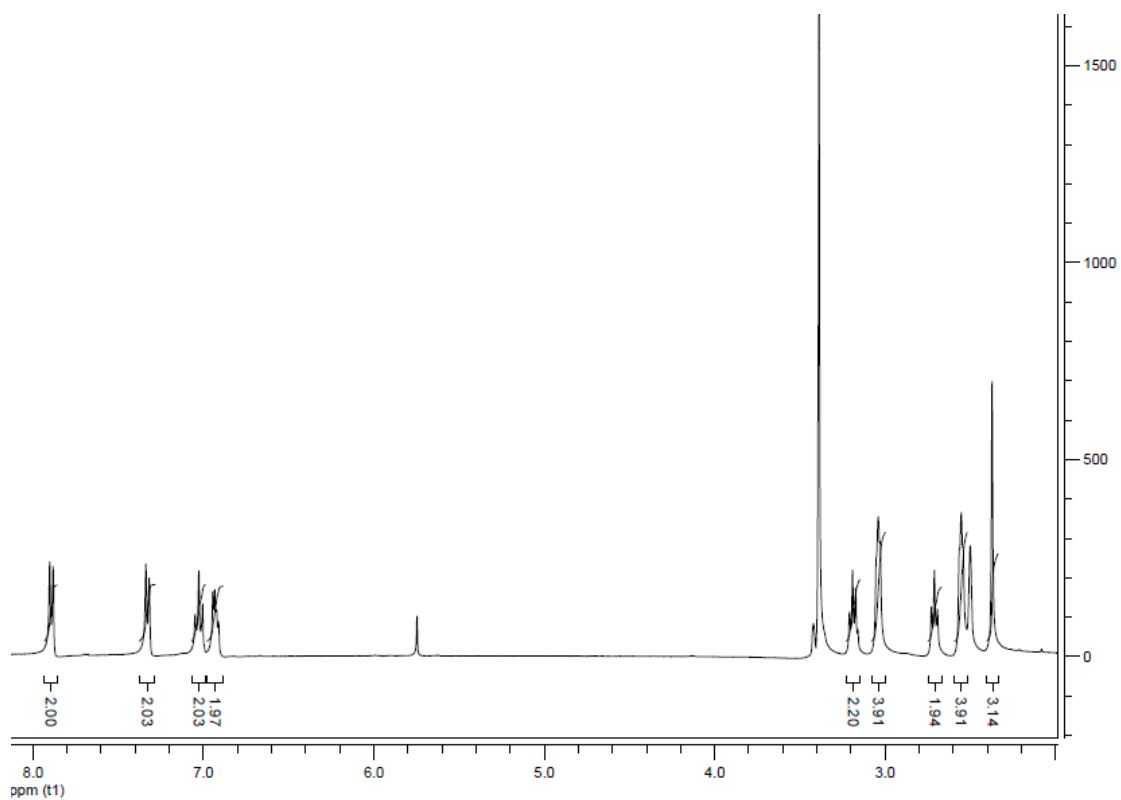
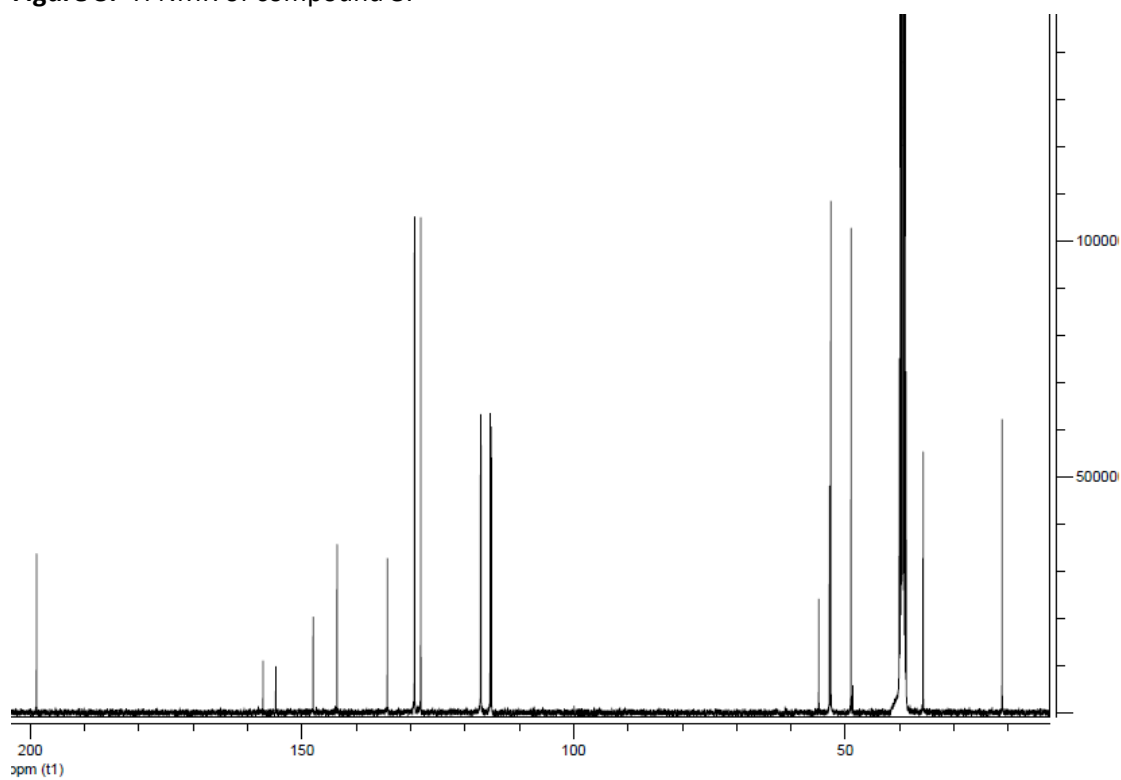


Figure 2.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 2.





**Figure 3.**  $^1\text{H}$  NMR of compound 3.



**Figure 4.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 3.

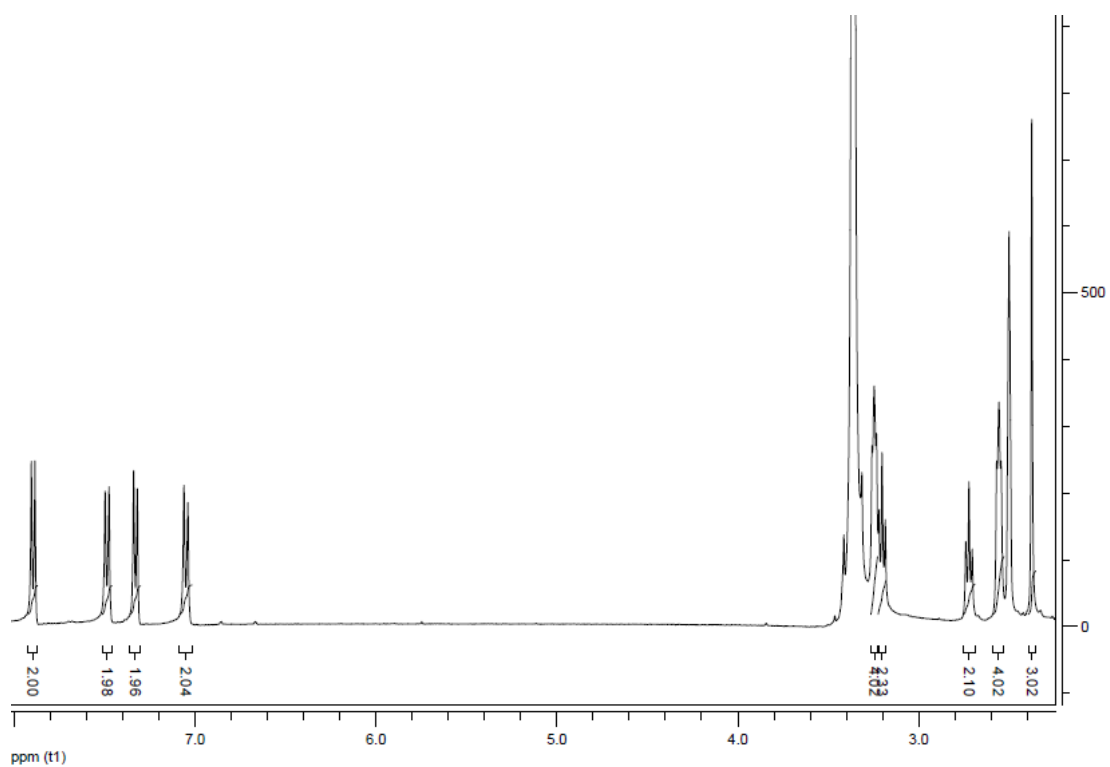


Figure 5.  $^1\text{H}$  NMR of compound 4.

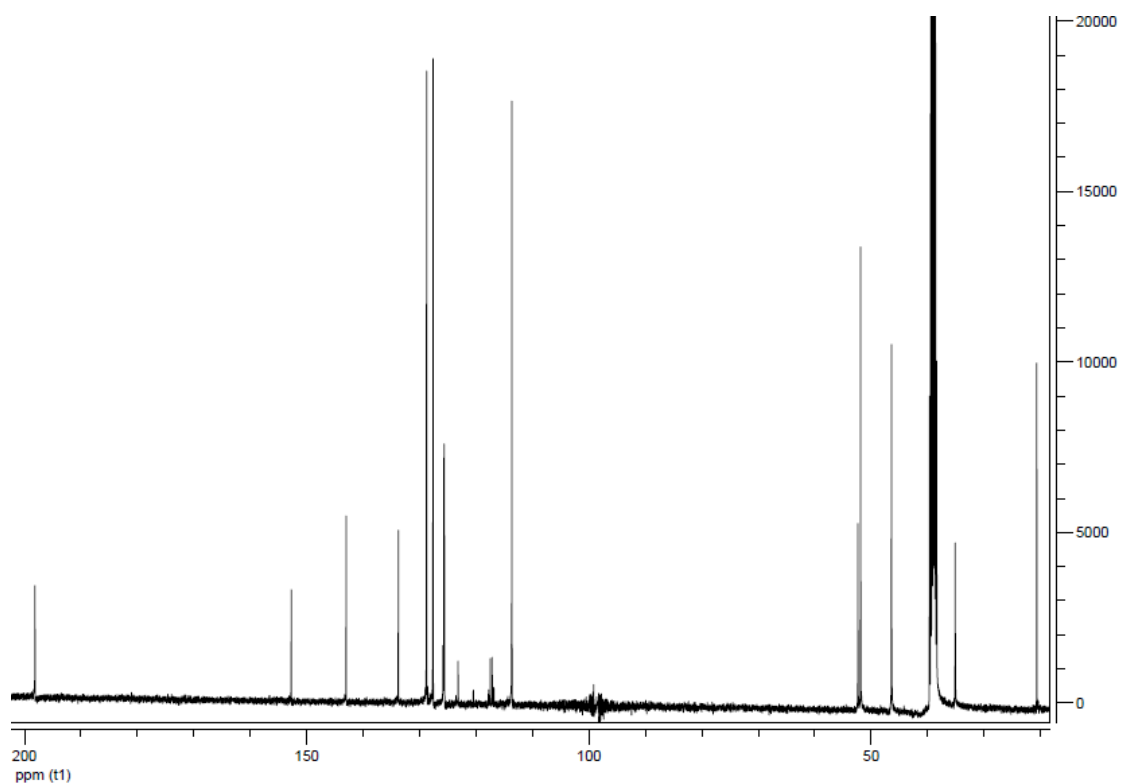


Figure 6.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 4.

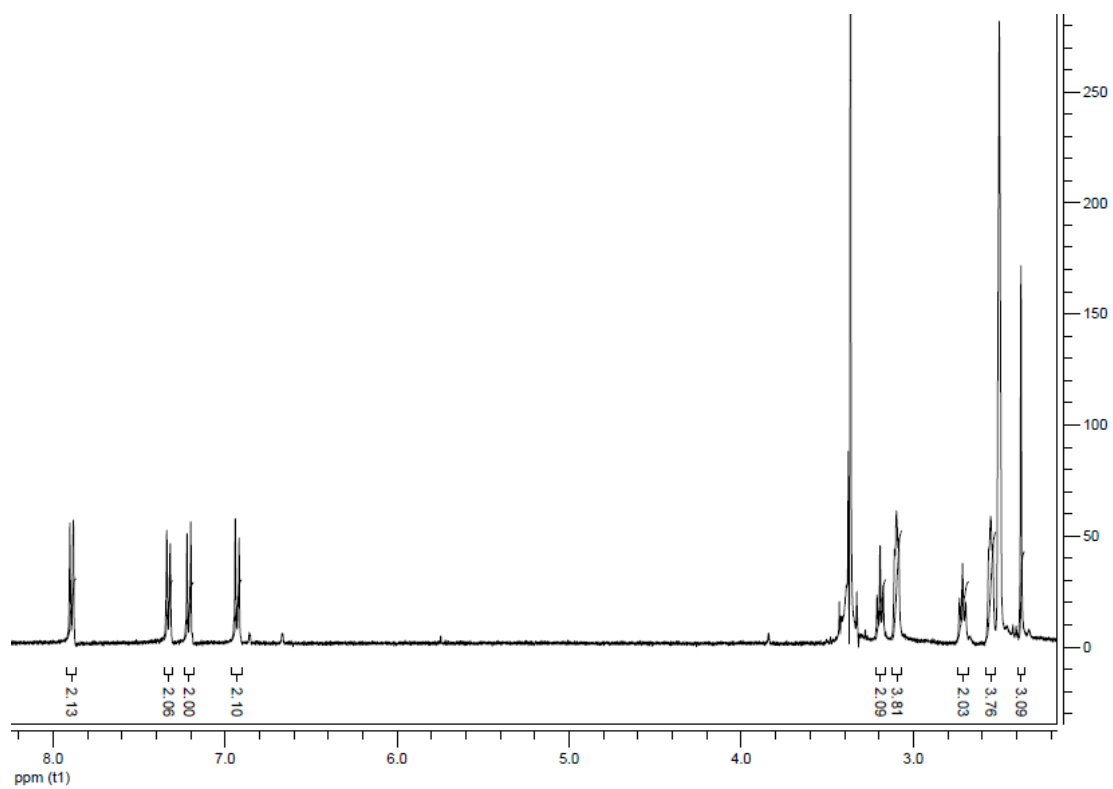


Figure 7.  $^1\text{H}$  NMR of compound 5.

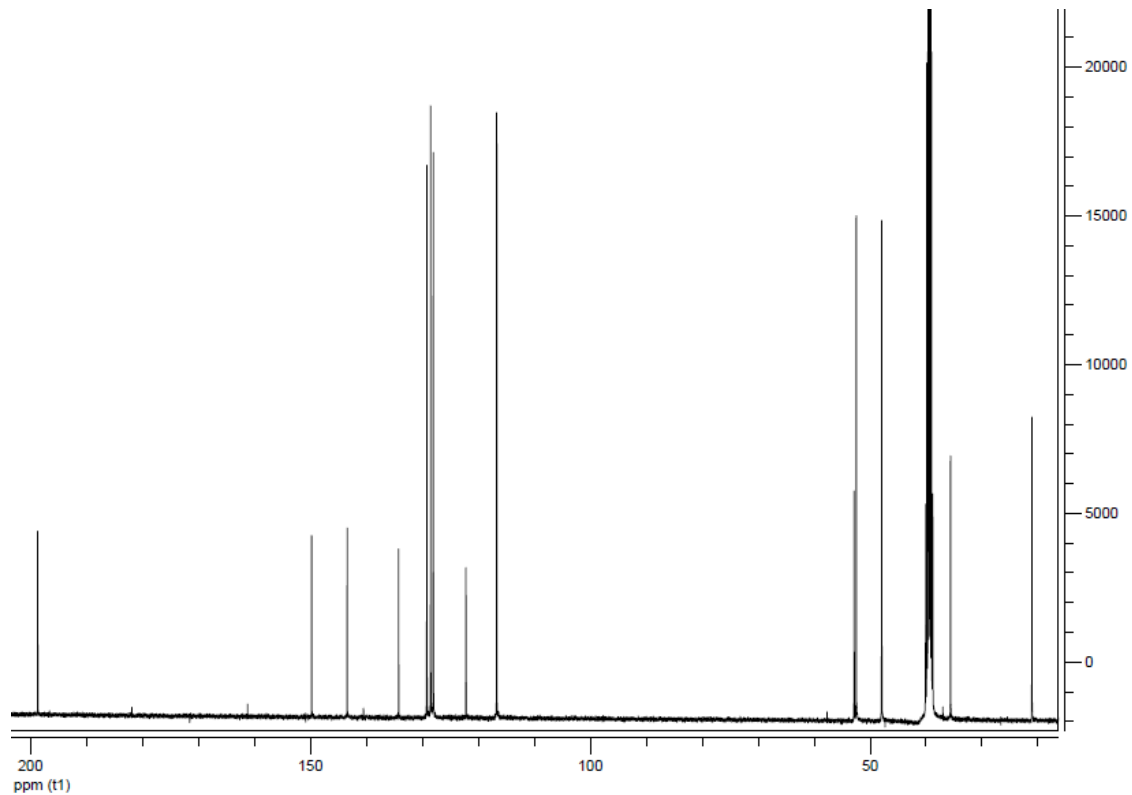


Figure 8.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 5.

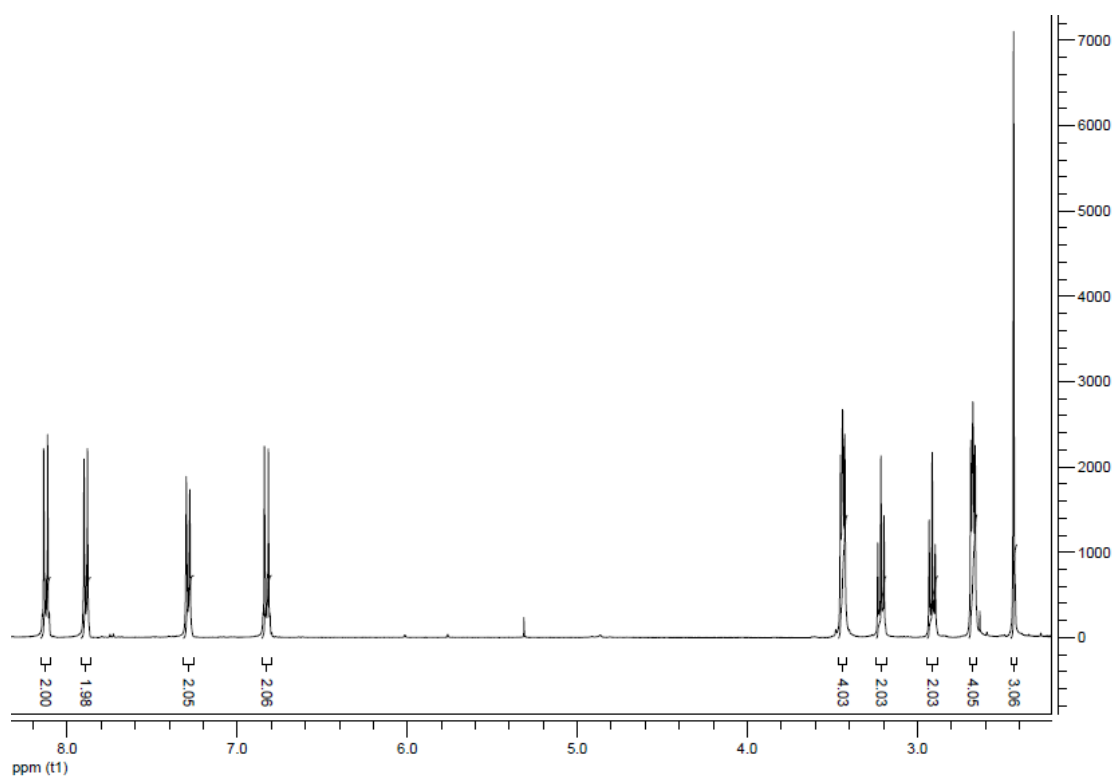


Figure 9.  $^1\text{H}$  NMR of compound 6.

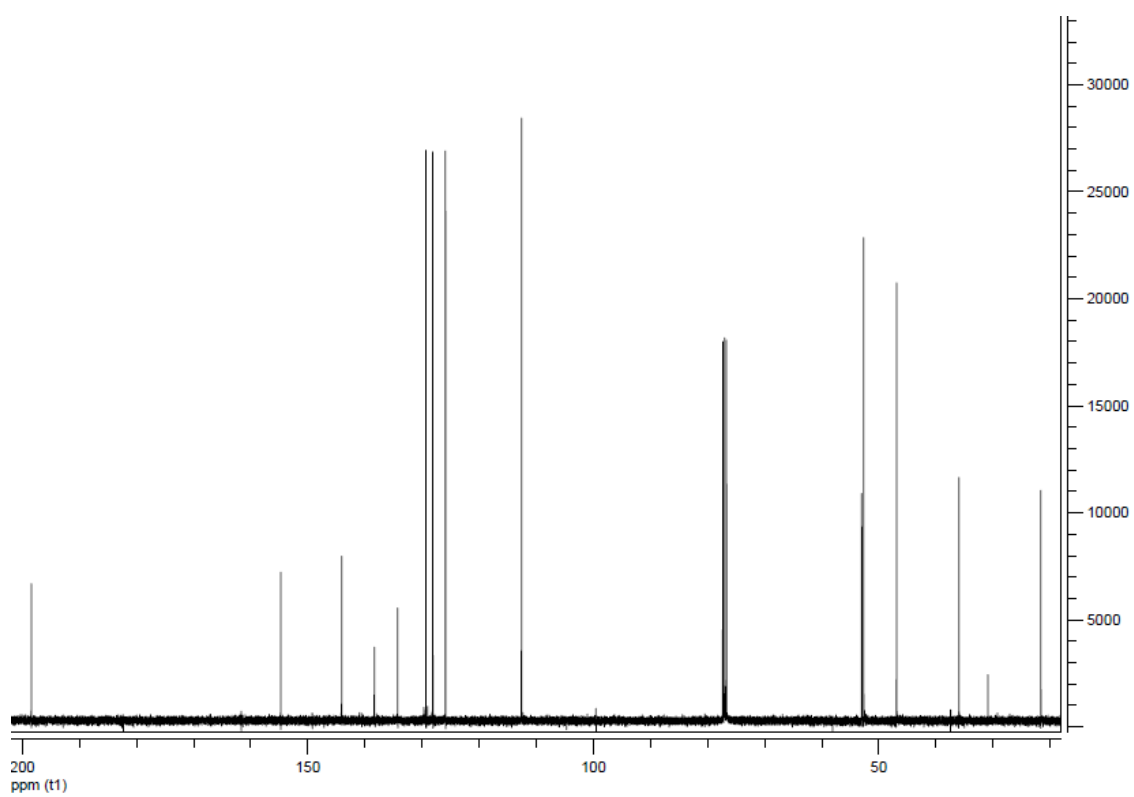


Figure 10.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 6.

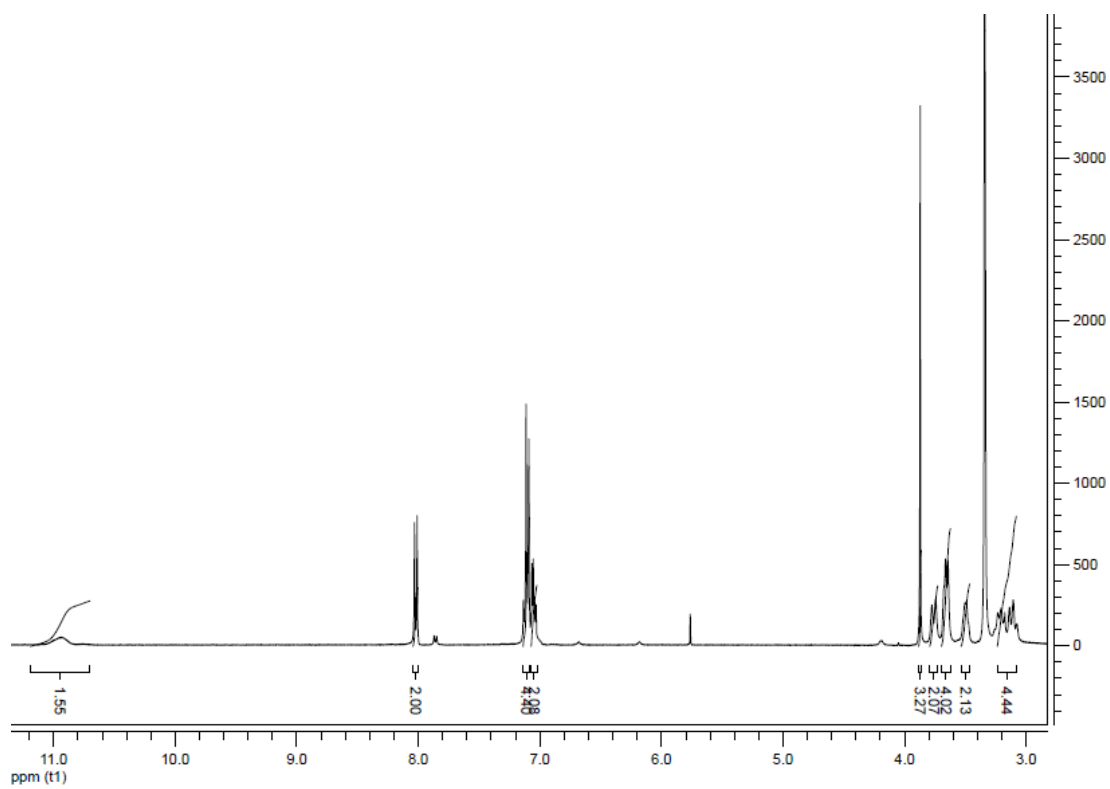


Figure 11.  $^1\text{H}$  NMR of compound 7.

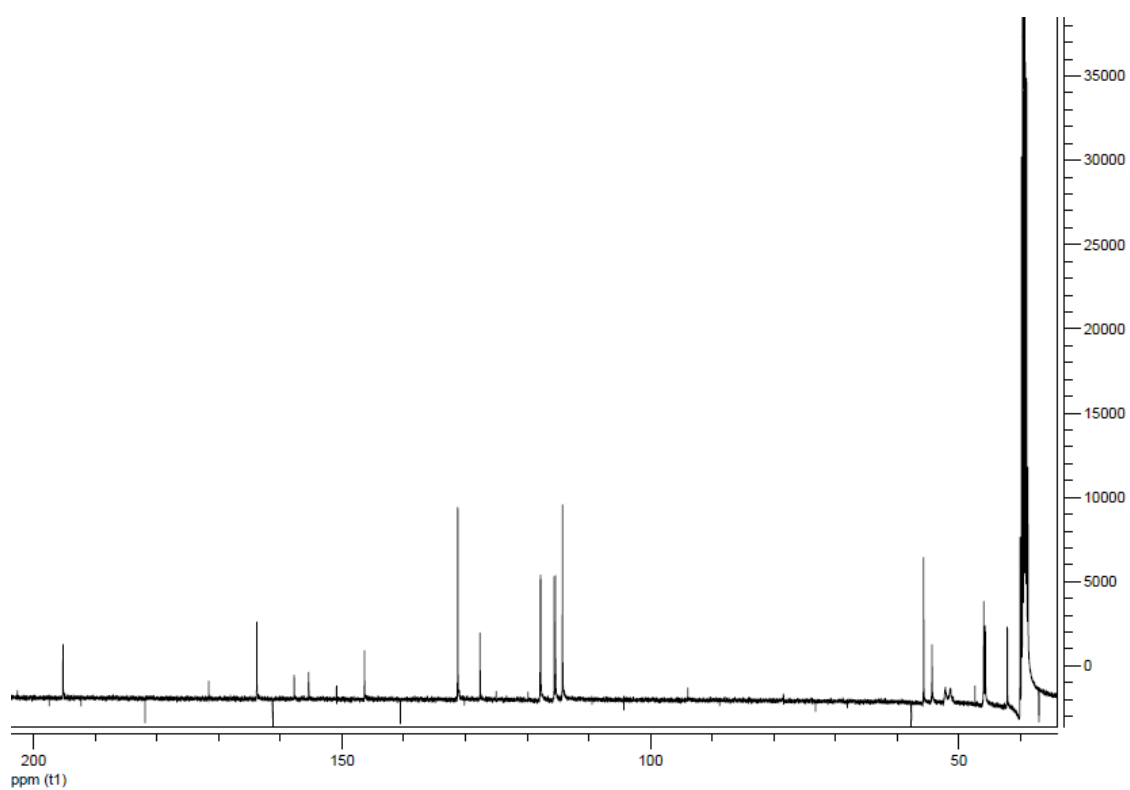


Figure 12.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 7.

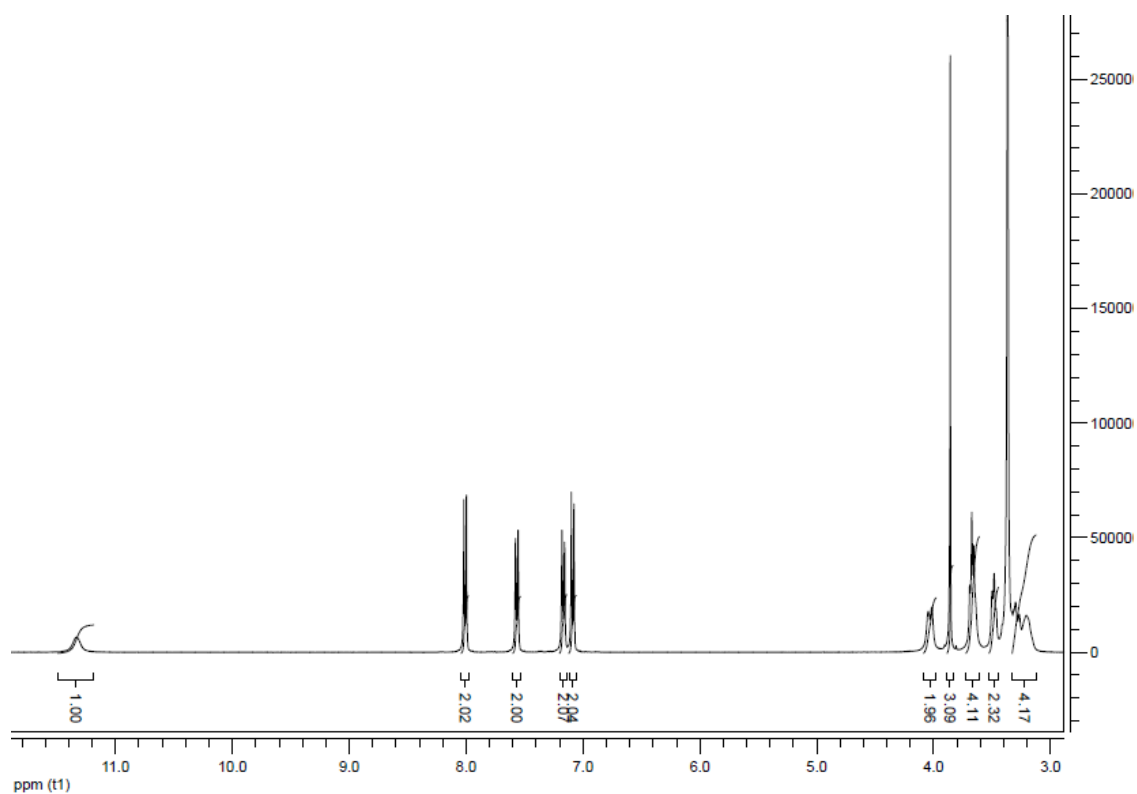


Figure 13.  $^1\text{H}$  NMR of compound 8.

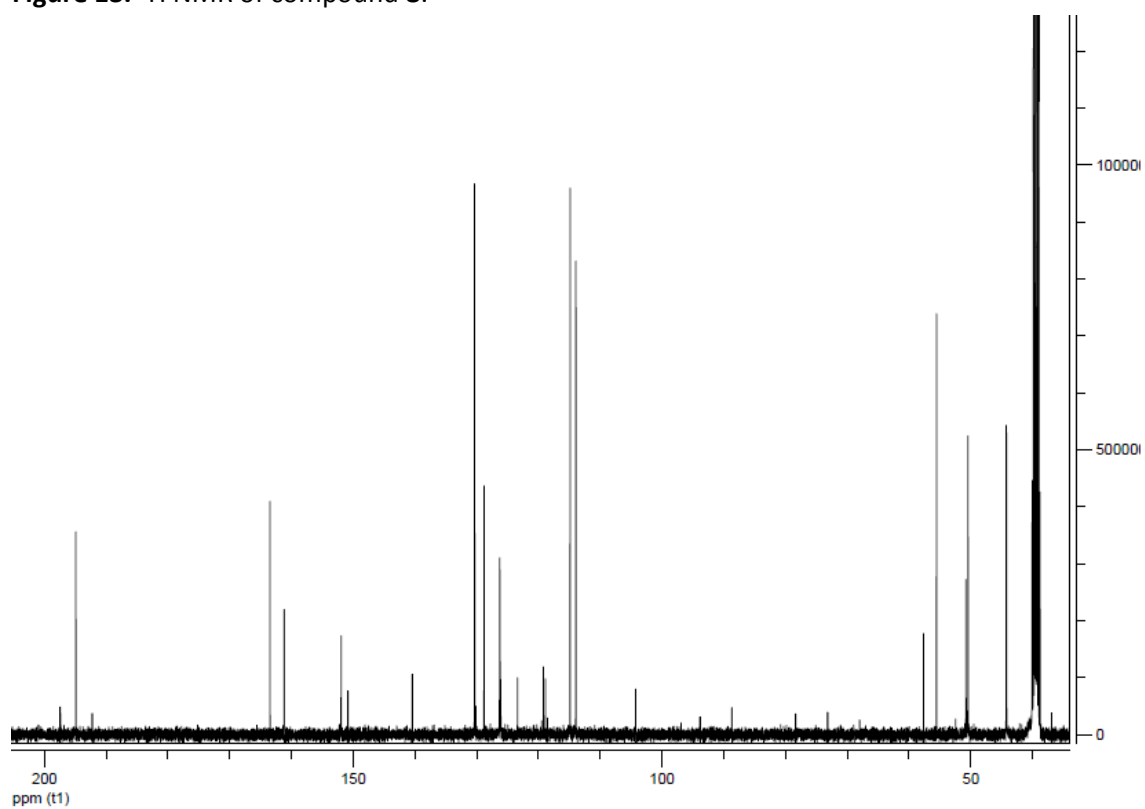


Figure 14.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 8.

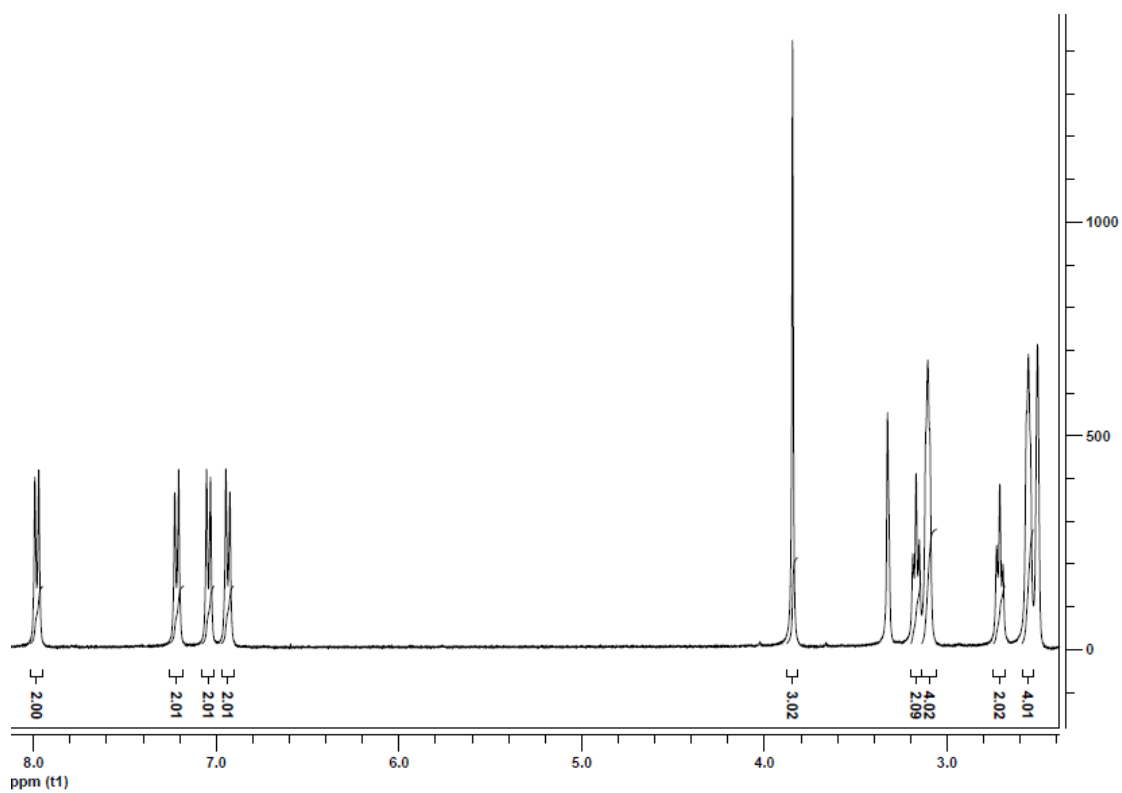


Figure 15.  $^1\text{H}$  NMR of compound 9.

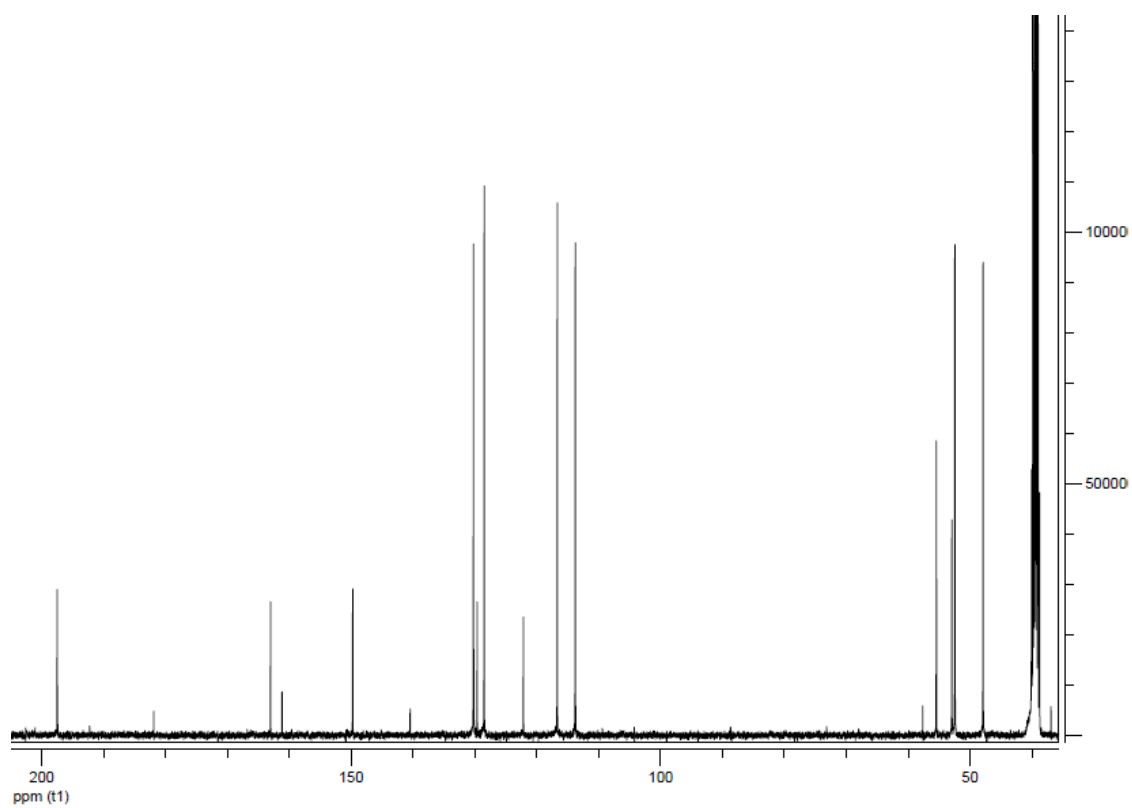


Figure 16.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 9.

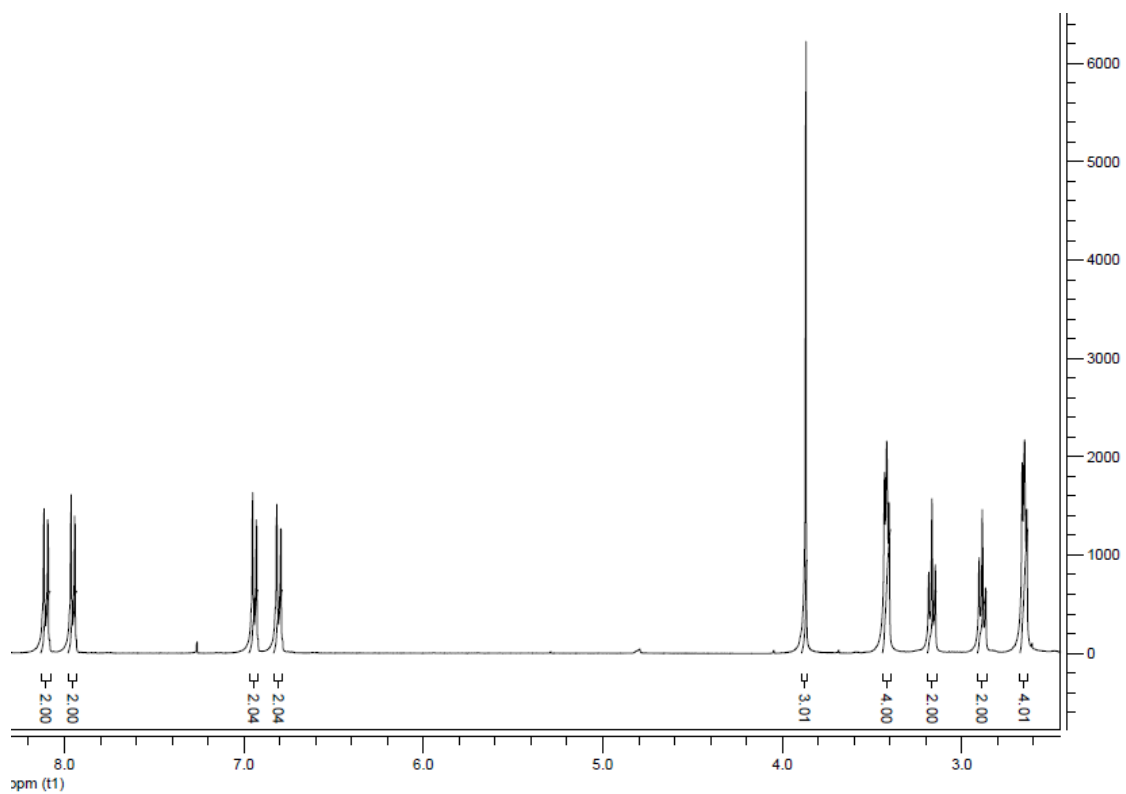


Figure 17.  $^1\text{H}$  NMR of compound 10.

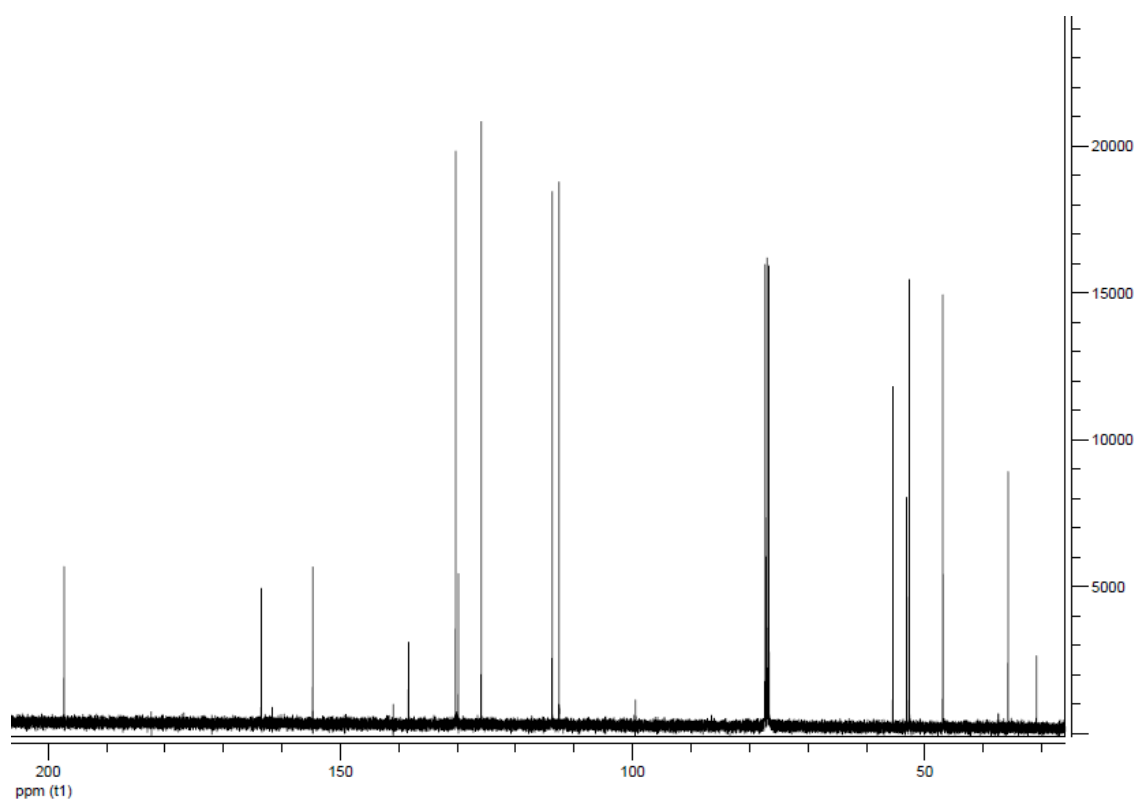


Figure 18.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 10.



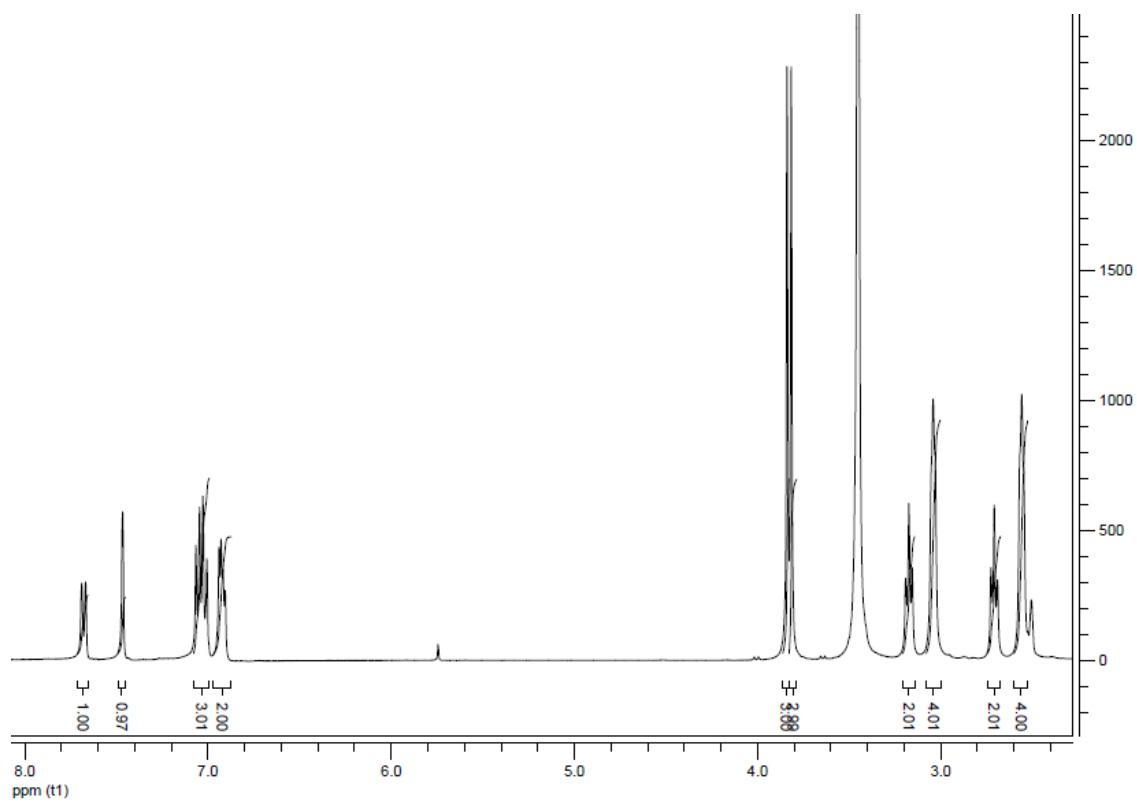


Figure 19.  $^1\text{H}$  NMR of compound 11.

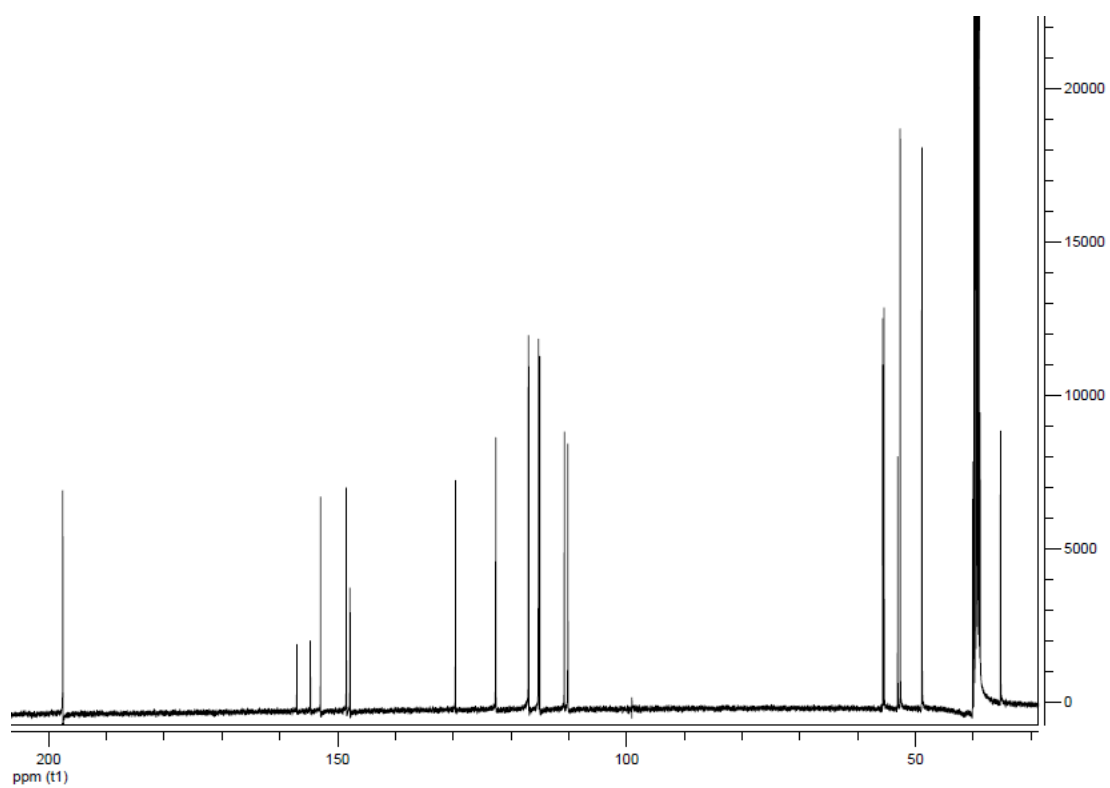


Figure 20.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 11.

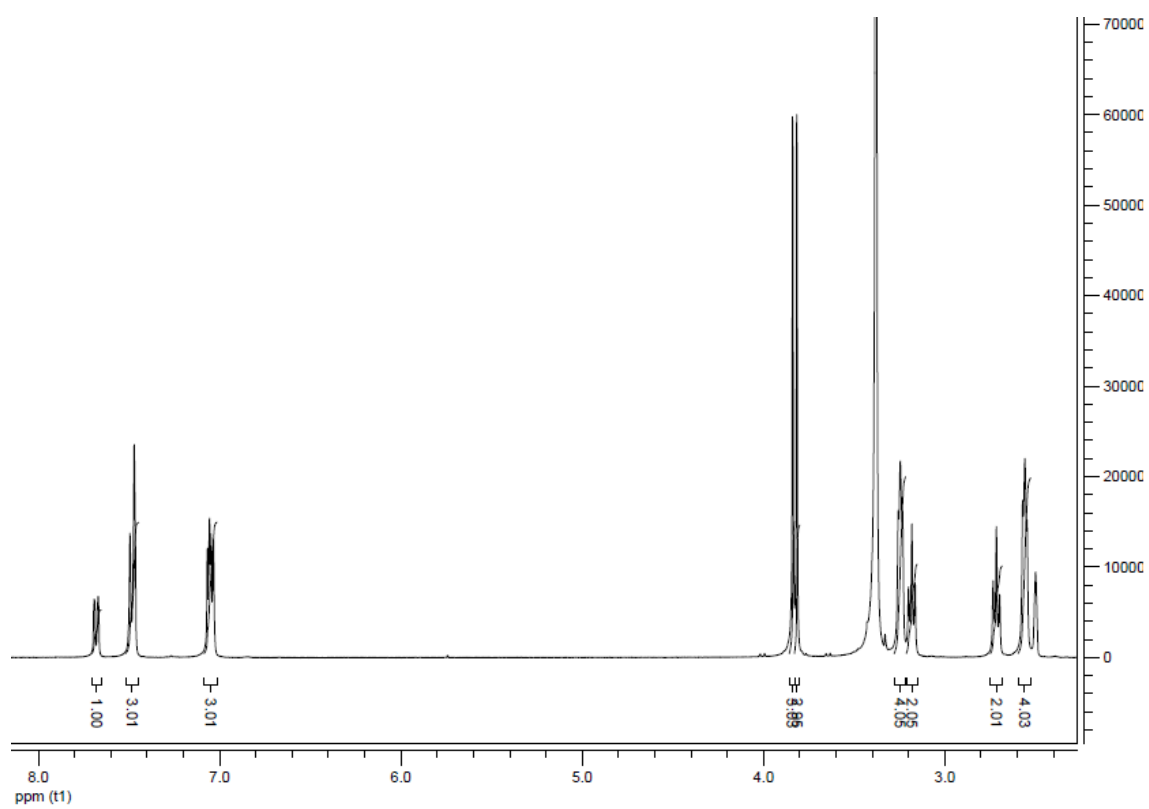


Figure 21.  $^1\text{H}$  NMR of compound 12.

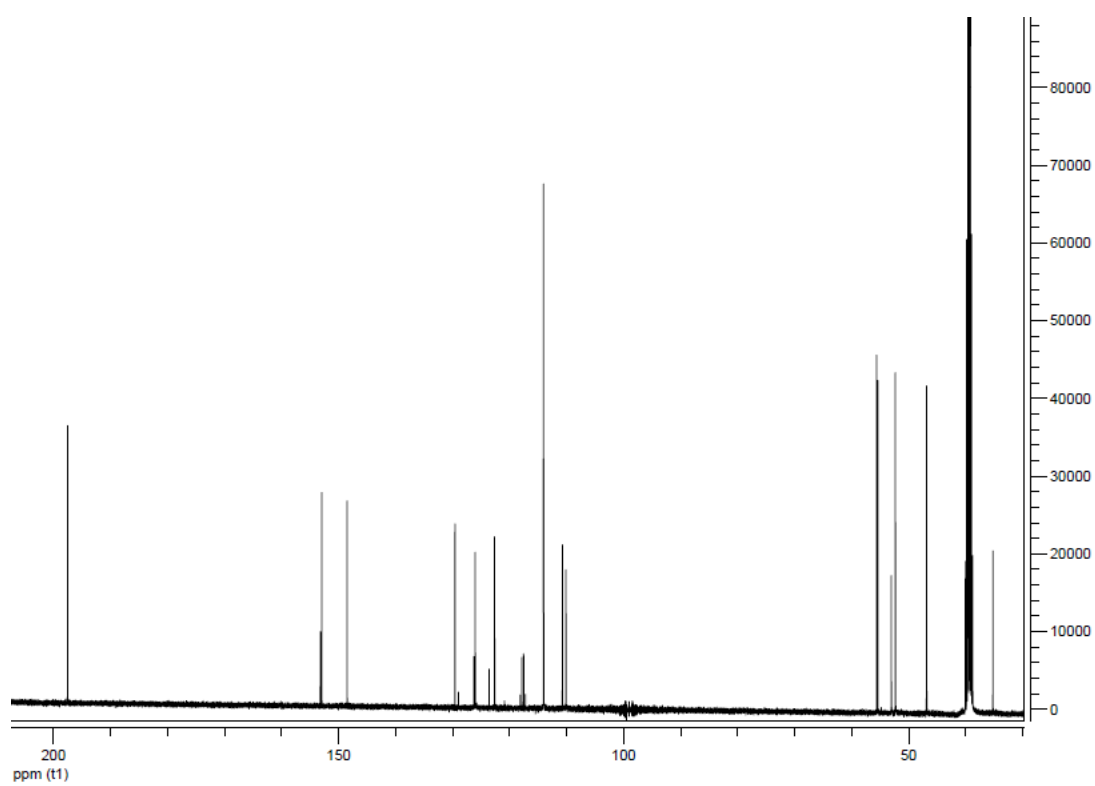


Figure 22.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 12.

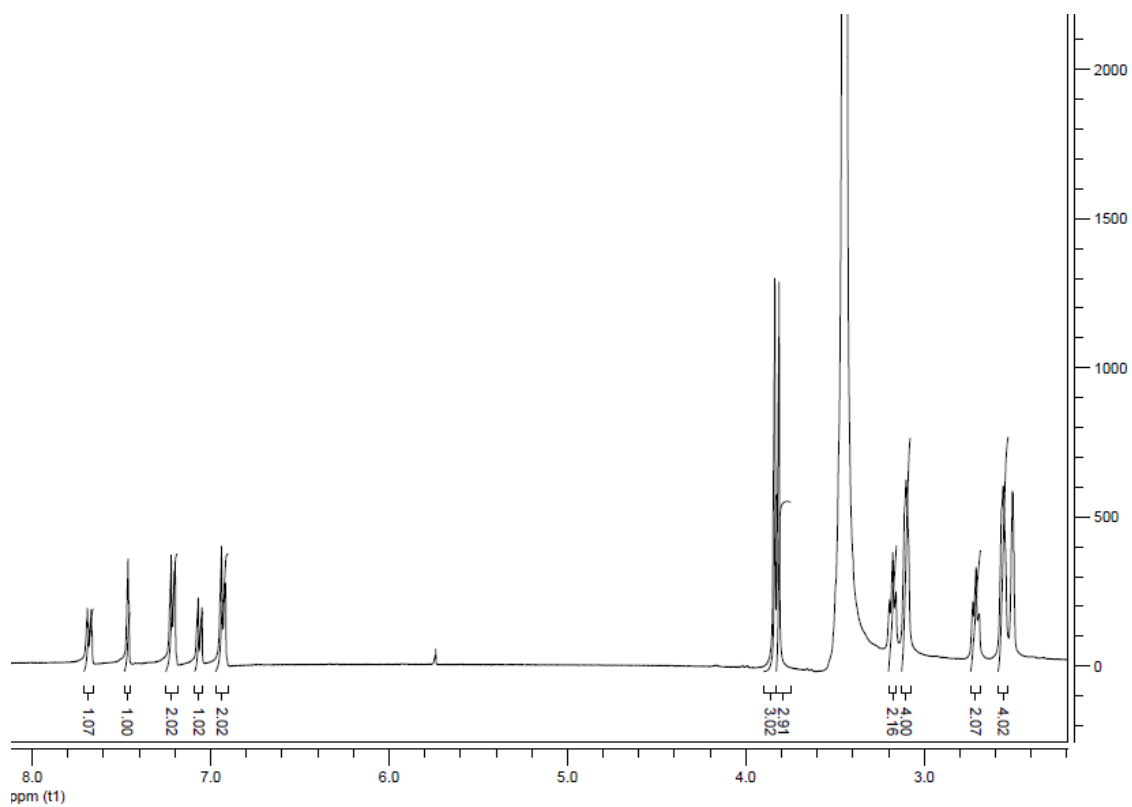


Figure 23.  $^1\text{H}$  NMR of compound 13.

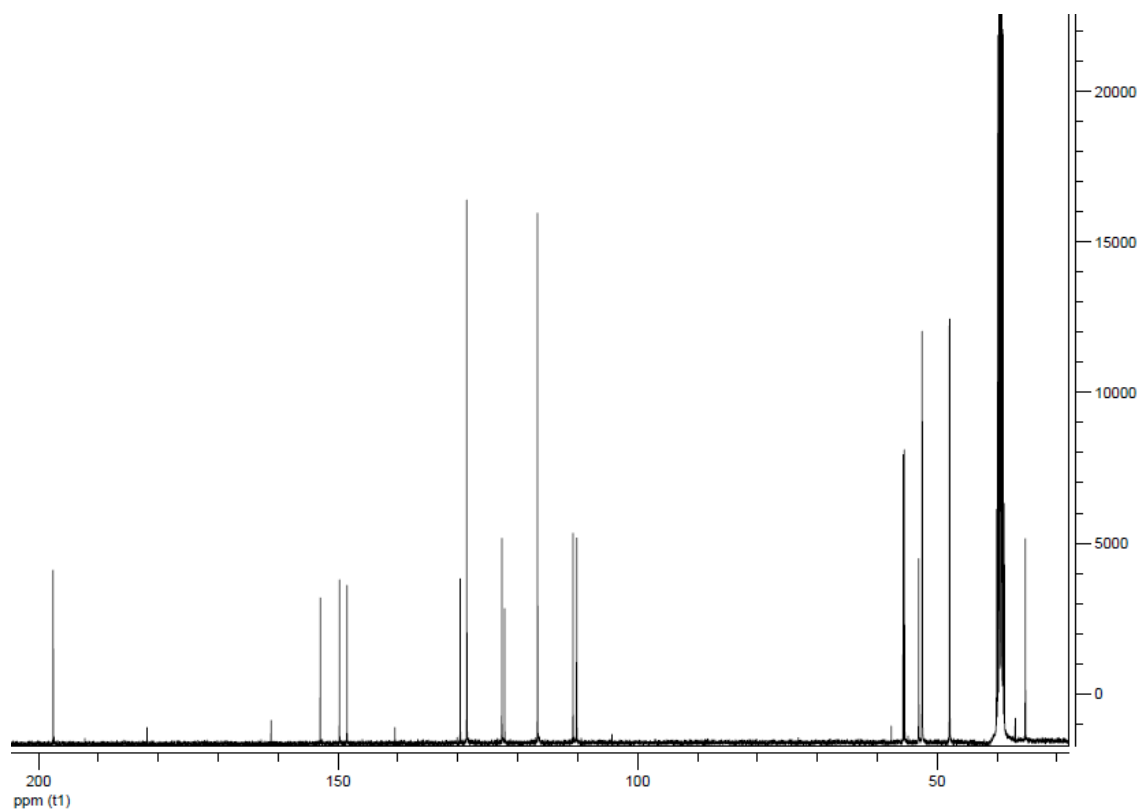
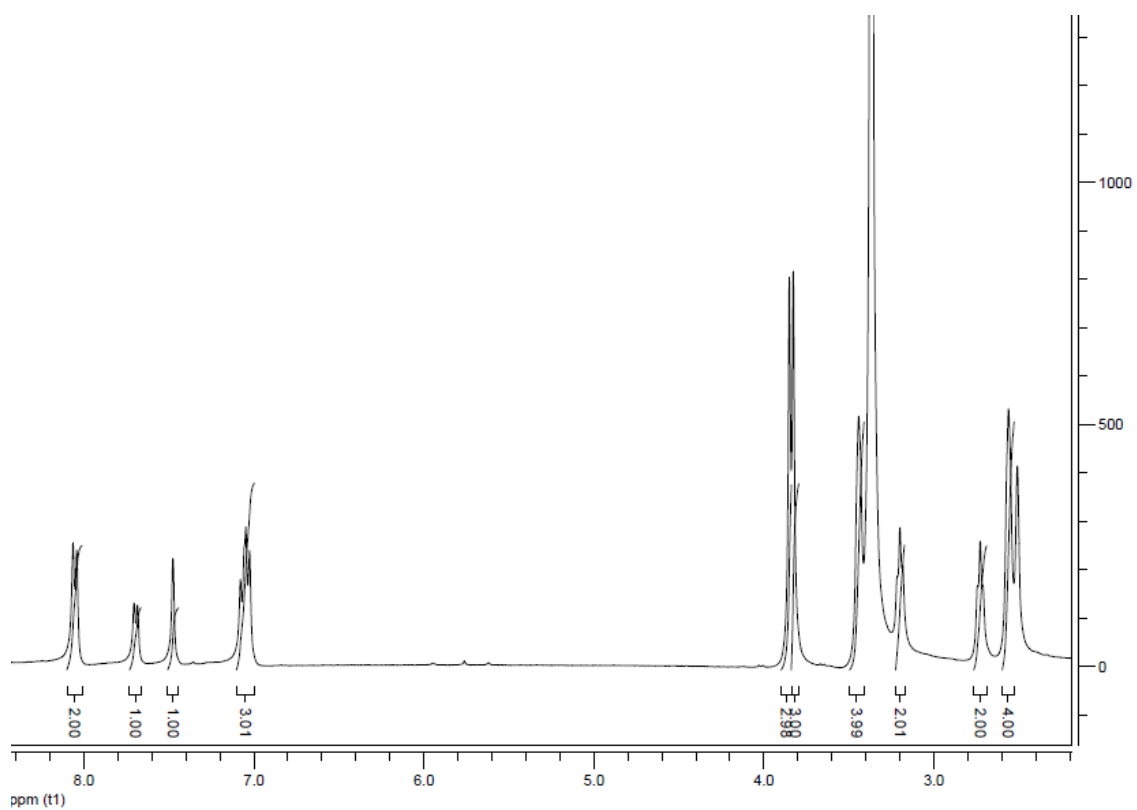
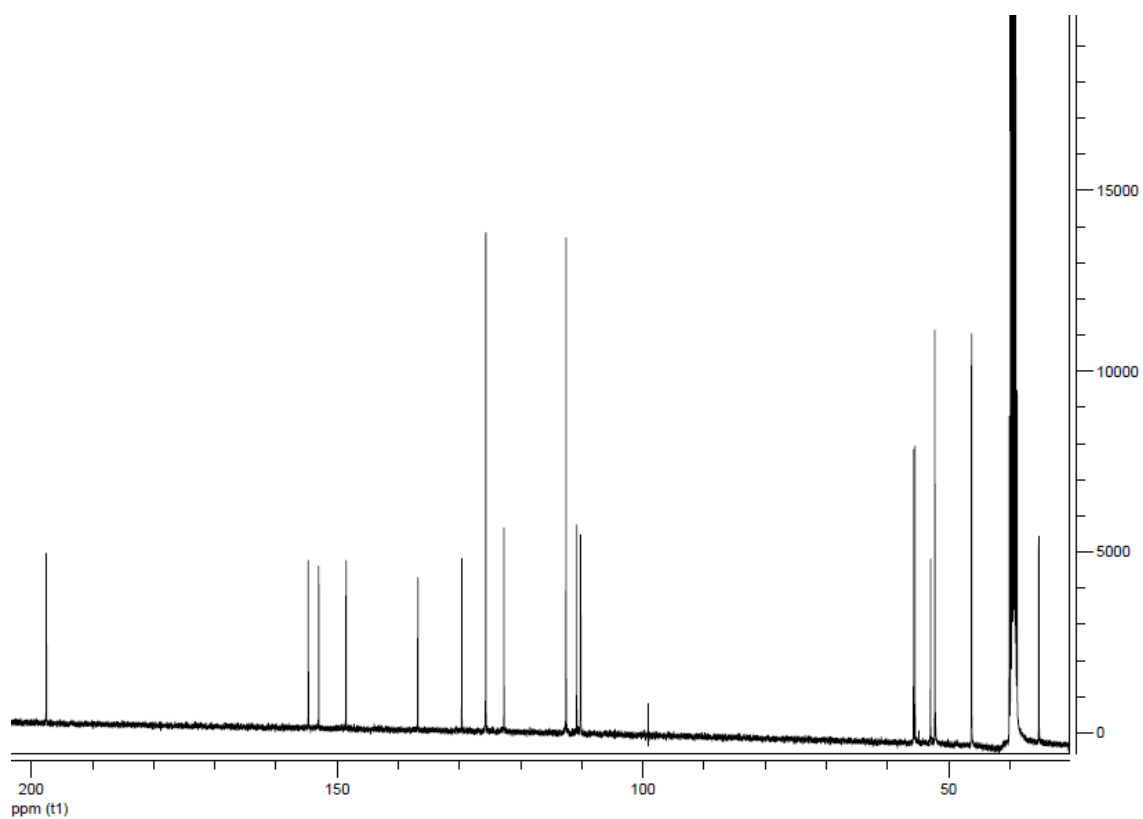


Figure 24.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 13.



**Figure 25.**  $^1\text{H}$  NMR of compound 14.



**Figure 26.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 14.

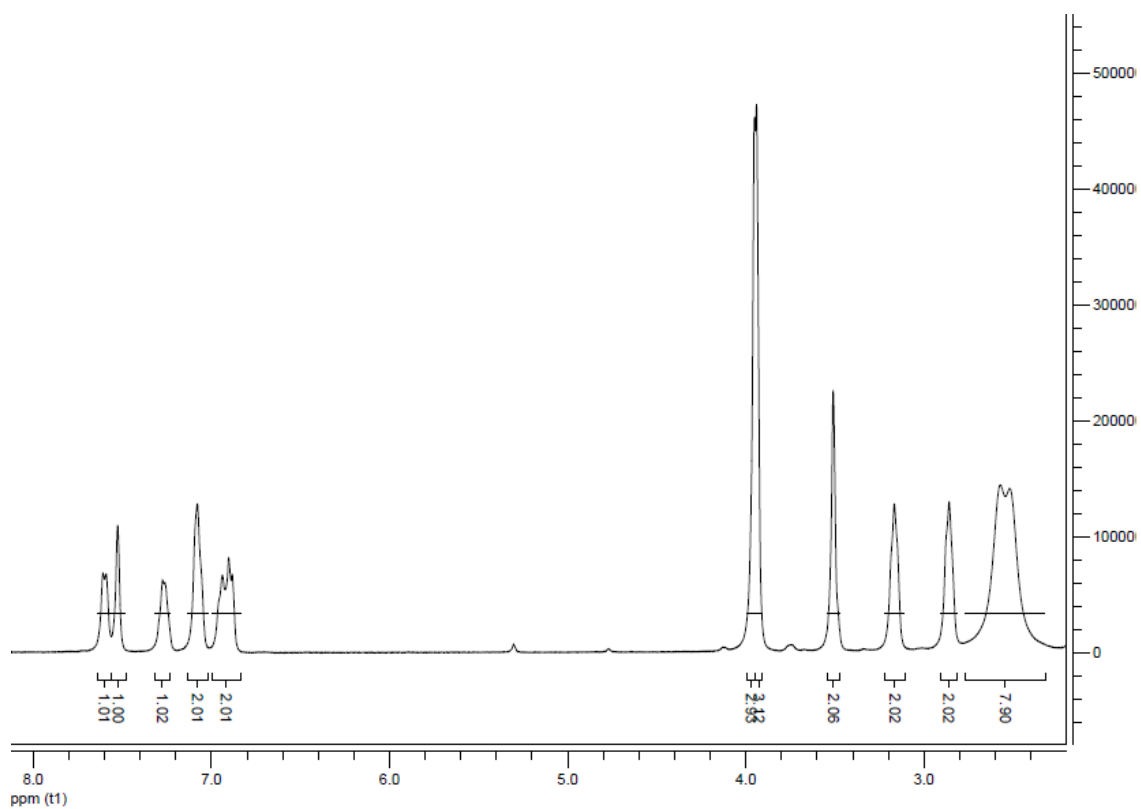


Figure 27.  $^1\text{H}$  NMR of compound 15.

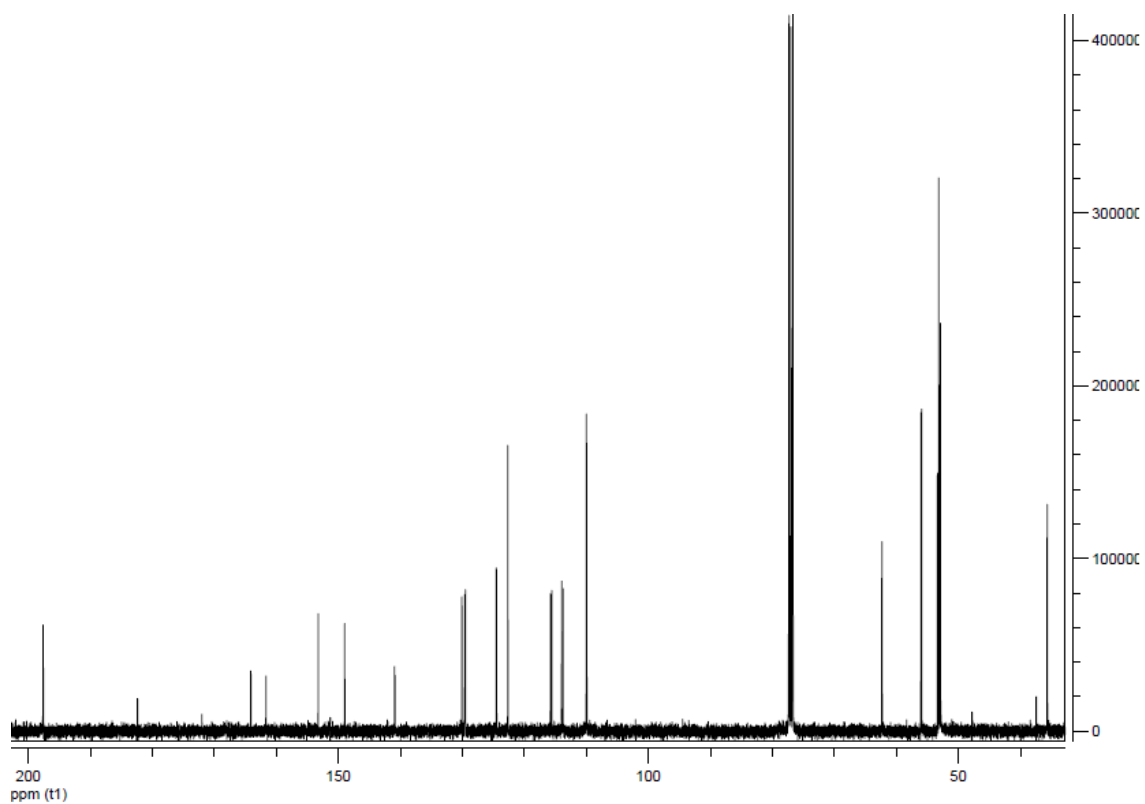
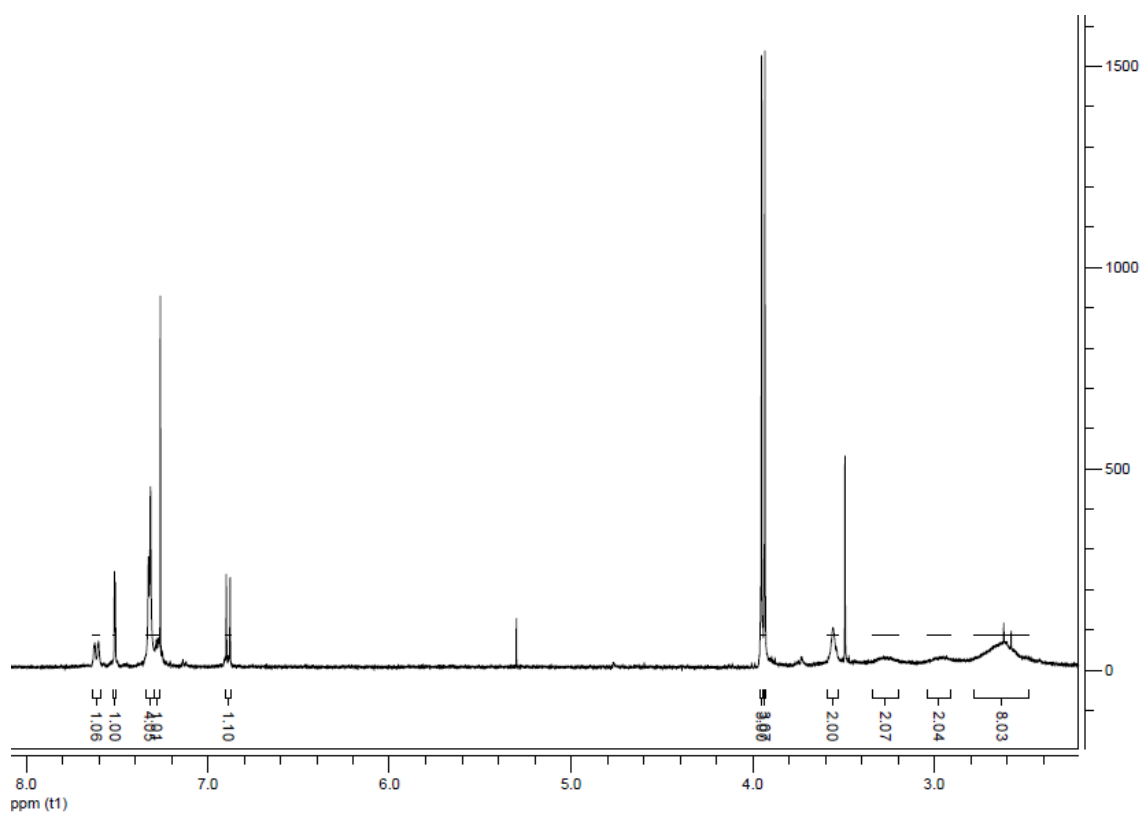
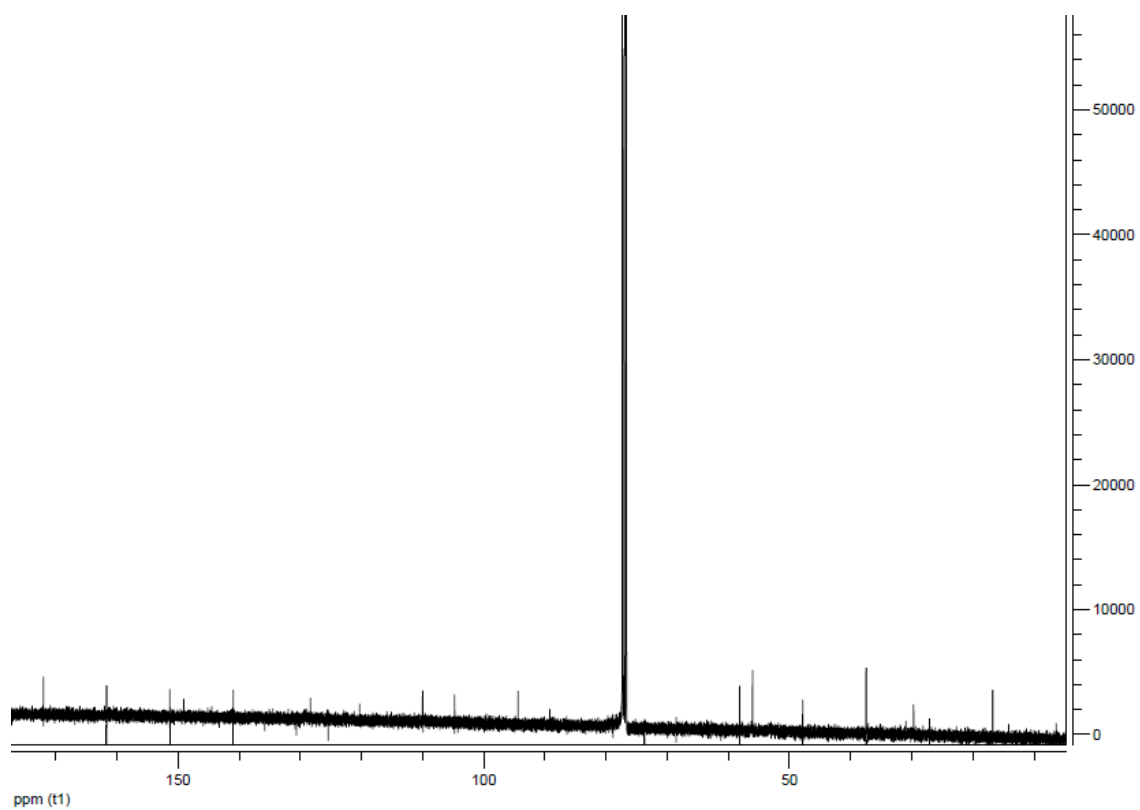


Figure 28.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 15.



**Figure 29.**  $^1\text{H}$  NMR of compound 16.



**Figure 30.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 16.

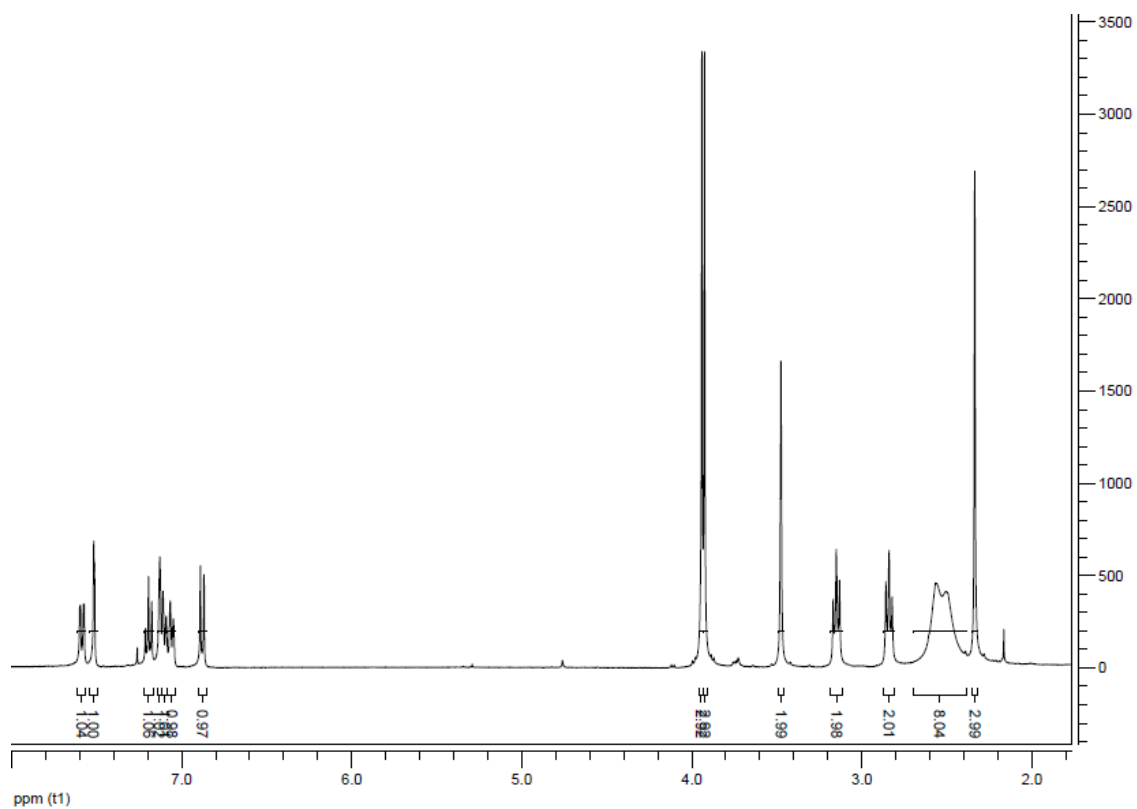


Figure 31.  $^1\text{H}$  NMR of compound 17.

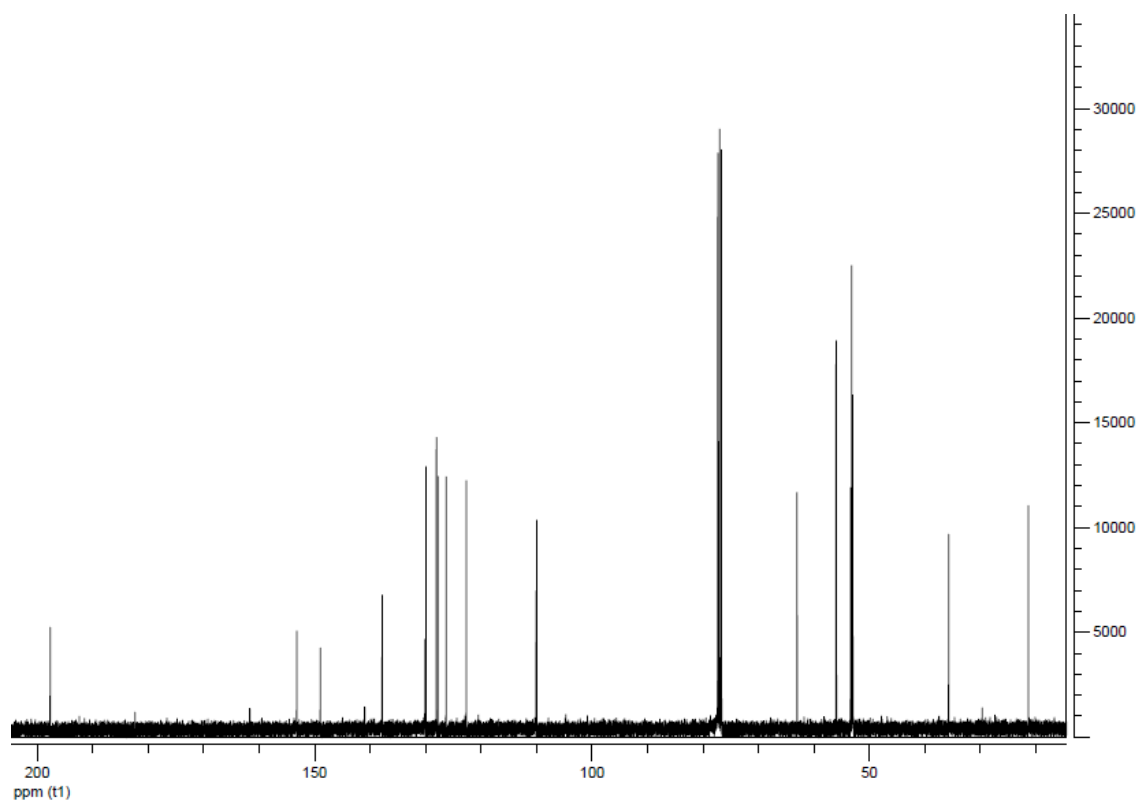


Figure 32.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 17.

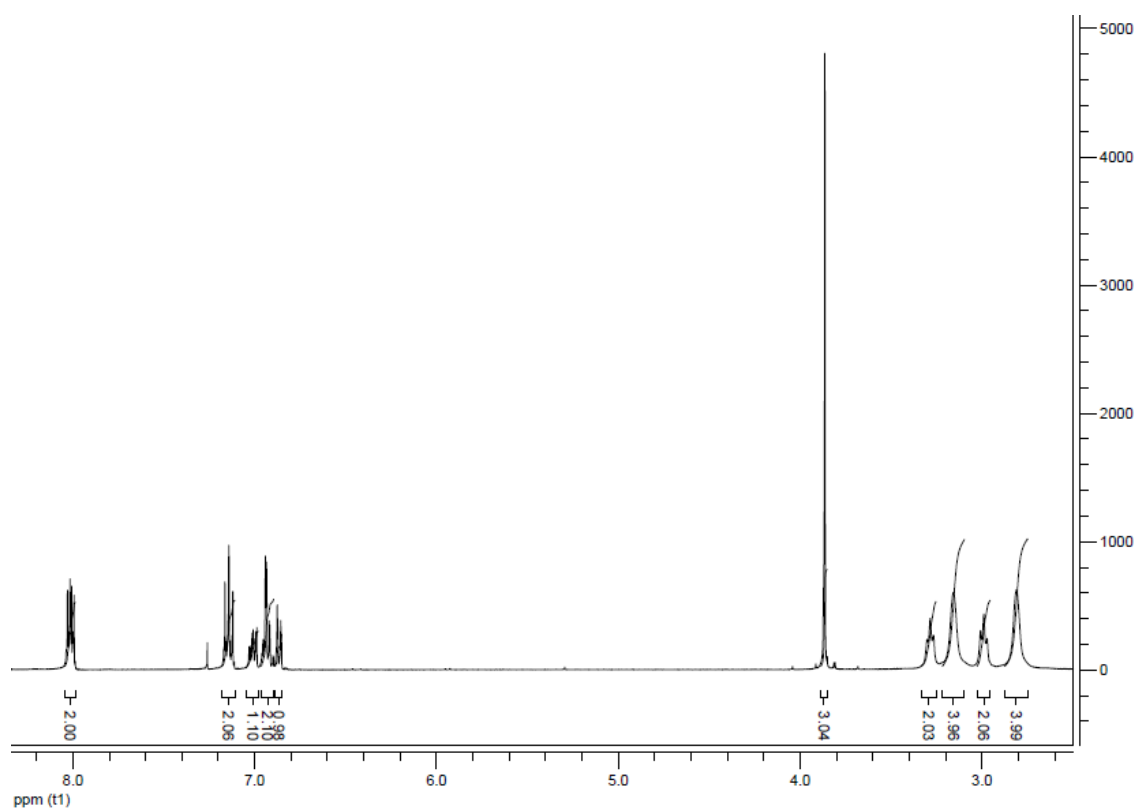


Figure 33.  $^1\text{H}$  NMR of compound 18.

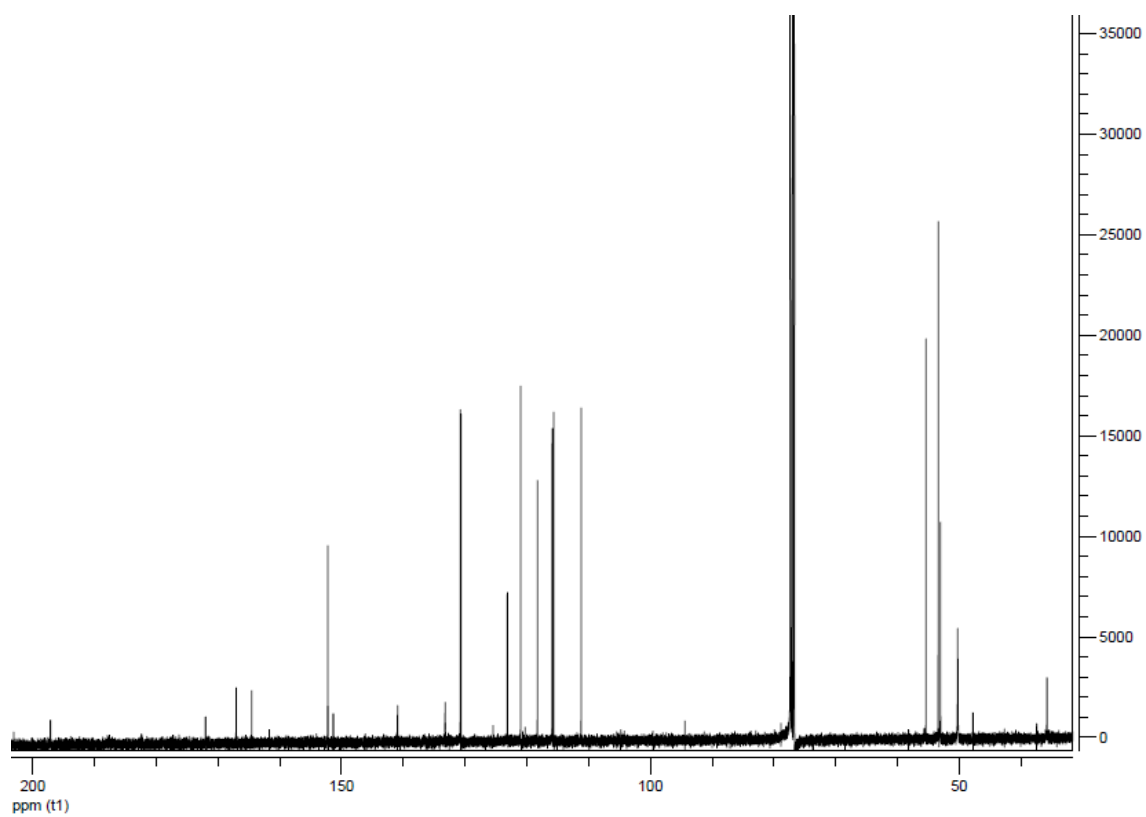


Figure 34.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 18.



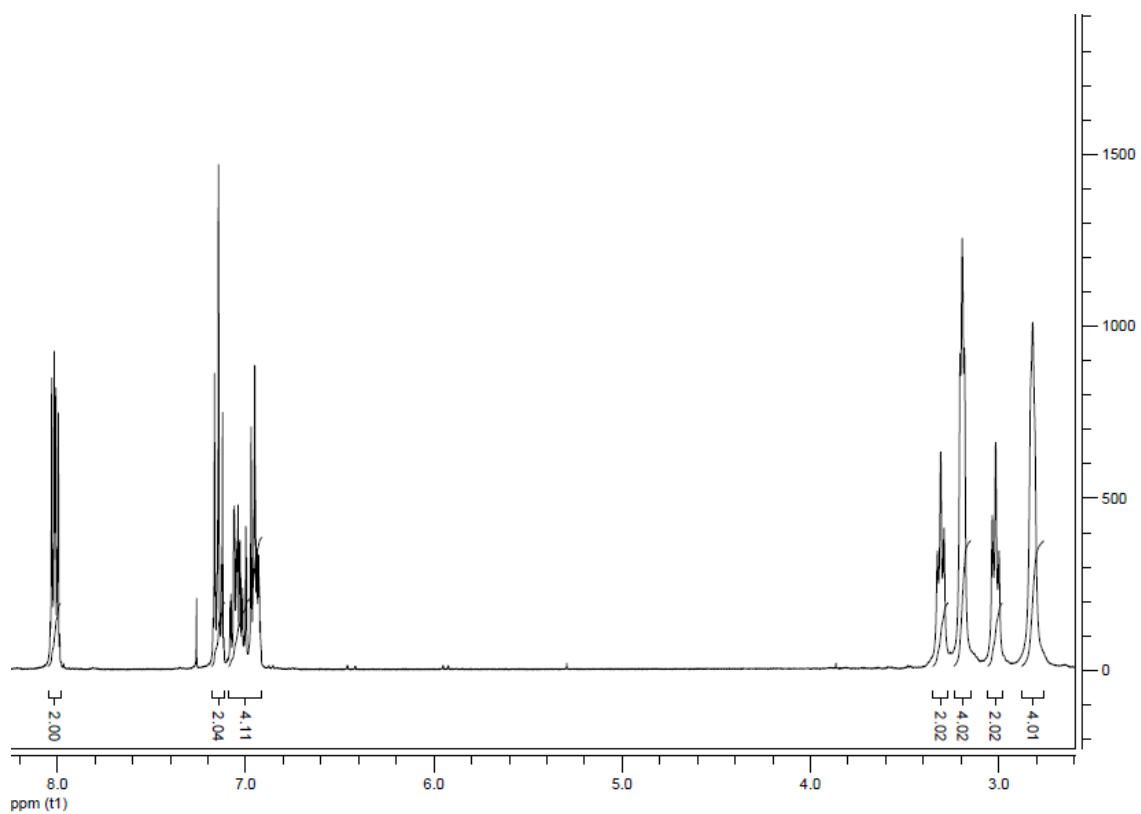


Figure 35.  $^1\text{H}$  NMR of compound 19.

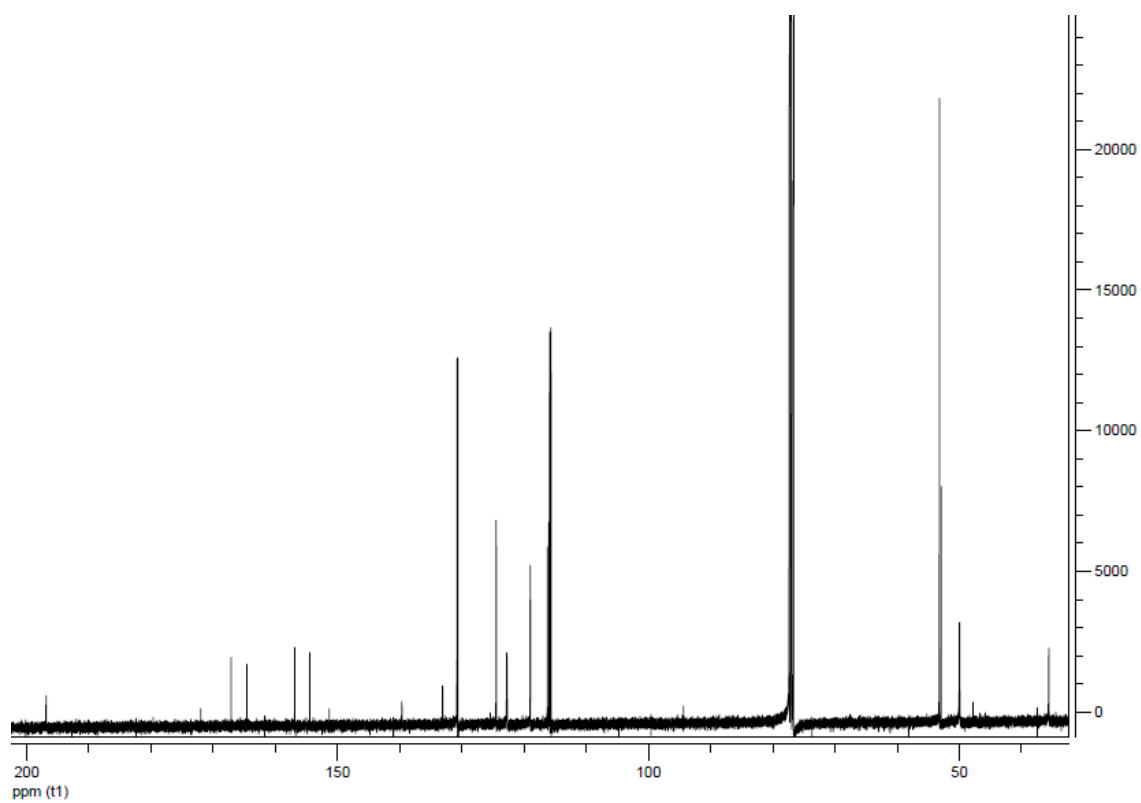


Figure 36.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 19.

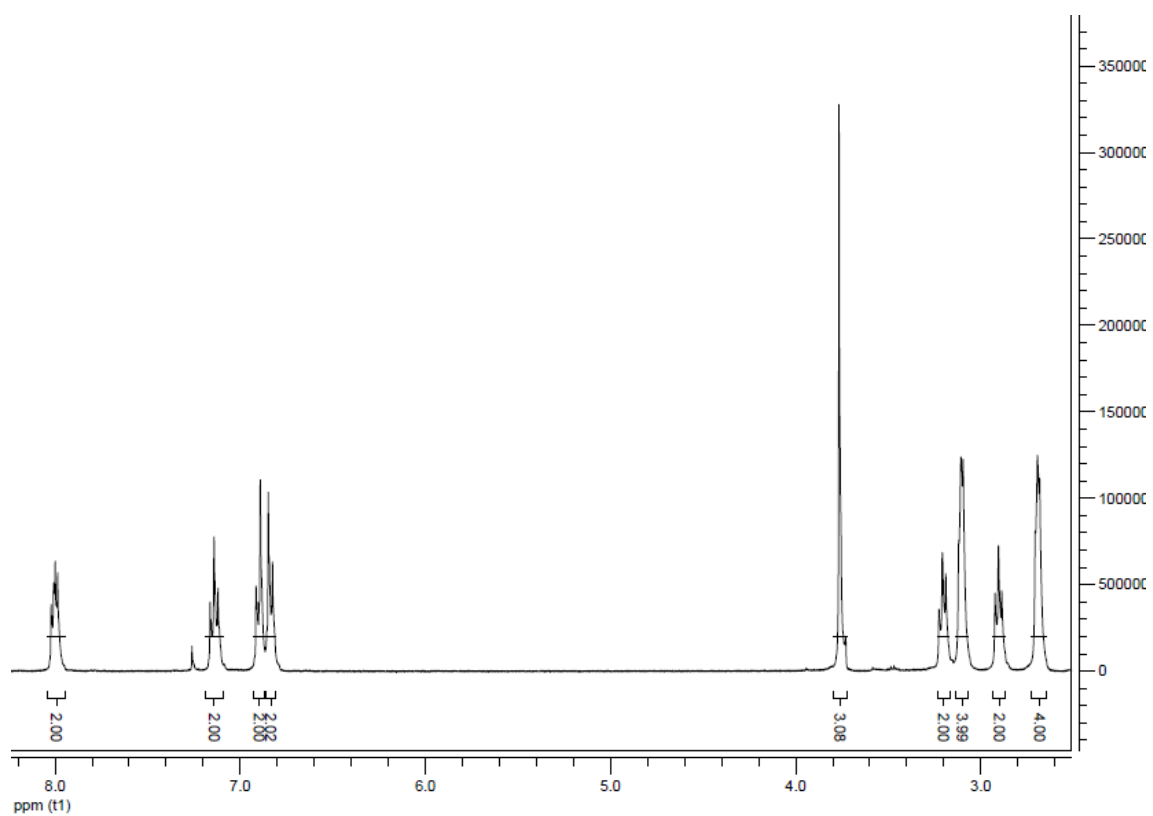


Figure 37.  $^1\text{H}$  NMR of compound 20.

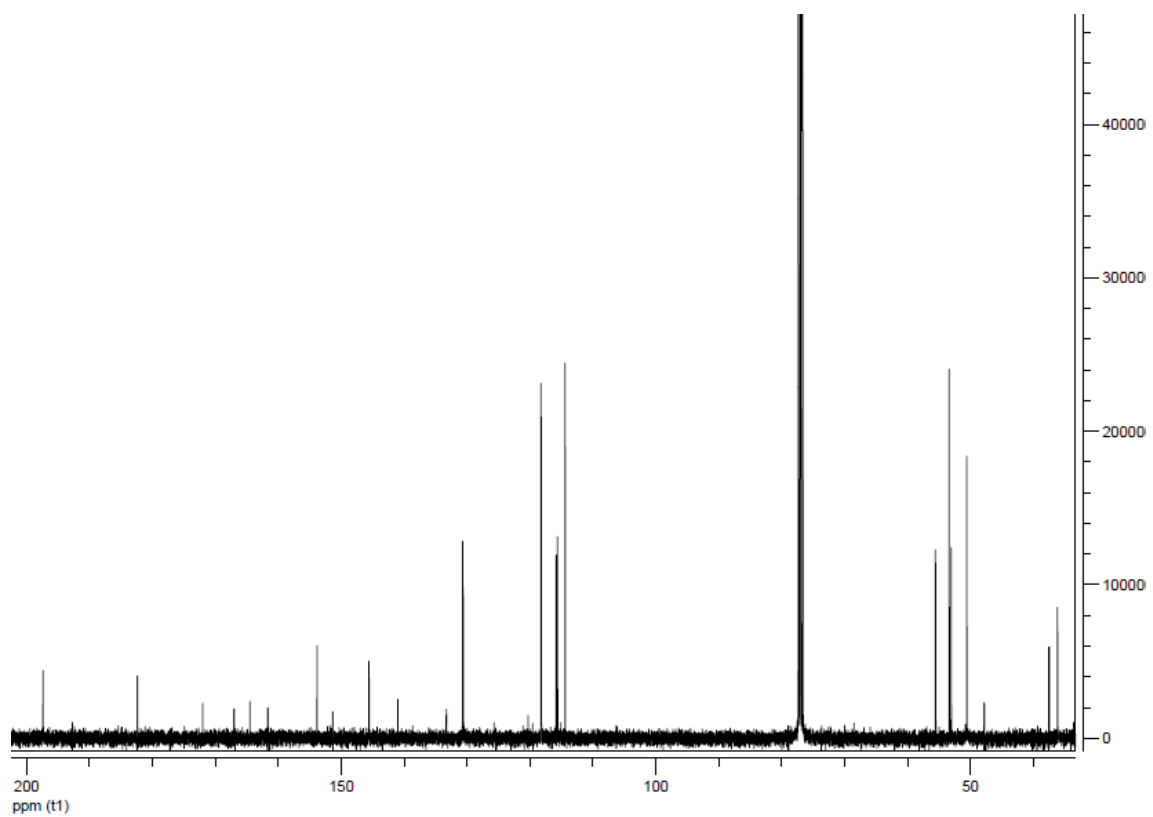


Figure 38.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 20.

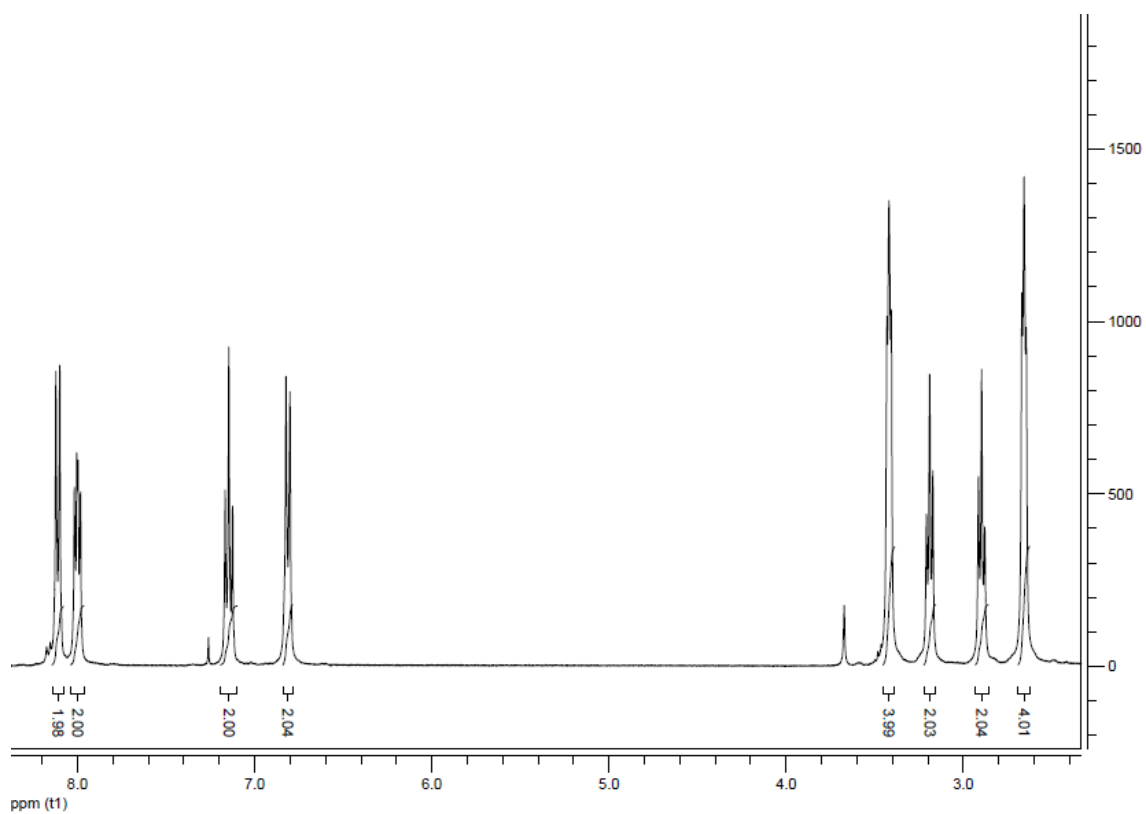


Figure 39.  $^1\text{H}$  NMR of compound 21.

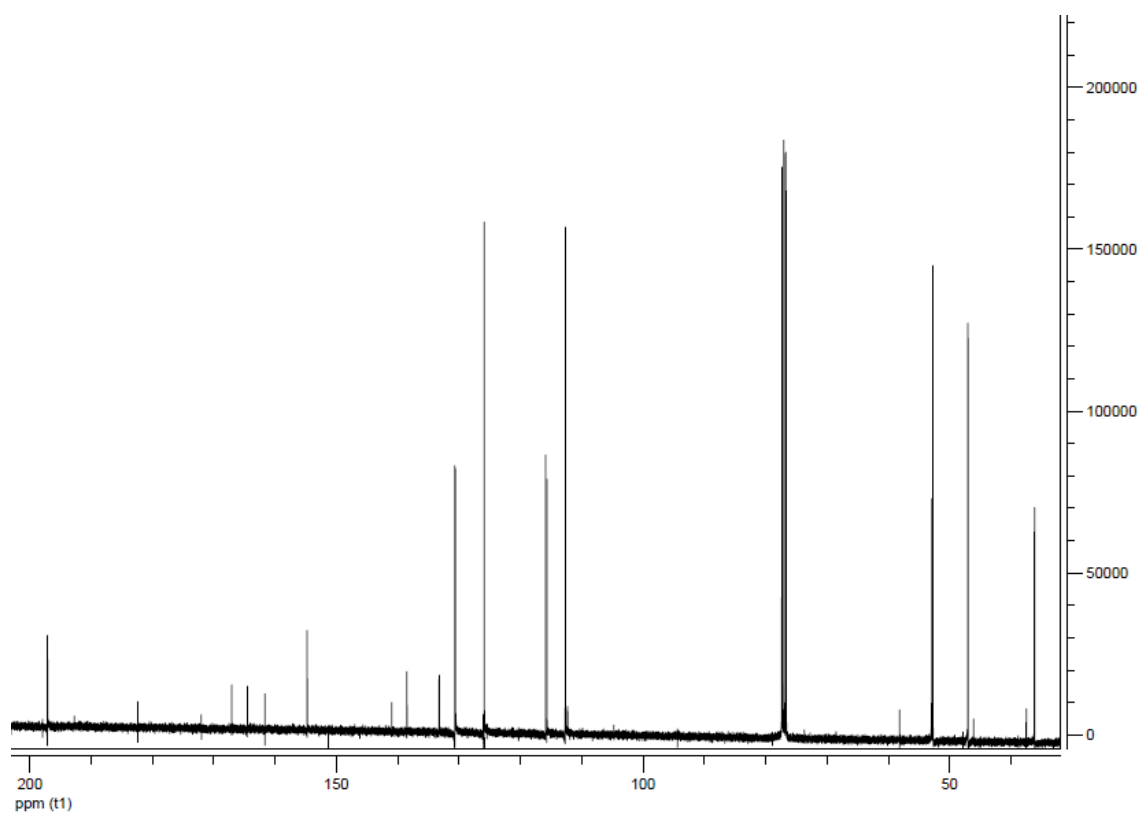


Figure 40.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 21.

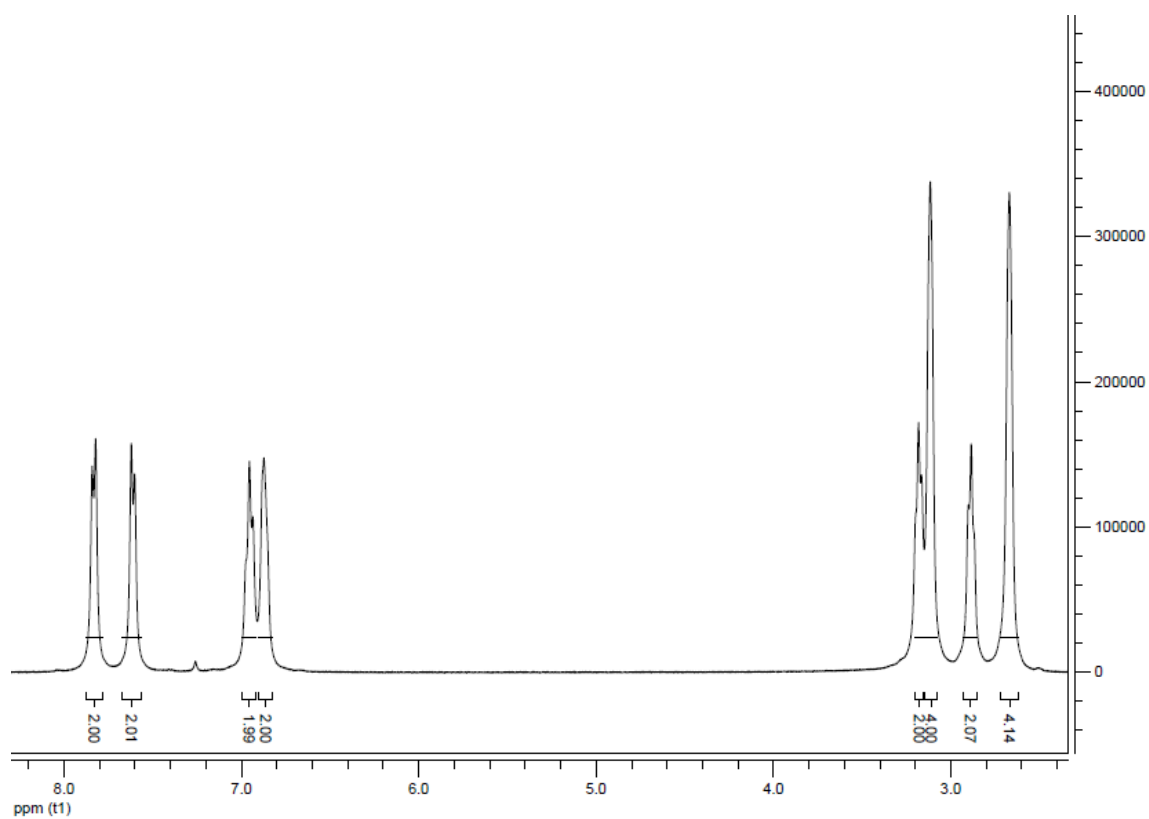


Figure 41.  $^1\text{H}$  NMR of compound 22.

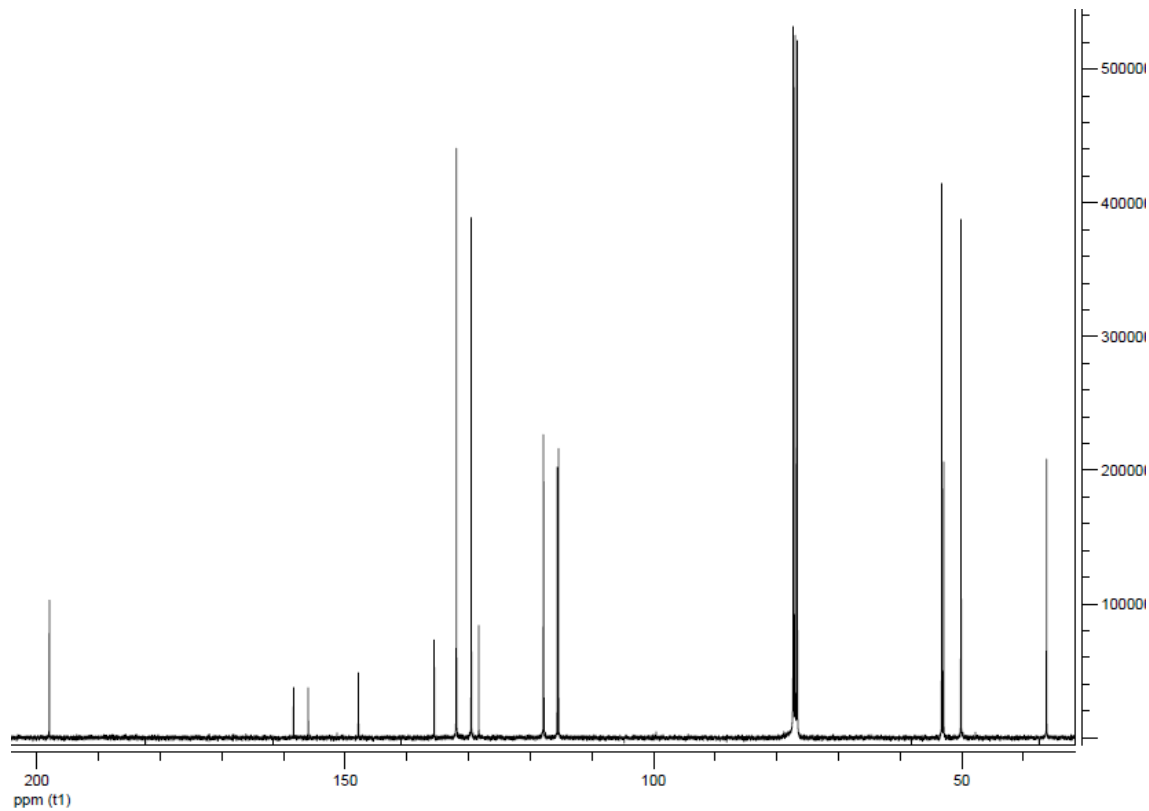


Figure 42.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 22.

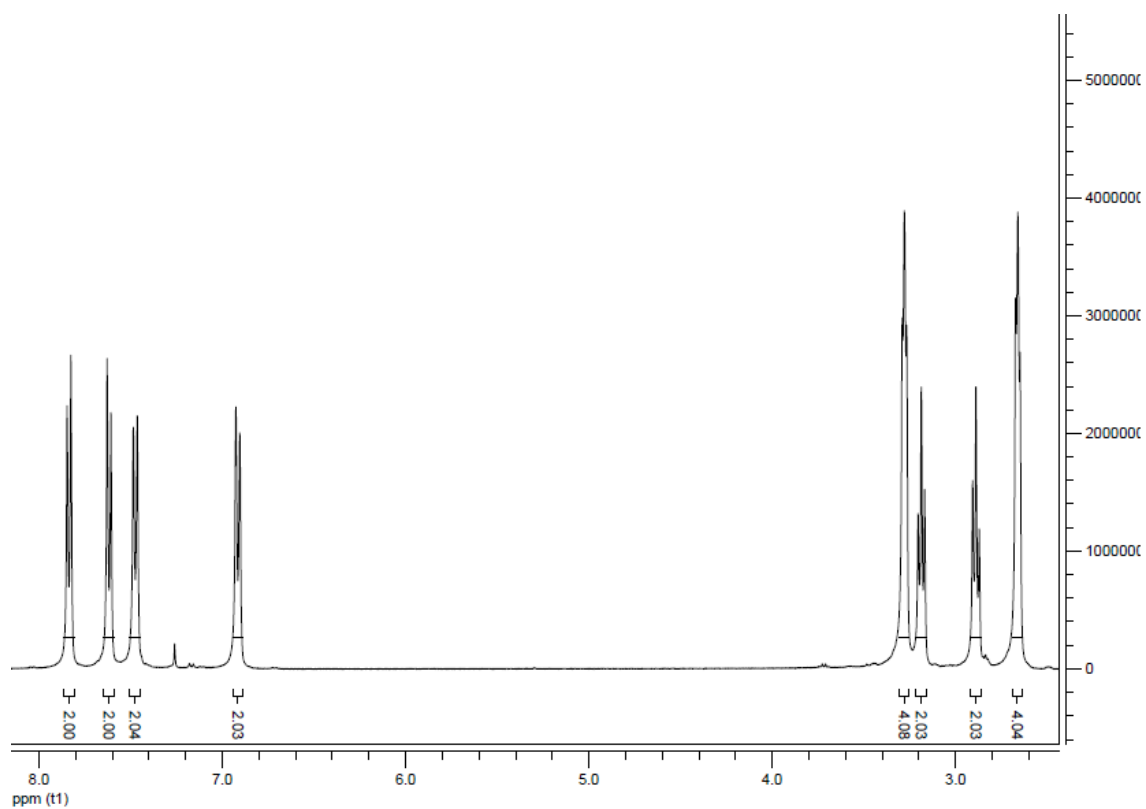


Figure 43.  $^1\text{H}$  NMR of compound 23.

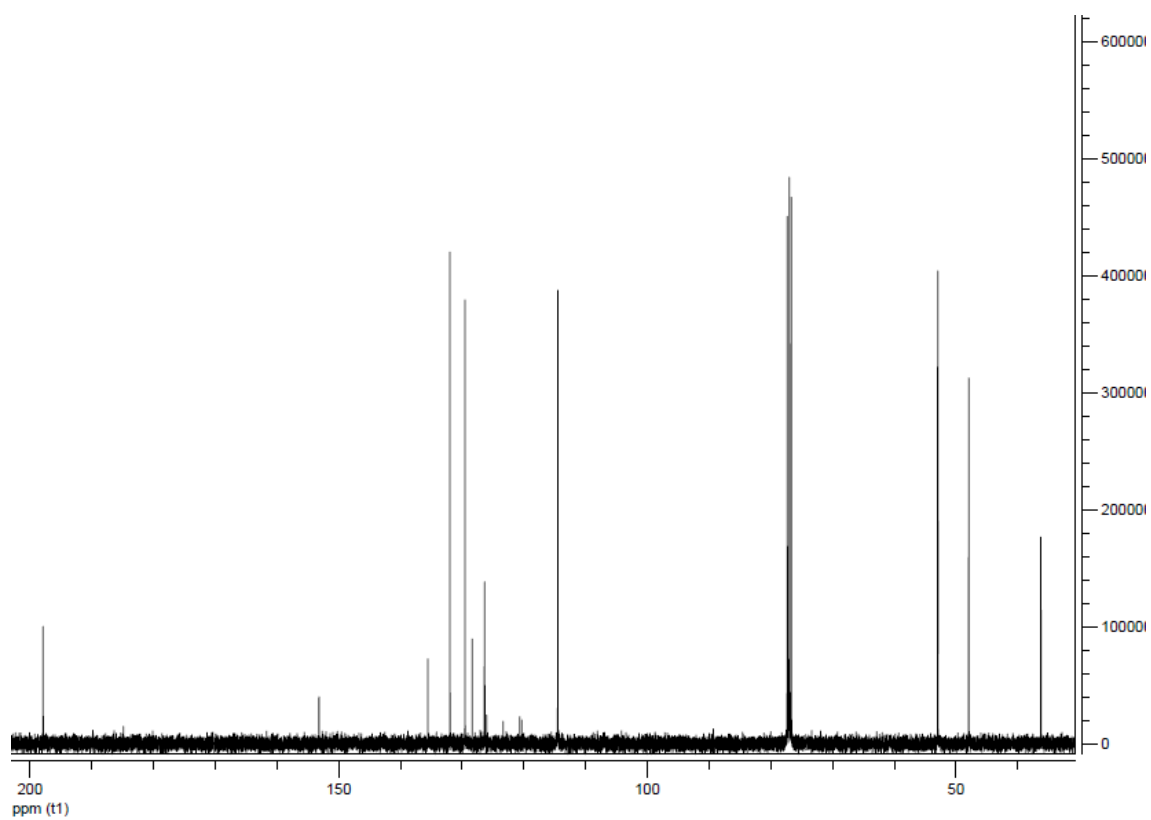


Figure 44.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 23.

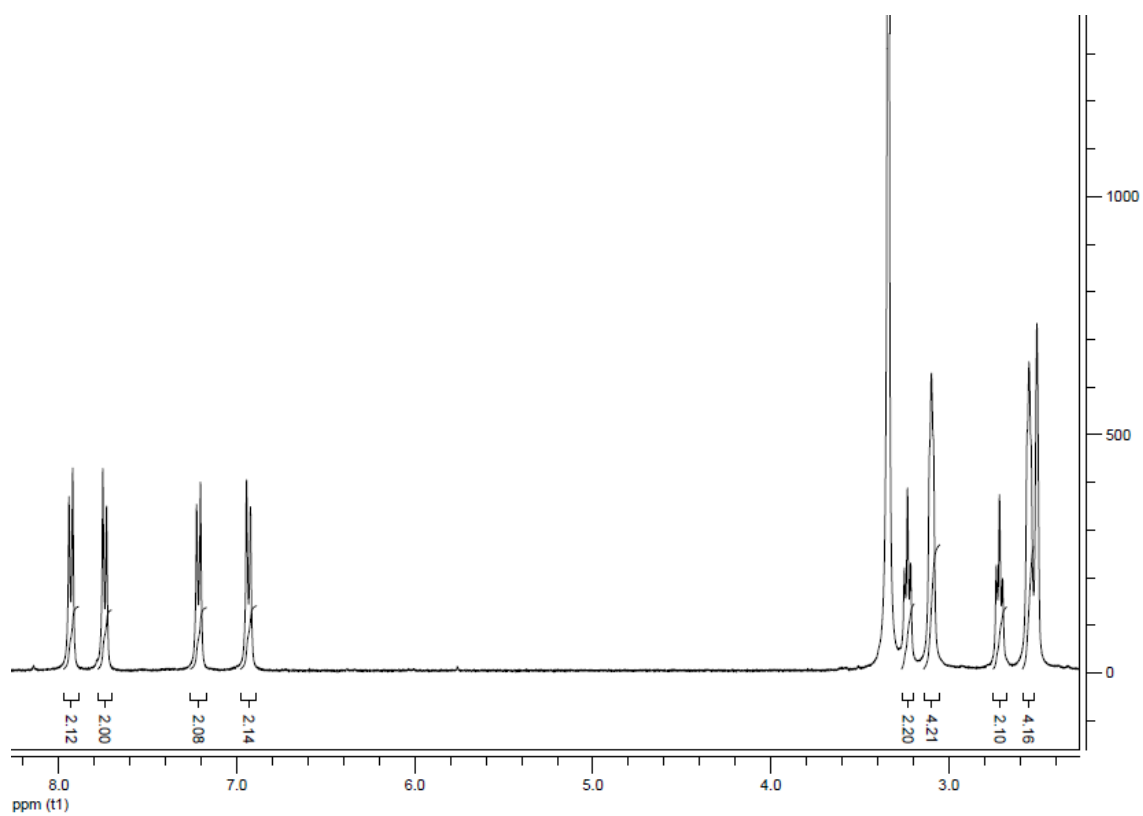


Figure 45.  $^1\text{H}$  NMR of compound 24.

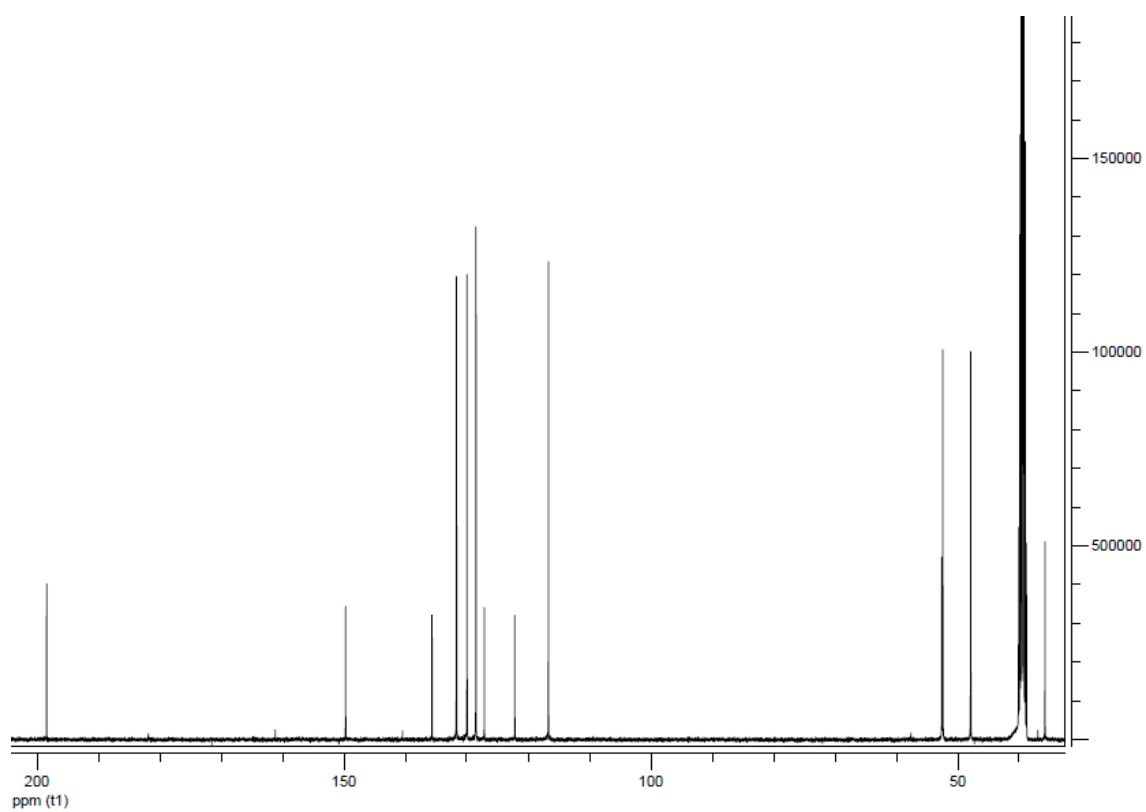


Figure 46.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 24.

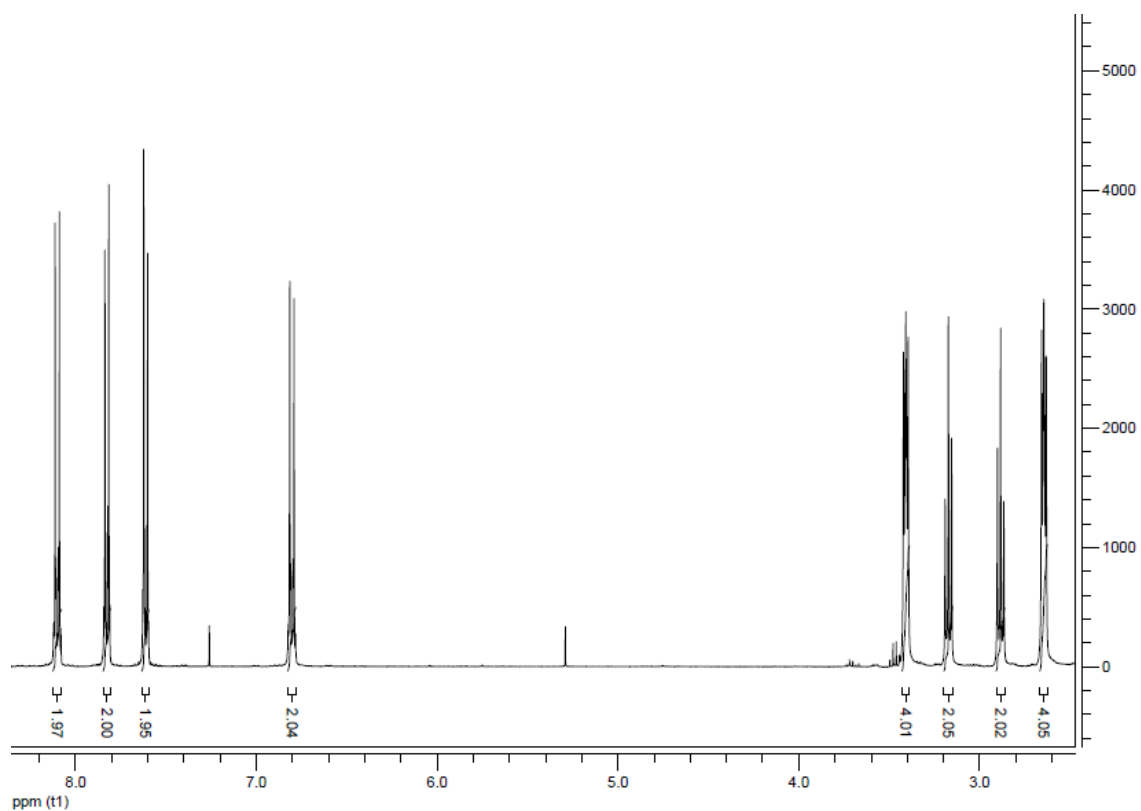


Figure 47.  $^1\text{H}$  NMR of compound 25.

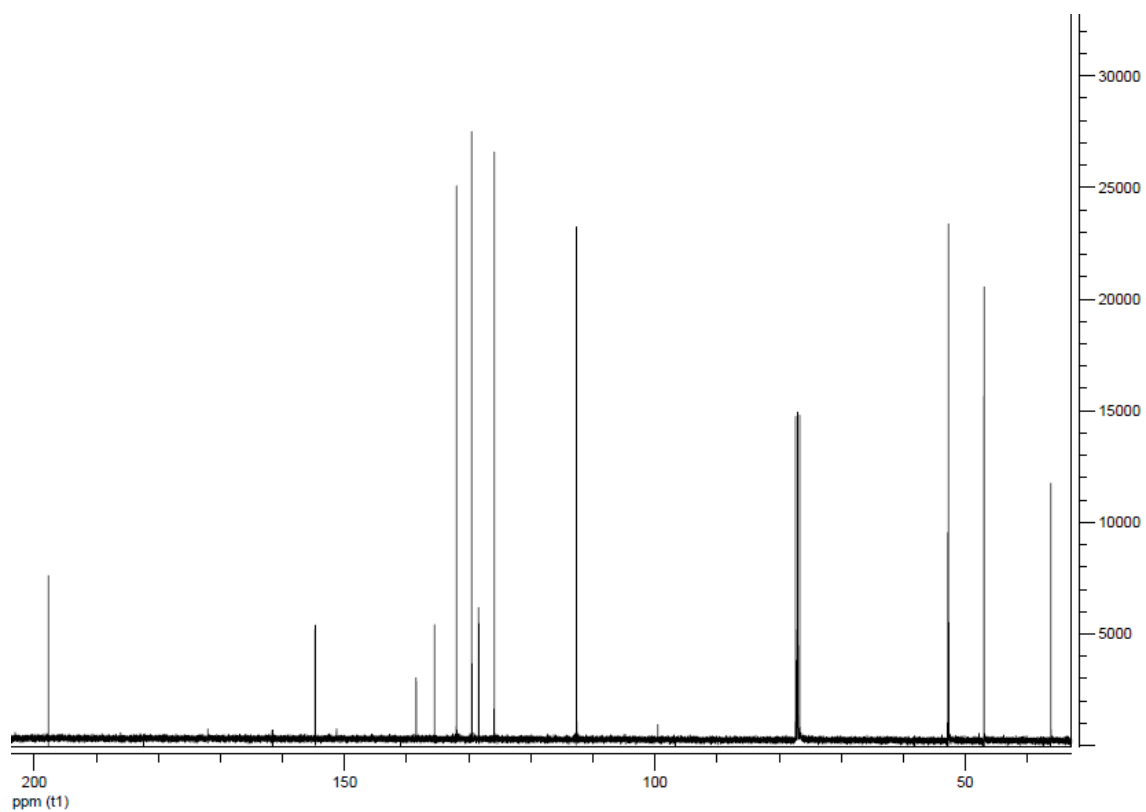


Figure 48.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 25.

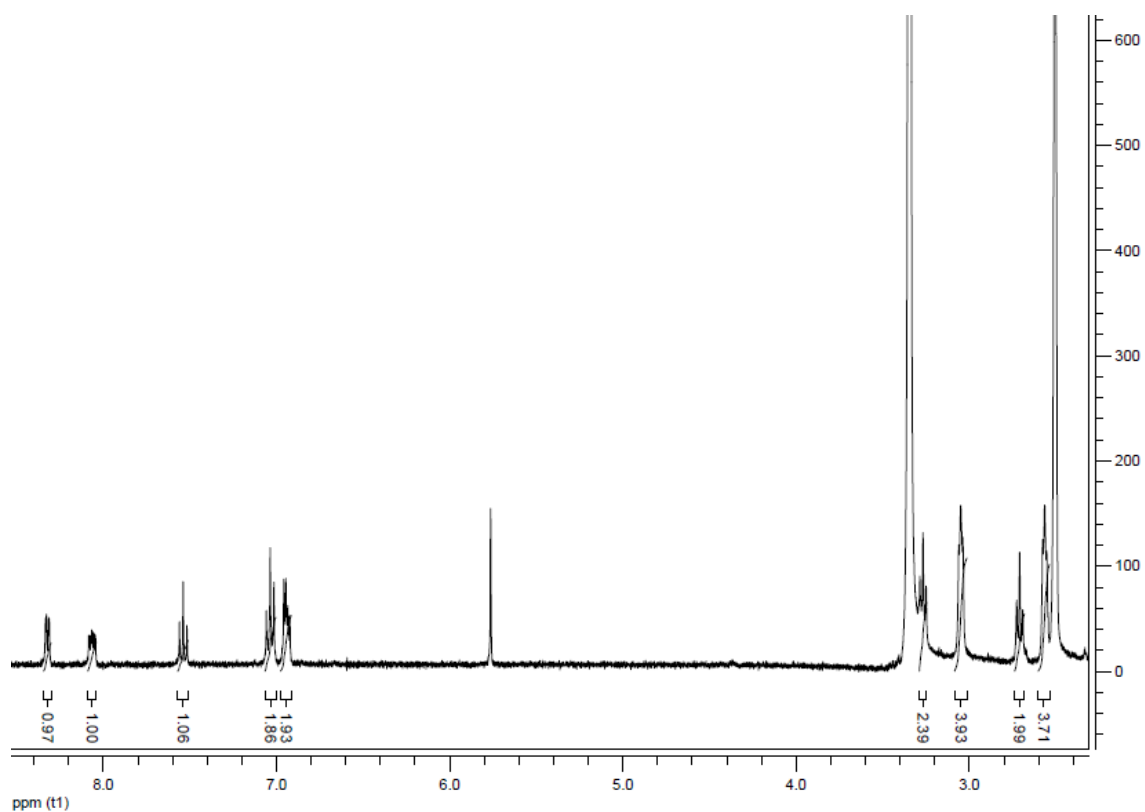


Figure 49.  $^1\text{H}$  NMR of compound 26.

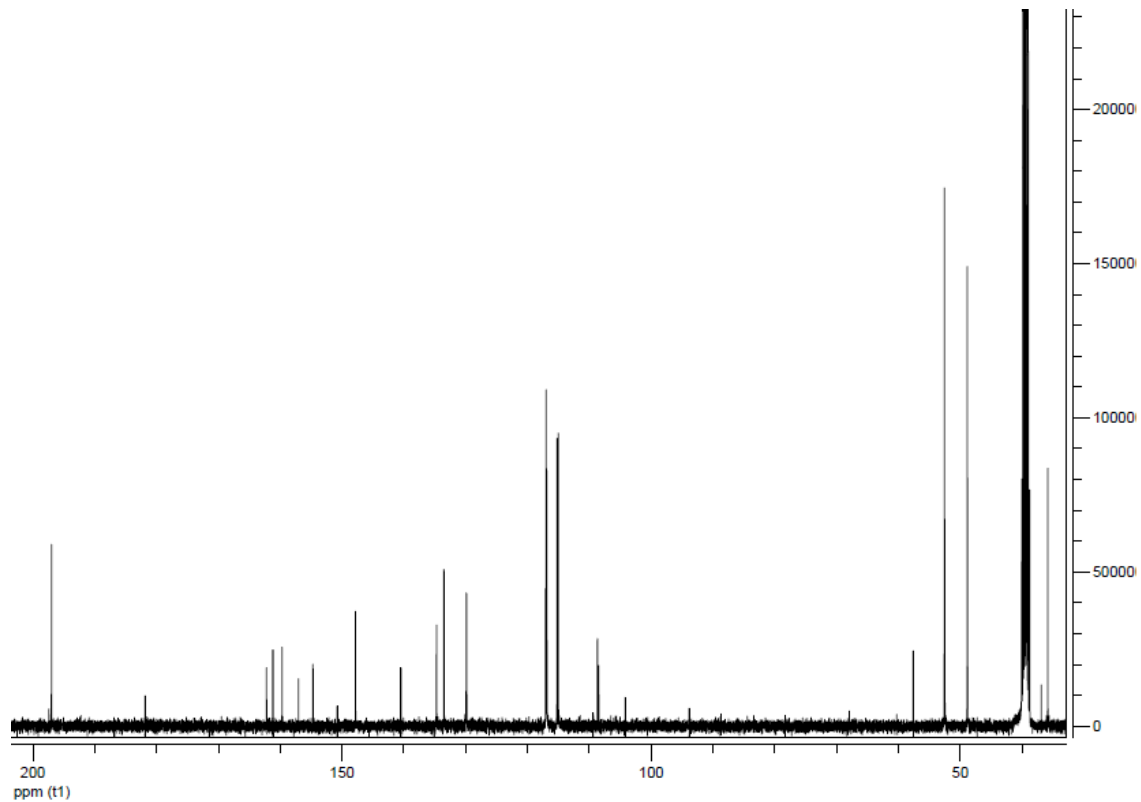


Figure 50.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 26.



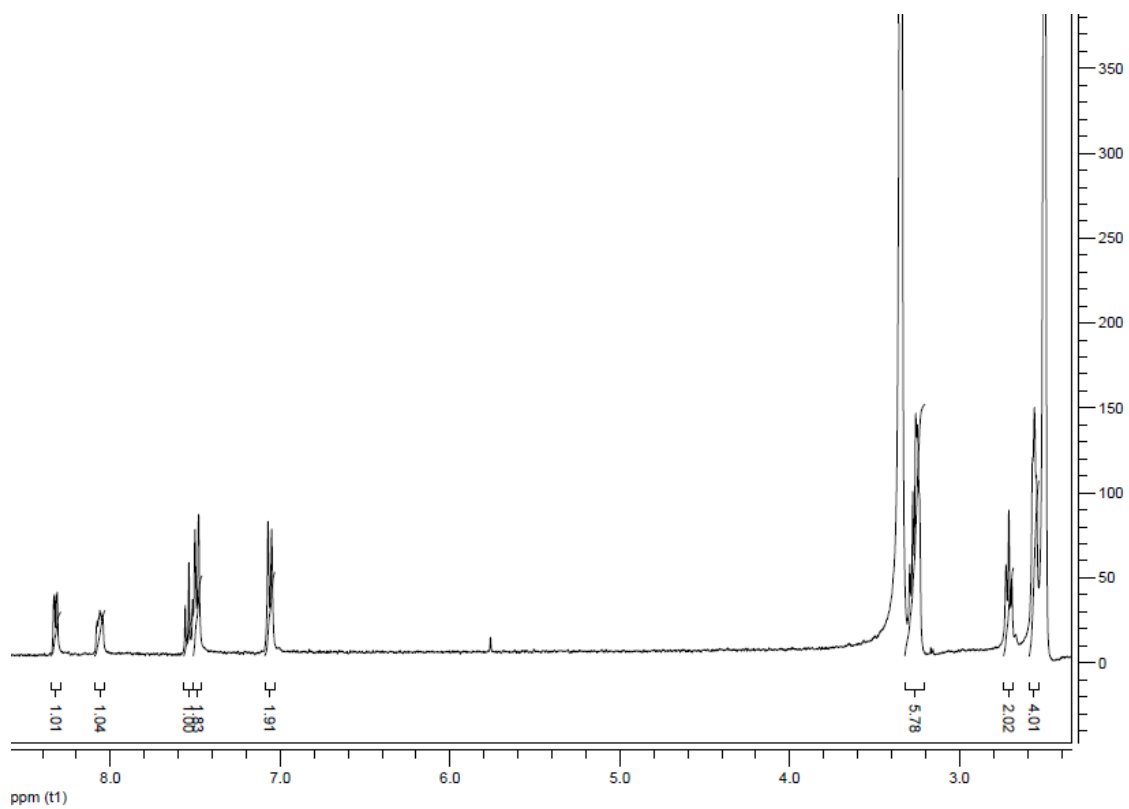


Figure 51.  $^1\text{H}$  NMR of compound 27.

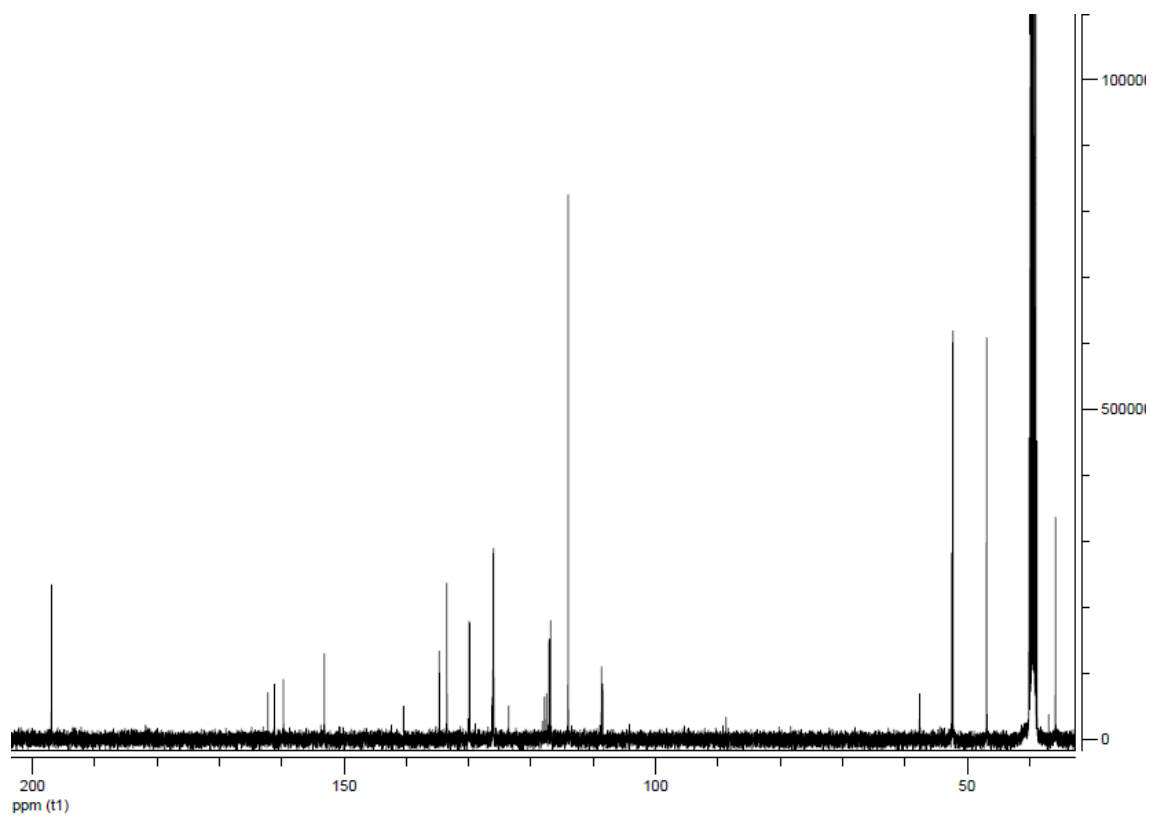
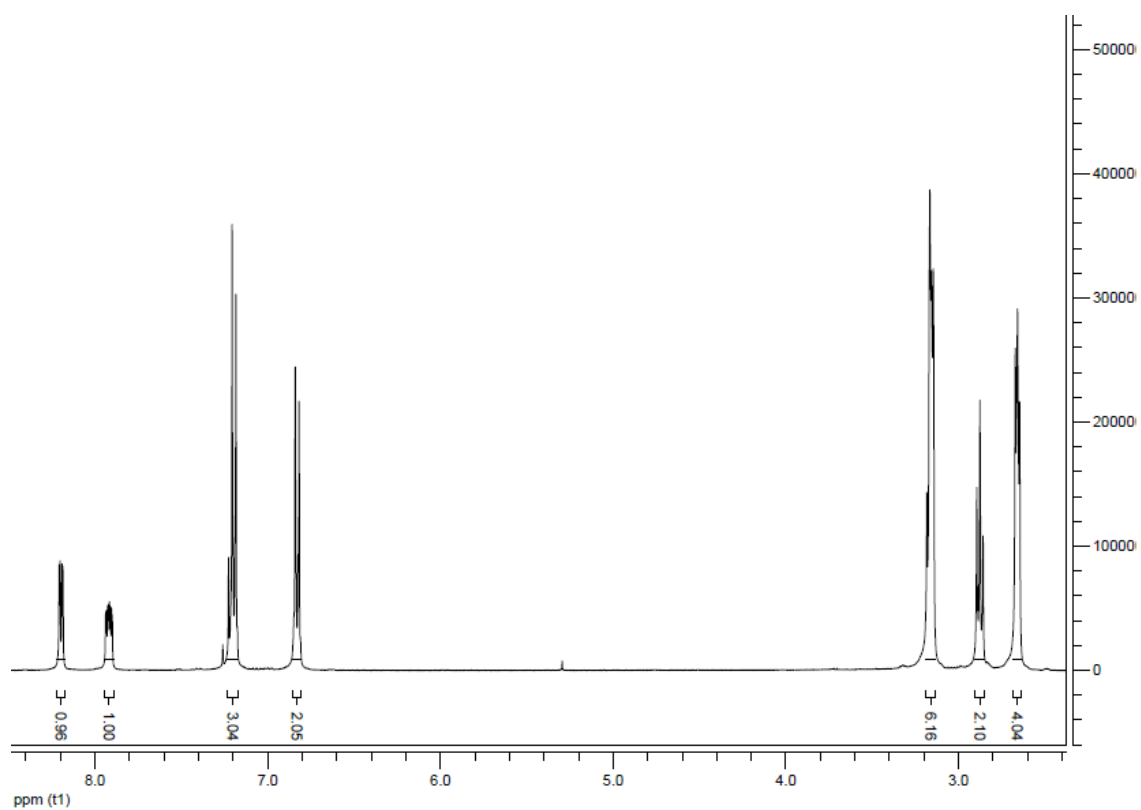
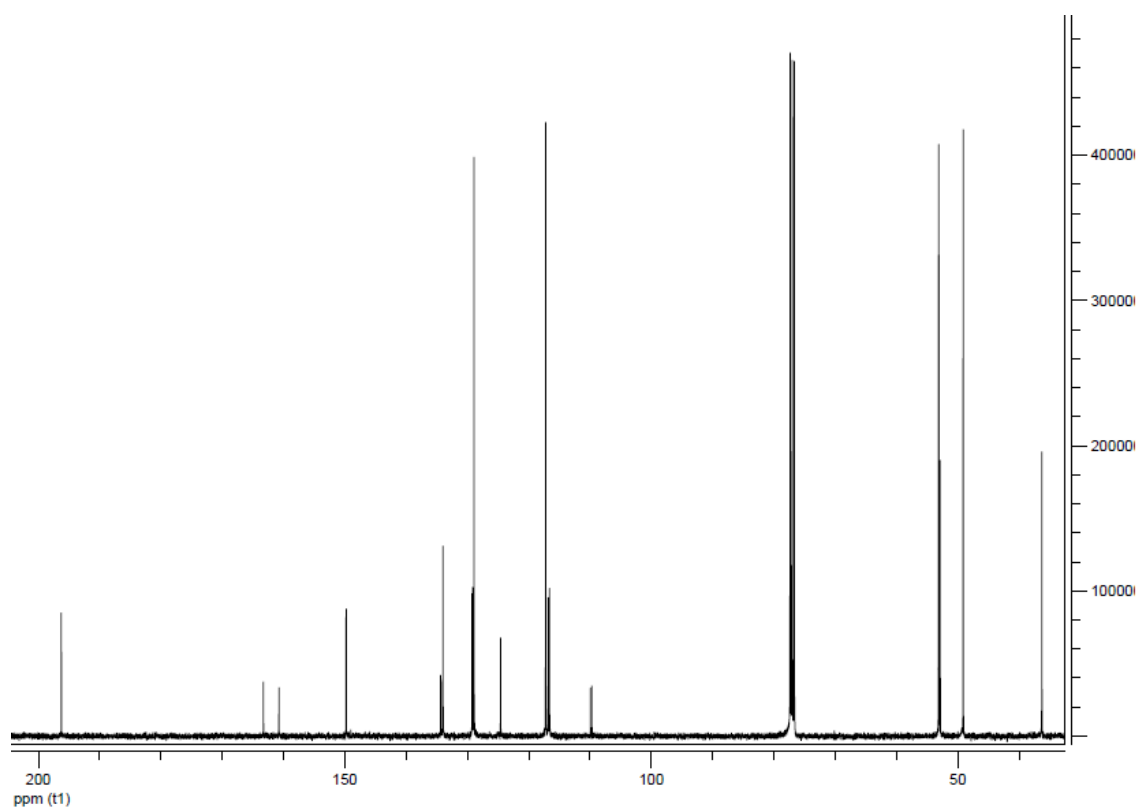


Figure 52.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 27.



**Figure 53.**  $^1\text{H}$  NMR of compound 28.



**Figure 54.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 28.

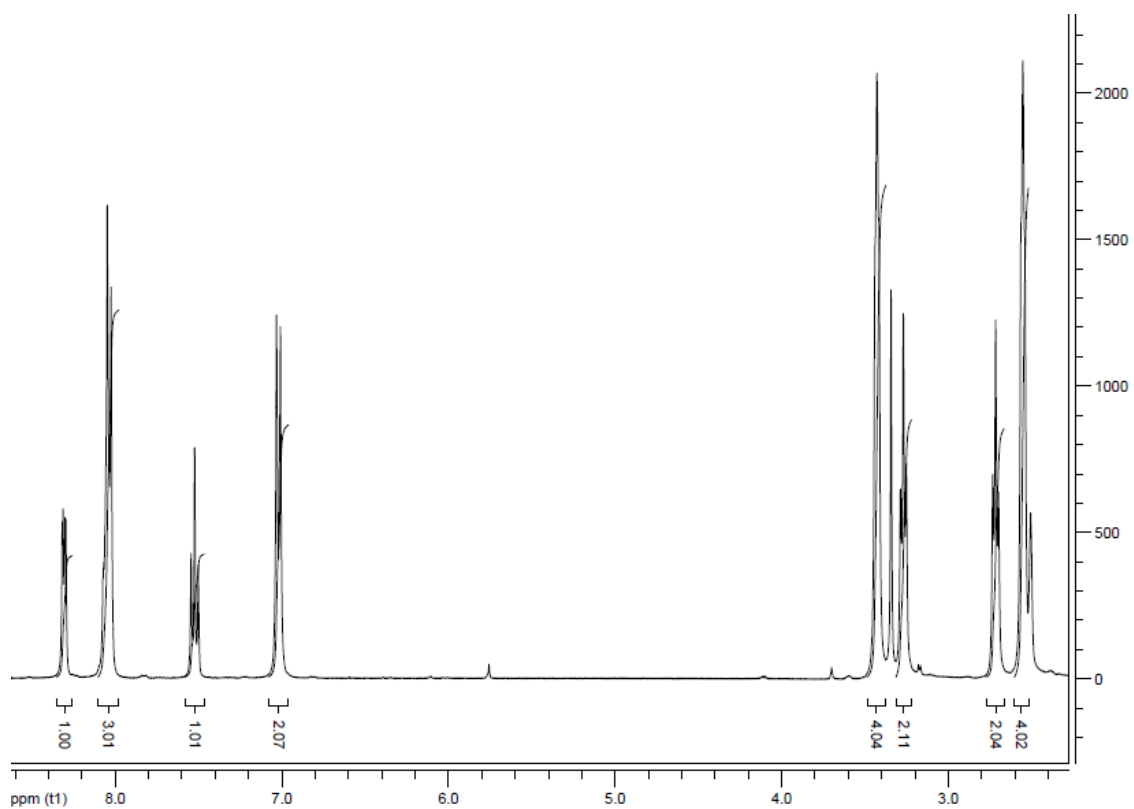


Figure 55.  $^1\text{H}$  NMR of compound 29.

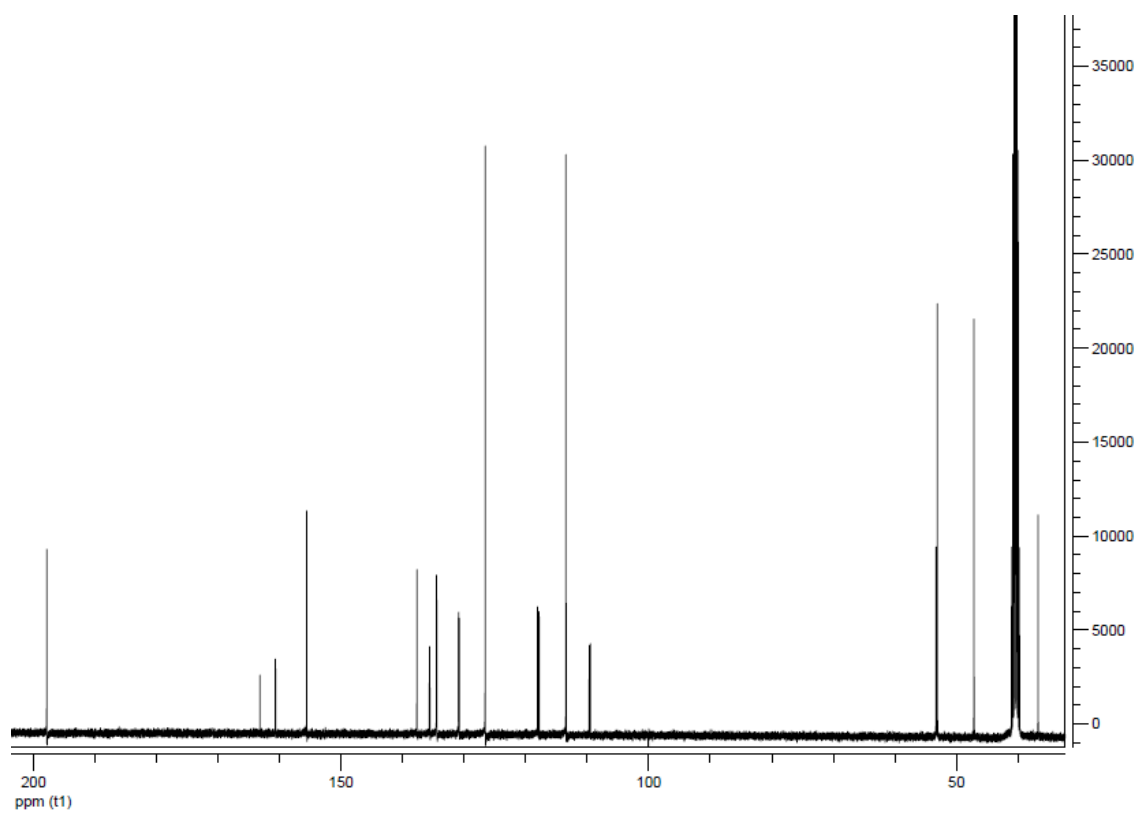


Figure 56.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 29.

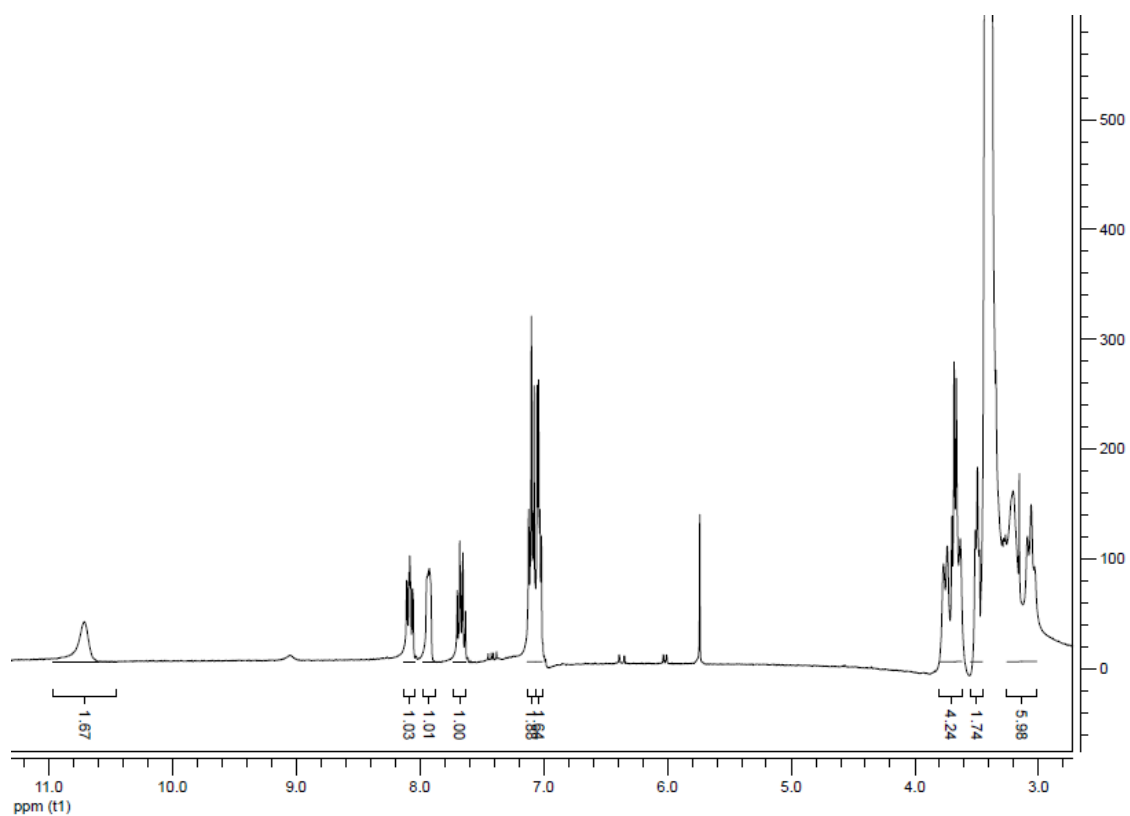


Figure 57.  $^1\text{H}$  NMR of compound 30.

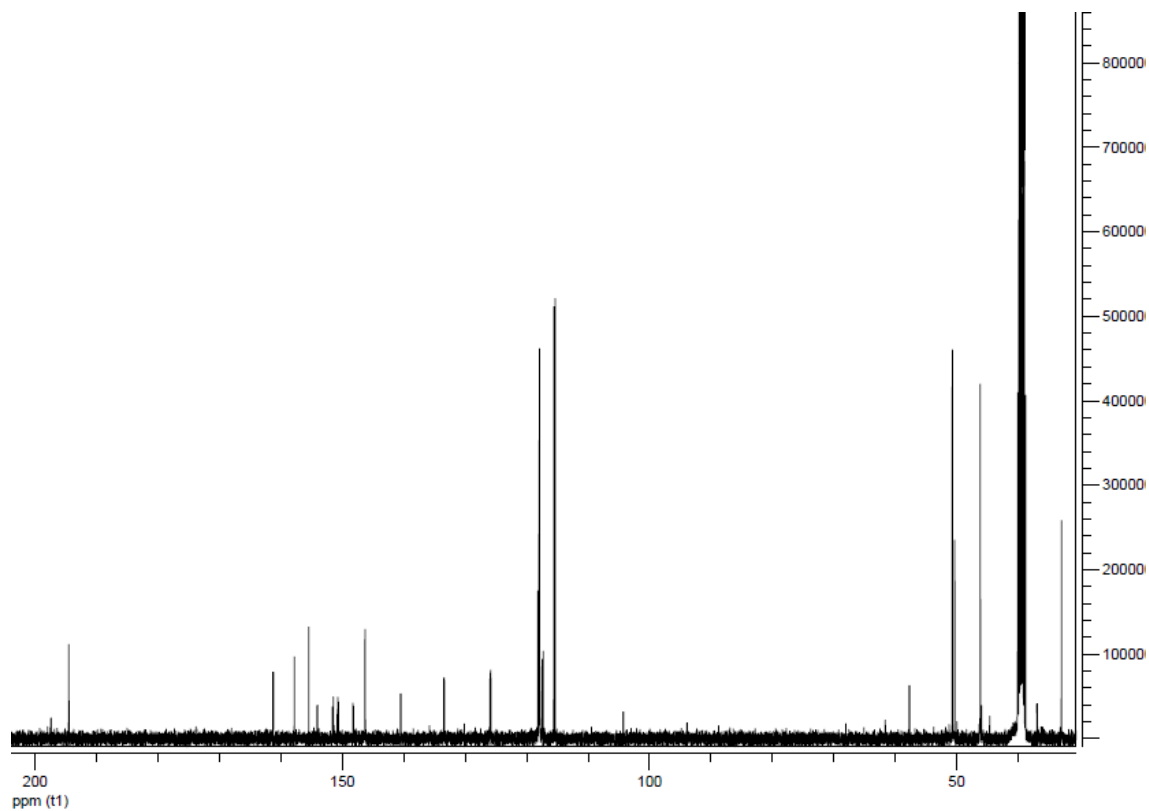


Figure 58.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 30.

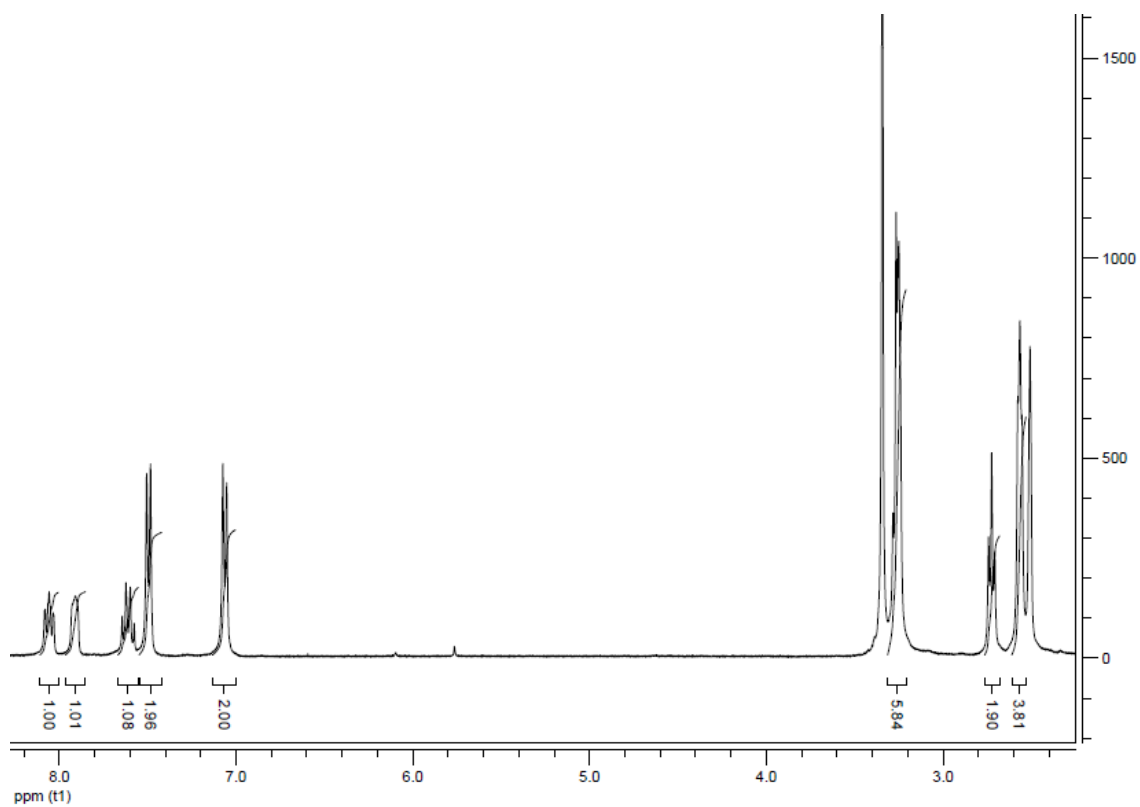


Figure 59.  $^1\text{H}$  NMR of compound **31**.

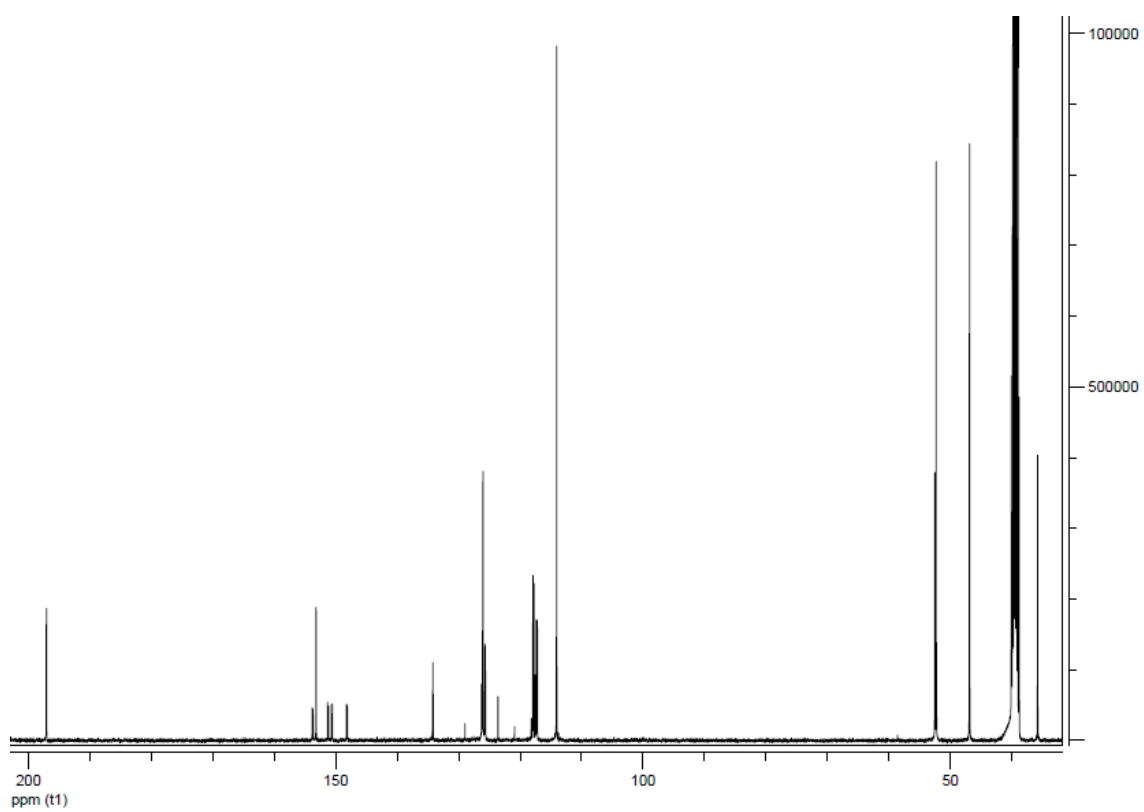
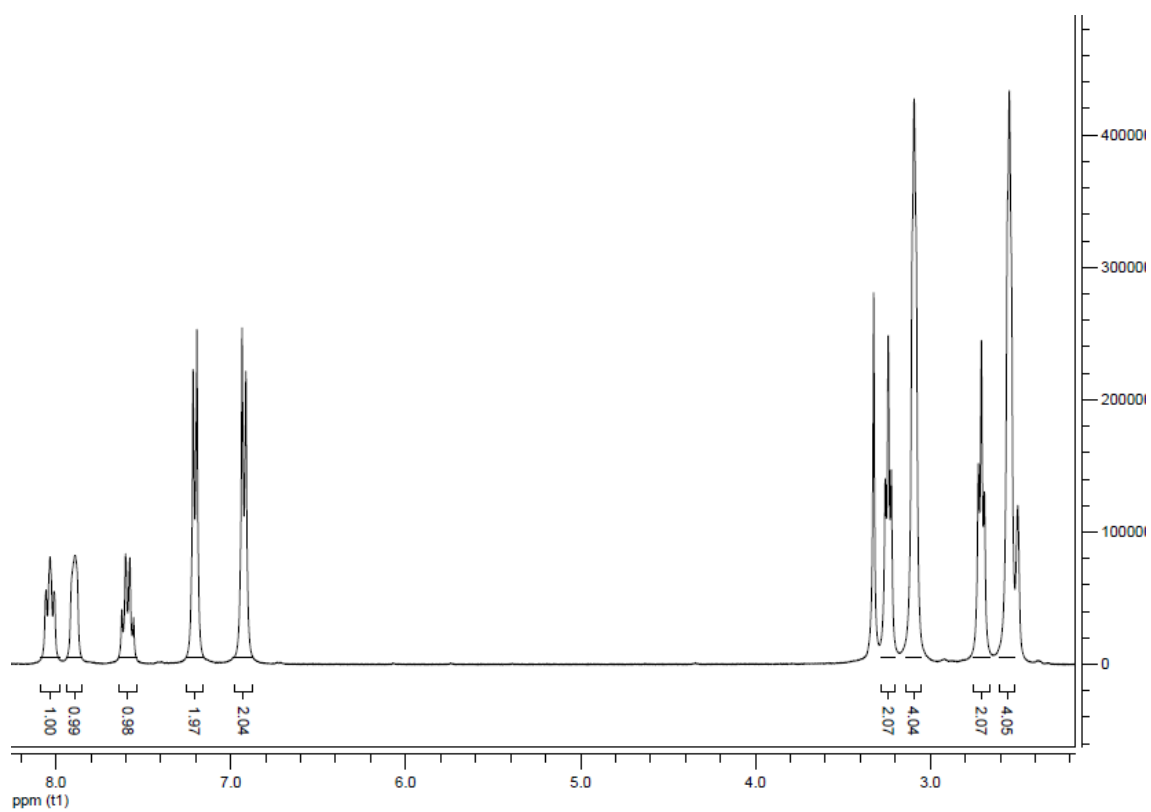
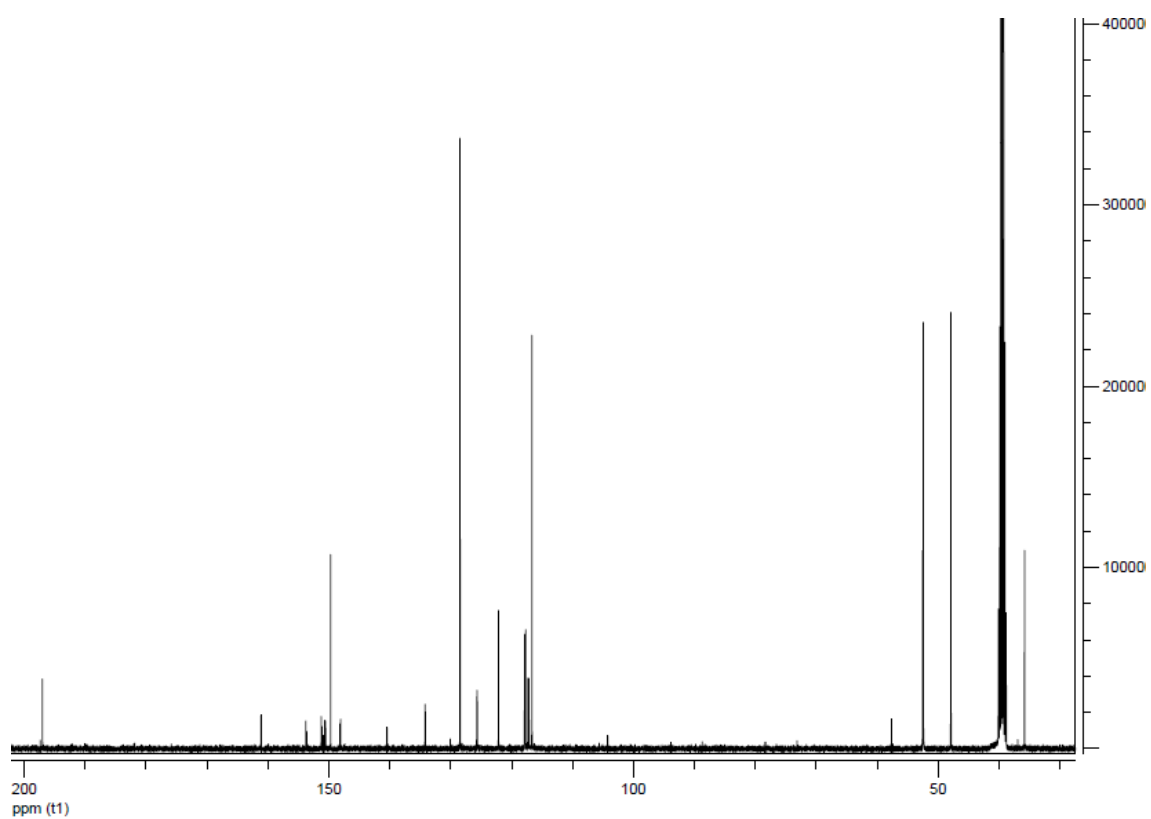


Figure 60.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound **31**.



**Figure 61.**  $^1\text{H}$  NMR of compound 32.



**Figure 62.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 32.

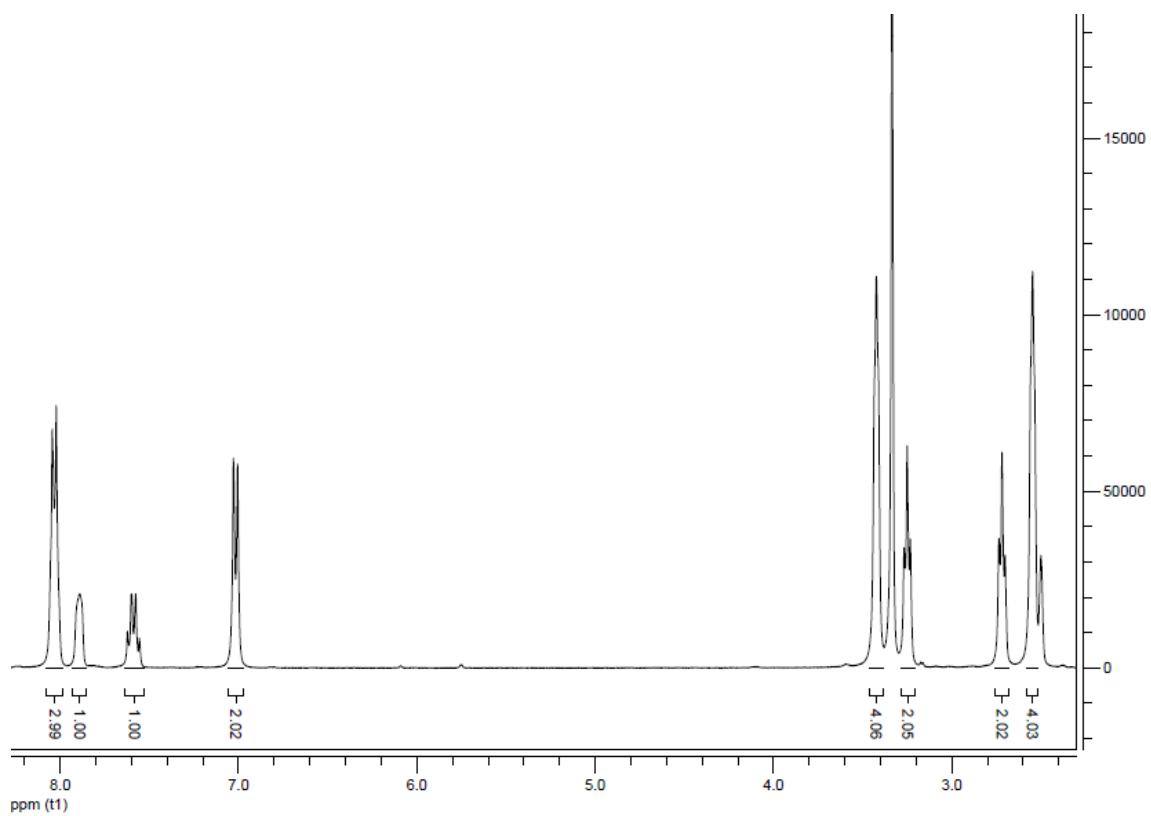


Figure 63.  $^1\text{H}$  NMR of compound 33.

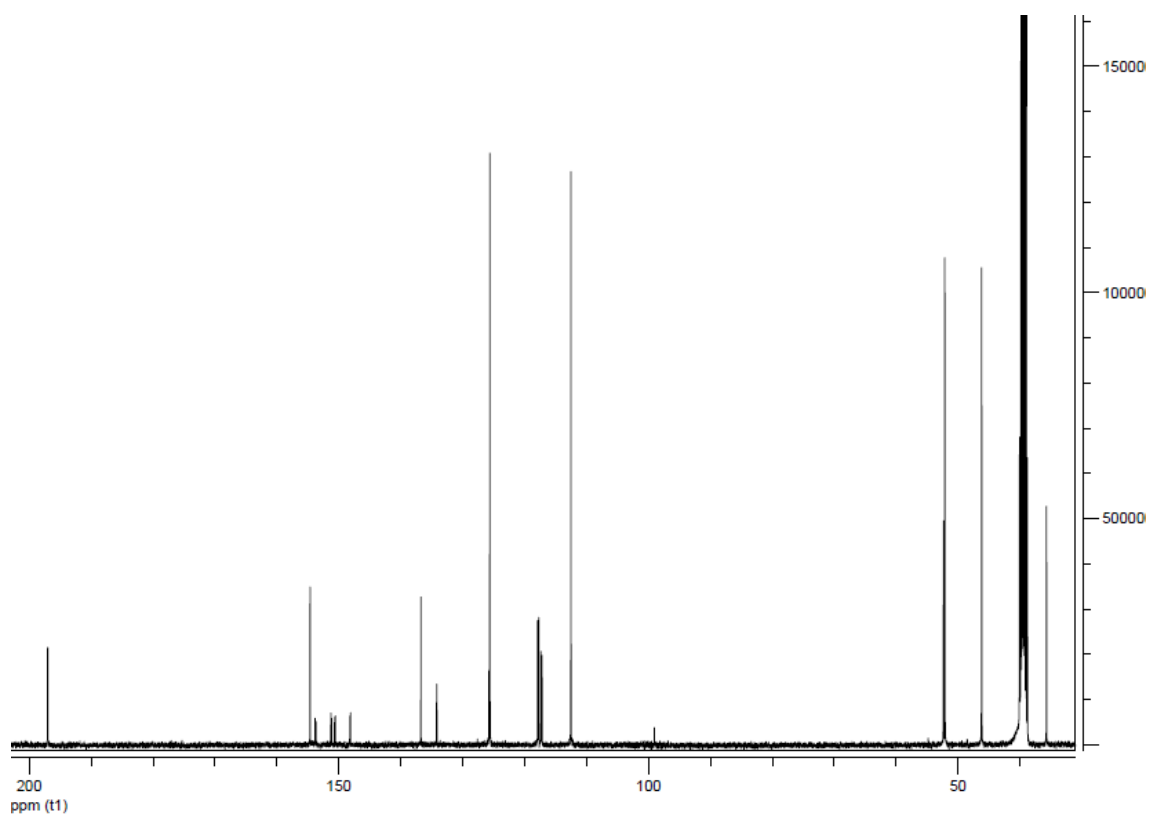


Figure 64.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 33.

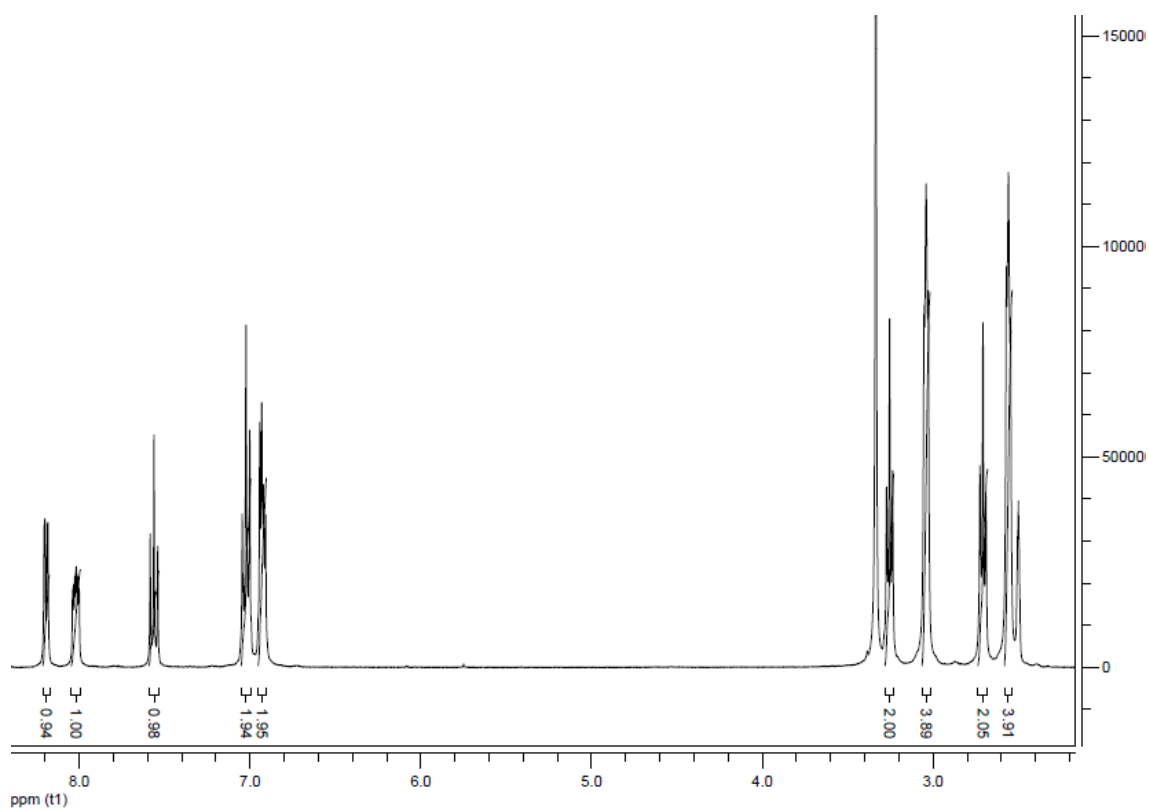


Figure 65.  $^1\text{H}$  NMR of compound 34.

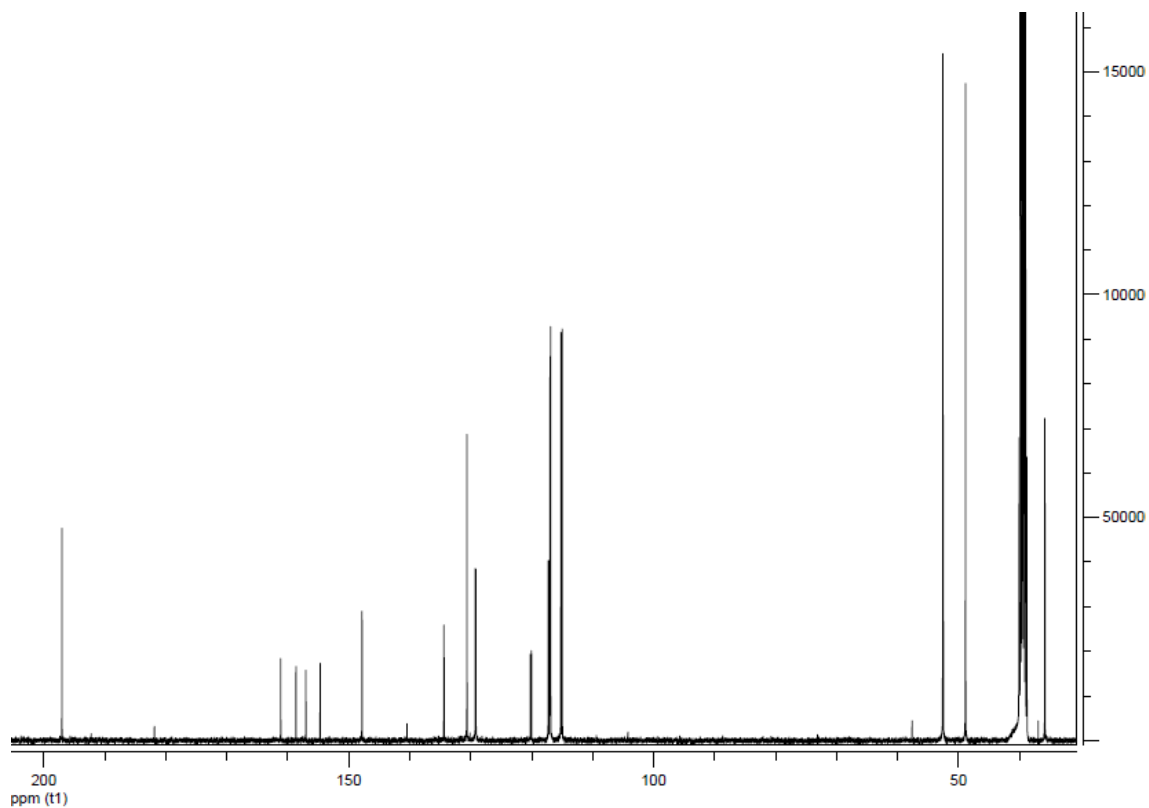


Figure 66.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 34.



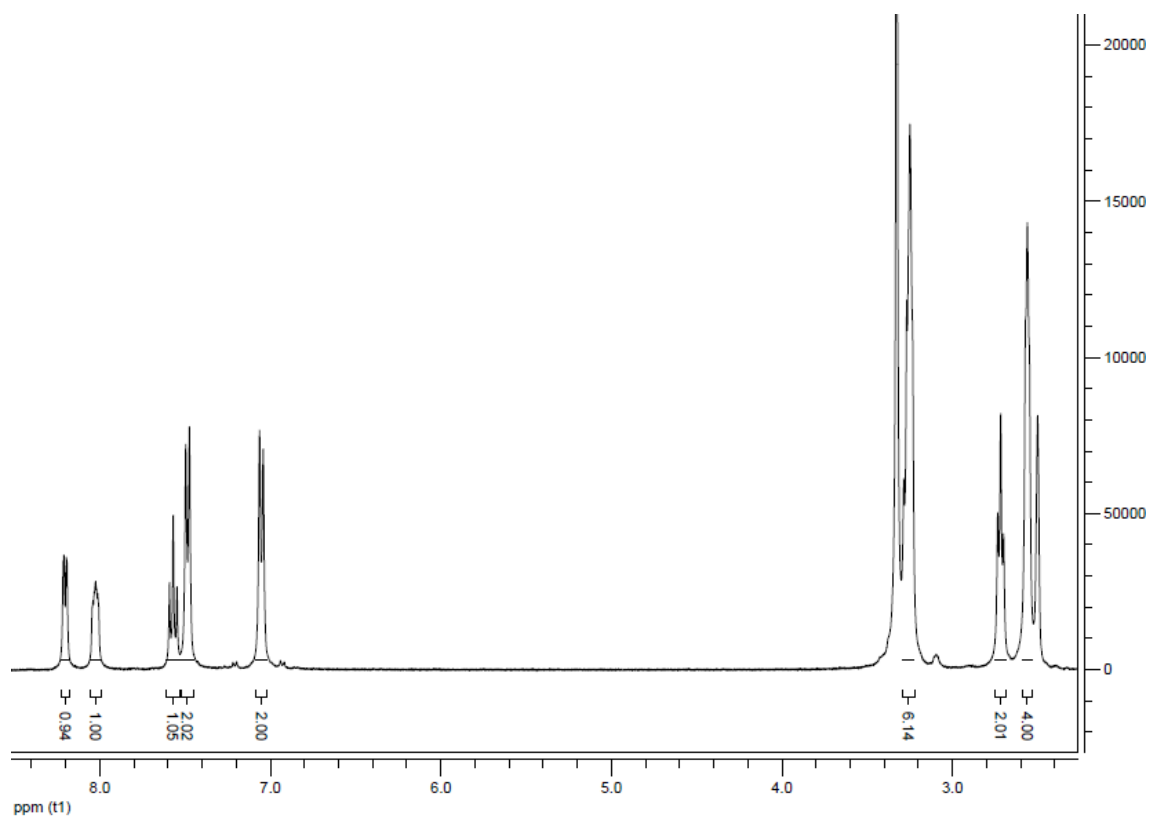


Figure 67  $^1\text{H}$  NMR of compound 35.

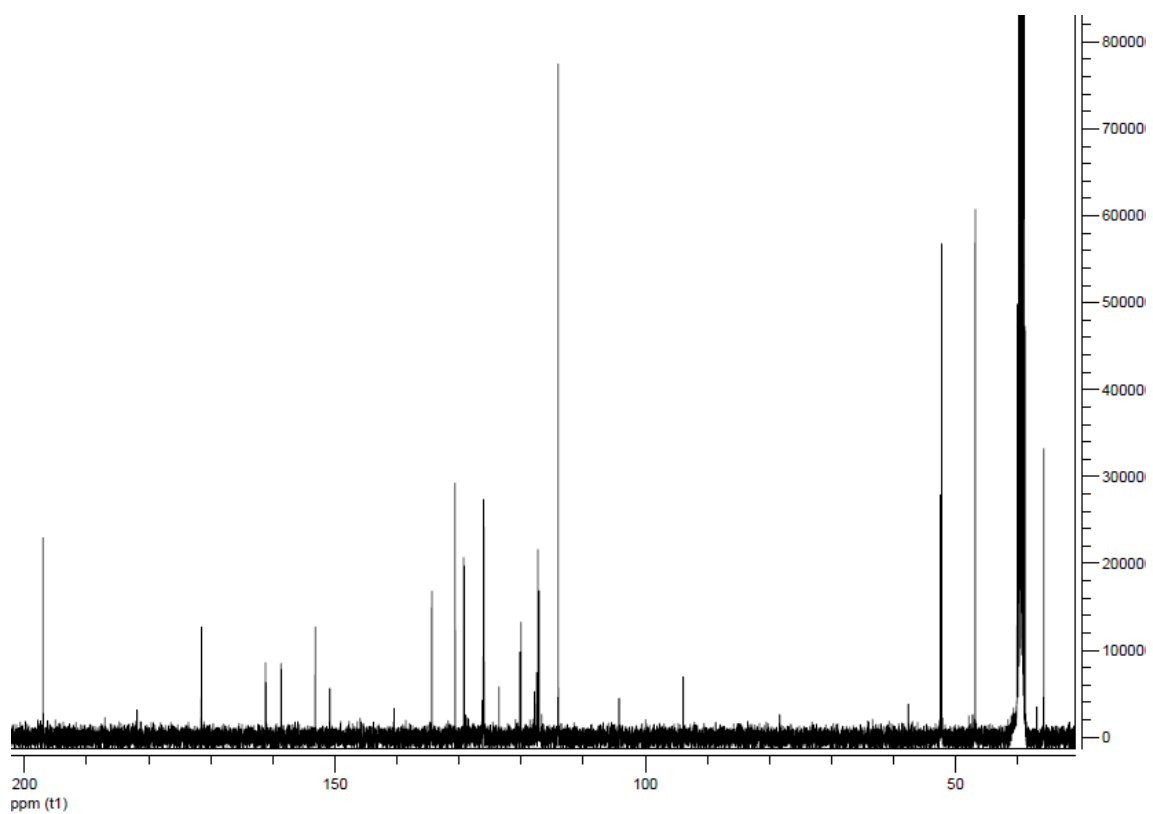


Figure 68.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 35.

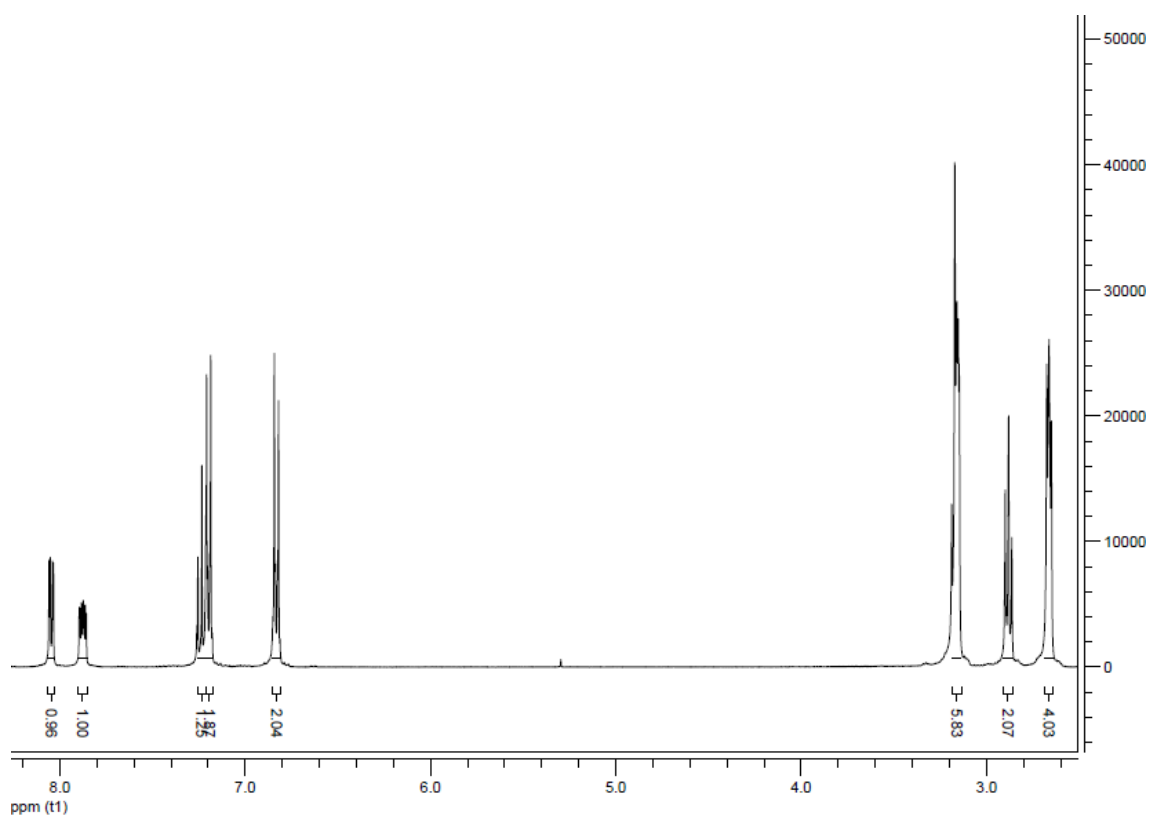


Figure 69.  $^1\text{H}$  NMR of compound 36.

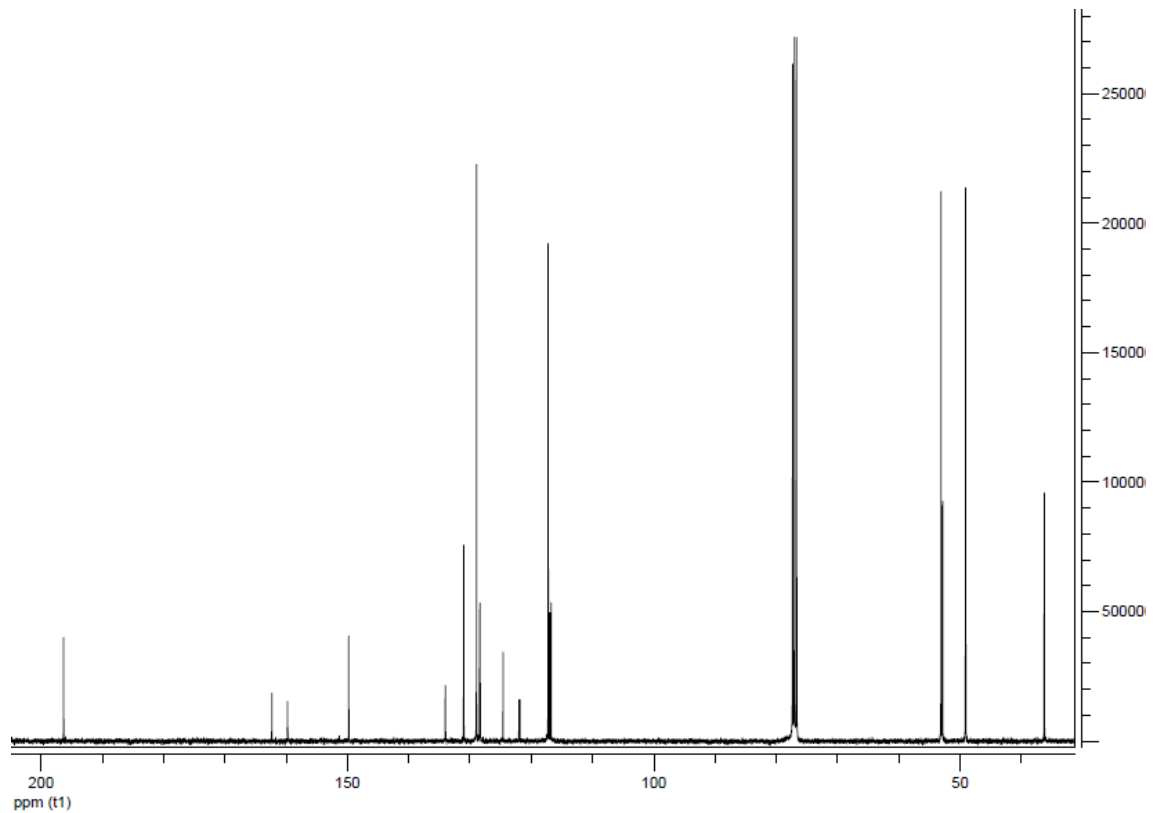


Figure 70.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 36.



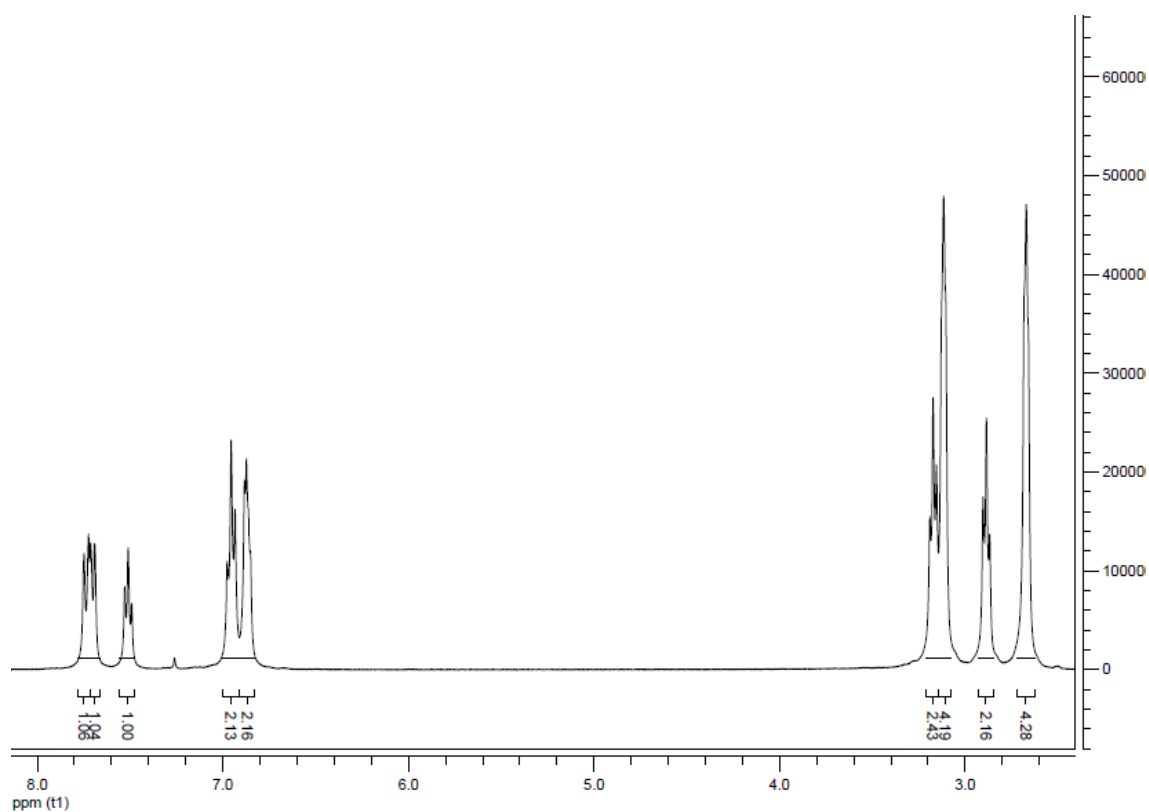


Figure 73.  $^1\text{H}$  NMR of compound 38.

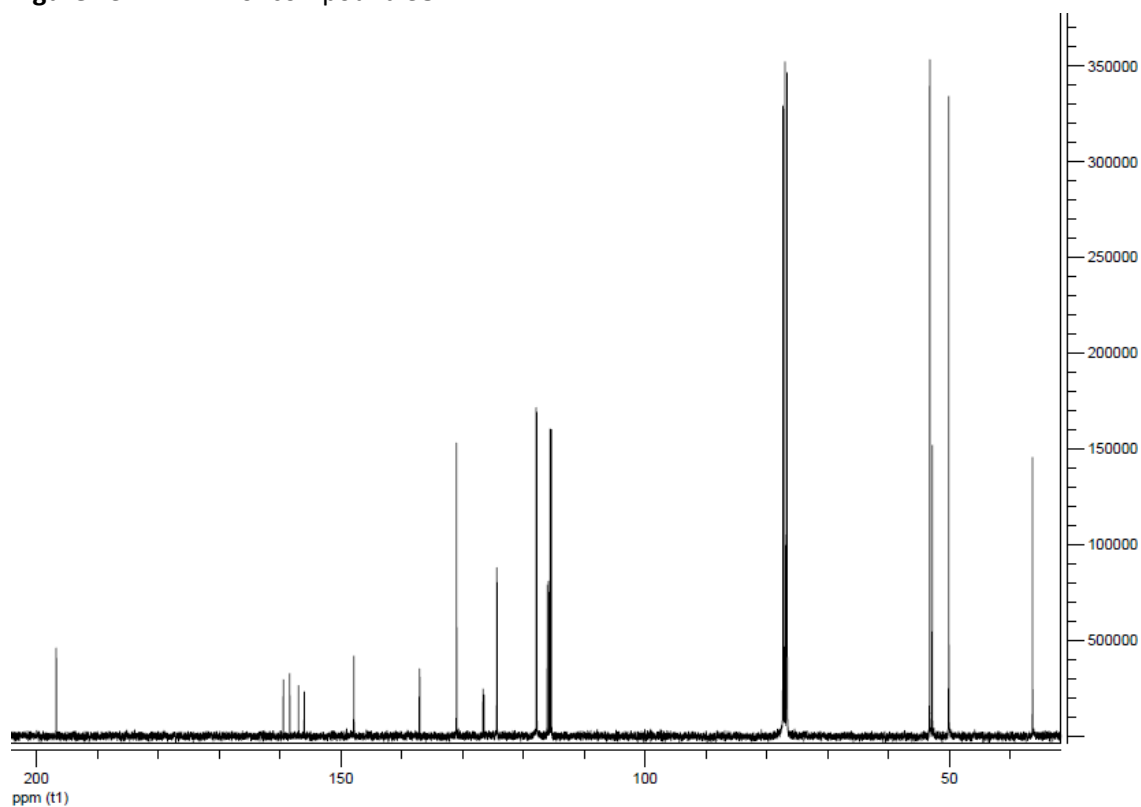


Figure 74.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 38.

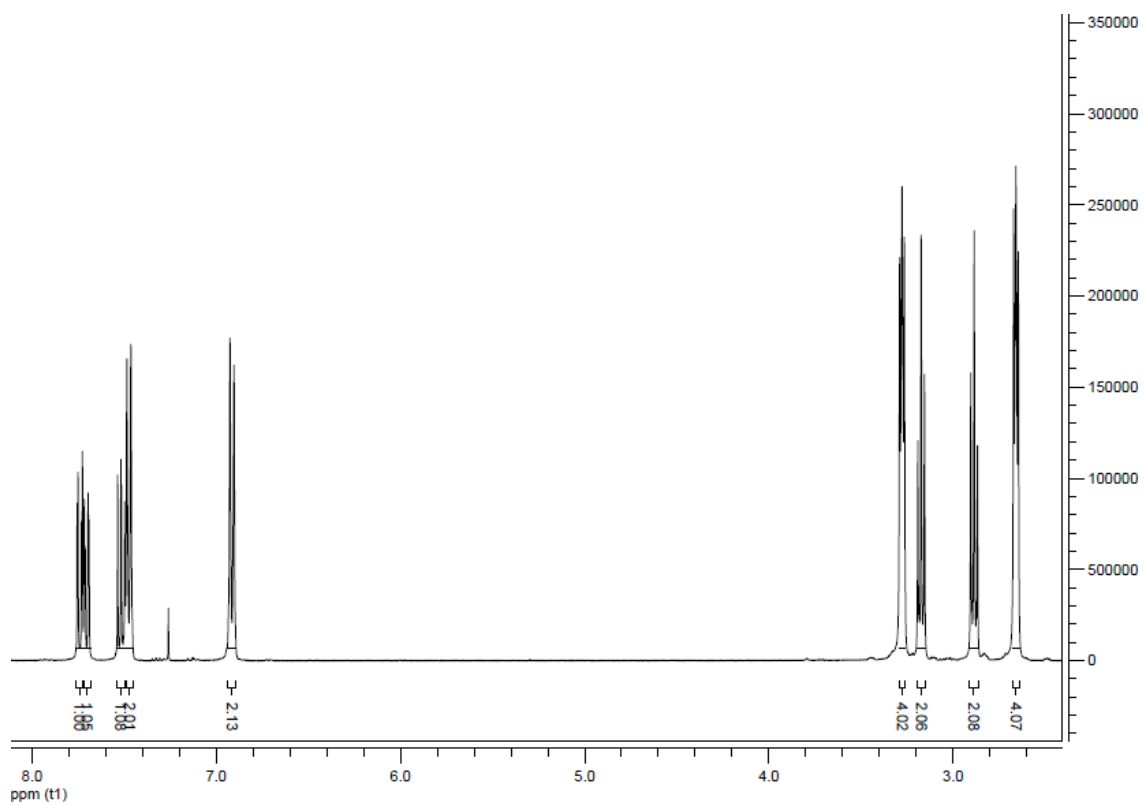


Figure 75.  $^1\text{H}$  NMR of compound 39.

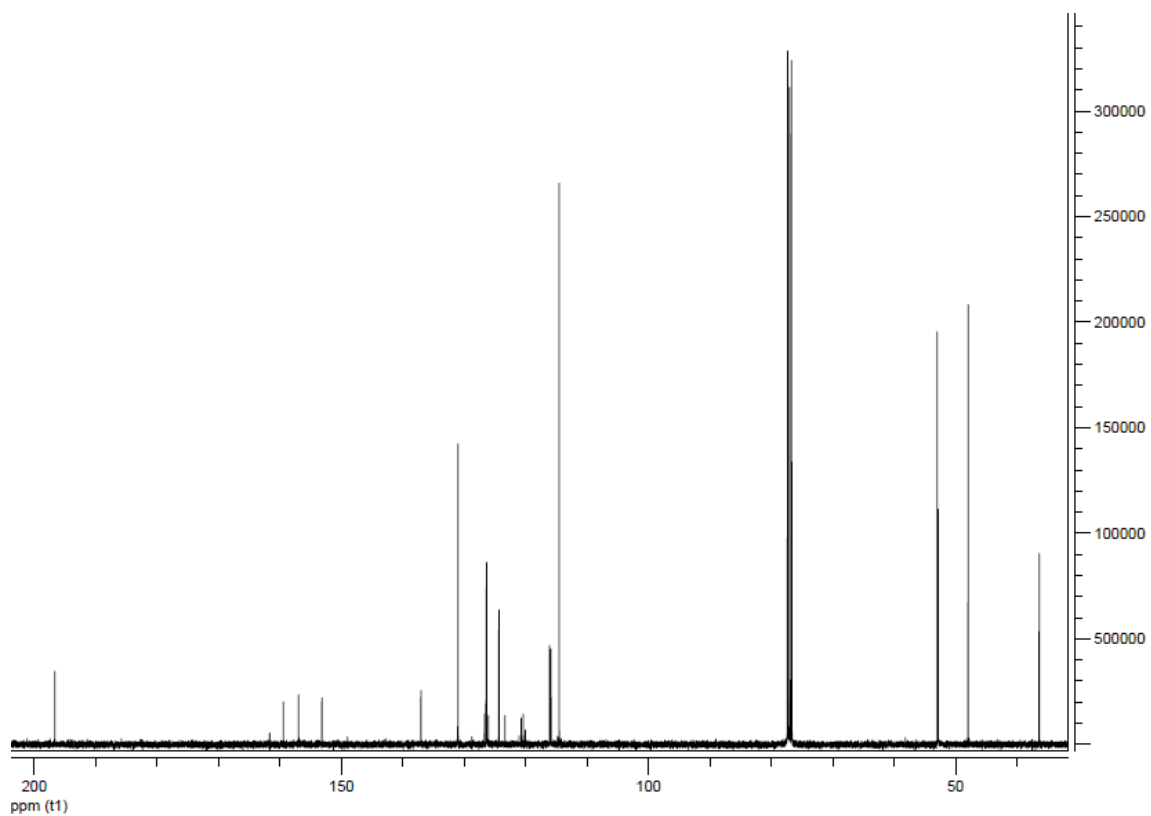


Figure 76.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 39.

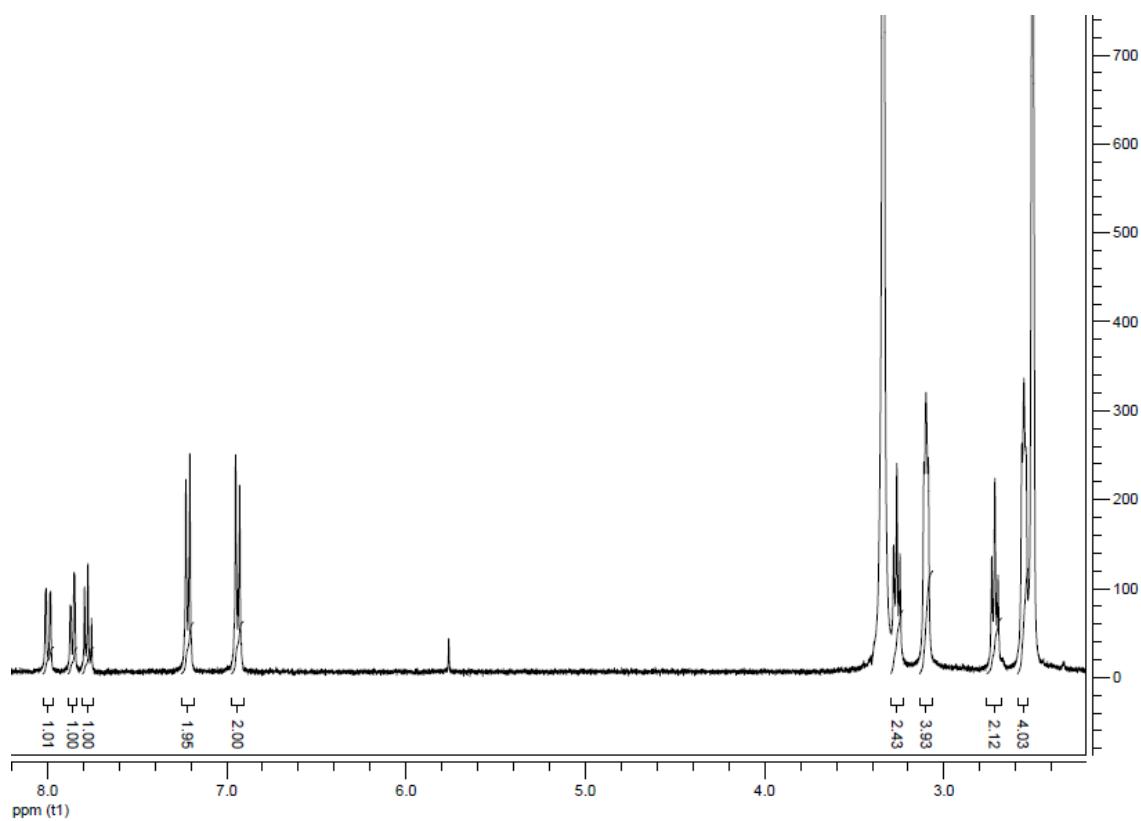


Figure 77.  $^1\text{H}$  NMR of compound 40.

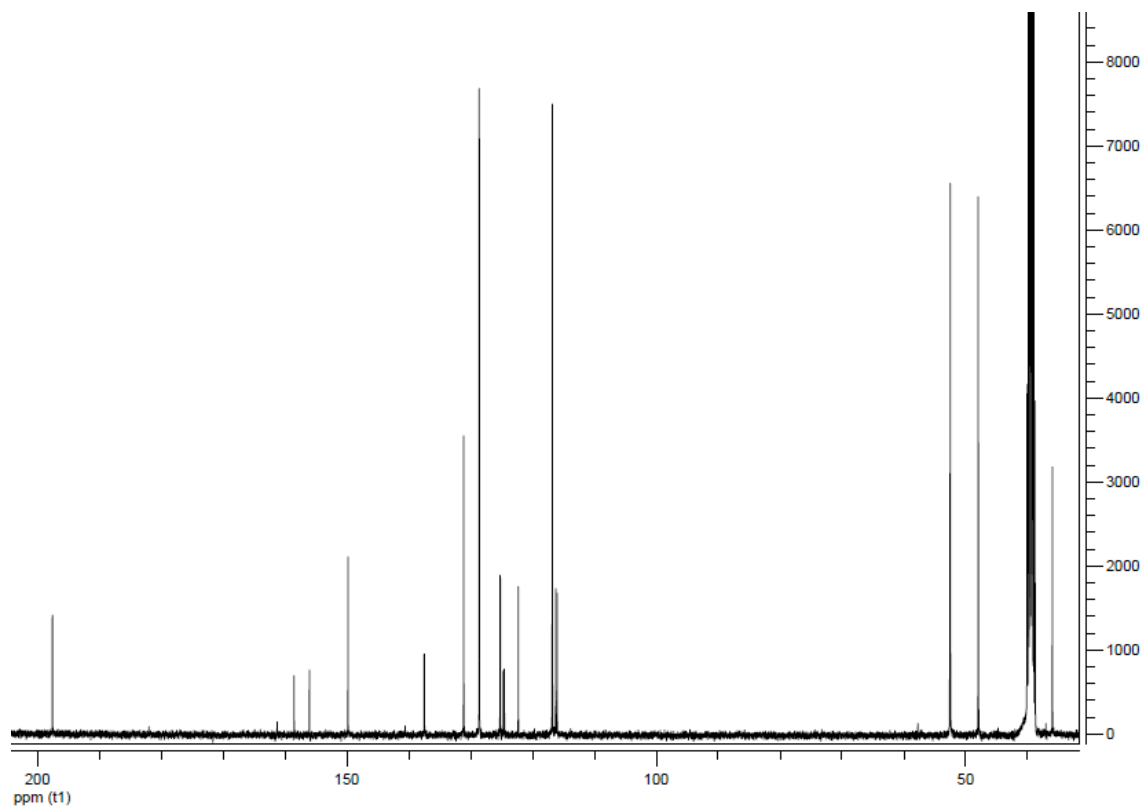


Figure 78.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 40.

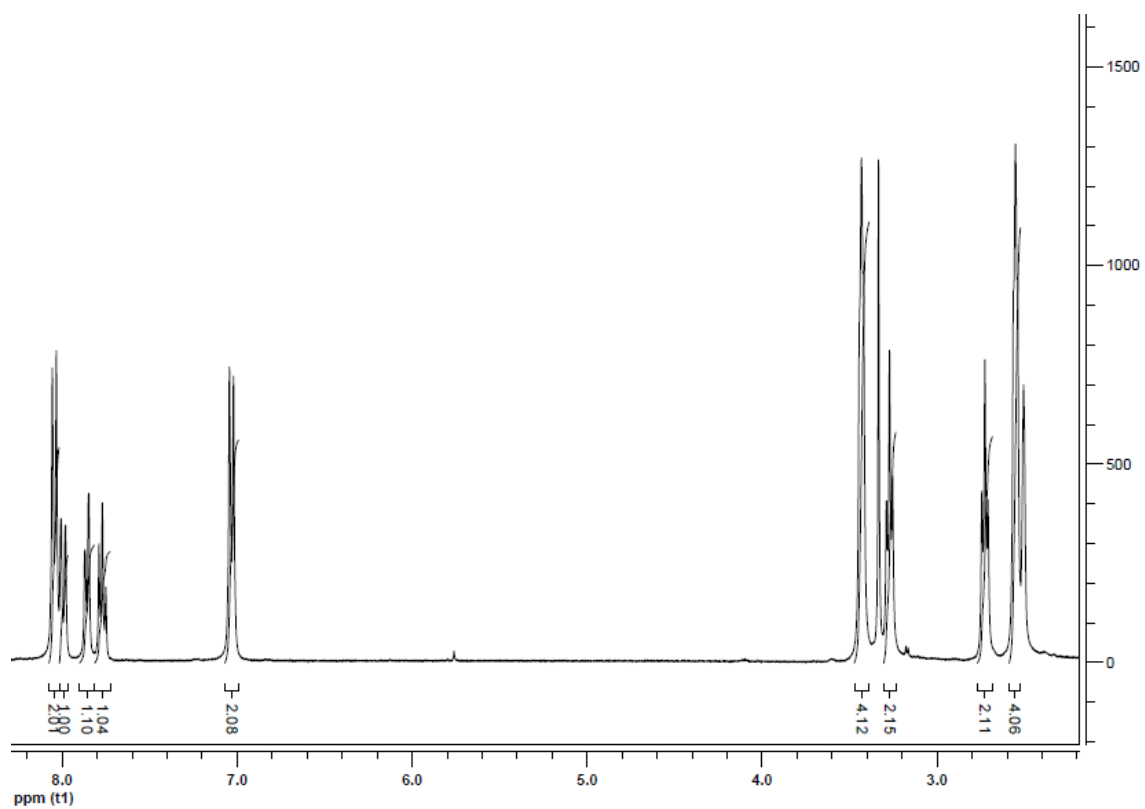


Figure 79.  $^1\text{H}$  NMR of compound 41.

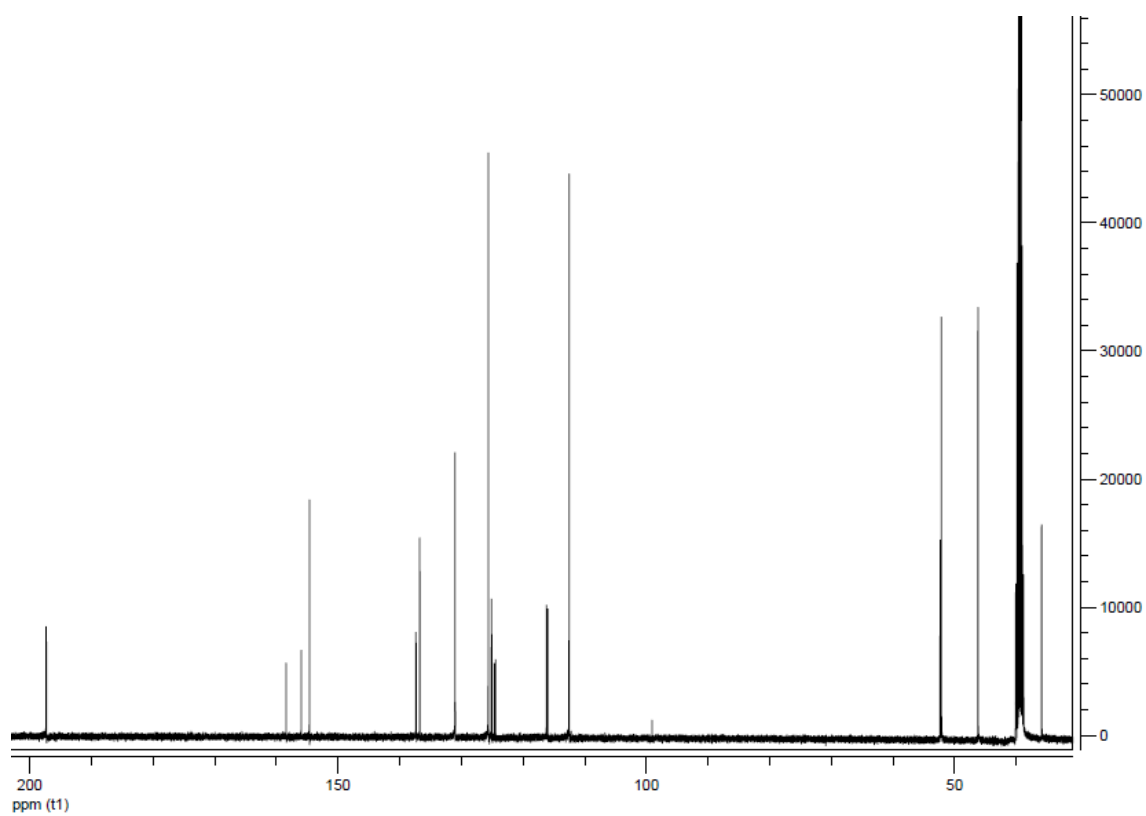
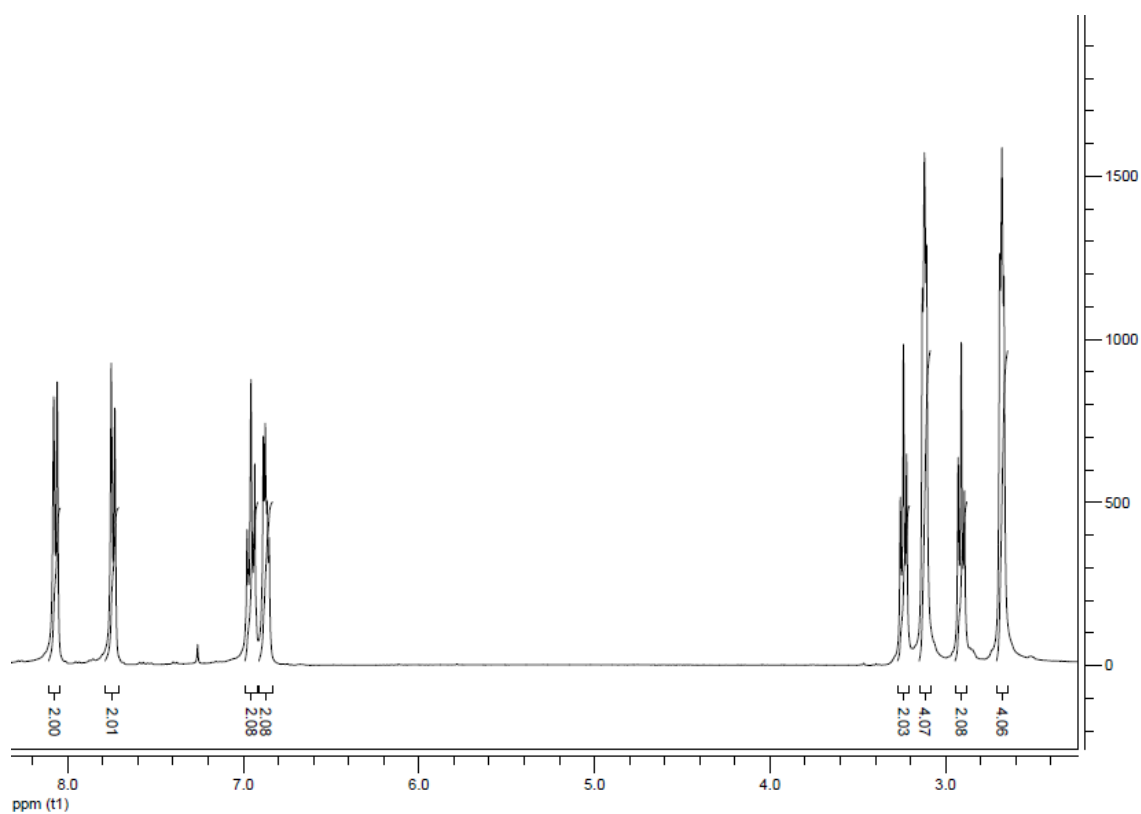
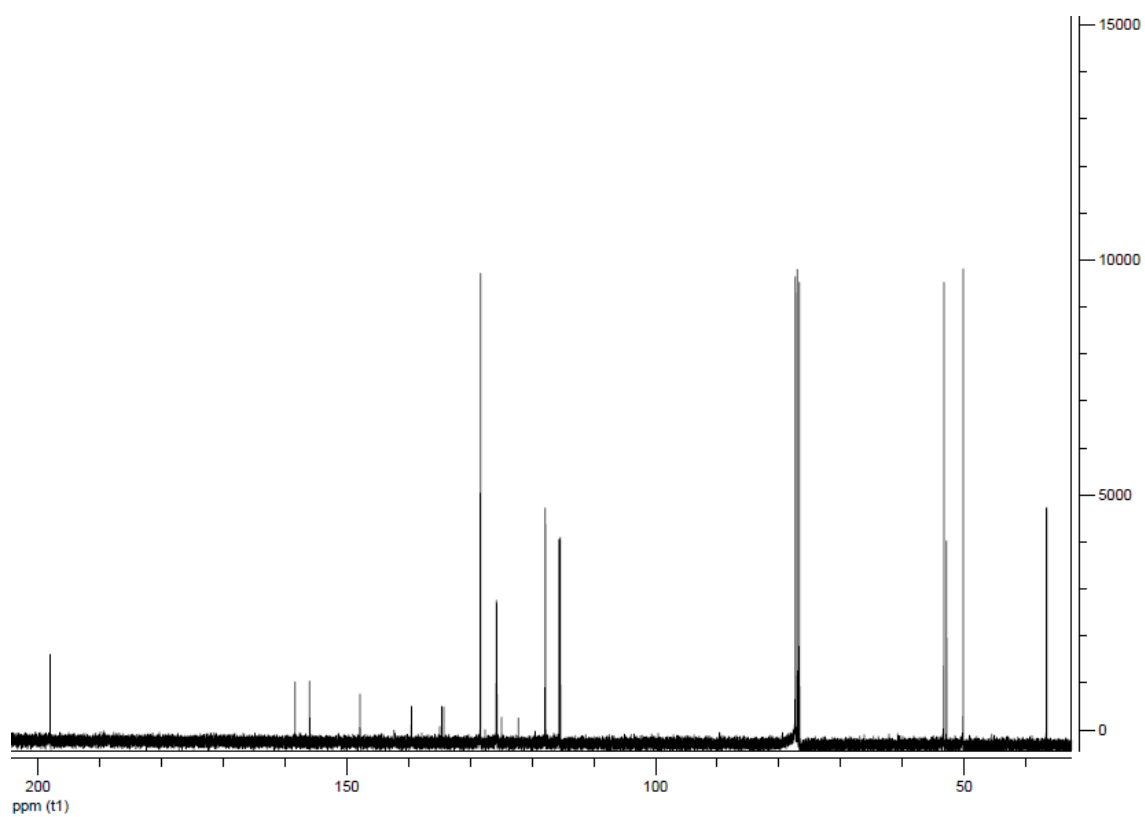


Figure 80.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 41.



**Figure 81.**  $^1\text{H}$  NMR of compound 42.



**Figure 82.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 42.



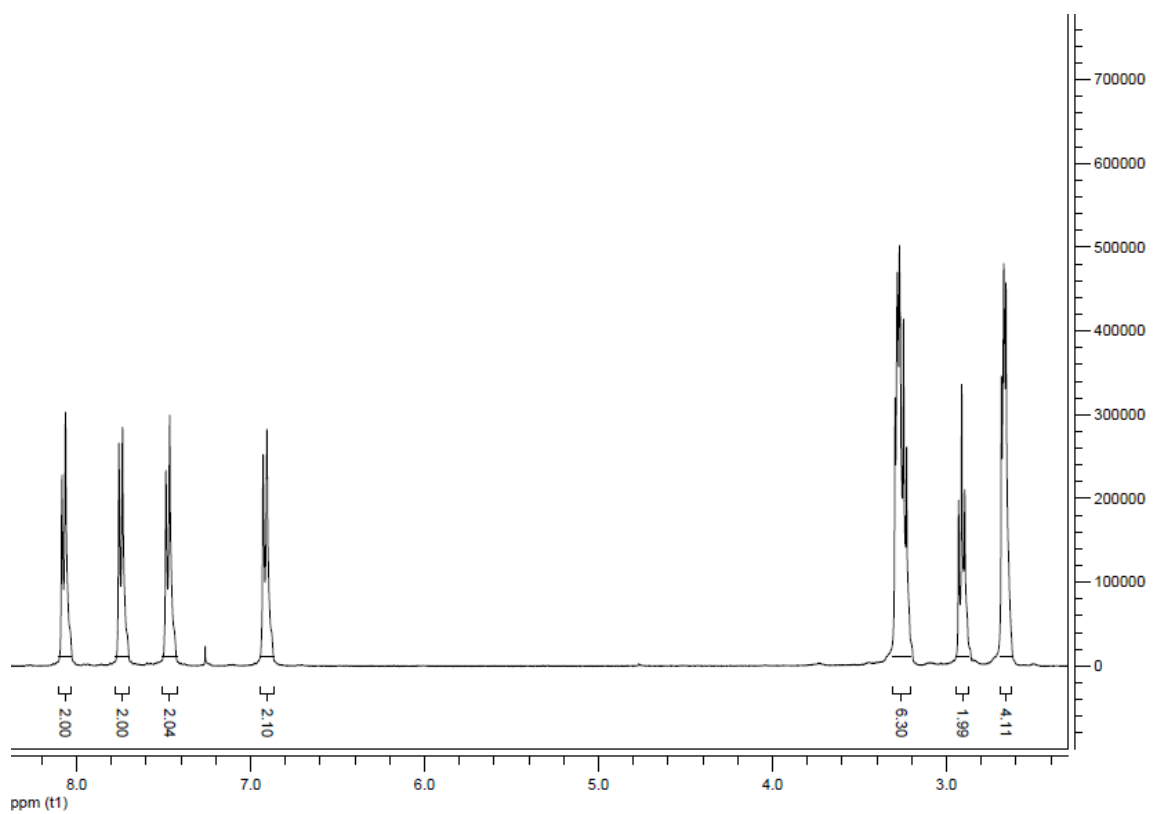


Figure 83.  $^1\text{H}$  NMR of compound 43.

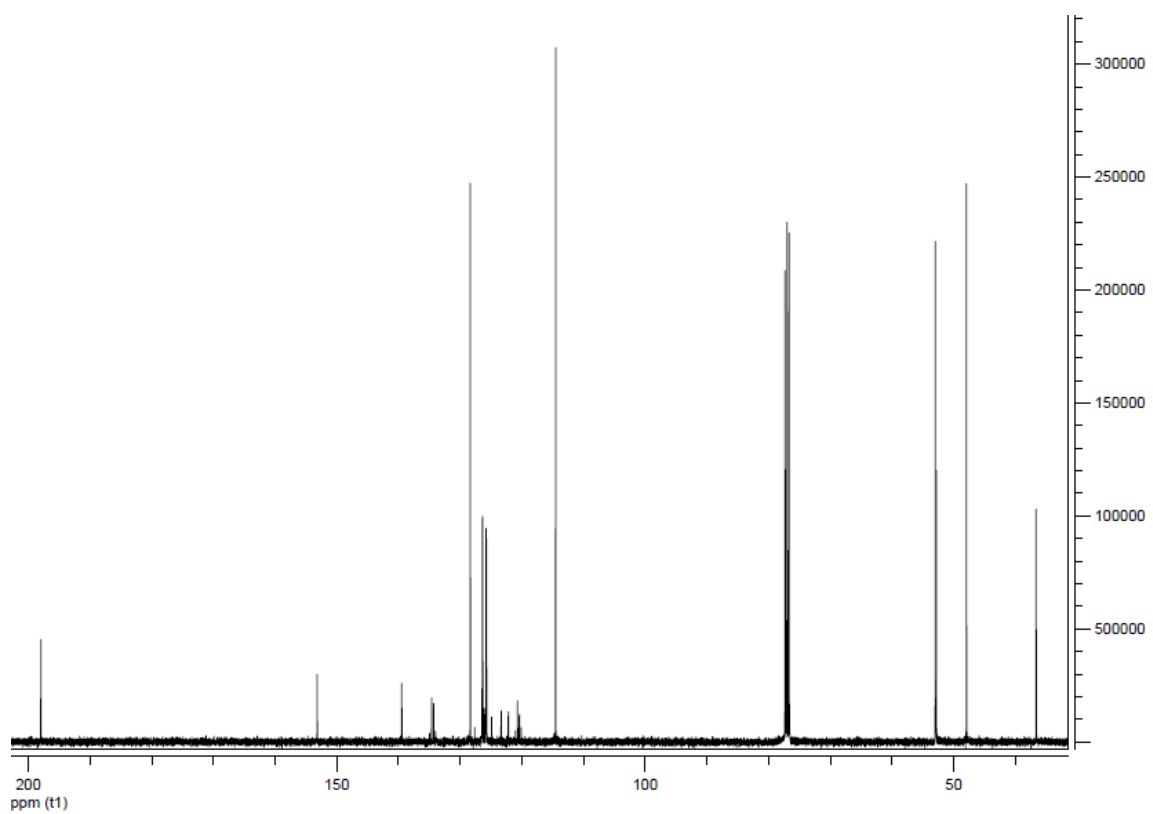
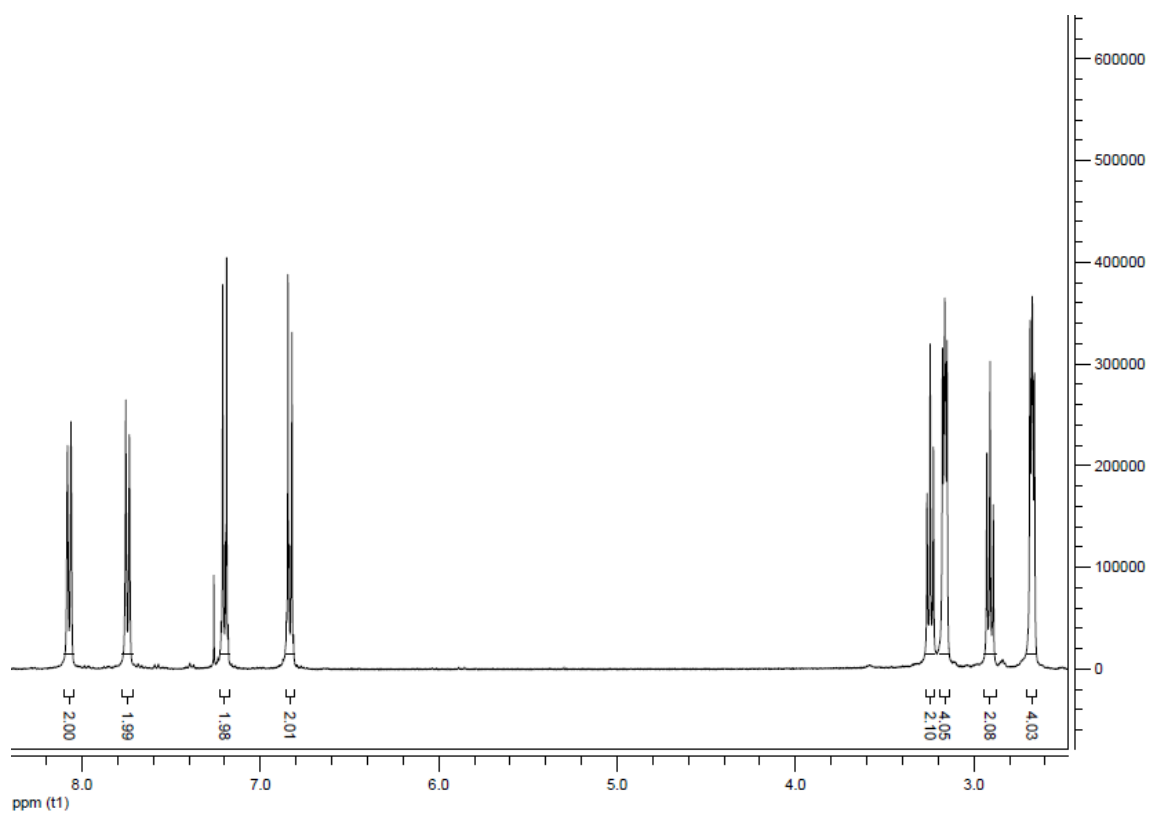
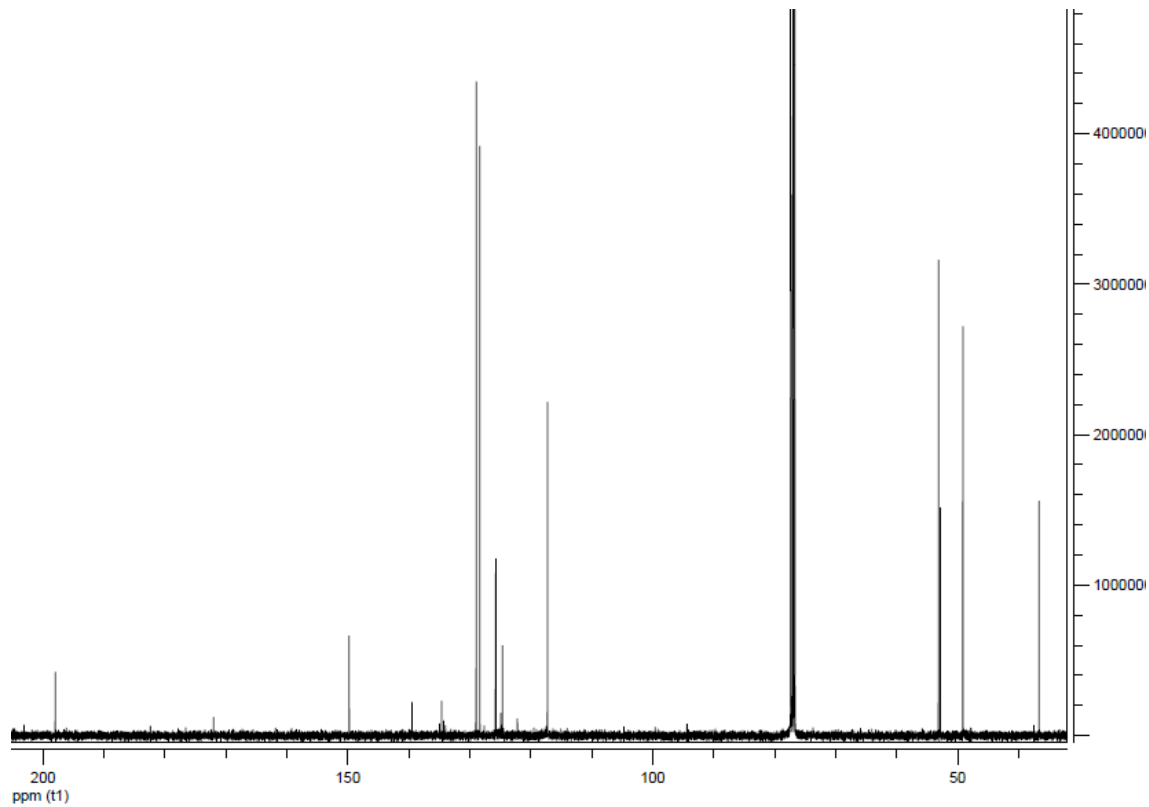


Figure 84.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 43.



**Figure 85.**  $^1\text{H}$  NMR of compound **44**.



**Figure 86.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound **44**.

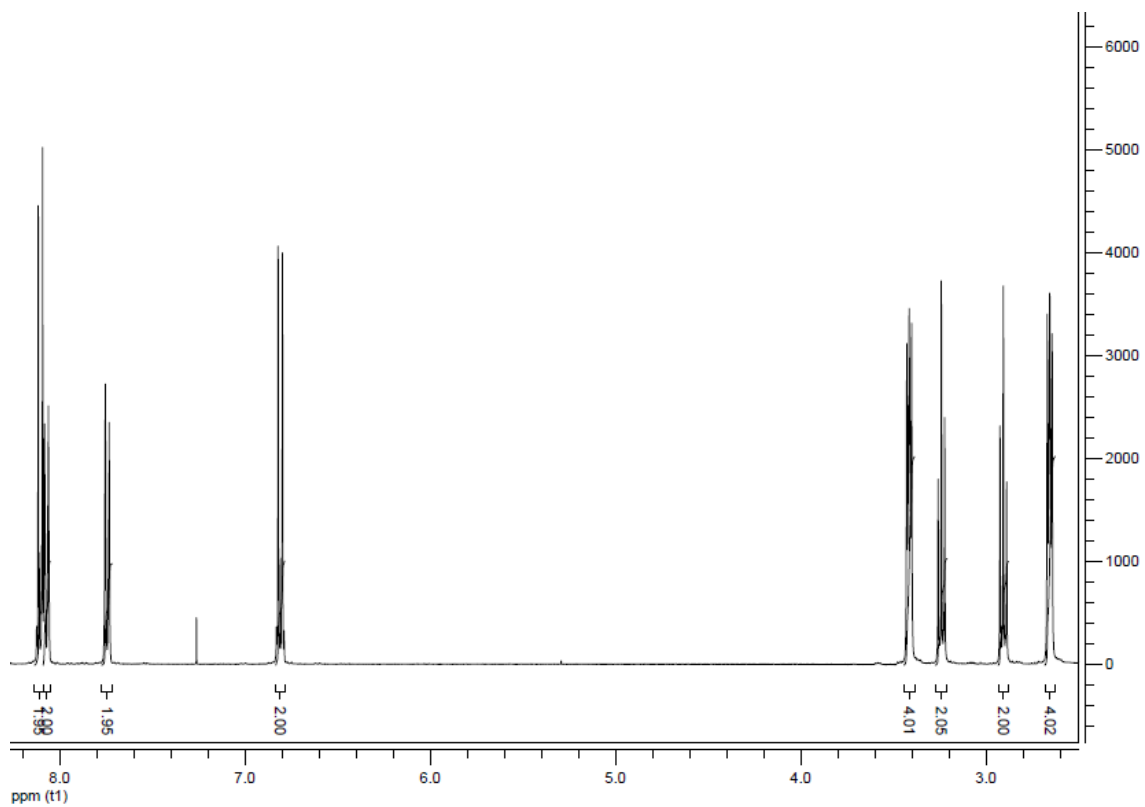


Figure 87.  $^1\text{H}$  NMR of compound 45.

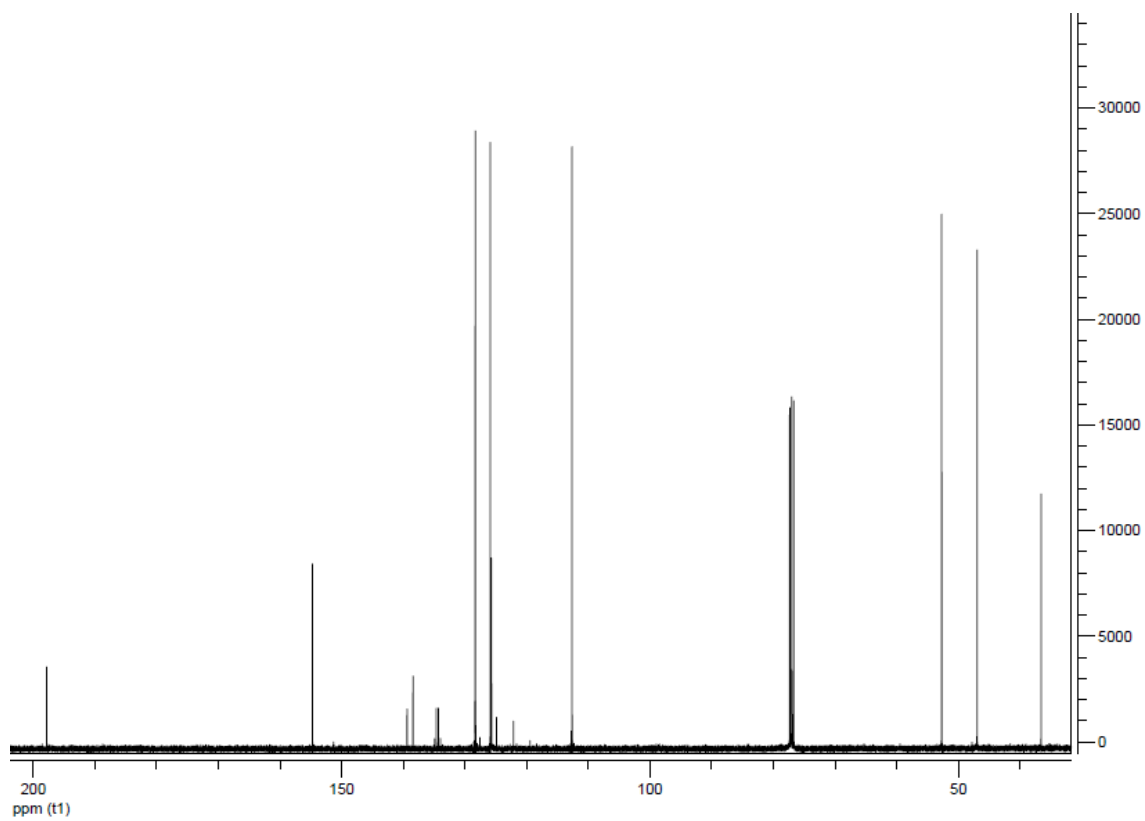


Figure 88.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 45.

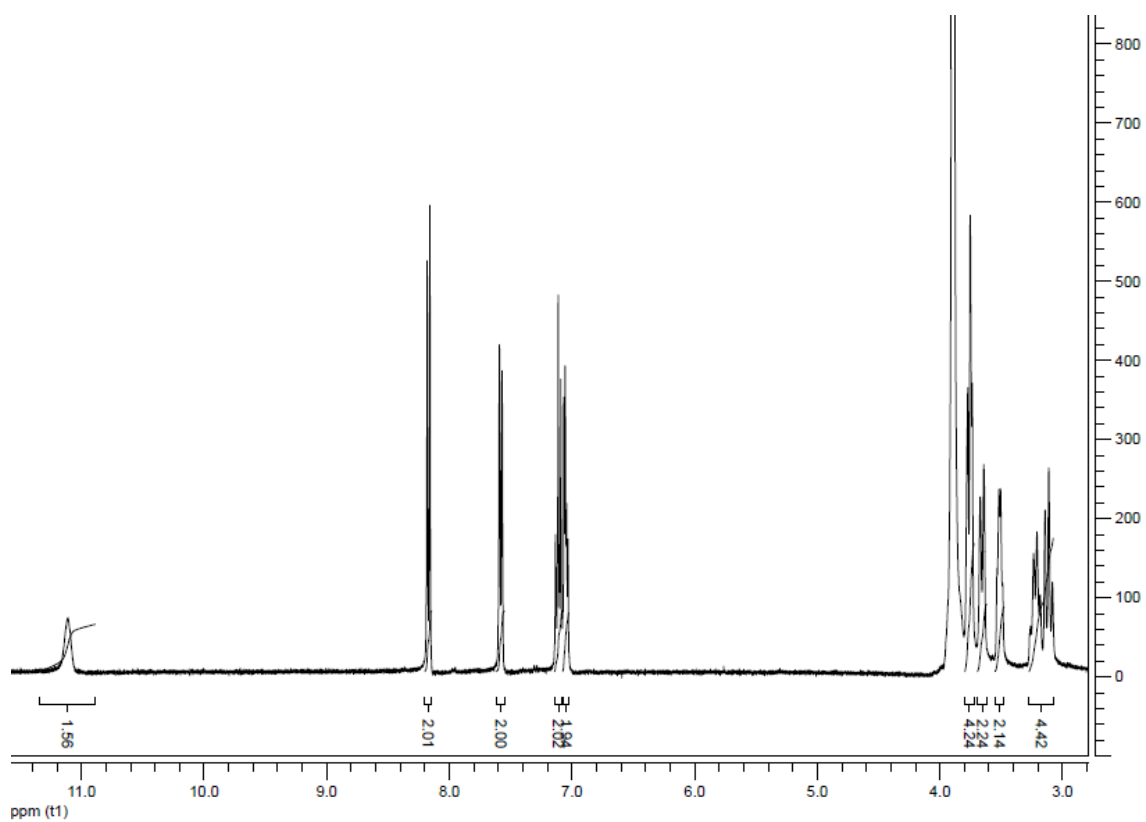


Figure 89.  $^1\text{H}$  NMR of compound 46.

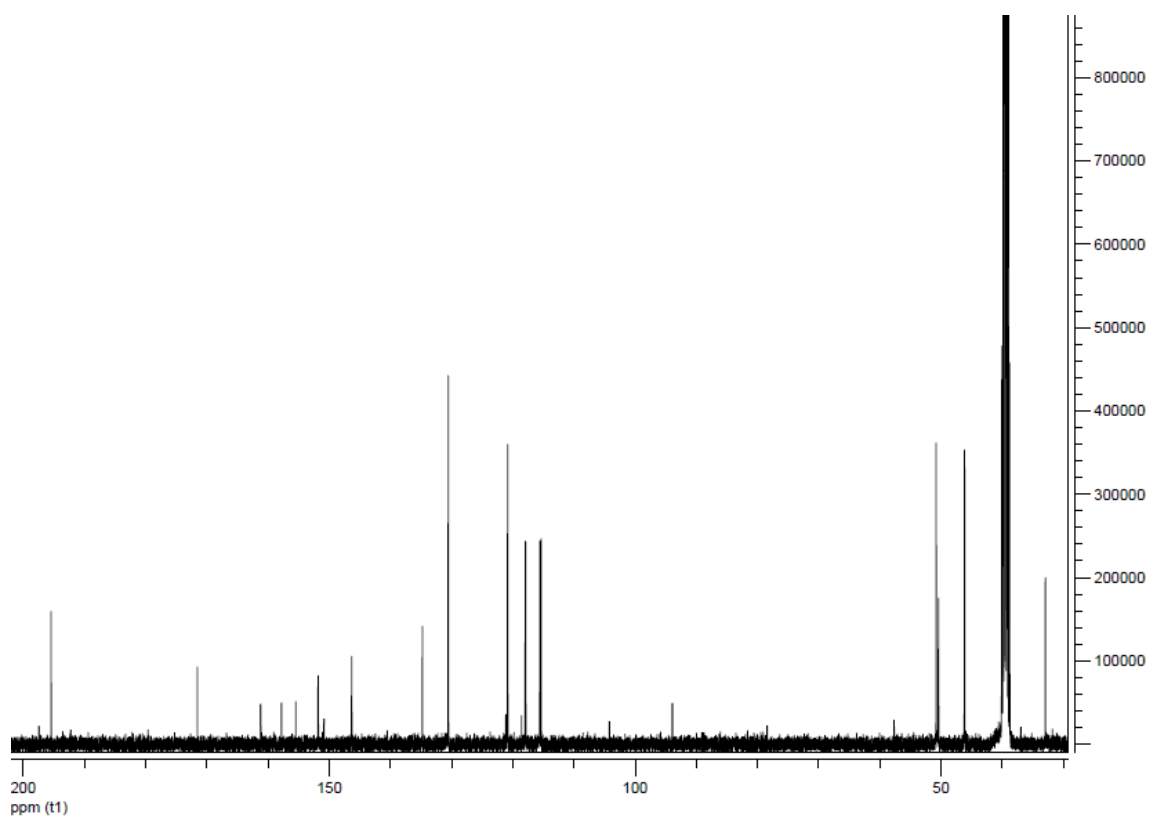


Figure 90.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 46.

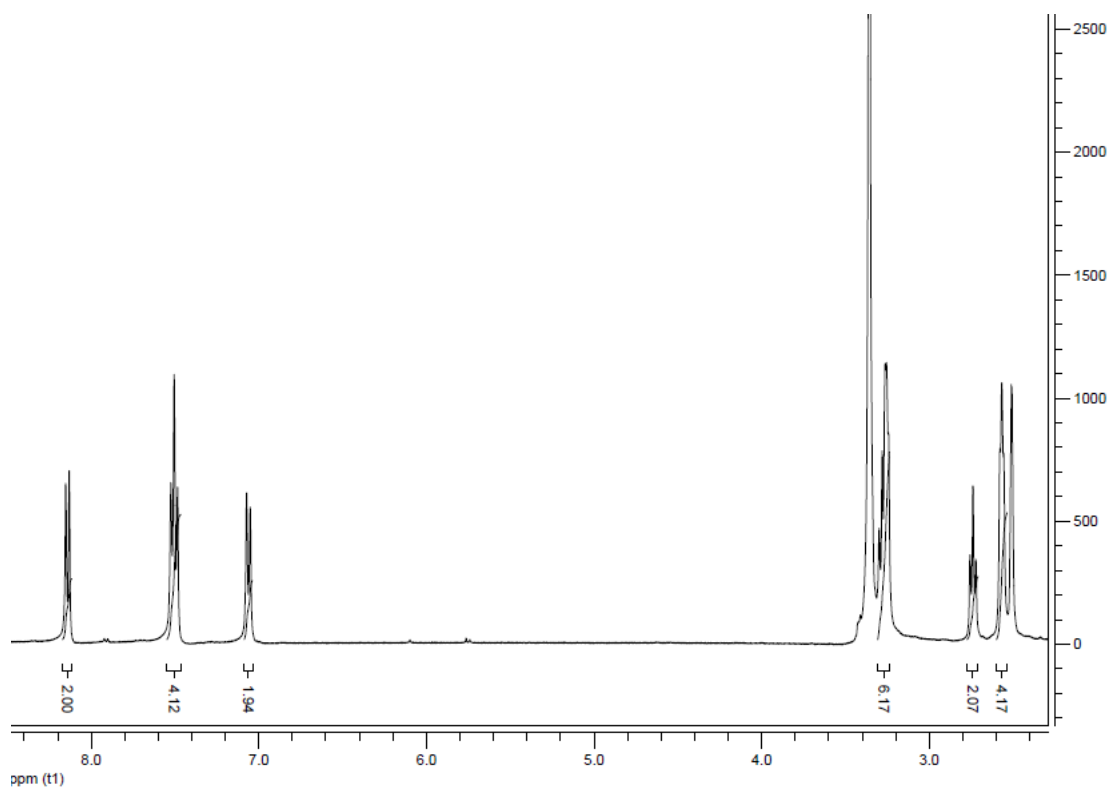


Figure 91.  $^1\text{H}$  NMR of compound 47.

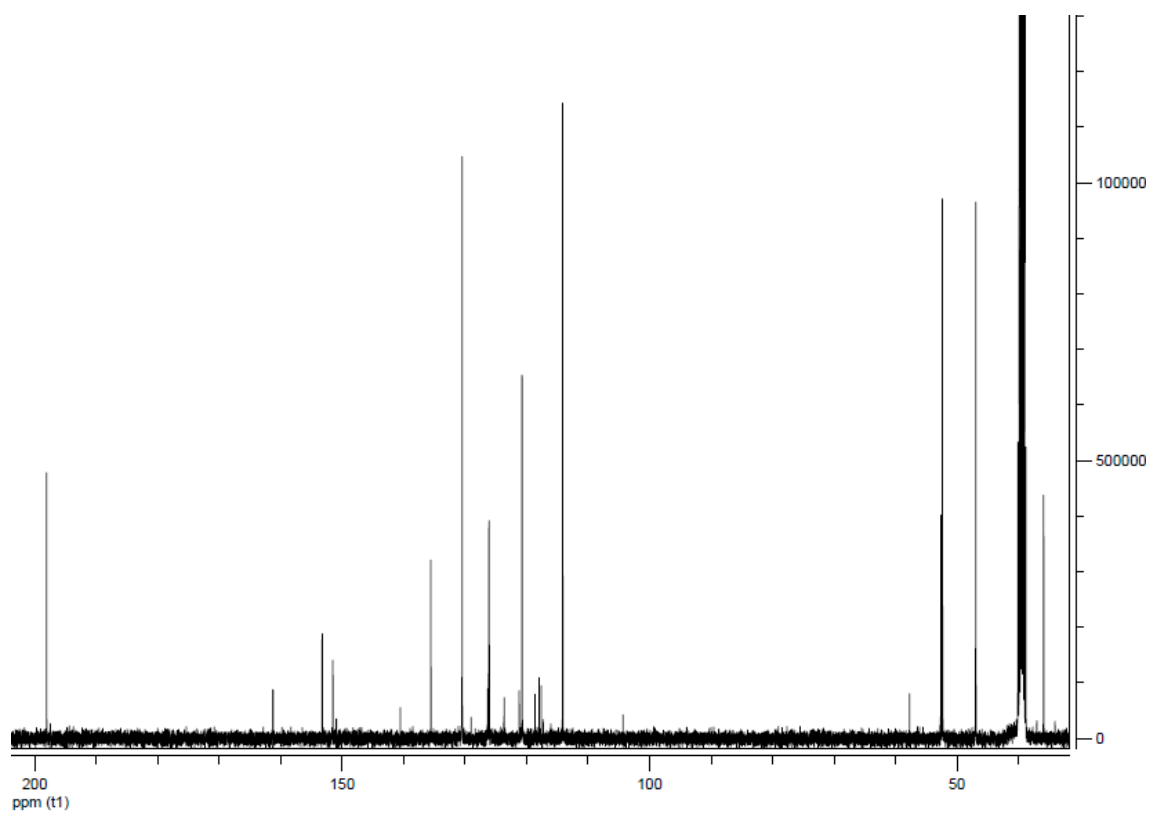
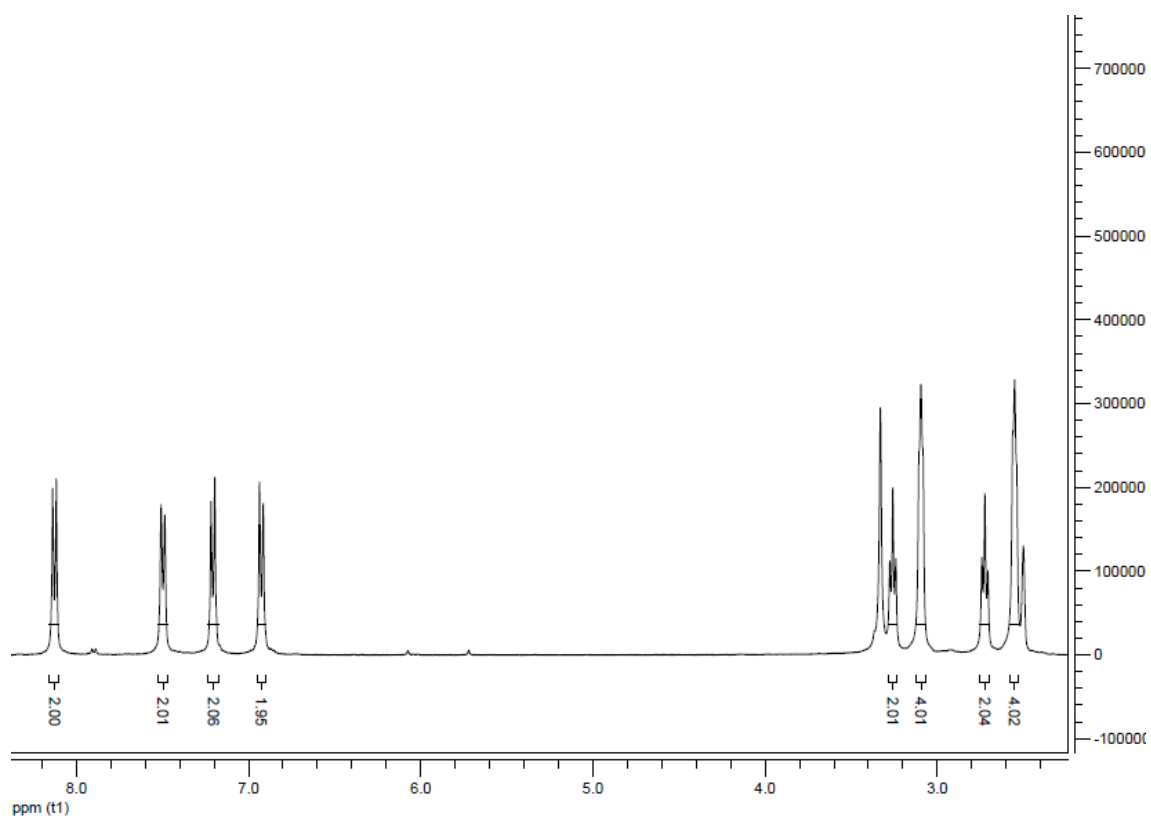
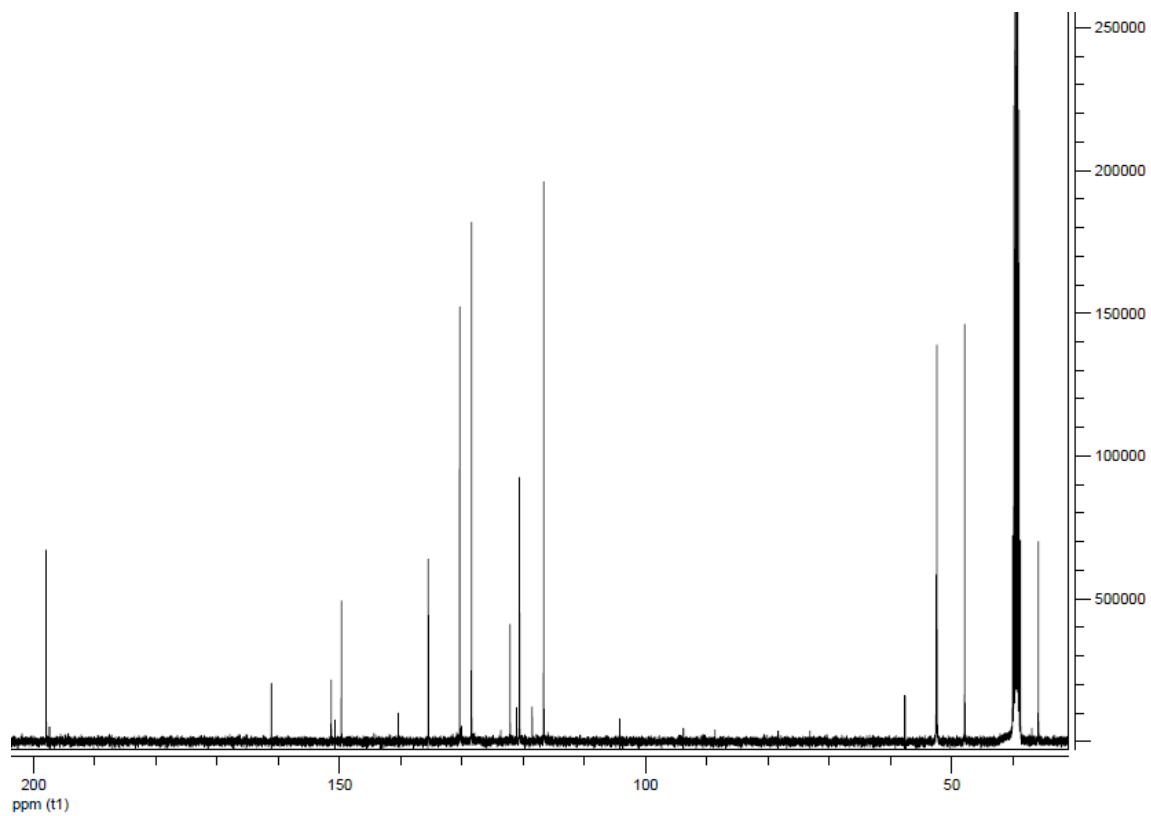


Figure 92.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 47.



**Figure 93.**  $^1\text{H}$  NMR of compound **48**.



**Figure 94.**  $^{13}\text{C}$  NMR of compound **48**.

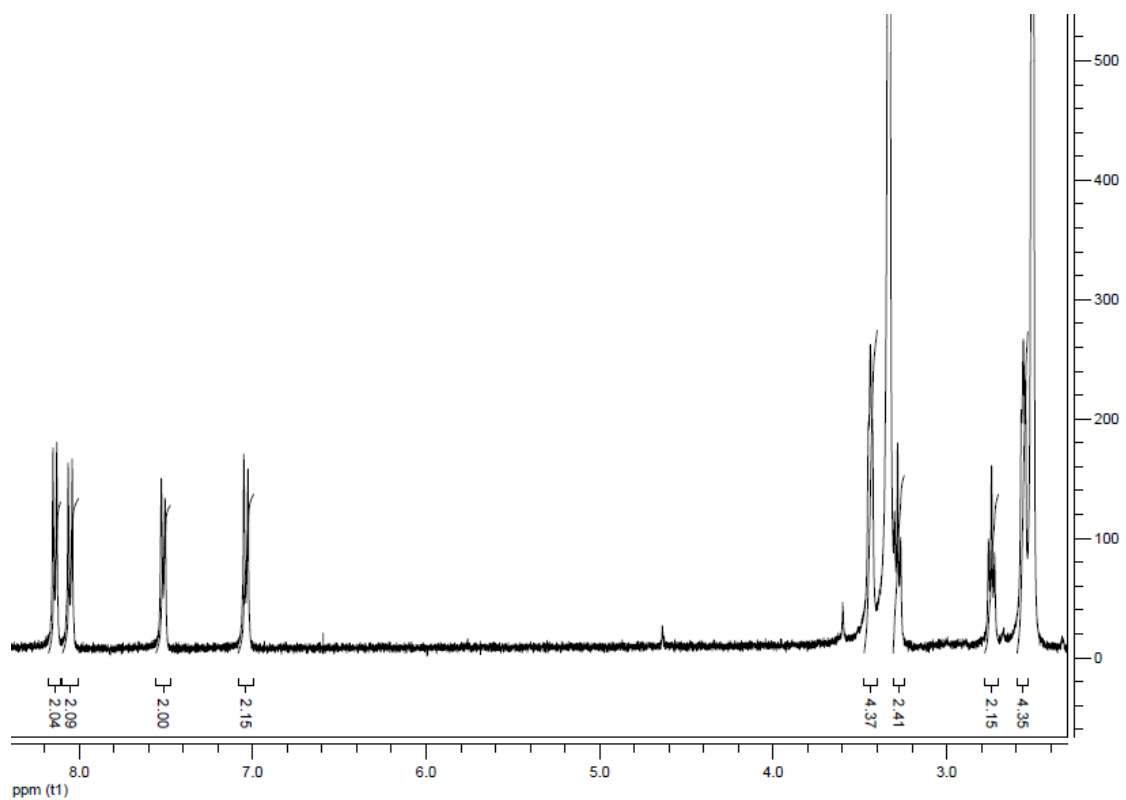


Figure 95.  $^1\text{H}$  NMR of compound 49.

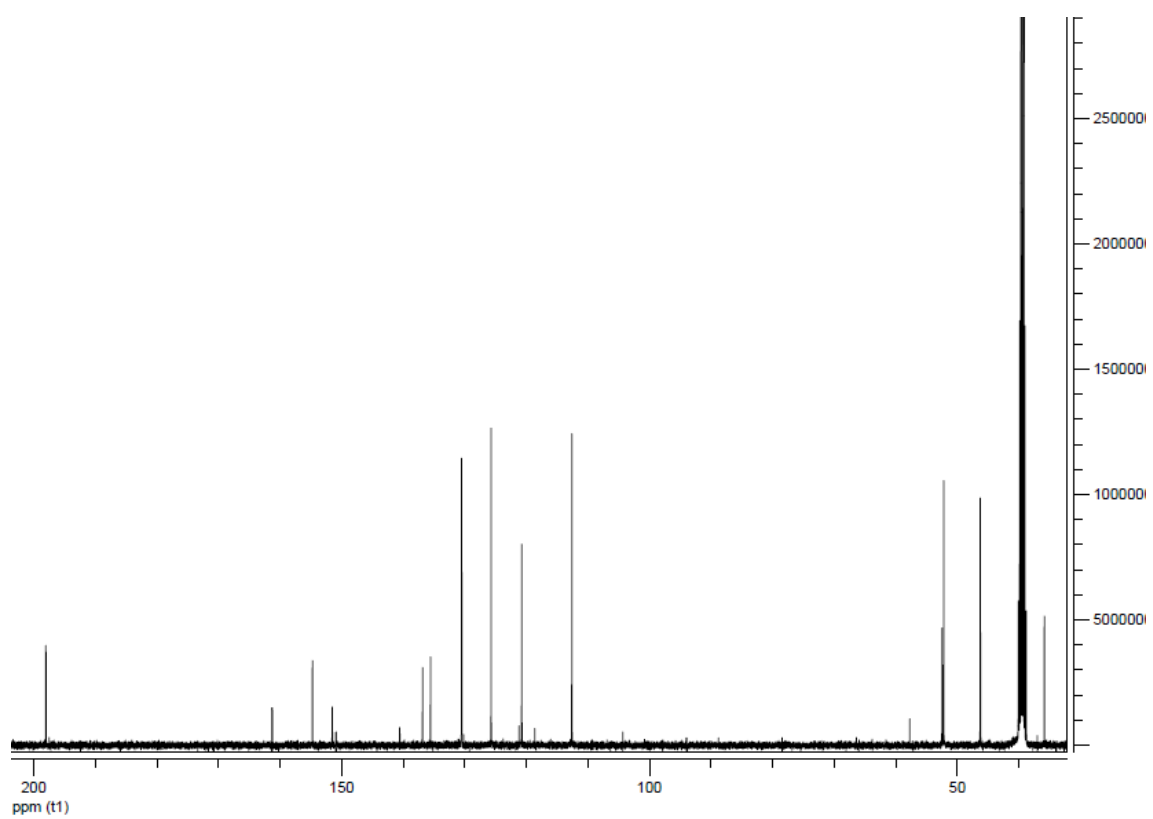


Figure 96.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 49.

**S2. Data of the SOS/umu screening test.****Table S1.** % survival

Testing conc. (mg/mL)	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001
<i>Without metabolic activation</i>											
7	161.1	152.4	39.1	84.9	38.4	47.2	98.1	43.6	79.7	82.8	104.2
9	P	P	101.7	89.0	115.7	115.7	126.9	119.6	109.2	112.9	116.7
10	P	P	P	P	113.3	113.3	99.7	120.2	98.8	118.4	125.7
<i>With metabolic activation (S9 fraction)</i>											
7	25.2	70.5	45.5	41.6	47.5	67.2	84.0	62.5	124.6	110.0	83.5
9	P	P	115.0	94.7	92.0	92.3	97.1	86.2	97.5	107.2	100.3
10	P	P	P	P	99.6	83.5	90.5	85.1	73.8	90.8	105.3
Testing conc.(mg/mL)	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005
<i>Without metabolic activation</i>											
BZN	76.6	71.9	100.5	115.8	108.8	112.7	110.7	110.2	108.8	109.3	104.9
<i>With metabolic activation (S9 fraction)</i>											
BZN	52.3	49.9	60.9	76.7	78.2	83.1	91.1	93.8	94.6	103.8	97.5

P: the compound precipitates

**Table S2:** Induction factor

Testing concentrations (mg/mL)	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001
<i>Without metabolic activation</i>											
7	0.076	0.053	0.258	0.103	0.298	0.501	0.962	0.663	1.866	1.427	1.096
9	P	P	0.883	0.960	0.781	0.821	0.792	0.867	0.945	1.165	0.761
10	P	P	P	P	1.013	0.687	0.800	0.623	0.601	0.938	0.851
<i>With metabolic activation (S9 fraction)</i>											
7	0.506	0.138	0.391	0.387	0.413	1.362	1.157	1.704	0.998	0.993	1.263
9	P	P	0.735	0.994	1.256	0.937	0.926	0.997	0.860	0.808	0.938
10	P	P	P	P	0.820	1.053	0.953	1.037	1.368	0.998	0.998
Testing concentrations (mg/mL)	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005
<i>Without metabolic activation</i>											
BZN	0.571	0.572	1.342	2.137	2.314	1.941	1.753	1.636	1.830	1.811	1.282
<i>With metabolic activation (S9 fraction)</i>											
BZN	0.627	0.467	0.919	2.108	2.401	2.299	1.698	1.747	1.572	1.555	1.136

P: the compound precipitates