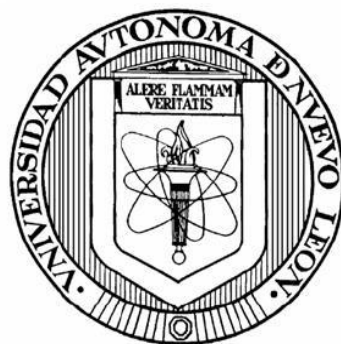


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN *IN VITRO* Y *EX VIVO* DE NUEVOS DERIVADOS DE 1,4
AMINONAFTOQUINONAS SOBRE EPIMASTIGOTE Y TRIPOMASTIGOTE DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Mvz. Mariana Mariel Ortiz Perez

**Como requisito para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL**

Julio, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACIÓN *IN VITRO* Y *EX VIVO* DE NUEVOS DERIVADOS DE 1,4
AMINONAFTOQUINONAS SOBRE EPIMASTIGOTE Y TRIPOMASTIGOTE DE

TRYPANOSOMA CRUZI

Aprobación de tesis por el comité particular de

Mvz. Mariana Mariel Ortiz Pérez

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACIÓN *IN VITRO* Y *EX VIVO* DE NUEVOS DERIVADOS DE 1,4
AMINONAFTOQUINONAS SOBRE EPIMASTIGOTE Y TRIPOMASTIGOTE DE
TRYPANOSOMA CRUZI

Aprobación de tesis por el comité particular de

Mvz. Mariana Mariel Ortiz Pérez


Dirección de Tesis


Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros


Dra. Sibylina Cedillo Rosales


Dr. Juan Jose Zarate Ramos


Dr. Cristian Salas Sanchez


Dr. Benjamin Noguera Torres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle especialmente a la Dra. Karina W. Vázquez Cisneros por aceptarme como su alumna de maestría y dirigir esta tesis, por sus enseñanzas, apoyo y confianza.

Al Dr. Cristian Salas por aceptar ser co-director de éste trabajo y por aceptarme dentro de su laboratorio durante mi estancia en Chile, por su apoyo y hospitalidad.

Agradezco al Dr, Benjamín Nogueta por aceptarme en su laboratorio y a la Dra. Fabiola Chacón por el tiempo dedicado durante este trabajo y su continuo apoyo.

Gracias a los Doctores que forman parte del comité de tesis quienes me apoyaron con sus aportaciones acertadas y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo. A las diversas instituciones por su apoyo financiero para poder realizar este proyecto CONACYT, PRODEP y al posgrado de la FMVZ.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis padres, por siempre apoyarme en mis metas e impulsarme a cumplirlas, por siempre estar presentes en cada una de las etapas de mi vida.

A mi pareja, por comprenderme, aconsejarme y acompañarme durante este camino principalmente en los momentos de ansiedad y frustración, por siempre creer en mí.

Principalmente está dedicado a Dios por permitirme culminar este proyecto y ser siempre mi guía y protector todos los días de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPÓTESIS	2
1.2 OBJETIVOS.....	2
1.2.1 Objetivo General.....	2
1.2.2 Objetivos Específicos	2
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Tripanosomiasis Americana: Agente causal y Transmisión	3
2.1.1 Clasificación taxonómica de <i>T. Cruzi</i>.....	5
2.1.2 Características Estructurales del parásito	5
2.1.3 Estadios Evolutivos del parásito: Adaptaciones Morfológicas.....	7
2.1.4 Ciclo de vida	11
2.2 Distribución de la Enfermedad: Panorama en México	13
2.3 Fases de la Enfermedad: Manifestaciones Clínicas.....	14
2.4 Chagas en animales.....	17
2.5 Tratamiento	18
2.5.1 Efectos adversos del tratamiento.....	20
2.6 Nuevas alternativas de Tratamiento	21
2.7 Naftoquinonas: Usos terapéuticos	24
2.7.1 Mecanismo de acción de las naftoquinonas.....	27
3 MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Sitios donde se llevaron a cabo las evaluaciones de los derivados de 1,4-aminonaftoquinonas	29
3.2 Síntesis de compuestos derivados de 1,4- aminonaftoquinonas ...	30

3.3 Soluciones Stock y diluciones de los compuestos derivados de 1,4-aminonaftoquinona	34
3.4 Cultivo de Parásitos	34
3.5 Condiciones de Cultivo de Epimastigotes	34
3.6 Mantenimiento de Tripomastigotes	35
3.7 Cultivo Celular	35
3.7.1 Macrófagos murinos J774	35
3.7.2 Hepatocitos murinos BpRc1	35
3.8 Ensayo <i>in vitro</i> en Epimastigotes	36
3.8.1 Evaluación <i>Ex vivo</i> de tripomastigote	37
3.9 Evaluación de citotoxicidad en macrófagos murinos	38
3.9.1 Evaluación de Viabilidad en Hepatocitos BpRc1	40
4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Evaluación <i>in vitro</i> en epimastigote.....	42
5.2 Resultado de Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición del crecimiento del 50% de la población de epimastigotes de <i>Trypanosoma Cruzi</i>	44
5.3 Evaluación <i>ex vivo</i> de tripomastigote en cepas INC-5 y NINOA.	46
5.4 Porcentaje de viabilidad en Hepatocitos BpRc1	48
5.5 Citotoxicidad en macrófagos murino J774.....	50
5.6 Índice de Selectividad	51
6 DISCUSIÓN.....	52
7 CONCLUSIÓN.....	59
8 PERSPECTIVAS	60
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Descripción de los 19 derivados de 1,4 aminonaftoquinonas.....	30
Tabla II: Resultados de screening inicial (PIC) sobre epimastigote de <i>Trypanosoma Cruzi</i>	43
Tabla III. Resultados de ensayo <i>in vitro</i> en epimastigote	45
Tabla IV. Resultados de concentración lítica del 50% de tripomastigotes.....	47
Tabla V. Porcentaje de viabilidad en Hepatocitos BpRc1.....	49
Tabla VI. Resultados de evaluación de citotoxicidad de derivados de 1,4 aminoaftoquinoas en una línea celular de macrófagos murinos.....	50
Tabla VII. Índice de selectividad basada en la relación CC_{50}/CI_{50}	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de triatominos en México.....	4
Figura 2. Características morfológicas del <i>T.cruzi</i>	5
Figura 3. Vista esquemática de la forma epimastigote de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 4. Estructura de epimastigote de <i>T.cruzi</i>	8
Figura 5. Estructura de tripomastigote de <i>T.cruzi</i>	9
Figura 6. Estructura de amastigote de <i>T.cruzi</i>	10
Figura 7. Esquema representativo del ciclo de vida de <i>T.cruzi</i>	12
Figura 8. Estructura de 1,4- y 1,2- naftoquinonas.....	24
Figura 9. Estructura de las principales naftoquinonas naturales.....	25
Figura 10. Esquema representativo del metabolismo de la quinona.....	28

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
ARN	Ácido Ribonucleico
BHI	Por sus siglas en inglés infusión Cerebro corazón (brain-Heart Infusión)
BNZ	Benznidazol
CH₃	Grupo metilo
CL₅₀	Concentración letal del 50%
CL	Cloro
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTU	Unidad de Tipificación Discreta
ECH	Enfermedad de Chagas
IC₅₀	Concentración Inhibitoria del 50%
KADN	Ácido desoxirribonucléico del kinetoplasto
MM	Milimolar
MTT	3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5- di fenil tetrazolio bromuro
NADPH	Nicotinamida-adenina- dinucleótido-fosfato reducido
NBPMS	Nitrobenzilfosforamida de mostaza
NTR	Nitrorreductasa
NO₂	Grupo nitro
PIC	Porcentaje de inhibición de crecimiento
RPMI	Medio de cultivo por sus siglas en ingles Roswell Park Memorial Institute médium
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido Dismutasa
<i>T. CRUZI</i>	Trypanosoma cruzi
μL	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

La tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas, es una enfermedad provocada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, en el mercado farmacéutico solo existen dos fármacos aprobados para dicha enfermedad el benznidazol y nifurtimox los cuales tiene resultados poco favorables y durante la etapa crónica presentan efectos secundarios adversos.

La organización Mundial de la Salud calcula que para el año 2017 había entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de estas personas se encontraban en América latina. En las últimas décadas se ha observado el aumento de los casos de personas infectadas en Estados Unidos de América, Canadá y algunos países europeos, esto debido a la migración de personas infectadas a estos países.

Nuestro trabajo tiene como objetivo la evaluación de la capacidad antiparasitaria de nuevos compuestos de 1,4 amino naftoquinonas, dado que compuestos similares a estas moléculas en estudios anteriores han demostrado distintas capacidades biológicas.

Se evaluaron 19 compuestos derivados de 1,4 amino naftoquinonas sobre epimastigote y tripomastigote de *T.cruzi*, realizando ensayos *in vivo*, *ex vivo*, citotoxicidad específica sobre macrófagos murinos y hepatocitos.

El compuesto MO19 fue el que mostró mejor actividad durante los ensayos con un IC_{50} (0.434 μ M) que en comparación con el fármaco de referencia nifurtimox (nfx) (4.46 μ M) resultó tener mejor actividad durante esta evaluación.

ABSTRACT

American trypanosomiasis, also known as Chagas disease, is a disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, in the pharmaceutical market there are only two drugs approved for this disease, benznidazole and nifurtimox, which have unfavorable results and during the chronic stage it presents adverse side effects.

The World Health Organization estimates that by 2017 there were between 6 and 7 million people infected with *T. cruzi*, the majority of these people were in Latin America. In recent decades, an increase in cases of infected people has been observed in the United States of America, Canada, and some European countries, this due to the migration of infected people to these countries.

Our work aims to evaluate the antiparasitic capacity of new 1,4-amino naphthoquinone compounds, since compounds similar to these molecules in previous studies have shown different biological capabilities.

Nineteen compounds derived from 1,4 amino naphthoquinones were evaluated on *T. cruzi* epimastigote and trypomastigote, performing in vivo, ex vivo, specific cytotoxicity tests on murine macrophages and hepatocytes.

Compound MO19 showed the best activity during the tests with an IC_{50} (0.434 μ M) which, compared to the reference drug nifurtimox (nfx) (4.46 μ M), proved to have better activity during this evaluation.

1 INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana también conocida como enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez por el Médico de origen brasileño Carlos Chagas , quien descubrió al parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, esta enfermedad es considerada como una enfermedad desatendida y se encuentra dentro del grupo denominado enfermedades de la pobreza , esto debido a que anteriormente solo se encontraba en personas de nivel socioeconómico bajo , pero con el paso del tiempo y debido a las actividades migratorias esta enfermedad se ha diseminado alrededor del mundo, se estima que en México hay más de 2 millones de personas portadoras de la enfermedad. (Rojo-Medina et al; 2018).

La principal limitante de los medicamentos disponibles en el mercado para el tratamiento de esta enfermedad es su poca efectividad antiparasitaria ya que menos del 80% de las personas tratadas no se curan parasitológicamente de acuerdo con los criterios clásicos indicados para las infecciones agudas.

Debido a la inminente necesidad de encontrar moléculas sintéticas o semisintéticas contra microorganismos patógenos, las naftoquinonas, por sus propiedades, constituyen un grupo de compuestos de importante relevancia para la investigación (López et al;2013)

Las naftoquinonas se pueden encontrar en un gran número de plantas, principalmente son extraídas de la corteza del árbol de Lapacho y se destacan sus propiedades tintóreas y biológicas (López et al; 2013).

1.1 HIPÓTESIS

Las 1,4-amino naftoquinonas presentan actividad tripanosomicida en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* y una baja citotoxicidad.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad tripanosomicida de un conjunto de nuevos derivados de 1,4-amino naftoquinonas sobre epimastigotes y trypomastigotes de *T. cruzi*, así como evaluar la citotoxicidad de estos compuestos sobre una línea celular.

1.2.2 Objetivos Específicos

1 Evaluar *in vitro* derivados de 1,4-amino naftoquinonas sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

2 Evaluar *ex vivo* derivados de 1,4-amino naftoquinonas sobre trypomastigotes de *T. cruzi*.

3 Evaluar la citotoxicidad de los derivados de 1,4-amino naftoquinonas sobre macrófagos murinos J774 y hepatocitos BpRc1.

2 ANTECEDENTES

2.1 Tripanosomiasis Americana: Agente causal y Transmisión

La Tripanosomiasis Americana conocida popularmente como enfermedad de Chagas, tiene como agente casual al parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, en América Latina es un grave problema de salud ya que se calcula que afecta alrededor de 18 millones de personas (OMS, 2019).

La eCh es una enfermedad considerada zoonótica ya que cuenta con una amplia variedad de reservorios naturales principalmente fauna silvestre como armadillos, marsupiales, zarigüeyas, roedores, primates, aunque con la creciente marcha urbana ya se encuentra en mamíferos domésticos tales como perros, gatos, ratas y cobayos.

La infección puede ser transmitida por diversas vías como transfusión sanguínea, vía congénita, trasplante de órganos y descubierta recientemente por la ingesta de alimentos contaminados (García-Jordan, 2015), la principal vía de transmisión es por el vector insecto estrictamente hematófago de la familia Reduviidae, orden Hemiptera (chinchas), subfamilia Triatominae.

Existe una amplia variedad de Triatominos dispersos por América latina las principales especies que destacan son: *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay Uruguay y Perú; el *R. prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica, el *T. dimidiata* en Ecuador y América Central; y el *Rhodnius pallescens* en Panamá. (García-Jordan, 2015). En México se detectaron ocho géneros y 31 especies de triatoma, las principales especies identificadas en 2015 fueron *Triatoma longipennis*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma dimidiata* (Rojo-Medina et al, 2015).

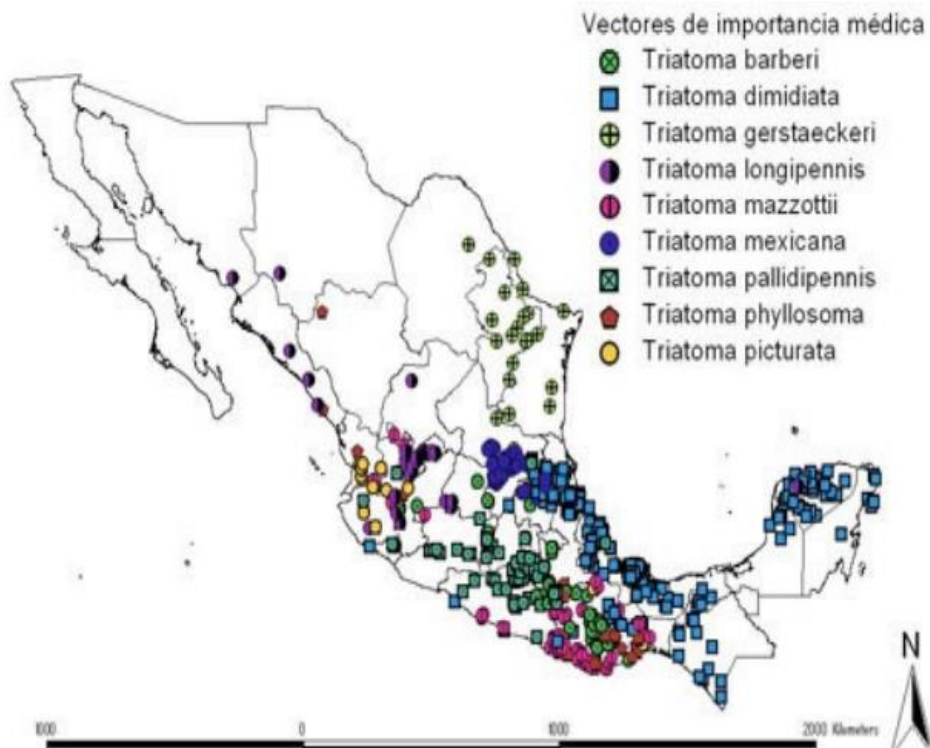


Figura 1. Distribución de triatominos en México (Sistema único de vigilancia epidemiológica, 2015)

La transmisión vectorial ocurre cuando el *T. cruzi* es introducido a través de una lesión ya que se puede encontrar en las heces infectadas de los insectos triatominos hematófagos. Estos insectos se encuentran principalmente en las grietas y las ranuras de viviendas que han sido mal construidas principalmente en zonas rurales o con un ambiente propicio para su crecimiento, normalmente no son vistos durante el día y se vuelven activos durante la noche, cuando se alimentan de sangre. Por lo general pican una zona expuesta de la piel o mucosas y el insecto defeca cerca de la picadura. Los parásitos entran en el cuerpo cuando el mamífero instintivamente al sentir la picadura se rasca las heces del insecto en la picadura, y contamina los ojos, la boca, o en cualquier lesión que comprometa la integridad de la piel.

2.1.1 Clasificación taxonómica de *T. cruzi*

T. cruzi es un protozoo que pertenece al Orden *Kinetoplastida*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma* del grupo llamado *Stercolaria*, parásitos que se reproducen en el intestino grueso posteriormente maduran a su forma infectiva saliendo por las heces. (De Souza,2002).

2.1.2 Características Estructurales del parásito

T. cruzi es un parásito pequeño aproximadamente 20 micras , posee un cuerpo alargado está provisto de un flagelo y una membrana ondulante que le permite moverse dentro del torrente sanguíneo.



Figura 2. Características morfológicas del *T. cruzi* (CDC,2019)

La superficie celular del parásito se compone de una membrana celular, una bicapa lipídica común, medio extracelular y una glucocálix que a su vez se compone de glucolípidos y glicoproteínas que recubren la parte interna del parásito.

El *T. cruzi* está formado al menos por 3 macrodominios conocidos: el cuerpo celular, el flagelo y la bolsa paraflagelar, en una superficie más interna tiene una

capa compuesta por microtúbulos subcelulares existente en todos los cinetoplastidos (Souza,2009),

La base del flagelo se encuentra pegado al cuerpo basal, siendo este el que otorga la capacidad de movimiento al parásito.

Existe otro organelo típico de estos parásitos, son conocidos como “acidocalcisomas” situadas alrededor del cuerpo del parásito, este organelo solo se encuentra en la etapa de amastigote, estos organelos poseen en su interior una gran cantidad de elementos que son capaces de otorgar energía, además, se cree que pudieran actuar como depósitos de calcio dándole una capacidad osmoreguladora al parásito.

Todos los protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* poseen una estructura muy característica conocida como cinetoplasto que se compone de DNA-cinetoplastidico que codifican rRNAs guías que modifican los transcritos mediante delección o inserción de urilidato. (Stuart et al; 2008).

Presentan una mitocondria única que se extiende a lo largo del cuerpo celular del parásito en la cual se encuentra el cinetoplasto.

Existen otras estructuras conocidas en estos protozoos como lo son los minicírculos con un tamaño aproximado entre 0.5 a 2.5 Kb, también cuenta con algunas docenas de maxicírculos. Los minicírculos son los encargados de un proceso conocido como “ARN editing” el cual codifica ARNs guías que son capaces de modificar los transcritos de los maxicírculos mediante la inserción o delección extensiva de urilidato(Stuart et al.,2005).

Los maxicírculos son análogos del ADN mitocondrial de las eucariotas superiores, tienen su función dentro de la cadena transportadora de electrones codificando RNAr y subunidades de los complejos de la cadena (Souza,2008).

El glicosoma es un organelo único dentro de la estructura que posee el parásito, el cual está encargada de la mayor parte de la ruta glucolítica. Son estructuralmente semejantes a los peroxisomas de células de mamíferos. Por tanto, los glicosomas al igual que los peroxisomas poseen catalasas y oxidasas productoras de H₂O₂(Teixeira et al.,2014).

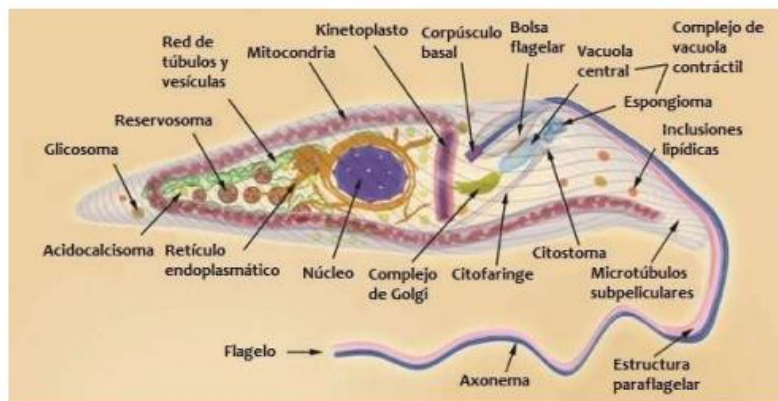


Figura 3. Vista esquemática de la forma epimastigote de *T. cruzi*, señalando las principales estructuras celulares (Teixeira, 2014)

2.1.3 Estadios Evolutivos del parásito: Adaptaciones Morfológicas

Las estructuras anteriormente mencionadas, la motilidad, las variaciones del flagelo y el cinetoplasto son quienes definen las diferencias evolutivas que existen y en qué etapa del ciclo de vida se encuentra el tripanosoma. Durante el paso de los años se han descrito una serie de formas intermedias de los tripanosomas, aunque, existen 3 formas evolutivas de mayor importancia, epimastigote, tripomastigote y amastigote.

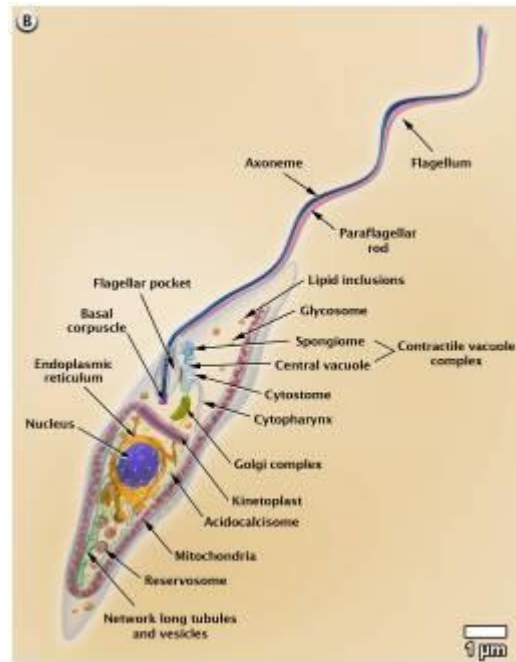


Figura 4. Estructura de epimastigote de *T. cruzi* (Texeira, 2014)

Epimastigote: Posee una forma elongada 2 μm , con un flagelo anterior que emerge por un costado del cuerpo celular y se origina en el cinetoplasto por delante del núcleo.

Presenta una membrana ondulante poco desarrollada que mide entre 20 y 40 μm . Generalmente en una posición central se encuentra el nucleolo y anterior a este ocupa posición el cinetoplasto.

Esta forma evolutiva se encuentra en el intestino del vector, es una forma replicativa no infectiva, se puede reproducir fácilmente de manera *in vitro* en un medio anéxico a una temperatura de 28 ° C.

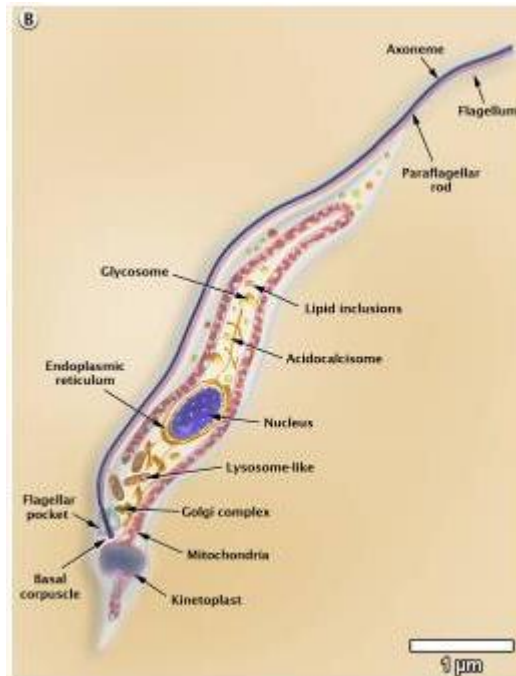


Figura 5. Estructura de tripomastigote de *T. cruzi* (Texeira, 2014)

Tripomastigote: Este estadio tiene una forma elongada de 20 a 32 μm , con el cinetoplasto ubicado detrás del núcleo, el flagelo emerge a partir del cinetoplasto y es liberado por el extremo anterior lo cual le otorga la característica de una membrana ondulante bastante extensa.

El tripomastigote es la forma infectiva, presente en el recto del insecto vector, se puede obtener en cultivos celulares y en la sangre del hospedero mamífero.

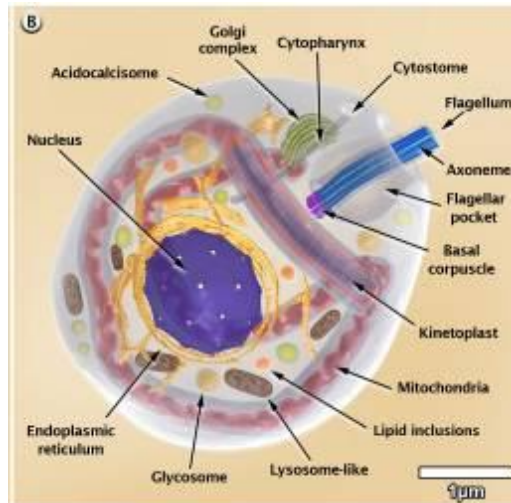


Figura 6. Estructura de amastigote de *T. cruzi* (Texeira, 2014)

Amastigote: Posee una forma característica que la diferencia de los otros estadios es esférica u ovalada mide aproximadamente 2-4 μm. Es un estadio replicativo no infectivo que se reproduce por fisión binaria dentro de las células del hospedador mamífero o en un cultivo celular.

2.1.4 Ciclo de vida

El ciclo inicia cuando el vector ingiere tripomastigotes circulantes en la sangre del huésped infectado, después, los tripomastigotes se convierten en epimastigotes en el intestino medio del parásito, estos se dirigen hacia el intestino posterior y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos la cual es la forma infectiva del parásito, al final son excretados a través de las heces del vector.

Los tripomastigotes metacíclicos ingresan al huésped a través de la picadura del vector o a través de una membrana mucosa, una vez que se encuentran en el citoplasma de las células se diferencian en amastigotes intracelulares que comienzan su replicación alrededor de 12 horas después y tiene una duración de 4 a 5 días, Al final de este periodo los amastigotes se convierten en tripomastigotes, la célula hospedera se rompe y los parásitos quedan liberados en la circulación del torrente sanguíneo y pueden invadir nuevas células o quedar a disposición para infectar nuevos vectores (Bern,2015).

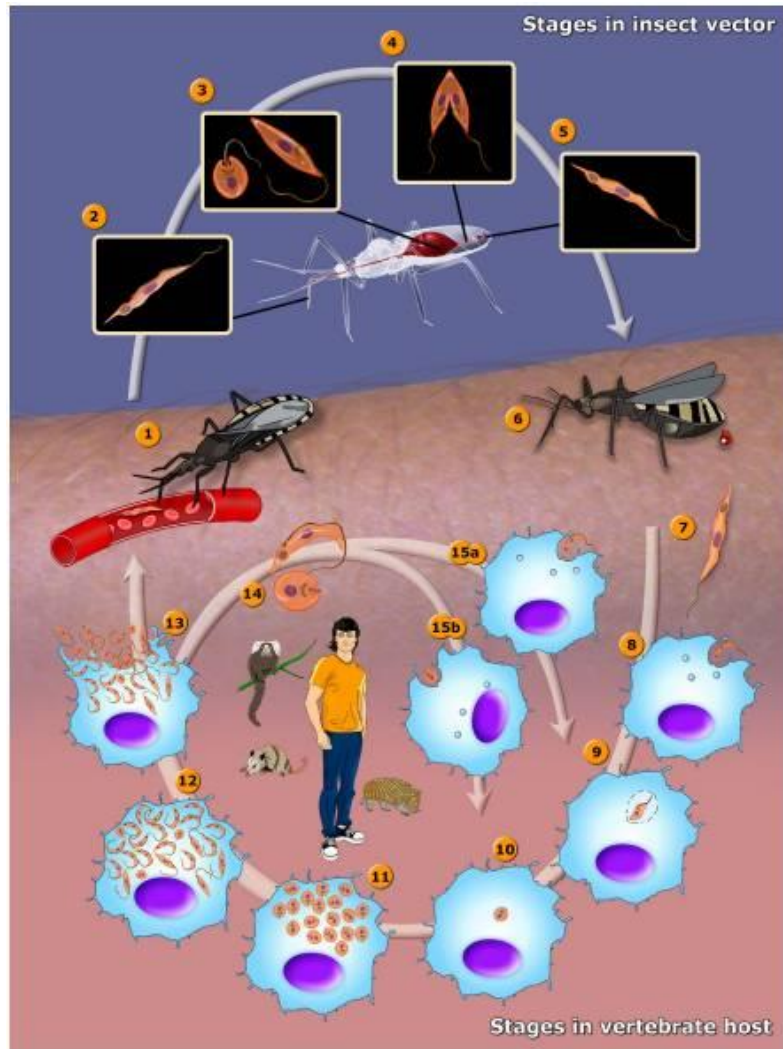


Figura 7. Esquema representativo del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se muestran los estadios dentro del vector (epimastigote, esferomastigote y tripomastigote metacíclico) los estadios dentro del huésped mamífero (tripomastigote sanguíneo, amastigote y tripomastigote metacíclico. (Texeira et al.,2012)

2.2 Distribución de la Enfermedad: Panorama en México

Según las estadísticas dadas por la Organización Mundial de la Salud se calcula que existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas y la mayoría se encuentran en América Latina. Aunque debido a la movilidad de la población la enfermedad también se encuentra en menor número de casos en Estados Unidos de América, Canadá y algunos países de Occidente (OMS, 2019).

En México la Secretaría de Salud registro que del 2000 al 2012 se encontraron 5559 casos nuevos en personas con un rango de edad entre los 22- 44 años.

Los estados con más casos registrados son Veracruz, Morelos, Chiapas, Yucatán, Guerrero y Jalisco.

En México existen las condiciones para que se lleve a cabo la transmisión vectorial en dos terceras partes del territorio ya que se cuenta con más de 32 especies de triatomíneos. Las poblaciones vectoriales por su capacidad de convivencia con los humanos se consideran domiciliadas, peri domiciliadas y selváticas o silvestres. Las especies intradomiciliadas que existen en el país son, *Triatoma Barberi* que se asocia con la presencia de cardiopatías y megas de órganos del tracto digestivo y *Triatoma Dimidiata* (Hashimoto K et al,2015).

En la República Mexicana, de las 32 especies existentes; 19 pertenecen al género *Triatoma*, seis al género *Meccus*, dos al género *Panstrongylus* y los géneros *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius*; existen 13 especies relacionadas con la vivienda; dos de hábitos intradomiciliados (*Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata*) y 11 peridomiciliadas, entre ellas *Meccus pallidipennis* Actualmente, *Rhodnius prolixus* se considera eliminado (Salazar et al, 2014).

2.3 Fases de la Enfermedad: Manifestaciones Clínicas

El curso natural de la enfermedad presenta la fase aguda, la crónica asintomática o indeterminada y la crónica sintomática. Las manifestaciones Clínicas y el tiempo de aparición y duración, así como el curso de la enfermedad usualmente son semejantes en todos los casos, aunque existirán diferencias dependiendo de algunos factores ligados al *T.cruzi* por ejemplo la cepa, virulencia y cantidad de inóculo; también dependerá del huésped a considerarse, la edad, el sexo, estado inmunológico y nutricional.

Periodo de incubación: Por transmisión vectorial es de 5 a 14 días.

Fase Aguda: Esta etapa de la enfermedad puede presentarse de forma aparente o inaparente, tiene una duración de 2 a 3 semanas normalmente, pero existen casos reportados con duración de hasta 4 meses, se produce con mayor frecuencia en niños pequeños con edades menores a 10 años.

Las manifestaciones clínicas que pudieran llegar a presentarse son picos febriles espontáneos y pasajeros, mialgias, artralgias, hepatomegalias, meningoencefalitis, anemia, leucocitopenia. En menos del 50% de los casos se presentan los signos patognomónicos de la enfermedad los cuales están relacionados con el sitio de entrada del parásito. En los casos de entrada por vía cutánea se presenta el Chagoma que es una lesión nodular subcutánea de color violeta el cual es acompañado de una tumefacción de los ganglios linfáticos satélites. El signo de Romaña-Mazza se presenta cuando la vía de entrada es por la mucosa ocular, es un edema bpalpebral unilateral de color violeta y puede ser ligeramente pruriginoso o acompañarse de adenopatías regionales. La mortalidad suele ser baja al menos que el huésped este inmunocomprometido o presente alguna afección cardiaca; el diagnóstico en esta etapa es difícil ya que la signología que se presentado no es representativa de la

enfermedad, reportes de la Organización Mundial de la Salud señalan que esta etapa es diagnosticada sólo entre el 1-2 % de los pacientes.

Durante esta etapa los tripomastigotes de *T. cruzi* se encuentran en sangre periférica y también en fluido cerebroespinal, donde el parásito se replica mayormente en las células del sistema reticuloendotelial mediante ciclos asincrónicos (De Souza,2009). Existe la posibilidad de realizar diagnósticos directos debido a la parasitemia elevada, detectando la presencia del parásito o de sus antígenos. Esta es la única fase de la infección en la que hasta el momento se ha conseguido lograr la cura parasitológica, mediante la administración de fármacos tales como Nifurtimox y Benznidazol

Fase Indeterminada: Esta fase suele durar entre 5 a 10 años, incluso existen casos con duraciones de 20 años, los pacientes chagasicos que no fueron diagnosticados de la fase aguda evolucionan a la fase indeterminada de 2 a 3 meses después. La parasitemía es muy baja y en este punto los métodos de diagnóstico de elección es serología, electrocardiográficos y radiológicos. Esta fase es clínicamente indetectable y silenciosa, no se presentan sinología y la mortalidad es alta debido a las alteraciones anatomopatológicas. Solo entre un 10-20% de los pacientes desarrolla la fase crónica.

Fase Crónica Sintomática: Dependiendo de algunos factores anteriormente mencionados como son, la cepa del parásito y las características del hospedador, se presentarán manifestaciones cardiacas patognomónicas a la fase crónica de la enfermedad.

En las manifestaciones cardiacas el corazón sufre alteraciones en la contractilidad y conductibilidad con insuficiencia cardiaca progresiva y cardiomegalia; la miocardiopatía chagastica crónica es la causa de miocardiopatía infecciosa más

frecuente del mundo, esta afección compromete varios tejidos cardiacos y presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas, en la etapa más avanzada el daño cardíaco evoluciona y se manifiesta una disfunción segmentaria o global por la fibrosis , insuficiencia, disnea, taquicardia y algias precordiales. Se estima que entre el 55 y 65% de las muertes con esta patología se presentan en forma de muerte súbita (Salazar-Schettino et al ;2009).

Las manifestaciones digestivas de la enfermedad de Chagas. como el megacolon y megaesófago, se han encontrado principalmente en pacientes de la zona central de Brasil, donde esta manifestación parece ser más frecuente (Koberle,2013). Más de dos terceras partes de los casos de megaesófago aparecen en personas de 20 a 60 años, de las que el 66 % son hombres. Los síntomas más frecuentes son disfagia y odinofagia, con los consiguientes signos de malnutrición.

En este punto de la enfermedad no existe un tratamiento totalmente efectivo y la tasa de mortalidad es alta, en México las manifestaciones cardiacas son las más comunes y el pronóstico de los pacientes que las presentan es malo, habitualmente no sobreviven más de cinco años y mueren por insuficiencia cardiaca o muerte súbita.

2.4 Chagas en animales

Trypanosoma cruzi se presenta en más de 100 especies de mamíferos, existen reportes de infecciones en carnívoros, incluidos perros y gatos, cabras, cerdos, murciélagos, lagomorfos, roedores, marsupiales, zarigüeyas, armadillos, mapaches, coyotes, ratas, ratones. Se sabe hasta el momento que las aves, reptiles y peces no son susceptibles a la infección (Rocha et al; 2013).

A pesar de que todas las especies de mamíferos en teoría son susceptibles a la infección con *T. cruzi*, son algunas especies las que han adquirido mayor relevancia al demostrar la capacidad de mantener la transmisión del parásito por más tiempo, los hospederos más antiguos conocidos son el *D. novemcinttus*, marsupiales del género *Didelphis* y *Philander oposum*.

Tanto como los animales domésticos y fauna silvestre cumplen un papel importante en la diseminación de la enfermedad ya que existe una convivencia directa entre el vector, animales y la población humana.

La sangre de los animales infectados sirve como alimento para los triatomíneos que normalmente se encuentran en los nidos o refugios de estos animales silvestres y a su vez sirven como transporte de triatomíneos hacia las viviendas humanas como es el caso de roedores y marsupiales quienes frecuentan comúnmente áreas peri domiciliadas y domiciliadas.

Los marsupiales del género *Didelphis* tienen potencial significancia en la transmisión del *T. cruzi*, se ha descubierto que en sus glándulas anales se pueden aislar diferentes estadios del ciclo biológico del parásito, es decir que el tripomastigote circulante en la sangre puede migrar hasta el lumen de las glándulas odoríferas y de ahí diferenciarse en formas epimastigotas donde se replicara para luego diferenciarse en tripomastigote metacíclicos el cual es el estadio infectivo y puede ser rociado en las secreciones de las glándulas y así completar el ciclo de

vida del parásito y ser capaz de transmitirlo a otros mamíferos (Galaviz-Silva et al;2017).

En Georgia, Estados Unidos, Científicos de la Universidad de Emory en colaboración con la Universidad de Buenos Aires, Argentina, han estudiado la incidencia de Chagas en distintas comunidades de Argentina, estos investigadores han determinado que los perros son importantes vectores de la enfermedad, ya que, aunque son incapaces de transmitir la infección de manera directa, pueden llevar al vector o el parásito y el mismo vector picar al humano.

En la República Mexicana, especialmente en un estudio realizado en perros de dos localidades urbanas de Morelos y Puebla se reportó una seroprevalencia de 8.8% en perros de Cuernavaca, Morelos, y 24.2% en animales de Puebla. Datos reportados en Yucatán se encontró que existe una seroprevalencia de 9.8% en áreas rurales y de 14.4% en las zonas urbanas. (García et al;2011).

En perros infectados experimentalmente histológicamente se puede observar anomalías en el esófago, pero a diferencia de las afecciones en humanos en perros no se han registrado megaesófago ni megacolon. De la misma manera que ocurre en humanos, la enfermedad presenta lesiones cardíacas, el miocardio suele estar pálido y presentar hemorragias subepicárdicas. Además se puede registrar edema pulmonar secundario, congestión en el hígado, bazo y riñones.

Es poco común que aparezcan lesiones macroscópicas en animales, principalmente por que presentan pelaje que no dejaría observar las lesiones a simple vista.

En la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, el miocardio se encuentra flácido y agrandado bilateralmente, se reduce el grosor en las paredes ventriculares,

Se han reportado casos en mapaches y zarigüeya miocarditis leve a la necropsia.

2.5 Tratamiento

Poco tiempo después de la aparición de la enfermedad de Chagas se comenzaron a realizar estudios que trajeron como resultado los dos medicamentos aprobados para el tratamiento de esta enfermedad que son el benznidazol y el nifurtimox en la década de los setenta (Cerecetto et al;2000). Estos dos medicamentos son compuestos nitrogenados heterocíclicos.

Nifurtimox. Lampit®, Laboratorio Bayer, es un análogo de nitrofuranos. Fue aprobado su uso en enfermedad de Chagas en el año 1965, tiene efecto tripanomicida, actúa contra las formas amastigote y tripamastigote de *T. cruzi*. Ha demostrado tener mayor efectividad en la fase aguda e indeterminada de la enfermedad y resultados pocos favorables y contradictorios en la etapa crónica.

Benznidazol. Radanil®, Argentina, Rochagan®, Brasil, Laboratorio Roche. Es también un fármaco tripanosomicida de elección. actúa a través de la unión covalente a los intermediarios de la nitrorreducción con los componentes del parásito, ADN, lípidos y proteínas. Su eficacia ha sido demostrada en el tratamiento de la fase aguda, en la fase crónica indeterminada, es el medicamento más usado por sus menores efectos adversos y mayor aceptación en niños.

Los derivados de nitrofuranos actúan reduciendo el grupo nitro para originar peróxido de hidrógeno o anión superóxido. Estos son compuestos oxidativos producidos por la acción de la enzima superóxido dismutasa, que es la responsable de la reducción de los grupos nitro; estos radicales en presencia de hierro forman un fuerte radical hidroxilo oxidante e incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno, que van a llevar a un estrés oxidativo en el parásito. No obstante, el efecto oxidativo nocivo de estos compuestos resultantes no se limita al parásito, sino que afecta en igual proporción a las células de los mamíferos, lo que lleva al desarrollo de los efectos adversos de estos medicamentos (Sosa Stanni et al; 2004).

En general, el mecanismo de acción de los medicamentos azoles consiste en bloquear la síntesis del ergosterol que es esencial para lograr la supervivencia del parásito.

Se ha evidenciado adicionalmente que el tratamiento antiparasitario combinado aumenta la efectividad, contribuye a la disminución en las tasas de desarrollo de resistencia y reduce a su vez la toxicidad (Pizani MJ, et al ;2013).

Actualmente el tratamiento se limita a estos dos medicamentos, ambos fármacos tienen actividad sobre la forma tripomastigote y amastigote del parásito, el uso de ambos tiene una eficacia variable y efectos secundarios considerables.

Mientras que en la fase aguda de la enfermedad de Chagas se reconocen cifras serológicas de eliminación del parásito cercanas al 100% con el tratamiento con benznidazol, en la fase crónica de la enfermedad se habla de cifras de curación muy por debajo de la media, aunque muy variables, hasta de un 60% en menores de 12 años y entre un 8 y un 25% en adultos (Cancado, 2000).

Diversas investigaciones han demostrado que la tasa de curación de la tripanosomiasis americana disminuye con la cronicidad de la enfermedad, siendo peores los desenlaces mientras más crónica sea la parasitosis; incluso se ha estimado que tan solo 5,9% de los pacientes que reciben tratamiento en estadios crónicos alcanza la cura parasitológica (Cancado, 2000). Adicionalmente, se ha demostrado cierto grado de resistencia por parte de este parásito a los tratamientos disponibles, condición que podría explicar las bajas tasas de cura de los pacientes

En medicina veterinaria no se encuentra con un tratamiento de elección. Ocasionalmente, los perros han recibido tratamiento con fármacos antiparasitarios. Estos parecen ser más eficaces en las primeras etapas.

2.5.1 Efectos adversos del tratamiento

El efecto nocivo de los fármacos no se limita solo al parásito. Sino que afecta también las células del huésped mamífero.

La aparición de efectos secundarios se presenta en más del 40% de los casos, pueden producir muchos efectos de origen dermatológico, hematológico e incluso de compromiso neurológico.

Entre los efectos secundarios más comunes se encuentran la dermatitis alérgica, erupciones cutáneas que aparecen después de una semana de recibir el tratamiento, edema generalizado, mialgias, artralgias, neuropatía periférica, anorexia, pérdida de peso, insomnio, vómitos, náuseas, dolor de cabeza, mareo y vértigo.

Existen casos crónicos donde se presenta depresión de la medula ósea con trombocitopenia. El compromiso neurológico se puede presentar con la polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica.

Al presentarse efectos como estos es poco probable e incluso riesgoso que el paciente continúe con el tratamiento, se busca realizar mejoras en el tratamiento para disminuir la toxicidad.

2.6 Nuevas alternativas de Tratamiento

Dada la inminente necesidad de mejorar el actual tratamiento o encontrar nuevas alternativas con el fin de mejorar la efectividad y la eliminación de los efectos adversos la comunidad científica ha desarrollado muchas investigaciones con moléculas tanto sintéticas como derivados de origen natural e inclusive medicamento ya existentes usados como tratamiento de otras enfermedades.

Una clase importante entre los compuestos candidatos para inhibir el crecimiento de *T. cruzi* son los derivados de los tiazoles los cuales, en un estudio realizado por Álvarez y col en 2010, mostraron tener actividad contra epimastigotes de la cepa Tulahuen y amastigotes 3 de sus moléculas presentaron índices de selectividad mayores a 1000.

Actualmente dentro del grupo de compuestos que han presentado mejor actividad tanto en el modelo *in vivo* como *in vitro* son los inhibidores de la síntesis de ergosterol. El posaconazol en un modelo murino y un ensayo clínico en humanos a demostrado una excelente actividad como antiparasitario y es capaz de detener la carga parasitaria en sangre, aunque comparado con benznidazol los resultados obtenidos no fueron mayores. (Bern;2012).

Otro grupo de medicamentos que han mostrado cualidades tripanocidas son un grupo conocido como NBPMs los cuales fueron desarrollados para tratar el cáncer que consisten en un grupo anitrobenzil unido a la fosforamida citotóxica de la mostaza y cuentan con una buena selectividad ya que actúan sobre una enzima que está ausente en la mayoría de los organismos eucariotas. (Buchanan-Kilbey et al; 2013)

Análogos de las purinas como el alopurinol, que actúan por medio de la interrupción de la síntesis de ARN, también ha mostrado actividad en contra de este protozoo, en un estudio probaron ser estadísticamente comparables en eficacia con el benznidazol. (Arguello et al ;2012).

Entre la categoría de productos de origen natural se encuentran los derivados de *Eugenia uniflora*, una planta que se conoce comúnmente como cereza de cayena, la cual en estudios anteriores mostro actividad antimicrobiana. Especies como *Ampelozizyphus* amazónicos una planta de origen brasileño mostro actividad profiláctica contra la parasitemia.

En Perú se llevó a cabo un estudio *in vitro* en el cual se evaluaron 10 aceites esenciales de plantas medicinales con el fin de determinar su capacidad tripanocida y su actividad citotóxica contra las células de mamíferos, los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Aloysia triphylla* (cedrón) inhibieron significativamente el crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*, con una CI_{50} de 63,09 y 96,49 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, no se observó variación significativa de la concentración de óxido nítrico y tampoco se evidenció citotoxicidad.

En el desarrollo de nuevas moléculas investigadores buscaron agentes tripanocidas que tuvieran poca o nula toxicidad en las células de mamíferos y mostraran buena actividad tripanocida bajo esta idea se han desarrollado una serie de moléculas de origen natural que han demostrado sus efectos terapéuticos.

2.7 Naftoquinonas: Usos terapéuticos

Como se ha explicado anteriormente el *T. cruzi* cuenta con una sola mitocondria y una región llamada cinetoplasto el cual es rico ADN, haciéndolo un organelo de interés farmacológico. Se sabe que la mitocondria de *T.cruzi* es pobre en oxígeno reactivo ,haciéndolo sensible al estrés oxidativo. Bajo este concepto las quinonas resultan ser interesantes para su estudio dado que se sabe que el mecanismo microbicida de las quinonas se relaciona con la generación de especies reactivas de oxígeno. (AOM; 2000).

Las quinonas son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se forman por la oxidación de compuestos aromáticos. De acuerdo con su complejidad química se clasifican en benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas (Leyva;2016).

Las naftoquinonas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, se han aislado de plantas, hongos, bacterias e inclusive animales. tienen la característica estructural de poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 en el anillo de naftaleno comúnmente, de ahí el nombre. Se pueden encontrar de forma libre o condensada con diversos monosacáridos.

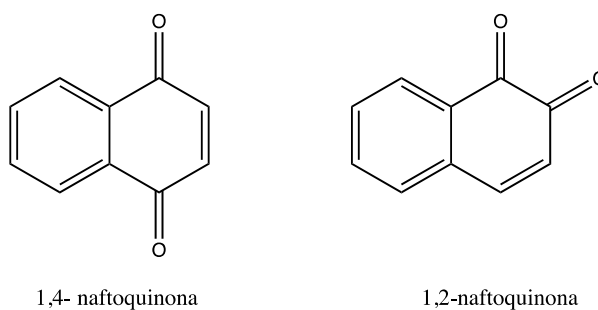


Figura 8. Estructura principal de 1,4- y 1,2- Naftoquinonas (Leyva L, et al; 2017)

Dentro de la familia de las quinonas, una de las clases químicas con mayor importancia biológica son las 1,4-naftoquinonas de igual manera que las quinonas, éstas pueden generar especies reactivas de oxígeno, así como superóxidos y radicales hidroxilo, además se ha descrito que la porción quinona puede actuar como un electrófilo y reaccionar con diferentes blancos biológicos en varias especies de mamíferos (Valencia et al; 2011).

En diversas investigaciones científicas se ha demostrado la actividad biológica de las naftoquinonas naturales como, la lawsona, juglona, plumbagina, lapachol, alkalina y shikona (Figura 9) ya que se han utilizado como agentes antimaláricos, antimicrobianos, antitumorales, fungicidas, anticancerígenos, entre otros.

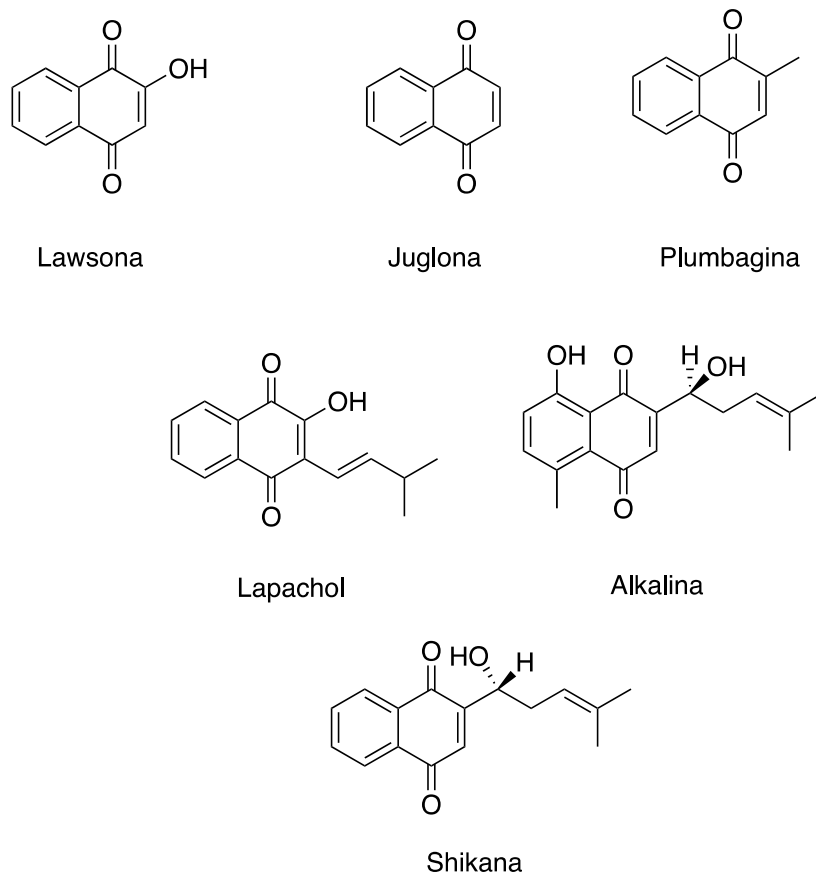


Figura 9. Estructura de las principales naftoquinonas naturales.(López L, et al; 2011)

En el 2008 Bolognesi y colaboradores seleccionaron compuestos a partir de la estructura del lapachol que son aislados a partir del árbol de la familia *Bignoniaceae*, donde seleccionaron la unidad quinona como la estructura central para la derivatización combinatoria, la pequeña librería creada de derivados de 2-fenoxi-1,4-naftoquinona y 2-fenoxi-1,4-antraquinona fue evaluada contra *T.B.rhodesiense*, *T.cruzi* y *L.donovan*. Todos los derivados mostraron actividad inhibitoria hacia las especies de Trypanosoma o Leishmania, siendo 8, 10 y 16 los compuestos más activos contra las células *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 50\text{nM}$), ($IC_{50} = 0.28\text{mM}$) e ($IC_{50} = 1.26\text{mM}$), respectivamente. (Bolognesi et al;2008)

En un estudio se sintetizaron un nuevo indol-4,9-diona y sus derivados fenoxi y fueron evaluados *in vitro* frente a la forma epimastigote de la cepa Y de *T.cruzi*. Se descubrió que todos estos nuevos compuestos son extremadamente potentes y selectivos comparados con el fármaco estándar nifurtimox. Curiosamente, el fenoxiindol-4,9-diona compuesto **9d** mostró una excelente actividad inhibidora con un $IC_{50} = 20\text{ nM}$, y un SI = 625. (Tapia et al; 2014).

La naftoquinona hidroxilada 2-hidroxi-3-(1-propen-3-fenil)-1,4-naftoquinona (PHNQ6) se reporta con actividad antiparasitaria contra *Toxoplasma gondii* en un estudio donde se evaluó su efectividad en ratones infectados, teniendo como resultado que al menos el 70% de los ratones tratados redujo considerablemente el número de quistes cerebrales en comparación con el grupo control. (Ferreira et al ;2006)

En una de las publicaciones más recientes con derivados de quinonas, se sintetizaron una serie de nuevas moléculas de ariloxiquinonas con modificaciones en el estructurales, las cuales fueron evaluadas *in vitro* sobre epimastigotes de *T.cruzi*. Dentro de los resultados la mayoría de las moléculas mostraron mayor potencia que el fármaco de referencia nifurtimox con valores de IC_{50} de $<0.70\text{ }\mu\text{m}$,

en cuanto al IS dos de estas moléculas mostraron mayor resultado en la selectividad que el nifurtimox (Espinoza-Bustos; et al 2020).

2.7.1 Mecanismo de acción de las naftoquinonas

El mecanismo de acción de las naftoquinonas no ha sido completamente elucidado, sin embargo, se sabe que están involucradas en diversos procesos a nivel celular. Se sabe que análogos de la ubiquinona sobre la mitocondria interfiriendo en la cadena transportadora de electrones inhibiéndose la síntesis de ácidos nucleicos y de ATP (Leyva et al;2017).

Otro proceso biológico de las naftoquinonas es su acción como intercaladores o alquilantes del ADN. En diversos estudios se ha comprobado que las quinonas tienen como blancos principales a las topoisomerasas I y II las cuales son las encargadas de la tipología de almacenamiento del ADN. Un ejemplo de esta acción de las quinonas es la β -Lapachol la cual se une a la enzima topoisomerasa I inhibiendo su efecto sobre el ADN. (Da Silva et al; 2003).

Las naftoquinonas son conocidas por su habilidad de participar en reacciones de cicloadición debido a su anillo deficiente de electrones (Pinto et al; 2009). En la mayoría de los casos, su actividad biológica se ha relacionado con sus propiedades de óxido-reducción y ácido-base, las cuales pueden ser moduladas modificando sintéticamente los sustituyentes unidos al esqueleto 1,4-naftoquinona.

Un mecanismo observado en las 1,4-Naftoquinonas es la inducción de estrés oxidativo en las células a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que sirve como señalización para la apoptosis celular. Bajo condiciones fisiológicas las naftoquinonas pueden experimentar una reducción no enzimática por ganancia de un electrón generando la semiquinona, que es una especie de moderada toxicidad, mediante la transferencia electrónica de un radical apropiado. Este proceso también puede llevarse a cabo enzimáticamente, usualmente por una reacción de reducción mediada por flavoenzimas. La reducción de la naftoquinona

puede seguir un mecanismo de un electrón, en donde participan la NADPH-citocromo P450 reductasa, NADH deshidrogenasa y la NADP ferredoxina reductasa, y por un mecanismo mixto de reducción por uno y dos electrones, con participación de las enzimas NAD(P)H deshidrogenasa (DTDiaforasa) y la lipoamida deshidrogenasa. Bajo condiciones aeróbicas, los radicales semiquinona pueden autooxidarse para regenerar la quinona con la subsecuente formación de aniones superóxido generando peróxido de hidrógeno (Pinto et al; 2009).

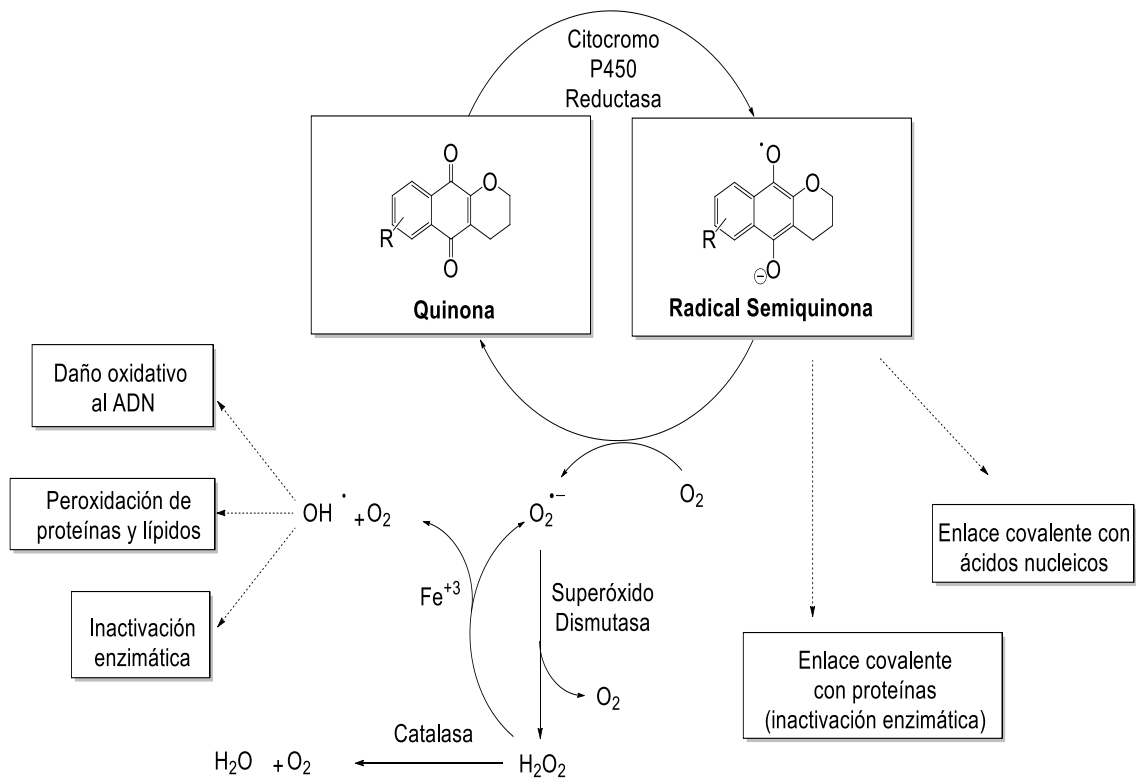


Figura 10. Esquema representativo del metabolismo de la quinona (Leyva, 2017)

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitios donde se llevaron a cabo las evaluaciones de los derivados de 1,4-aminonaftoquinonas

*La evaluación *in vitro* se llevó a cabo dentro del laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

*Dentro del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas se llevó a cabo la evaluación *ex vivo*.

*Para la determinación de la citotoxicidad con células hepáticas se contó con el apoyo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

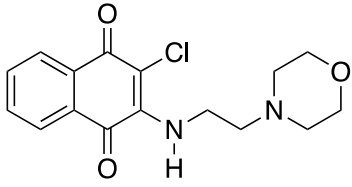
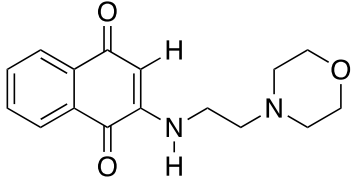
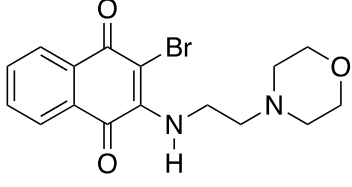
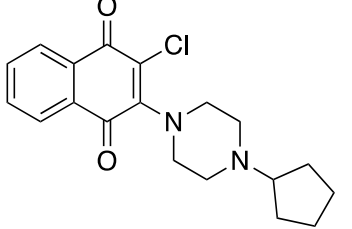
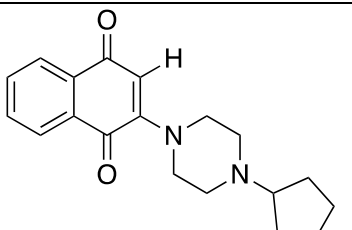
*La evaluación citotóxica con macrófagos BpRc1 se llevó a cabo en el laboratorio de inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UANL.

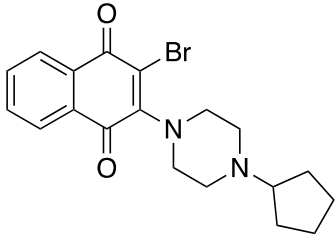
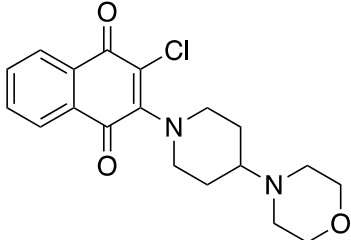
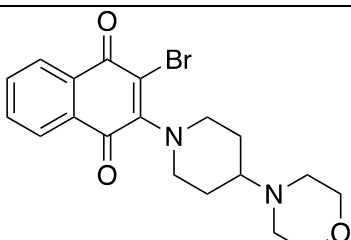
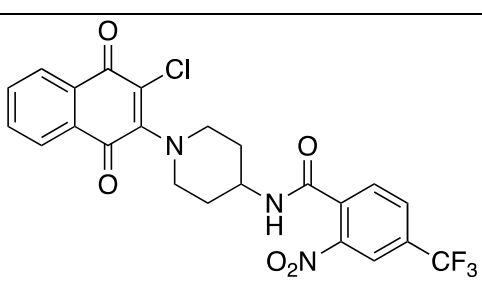
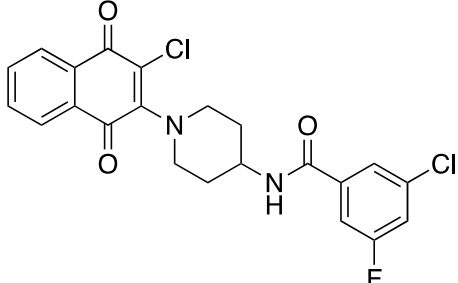
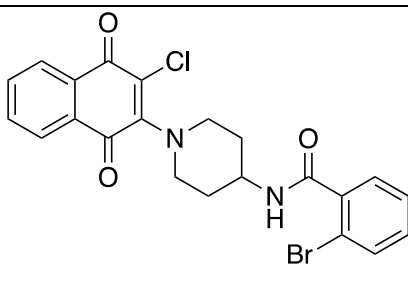
Materiales

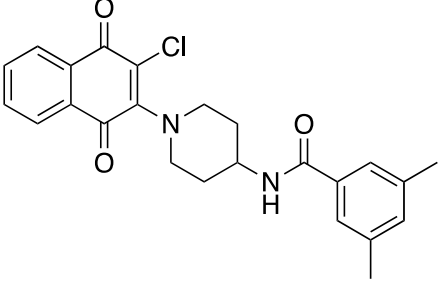
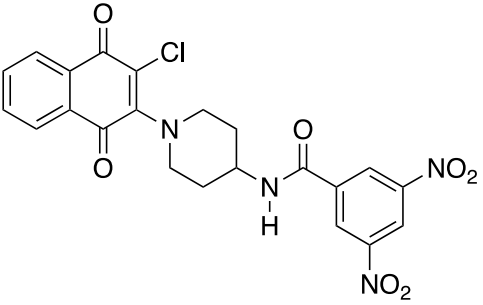
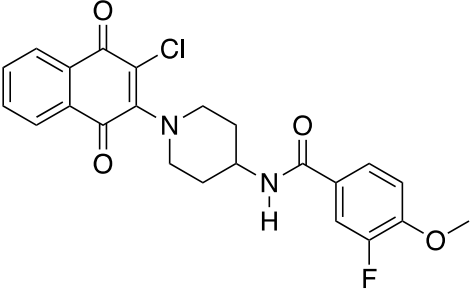
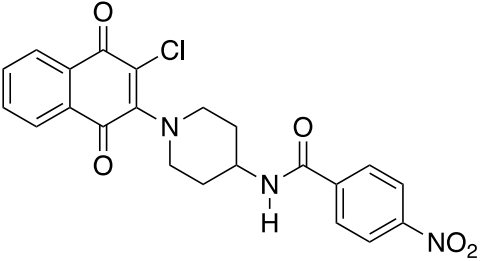
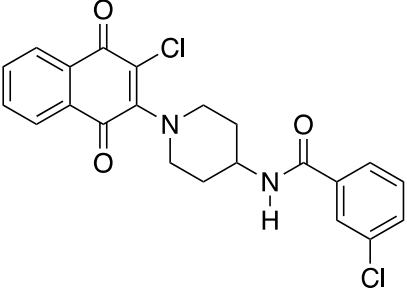
3.2 Síntesis de compuestos derivados de 1,4- aminonaftoquinonas

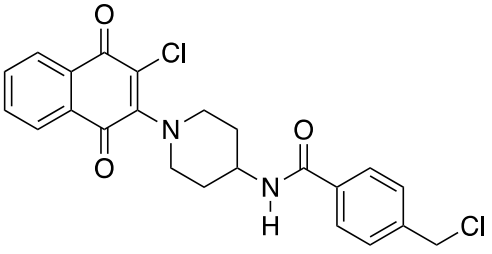
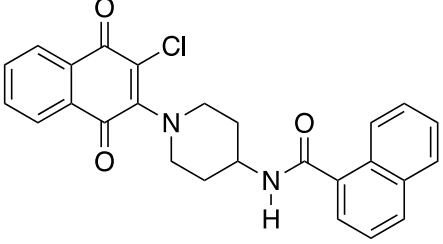
Los compuestos fueron sintetizados por el Departamento de Química Orgánica de las Pontificia Universidad Católica de Chile. Se sintetizaron 19 compuestos nuevos con un grupo amino unido a la estructura quinónica y distintos sustituyentes como el cloro y el bromo.

Tabla I. Descripción de los 19 derivados de 1,4 aminonaftoquinonas

Nomenclatura	Peso molecular (g/mol)	Estructura
MO1	320.77	
MO2	286.33	
MO3	365.23	
MO4	344.84	
MO5	310.40	

MO6	389.29	
MO7	360.84	
MO9	405.29	
MO10	507.85	
MO11	447.29	
MO12	473.75	

MO13	429.30	
MO14	484.85	
MO15	442.87	
MO16	439.85	
MO17	429.30	

MO18	443.32	 <chem>ClC1=CC=C(C=C1)C(=O)N2CCN(C2)c3c(Cl)c(=O)c4ccccc43=O</chem>
MO19	444.92	 <chem>c1ccc2ccccc2c1C(=O)N3CCN(C3)c4c(Cl)c(=O)c5ccccc54=O</chem>

3.3 Soluciones Stock y diluciones de los compuestos derivados de 1,4-aminonaftoquinona

Los compuestos fueron proporcionados en estado sólido, posteriormente se prepararon soluciones Stock, en el cual cada compuesto fue pesado de 2 a 4 mg a evaluar y disueltos en DMSO para obtener una concentración de 24 μ M. posteriormente fueron utilizada las diluciones seriadas a concentraciones de 200 μ m, 100 μ m, 50 μ m, 20 μ m, 10 μ m hasta alcanzar una concentración final menor del 1 % en DMSO, una concentración no tóxica para células de parásitos ni mamíferos (reather et al, 1988).

3.4 Cultivo de Parásitos

Se utilizaron dos cepas mexicanas de *Trypanosoma Cruzi*, un aislado de la Cepa INC-5 y la cepa NINOA donadas por el Departamento de Parasitología de la ENCB-IPN.

CEPA	ORIGEN
INC-5	Aislado de un paciente crónico del Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México.
NINOA	Aislado de paciente de 9 años cursando por la etapa aguda de la enfermedad. Estado de Oaxaca, México.

3.5 Condiciones de Cultivo de Epimastigotes

Para el cultivo de epimastigotes ambas cepas se mantuvieron en un medio de cultivo anéxico compuesto por un caldo de infusión cerebro corazón (BHI) 89%, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 1% de estreptomina con penicilina del laboratorio GIBCO en una incubadora a 28°C.

3.6 Mantenimiento de Tripomastigotes

Los tripomastigotes sanguíneos fueron cultivados alrededor de 4 semanas en ratones CD1 de 6 a 8 semanas de edad esperando un alta parasitemia para después extraer la sangre por punción cardiaca utilizando heparina sódica como anticoagulante. Los experimentos con animales se llevaron de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidados y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) publicada el 22 de agosto del 2009.

3.7 Cultivo Celular

3.7.1 Macrófagos murinos J774

La línea celular de macrófagos murinos J774 fueron mantenidas en medio RPMI (Sigma Aldrich) con suero fetal bovino al 8% a 37 °C en un frasco de cultivo de 25 cm³, usando un incubador de cultivo celular bajo una atmósfera húmeda 95% y 5% de CO₂.

3.7.2 Hepatocitos murinos Bpcr1

La línea celular utilizada se cultivó en condiciones óptimas para el crecimiento, es decir, las células se mantuvieron a una temperatura de 37 ° C, humedad relativa de $\approx 82\%$, atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ en una incubadora con atmósfera de CO₂ (Thermo Scientific). Se utilizaron los medios de cultivo recomendados (GIBCO®) suplementados con penicilina / estreptomicina (GIBCO®) y suero fetal bovino (SBF, GIBCO®). El mantenimiento de la línea celular utilizada se realiza de acuerdo con la información proporcionada por la guía ATCC correspondiente.

El DMSO y el RPMI, utilizados para las técnicas de cultivo celular fueron adquiridos comercialmente de la marca Sigma Aldrich, la tripsina y el Pen Strep (penicilina/estreptomicina) fueron de la marca Gibco.

Para la lectura de las microplacas utilizadas en las técnicas de cultivo celular se utilizó un espectrofotómetro marca Stat Fax 4200 utilizando una longitud de onda de 545, 630 nm.

Métodos

3.8 Ensayo *in vitro* en Epimastigotes

Para la evaluación de actividad tripanocida *in vitro* se realizó primero un screening inicial con el fin de determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento de los epimastigotes y determinar si existía actividad biológica por parte de los compuestos derivado de 1-4 amino naftoquinonas. Se utilizaron los cultivos de parásitos en fase exponencial de las cepas INC5 y NINOA, para contabilizar el número de epimastigotes se tomaron 10 μm del cultivo se colocaron en una cámara de Neubauer con el objetivo de determinar una concentración inicial de 1×10^6 células/ml. Los compuestos fueron ensayados a partir de una concentración de 10 μm en una placa de 96 pocillos donde se colocaron 296 μm del medio con parásitos y 5 μm del compuesto, cada compuesto, blanco de esterilidad y fármacos de referencia utilizados fueron probados por triplicado e incubados a 28°C para después ser medidos tanto el día 0 como el día 5 de inoculación en un

espectrofotómetro a una absorbancia de 630 nm. Después de la lectura del día 5 se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y aquellos compuestos que obtuvieron un valor mayor del 70% se utilizaron para obtener la concentración inhibitoria media (IC_{50}).

El porcentaje de inhibición de crecimiento fue calculado con la sig. formula:

$PIC = \{1 - (ABS\ p5 - ABS\ p0 / ABS\ b5 - ABS\ b0)\} * 100$, donde:

- P5: Absorbancia problema día 5
- P0: Absorbancia problema día 0
- ABS b5: Absorbancia blanco día 5
- ABS b0: Absorbancia blanco día 0

Para la determinación de la inhibición de crecimiento del 50 % de la población de parásitos se probaron los compuestos con mejor PIC a diferentes diluciones seriadas y con un porcentaje final de DMSO menor al 1%, se colocaron 3 controles, un control de parásitos con medio de cultivo, un control de parásitos con DMSO y un control de medio de cultivo sin parásitos como blanco de esterilidad, se utilizó también el nifurtimox (nfx) como fármaco de referencia todos fueron probados por triplicado. para obtener el IC_{50} se realizó la medición de absorbancia al día 0 y al día 5 de inoculación y los datos de cada concentración fueron calculados con la misma fórmula de PIC y analizados en el programa Origin lab 8 SROv8.0724.

3.8.1 Evaluación *Ex vivo* de tripomastigote

Para la evaluación *ex vivo* se obtuvo sangre por punción cardíaca de ratones CD1 infectados con la cepa INC5 y NINOA con altas parasitemias, para la extracción de la sangre se utilizó heparina como anticoagulante y solución salina fisiológica estéril para diluir la sangre a una concentración de 1×10^6 tripomastigotes sanguíneo/mL.

Se realizaron diluciones seriadas de los 19 compuestos utilizando DMSO como solvente sin exceder el 2.5% de DMSO en concentración final a 20 μm , 10 μm y 5 μm .

En las placas de 96 pocillos se colocaron 195 μL de sangre con parásitos y 5 μL de los compuestos derivado de 1,4 amino naftoquinonas y las diluciones de los fármacos de referencia Bnz y Nfx, cada pocillo alcanzo un volumen final de 200 μL y se realizó por triplicado, la placa se incubo durante 24 horas a 4° C.

La reducción en el número de tripomastigotes que indican la lisis parasitaria se determinó a través de un microscopio óptico usando el método de Brener-Pizzi, se colocaron 5 μL de sangre de ratones infectados en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de 13 x 13 mm, se contabilizaron 15 campos microscópicos utilizando un objetivo de 40x y se determinó el porcentaje de lisis haciendo una comparación en la cuenta de la cantidad de tripomastigotes sanguíneos móviles en el control negativo en este caso sangre infectada sin tratamiento contra sangre tratada . La actividad tripanosomicida fue expresada como concentración lítica del 50% de la población de parásitos (CL_{50}) y se utilizó la herramienta de regresión lineal. (Chacón Vargas et al; 2017).

Evaluación de Citotoxicidad

3.9 Evaluación de citotoxicidad en macrófagos murinos

La citotoxicidad celular fue determinada mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio (MTT) para la evaluación de la función mitocondrial (Mosmann, 1983). Para esta evaluación se utilizaron solo los compuestos con mejores resultados dentro de la evaluación *ex vivo* en tripomastigote, en una placa de 96 pocillos se sembraron 50 mil células de macrófagos J774 por pocillo durante 24 horas en una atmósfera de 37 °C al 5% de CO₂. Después de cumplirse el lapso de 24 h se retiró el medio en el cual estaban los macrófagos murinos y se adicionaron 95 µl de medio nuevo y 5 µl de los distintos compuestos de 1,4 amino naftoquinonas , además se adicionaron pocillos controles , como control positivo se utilizaron macrófagos con medio de cultivo, macrófagos sin medio de cultivo como control positivo y como fármaco de referencia el nfx cada pocillo fue preparado por triplicado en concentraciones decrecientes desde 20 µm, hasta 1.25 µm , se realizaron 3 réplicas independientes y se dejó incubar durante 24 h.

Después de las 24 h de incubación el medio de cultivo fue retirado se hicieron al menos 3 lavados con PBS con el fin de asegurar que no quedaran restos de los compuestos ni células muertas.

Se adicionaron a los pocillos la solución MTT 0.1 mg/ml en 200 µm de PBS estéril y se dejó actuar durante 3 h a 37° C, luego el MTT y el PBS se eliminaron y se reemplazaron por 200 µl de DMSO (Sigma-Aldrich), para disolver los cristales de formazán, incubándolos durante 30 minutos. La lectura de la placa fue a una longitud de onda de 570 nm en un lector Elisa Epoch (Epoch 2 Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU. Los resultados fueron expresados como porcentaje de citotoxicidad.

Para el porcentaje de cada compuesto se utilizó la siguiente formula:

%Citotoxicidad: $(100 - (\text{promedio de células con tratamiento} / \text{células sin tratamiento}) * 100)$

3.9.1 Evaluación de Viabilidad en Hepatocitos BpRc1

Durante esta evaluación se utilizó la metodología descrita por Tang et al 2006, se estimó la viabilidad celular por medio del ensayo espectroscópico con rojo neutro, se prepara la dilución stock de rojo neutro (0.01 g/ml) en agua destilada, las células se cultivan en la placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas con medio RPMI con el fin de alcanzar una confluencia de 70% , pasado el lapso de 24 h se añadieron las distintas diluciones de los compuestos , reemplazo el medio por 100 μL del medio de crecimiento con 50 μl de rojo neutro y se incubo la placa a 37°C durante 3 h, después se removió el medio y se realizaron distintos lavados con etanol al 50% para remover cualquier rastro de colorante y las placas se leyeron a 540 nm .

El porcentaje de células viables en la población celular cada concentración de los compuestos ensayados se calculó por medio de la siguiente formula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Abs promedio de las células tratadas}}{\text{Abs promedio de las células control}} \times 100$$

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de ANOVA para la prueba in vitro con la ayuda del programa estadístico Origin Pro8 para evaluar los resultados de la prueba in vitro y determinar si existía diferencia entre tratamientos.

En la evaluación ex vivo con tripomastigote se utilizó el modelo probit de regresión donde la variable dependiente fueron las distintas concentraciones y la variable independiente el resultado de CL_{50} y se llevó a cabo con las herramientas de Excel.

5 RESULTADOS

5.1 Evaluación *in vitro* en epimastigote

Inicialmente se realizó un screening inicial para determinar si los derivados de 1-4 aminonaftoquinonas tenían actividad tripanosomicida y aquellas que obtuvieron niveles mayores a 70% de porcentaje de inhibición de crecimiento fueron seleccionadas para realizar el ensayo y determinar la concentración inhibitoria del 50% de los parásitos (IC₅₀).

El screening inicial se realizó en ambas cepas con una concentración de 10µm con un porcentaje de DMSO menor al 1% el cual no altera el compuesto y por lo tanto no interfiere con los resultados obtenidos, cada compuesto fue realizado por triplicado, se utilizó el nifurtimox como fármaco de referencia.

Dentro de los 19 compuestos derivados de naftoquinonas se presentaron buenos resultados (Tabla II) ante las formas de epimastigote de *T.cruzi* la mayoría de los compuestos en ambas cepas mostraron tener actividad biológica a excepción del compuesto MO2 y MO8 que mostraron porcentajes por debajo de 70% PIC, MO2 con porcentajes menores en ambas cepas INC-5 y NINOA, el compuesto MO8 solo en INC-5 fue menor con un resultado de 64%.

Tabla II. Porcentaje de inhibición de crecimiento en epimastigote de *T.cruzi*

Representación de los porcentajes obtenidos en la evaluación inicial de los compuestos derivados de 1,4-

Clave del Compuesto	INC-5 % PIC	NINOA % PIC
M01	95	80
M02	72	65
M03	100	100
M04	84	100
M05	93	100
M06	95	100
M07	100	100
M08	64	68
M09	89	92
M010	78	90
M011	90	100
M012	100	100
M013	96	86
M014	100	100
M015	87	98
M016	98	96
M017	100	96
M018	100	100
M019	100	98

aminonaftoquinonas sobre las cepas INC-5 y NINOA. El ensayo comprobó la existencia de actividad biológica a una concentración de 10 μm y se comparó con el medicamento de referencia nfx.

5.2 Resultado de Ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento del 50% de la población de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para la prueba *in vitro* IC₅₀ igual que para el PIC, el ensayo se realizó a partir de una concentración inicial de 24 mM para obtener 5 concentraciones de forma descendente 10 μm, 5μm, 2.5μm, 1.25μm, 0.625μm , se colocaron pocillos con DMSO, se colocaron controles con medio fresco con parásitos, parásitos con PBS y como fármaco de referencia se utilizó en nfx que actualmente es el tratamiento de elección disponible en el mercado farmacéutico; esta evaluación se llevó a cabo en dos cepas mexicanas INC-5 y NINOA.

En esta evaluación el grupo de 1,4-aminonaftoquinonas en interacción con los parásitos se aprecia una diferencia significativa entre el día 1 y el día 5 de evaluación, así como la diferencia entre las diferentes concentraciones, lo que nos indica que existe un efecto dosis-respuesta, a mayor concentración de los compuestos menor era la viabilidad que muestran los parásitos.

Se observan diferencias entre cepas la cepa INC-5 muestra un poco más de resistencia a los compuestos en comparación con la cepa NINOA, el compuesto MO8 fue de los menos activos (7.45μM ,8.45μM) en ambas cepas a comparación del nfx, entre los más sobresalientes en la cepa NINOA se encuentran (Tabla III) MO4(0.426μM) y MO19(0.434μM) que en comparación con el fármaco de referencia resultaron tener mejor actividad durante esta evaluación , en cuanto a la cepa INC-5 que mostro ser un poco más resistente los compuestos con mejor actividad tripanosomicida fueron MO4 (0.189μM), MO17(1.14μM) y MO19(0.924μM) en comparación con los resultados obtenidos con nfx (4.89μM).

Tabla III. Resultados de ensayo *in-vitro* en epimastigote

Clave del Compuesto	NINOA IC₅₀ (μM)	INC5 IC₅₀ (μM)
MO1	1.101 ± 0.05	2.984 ± 0.2
MO2	1.101 ± 0.12	3.06 ± 0.01
MO3	1.138 ± 0.06	2.22 ± 0.04
MO4	0.426 ± 0.15	0.189 ± 0.07
MO5	1.12 ± 0.04	5.038 ± 0.26
MO6	1.15 ± 0.09	1.456 ± 0.03
MO7	6.4 ± 0.02	6.6 ± 0.08
MO8	7.05 ± 0.95	8.45 ± 0.35
MO9	10.12 ± 0.05	1.739 ± 0.02
MO10	1.098 ± 0.01	3.35 ± 0.05
MO11	3.549 ± 0.02	2.57 ± 0.04
MO12	6.408 ± 0.02	2.46 ± 0.08
MO13	4.452 ± 0.06	5.6 ± 0.03
MO14	0.99 ± 0.01	1.84 ± 0.06
MO15	0.845 ± 0.11	1.345 ± 0.01
MO16	0.768 ± 0.21	2.234 ± 0.06
MO17	0.525 ± 0.04	1.14 ± 0.07
MO18	1.25 ± 0.06	2.3 ± 0.11
MO19	0.434 ± 0.03	0.924 ± 0.01
Nfx	4.46 ± 0.01	4.98 ± 0.06

Los datos muestran el IC₅₀ obtenido por los compuestos derivados de 1,4 aminonaftoquinonas a diferentes concentraciones al interactuar con epimastigotes de *Trypanosma cruzi*.

5.3 Evaluación *ex vivo* de tripomastigote en cepas INC-5 y NINOA.

Para esta evaluación se descartaron los compuestos que hayan presentado poca actividad durante el ensayo *in vitro* con epimastigotes los cuales fueron MO7, MO8 y MO12. La finalidad de este ensayo es obtener la Concentración letal del 50% de los parásitos, en este caso se utilizó sangre fresca de ratones infectados con las cepas INC-5 y NINOA de *T.cruzi*, se utilizaron controles con DMSO en un porcentaje menor al 2% en la concentración final, esto para asegurar que no existiera interferencia con los resultados obtenidos, como fármaco de referencia se utilizó Nifurtimox (nfx) y Benznidazol (bnz) , la placa tuvo un periodo de incubación de 24 h a 4°C.

El valor de CL₅₀ se determinó utilizando el método Probit trazando el porcentaje de reducción contra el logaritmo de la concentración del compuesto. Los resultados muestran en el caso de la cepa INC-5 el bnz obtuvo un CL₅₀ de 85.62 µg/mL y el nfx 68.92 µg/mL, el compuesto MO19 mostro mejor eficacia ante los medicamentos de referencia con un CL₅₀ de 59.73 µg/mL, el resto de los compuestos requerían concentraciones más altas que los fármacos de referencia.

En el caso de la cepa NINOA se observaron mayor actividad tripanocida de los compuestos derivados de 1,4-aminonaftoquinonas entre las cuales destacan (Tabla IV) MO14 (70.86 µg/mL), MO15 (78.56 µg/mL) y MO17 (68.35 µg/ml) que se encuentran por debajo de la concentración lítica del 50% que presentan en nifurtimox (89.11 µg/mL) y benznidazol (149.32µg/mL).

Tabla IV: Resultados de concentración lítica del 50% de tripomastigotes.

Clave del Compuesto	INC-5 CL ₅₀	Desv Est	NINOA CL ₅₀	Desv Est
MO1	>100	7.5	161.33	3.23
MO2	>100	6.32	186.79	6.74
MO3	>100	4.3	146.62	2.89
MO4	>100	3	113.67	3.01
MO5	87.34	5.32	151.25	4.52
MO6	>100	6.41	97.86	2.13
MO10	>100	3.36	90.45	6.58
MO11	>100	9.4	154.31	5.21
MO14	98.56	8.2	70.86	7.31
MO15	94.65	5.21	78.57	3.91
MO16	>100	4.13	80.32	4.03
MO17	>100	2.65	68.35	6.3
MO18	>100	1.29	105.97	5.31
MO19	59.73	3.72	98.06	8.9
NFX	68.92	2.63	89.11	3.3
BNZ	85.62	4.23	149.32	7.02

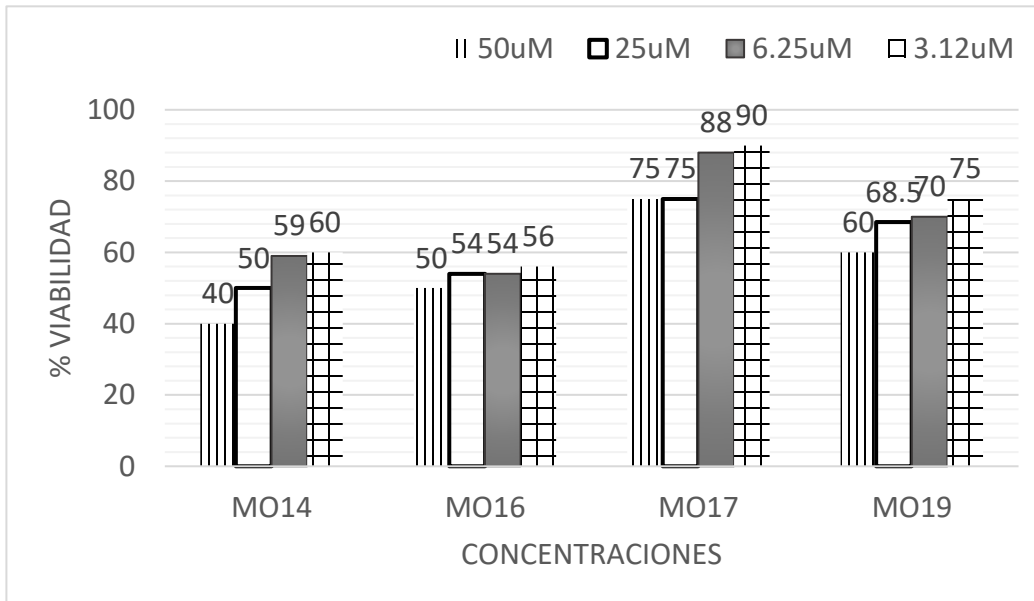
Se muestran los valores de concentración lítica del 50 % de tripomastigote de *Tripanosoma Cruzi* cepa NINOA y INC-5, se muestra la actividad sobre el parásito contra los fármacos de referencia

5.4 Porcentaje de viabilidad en Hepatocitos BpRc1

Con los resultados obtenidos durante el ensayo en tripomastigote se comprobó que algunos compuestos mostraron buena actividad tripanocida en comparación con los fármacos de referencia, con los compuestos MO14, MO15, MO17 y MO19 se decidió realizar la prueba de citotoxicidad para evaluar si son generadores de toxicidad en células del huésped.

La viabilidad se evaluó por el método de rojo neutro con hepatocitos murinos BpRc1 se utilizaron distintas concentraciones y se dejó incubar la placa durante 24 horas, en la tabla (Tabla V) se presentan la viabilidad de los compuestos y se observa como la viabilidad varía dependiendo la concentración del compuesto y que existen diferencias entre compuestos, se observa como el compuesto MO17 alcanza el 90% de viabilidad en su concentración más baja 3.12 μM y en su concentración más alta 50 μM obtiene un 75% de viabilidad lo que es un buen resultado considerado que es equivalente a una citotoxicidad baja, otro compuesto con buenos resultados fue el MO19 que mostro en su concentración más baja 3.12 una viabilidad del 75%.

Tabla V. Porcentaje de viabilidad en Hepatocitos BpRc1



La grafica muestra el resultado de la evaluación de viabilidad en una línea celular de hepatocitos BpRc1 de los 4 compuestos derivados de 1,4 aminonaftoquinonas a distintas concentraciones.

5.5 Citotoxicidad en macrófagos murino J774.

Para que un compuesto con capacidades biológicas sea considerado como un prospecto para fármaco es necesario que pase por distintas evaluaciones , una de ellas es la prueba de citotoxicidad con el fin de determinar si tienen algún potencial toxico en las células huésped, para ello se cultivaron y mantuvieron células de macrófagos murinos J774 en las cuales se probaron 4 compuestos que fueron elegidos por sus resultados sobresalientes en las evaluaciones de epimastigote y tripomastigote de *T.cruzi*. se seleccionaron los compuestos MO14, MO15, MO17, MO19 y como fármaco de referencia nifurtimox, se probaron en 5 distintas concentraciones 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.125 μ M para determinar la CC₅₀. Los resultados obtenidos (Tabla VI) muestran resultados semejantes entre las moléculas a diferencia del nifurtimox que tiene un CC₅₀ a una concentración más alta.

Tabla VI. Resultados de evaluación de citotoxicidad de derivados de 1,4 aminoaftoquinoas en una línea celular de macrófagos murinos.

Compuesto	CC ₅₀ (μ M)
MO14	25
MO15	22
MO17	25
MO19	33
Nfx	316

Se muestra la concentración citotóxica a la que los compuestos causan el 50% de muerte celular.

5.6 Índice de Selectividad

La relación entre el CC_{50} y el IC_{50} permite establecer el índice de selectividad el cual es un indicador de la cantidad que es posible concentrar un compuesto y que ejerza una actividad inhibitoria tripanocida sin llegar a ser toxico para las células del huésped. De los 4 compuestos que fueron evaluados el que obtuvo el mayor índice de selectividad fue el MO19 (IS=76) que es similar al Nfx (IS= 70), los otros tres compuestos obtuvieron índices de selectividad más bajos que el fármaco de referencia para esta evaluación.

Tabla VII. Índice de selectividad basada en la relación CC_{50}/CI_{50}

Clave del compuesto	IC_{50} epimastigote (μM)	CC_{50} Macrófagos JJ74 (μM)	IS
MO14	0.99	25	25
MO15	0.845	22	26
MO17	0.525	25	47
MO19	0.434	33	76
Nfx	4.46	316	70

Se muestran los valores obtenidos de la relación entre la CC_{50} y el IC_{50} de los 4 compuestos seleccionados y el fármaco de referencia obtenido durante las evaluaciones

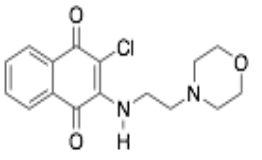
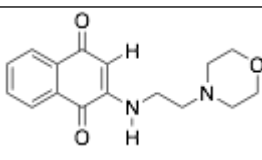
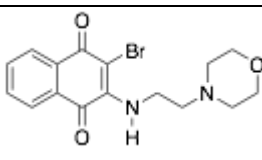
6 DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América, más de 6 millones de personas viven actualmente con esta enfermedad y se estima que se producen 28.000 nuevos casos cada año (OMS; 2019) la gran mayoría de las personas desarrollan un curso crónico de la enfermedad lo que se traduce en un costo de tratamiento de hasta 12.000 dólares por paciente, además la quimioterapia específica existente nifurtimox y benznidazol resultan tóxicos en la fase crónica, por esto es indispensable la búsqueda de nuevas moléculas con actividad tripanocida.

En esta investigación se evaluaron 19 nuevos derivados de 1,4 aminonaftoquinonas, los derivados tienen diferentes sustituyentes adicionados a la estructura quinónica como el bromo y el cloro además de tener un grupo amino, con la finalidad de reconocer que modificaciones funcionaron mejor durante esta investigación se agruparon por sus características estructurales en 4 series de compuestos. Se realizaron distintos ensayos con 2 estadios del parásito, por lo cual se necesitaron distintas metodologías.

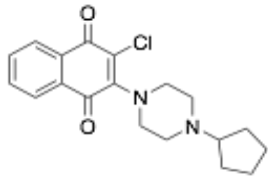
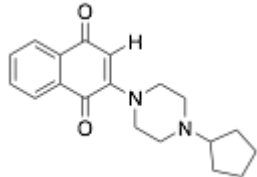
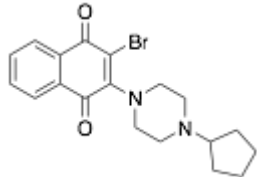
Los resultados obtenidos mostraron una tendencia dosis- respuesta principalmente, en la evaluación *in vitro* la mayoría de los compuestos tuvieron una actividad biológica buena contra el estadio epimastigote, dentro de los compuestos agrupados en la serie I (tabla VIII) se puede observar que los 3 compuestos mostraron una actividad biológica de IC_{50} similares entre sí, el Cl anclado a la estructura quinónica en el compuesto MO1 ($IC_{50} = 1.101\mu M$) en cepa NINOA favorece su actividad tripanosomicida superando el resultado del nfx ($4.46\mu M$).

Tabla VIII. Compuestos de la serie I

Compuesto	Estructura	IC ₅₀ μM NINOA	IC ₅₀ μM INC-5
MO1	 <chem>O=C1C(Cl)=C(NCCN2CCOCC2)C(=O)C1c3ccccc3</chem>	1.101 0.05	2.984±0.02
MO2	 <chem>O=C1C=C(NCCN2CCOCC2)C(=O)C1c3ccccc3</chem>	1.101±0.12	3.06±0.01
MO3	 <chem>O=C1C(Br)=C(NCCN2CCOCC2)C(=O)C1c3ccccc3</chem>	1.138±0.06	2.22±0.04

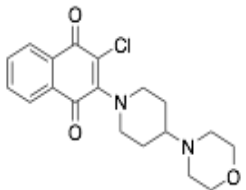
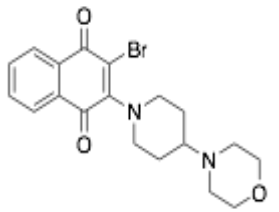
En los derivados de la serie II se agrupan las moléculas MO4, MO5 y MO6, los resultados mostrados en la cepa NINOA muestran que el compuesto MO4(0.426 μ M) tuvo un resultado sobresaliente en comparación con el fármaco de referencia y mostró tener mejor actividad durante esta evaluación, en cuanto a la cepa INC-5 que es un poco más resistente el compuesto con mejor actividad tripanosomicida fue el MO4 (0.189 μ M), esto puede deberse a la presencia del grupo Cl unido a la estructura quinónica.

Tabla IX. Compuestos de la serie II

Compuesto	Estructura	IC ₅₀ μ M NINOA	IC ₅₀ μ M INC-5
MO4		0.426 \pm 0.15	0.189 \pm 0.07
MO5		1.12 \pm 0.04	5.038 \pm 0.26
MO6		1.15 \pm 0.09	1.456 \pm 0.03

En la tabla X se puede observar que la presencia de los halógenos Cl y Br en comparación con el efecto en ambas cepas estos dos compuestos no tienen mejor actividad tripanosomicida que el nfx(4.46 μ M), sin embargo entre ellas el compuesto MO7 resultó tener mejor actividad que el compuesto M09 probablemente por el sustituyente Cl.

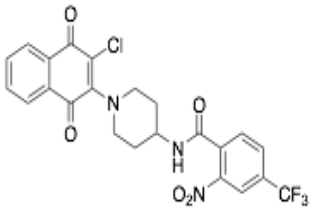
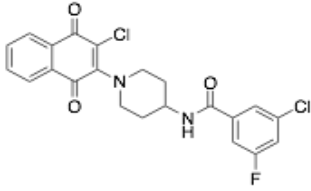
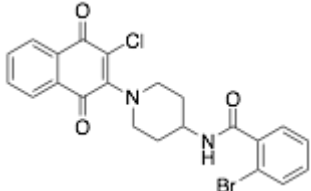
Tabla X. Compuestos de la serie III

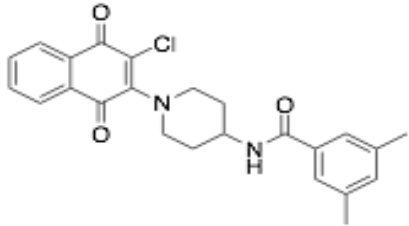
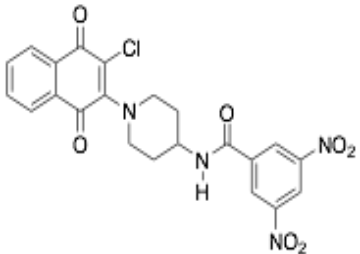
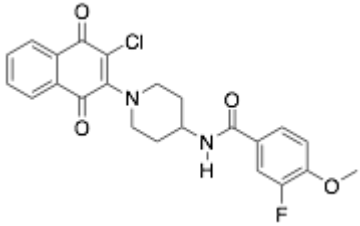
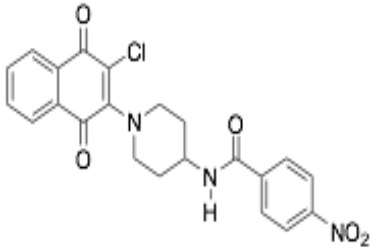
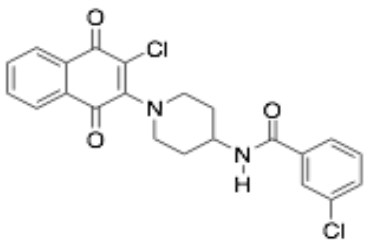
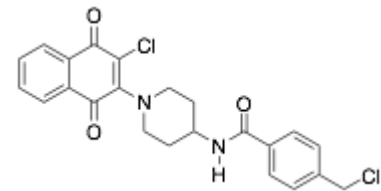
Compuesto	Estructura	IC ₅₀ μ M NINOA	IC ₅₀ μ M INC-5
MO7		6.408 \pm 0.02	6.6 \pm 0.08
MO9		10.12 \pm 0.05	1.739 \pm 0.02

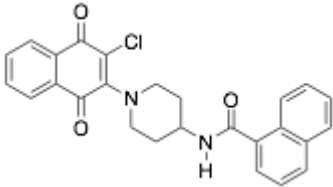
La serie IV agrupa a los compuestos que en ambas cepas obtuvieron los mejores resultados en la cepa NINOA, se presentan compuestos con mejores resultado incluso que el fármaco de referencia nfx (4.46 μ M) siendo el MO19 el compuesto que destaco con la mejor actividad biológica de IC₅₀ (0.434 μ M), donde el grupo cloro se encuentra anclado en el núcleo quinónico y contiene grupo amino,

siguiendo el compuesto MO17 (0.525 μM) como el de segundo de mejor actividad dentro de los 19 compuestos derivados de 1,4-aminonaftoquinonas, que comparte una estructura similar al MO19 solo cambiando posiciones de los grupos sustituyentes. En la cepa INC-5, los 3 compuestos fueron similares entre sí pero equipotentes al nfx, el compuesto que tuvo el mejor IC_{50} fue el Ce-Q11 (1.14 μM) donde en su estructura se encuentra anclado un grupo bromo en el núcleo de la naftoquinona, como en el caso de la evaluación en cepa INC-5, la mejor actividad tripanosomicida fue de nuevo el compuesto MO19 (0.924 μM) por esta razón esta estructura habría sido considerada interesante para seguir modificando y evaluando.

Tabla XI. Compuestos de la serie IV

Compuesto	Estructura	IC_{50} μM NINOA	IC_{50} μM INC-5
MO10		1.098 \pm 0.01	3.35 \pm 0.05
MO11		3.549 \pm 0.02	2.57 \pm 0.04
MO12		6.408 \pm 0.02	2.46 \pm 0.08

MO13		4.452±0.06	5.6±0.03
MO14		0.99±0.01	1.84±0.06
MO15		0.845±0.11	1.345±0.01
MO16		0.768±0.21	2.234±0.06
MO17		0.525±0.04	1.14±0.07
MO18		1.25±0.06	2.3±0.11

MO19		0.434±0.03	0.924±0.01
------	---	------------	------------

Esta evaluación nos permitió ver que estas modificaciones a las estructuras favorecían la actividad tripanosomicida durante el ensayo *in vitro* al contrario de lo que se pudo observar en la evaluación *ex vivo* con tripomastigote donde solo 4 compuestos MO14, MO15, MO17, MO19 tuvieron actividad sobresaliente al resto de las moléculas, inclusive mejor que los fármacos de referencia utilizados. Esto puede deberse a las diferencias entre los modelos biológicos de epimastigotes y tripomastigotes, las evaluaciones para tripomastigote necesitan concentraciones más altas debido a la interacción de los derivados no solo con el parasito si no con los demás componentes sanguíneos. Se ha reportado previamente que existen diferencias de susceptibilidad a los fármacos por partes de diversas cepas de *T. cruzi* (León-Pérez *et al.*, 2007); Se observó que las cepas mexicanas, las cuales ya se ha demostrado que pertenecen al TcI (Gómez-Hernández *et al.*, 2011), presentaron mayor resistencia a los fármacos frente a cepas con linaje TcII.

Es importante tener en cuenta que en la búsqueda de nuevo compuestos tripanosomicidas es necesario que cuenten con baja toxicidad en las células del huésped, ya que aun y si los compuestos tienen actividad sobre el parasito, pero alta toxicidad en el huésped no tendrá relevancia como agentes terapéuticos. Bajo estas condiciones se realizaron las evaluaciones citotóxicas en dos líneas celulares, hepatocitos murinos ya que el objetivo es crear un fármaco y el principal órgano que interfiere en el metabolismo de estos es el hígado, y en macrófagos murinos por ser la primera línea celular de defensa contra el parásito al momento de entrar al organismo. Los resultados obtenidos en hepatocitos murinos muestran que a

mayor concentración más alta es la citotoxicidad que se presenta, en el caso de la molécula MO19 se obtuvo una toxicidad del 40% para la concentración más alta del compuesto (50 μM), y para su concentración más baja (3.125 μM) una citotoxicidad de 25%.

En el caso de la línea celular de macrófagos murinos el compuesto con el CC50 más alto fue el MO19 (33 μM) pero en comparación con el nfx (316 μM) estuvo muy inferior en los resultados. Esta evaluación fue utilizada para obtener el índice de selectividad, en el cual la molécula más sobresaliente fue la MO19 (IS =70), lo que indica una mayor selectividad por el parásito.

7 CONCLUSIÓN

De nuestro set de 19 derivado de aminoftoquinonas la mayoría tuvo actividad durante el ensayo *in vitro* en epimastigote incluso con mejores resultados que el fármaco de referencia nifurtimox.

En el caso de la evaluación *ex vivo* 4 compuestos mostraron actividad sobresaliente, en este caso fueron para la cepa NINOA el compuesto MO14, MO15, MO17 y para la cepa INC-5 el compuesto MO19.

Se observó la diferencia entre estadios e incluso entre ambas cepas, Esto nos indica como la variabilidad genética del propio parásito está altamente involucrada en la elección de terapias farmacológicas en busca del control de la enfermedad de Chagas.

En general estos resultados proporcionaron información útil sobre las características estructurales que se pueden seguir desarrollando para nuevos derivados y que podrían tomarse en cuenta para la experimentación y desarrollo de nuevos fármacos tripanosomicidas.

8 PERSPECTIVAS

1. Es necesario continuar con los ensayos sobre los compuestos que muestren mejor actividad tripanosomicida, así como una baja citotoxicidad en células de mamífero.
2. Los compuestos probados nos dan una orientación sobre cómo podrían surgir nuevas estructuras de derivados de naftoquinonas con la posibilidad de que posean mejor actividad sobre *T. cruzi*.
3. Realizar nuevas evaluaciones sobre estos mismos compuestos como curva de tiempo, citometría de flujo o alguna otra evaluación nos darían más información sobre estos compuestos y un posible mecanismo de acción.
4. Continuar con un ensayo *in vivo* nos dará una mejor orientación sobre el funcionamiento de los compuestos y su potencial como fármaco.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Acosta N, López E. (2013) Mammalian reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 11(2) 90-96

Argüello RJ, Albareda MC, Alvarez MG, Bertocchi G, Armenti AH, Vigliano C, Meckert PC, Tarleton RL, Laucella SA. (2012) Los receptores inhibitorios se expresan mediante células T efectoras específicas de *Trypanosoma cruzi* y en corazones de sujetos con enfermedad de Chagas crónica. (7) 125-142

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Jr, Marin JA, Neto, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. (2007) Evaluación y tratamiento de la enfermedad de Chagas en los Estados Unidos: una revisión sistemática. JAMA (298): 2171–2181

Bolognesi ML, Lizz, Perozzo R, Brun R, Cavalli A. (2008). Synthesis of a small library of 2-phenoxy-1,4-naphthoquinone and 2-phenoxy-1,4-anthraquinone derivatives bearing anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(7), 2272–2276.

Brener Z (2000). Terapêutica experimental na doença de Chagas. En Z Brener, Z Andrade, M Barral-Netto (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2 a ed., Guanabara Koogan, Río de Janeiro, p. 379-388

Cançado JR, Marra UD, Lopes M, Mourão O, Faria CAF, Álvares JM, Salgado AA (1999). Toxicidade and value terapêutico del Bay 2502 en la enfermedad de Chagas en tres esquemas posológicos. Bol Chil Parasitol (24) 28-32

Cerecetto H, Di Maio R, Gonzalez M, Risso M, Sagrera G, Seoane G, Denicola A, Peluffo G, Quijano C, Stoppani AO, Paulino M, Olea-Azar C, Basombrio MA. (2000). Síntesis y evaluación antitripanosómica de E - isómeros de derivados de 5-nitro-2-furaldehído y 5-nitrotiofeno-2-carboxaldehído semicarbazona. Relaciones estructura-actividad. Eur J Med Chem (35) 343-350.

Chacón-Vargas KF, Noguera Torres B, Sánchez-Torres LE., Suarez-Contreras, E. (2017). Trypanocidal activity of quinoxaline 1,4 Di-N-oxide derivatives as trypanothione reductase inhibitors. *Molecules*, 22(2).

De Souza W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*. (4) 1-21

Espinosa-Bustos C, Vázquez K, Varela J, Cerecetto H, Paulino M, Segura R, Pizarro J, Vera B, González M, Zarate AM, Salas C. (2020). New aryloxy-quinone derivatives with promising activity on *Trypanosoma cruzi*. *Arch Pharm Chem Life Sci*. (3) 53:1900213

Da Silva JT, Guimarães R, Menna-Barreto FS. (2015). The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: Synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(9), 3224-3230

Ferreira J, Faúndez M, Galanti N. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146:601-20.

Galaviz silva L., Mercado hernández, R, Zárate-ramos J, Molina-garza, Z. J. (2017). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*, 4–11.

García-jordán, N., Berrizbeitia, M., & Concepción, J. L. (2015). Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomedica*, 35, 247–257.

Gómez-Hernández, Rezende-Oliveira, Martínez-Ibarra J, Trujillo-Contreras F, Silva E. (2011). Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44. 684-90

Hashimoto K, Schofield C. (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit. Vectors*. 5:45

León-Pérez F, Gómez-García L, Alejandre-Aguilar R, López R, Monteón VM. (2007) Mexican *Trypanosoma cruzi* isolates: in vitro susceptibility of epimastigotes to anti-trypanosoma cruzi drugs and metacyclic forms to complement-mediated lysis. *Vector Borne Zoonotic*.7(3):330-6.

Leyva, E. (2016). Importancia química y biológica de naftoquinonas . Revisión bibliográfica, (6).

Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas. Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, PROSICS, Barcelona, España 34(2) 132-138

Molina-Garza Z, Rosales-Encina J, Galaviz-Silva L, Molina-Garza, D. (2007). Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Pública de Mex*, 49:37-44

Pinto, A. V., & De Castro, S. L. (2009). The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. *Molecules*, 14(11), 4570–4590.

Rocha, FL, Roque, AL, de Lima, JS, Cheida, CC, Lemos, FG, de Azevedo, FC, Arrais, RC, Bilac, D., Herrera, HM, Mourão, G. y Jansen, AM (2013) Infección por *Trypanosoma cruzi* en carnívoros salvajes neotropicales (Mammalia: Carnivora): en la parte superior de la cadena de transmisión de *T. cruzi*. *PloS one* .8 (7), e67463.

Royo M (2014) Enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión. Panorama internacional y en México. *Gac Méd Méx*. (150) 78-83

Salas, C. O., Faúndez, M., Morello, A., Maya, J. D., & Tapia, R. a. (2011). Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. *Current Medicinal Chemistry*, 18(1), 144–161.

Salazar PM, Barrera M, Bucio MI. (1989) Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea, primer caso humano en México. *Mex Patol Clin*.36:57-9

Salazar PM, Perera R, Ruiz-Hernández AL, Bucio-Torres MI, Zamora-González C, Cabrera Bravo M.(2009). Chagas Disease as a Cause of Symptomatic Chronic Myocardopathy in Mexican Children. *Pediatr Infect Dis J*.28(11):1011-3

Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M, Alba-Alvarado, Rojo-Medina J. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(3), 6-16

Silva, L. (2015). *Trypanosoma cruzi* -infected *Triatoma gerstaeckeri* (Hemiptera: Reduviidae) from Nuevo Leon, Mexico, and pathogenicity of the regional strain. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 35(3), 372–378.

Sosa-Estani S, Armenti A, Araujo G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B. (2004). Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tióctico. *Medicina (Buenos Aires)*.64:1-6

Sosa-Estani S, Segura EL. (1994) Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines in argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.94(Suppl.1):363-5

Souza D, Carvalho TM, Santos Barrias E. (2008). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*,1-18

Tapia RA, Salas C, Vázquez K, Espinosa-Bustos C, Soto Delgado J, Varela E, Cerecetto H, González M, Paulino M. (2014) Synthesis and biological characterization of new aryloxyindole-4,9-diones as potent trypanosomicidal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*24(16), 3919-3922.

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(8), e1749.

Valencia L, Muñoz DL, Robledo SM, Echeverri F, Arango GJ, Vélez ID. (2011). Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas, *Biomédica* 31:552-9

Vázquez K, Espinosa-Bustos C, Soto-Delgado J, Tapia R. A, Varela J, Birriel E, Salas C. (2015). New aryloxy-quinone derivatives as potential anti-Chagasic agents: synthesis, trypanosomicidal activity, electrochemical properties, pharmacophore elucidation and 3D-QSAR analysis. *RSC Adv.*, 5(80), 65153–65166

WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases, January 2013