



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“QUIMIOTERAPIA DE LA TRIPANOSOMIASIS
AMERICANA”**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

LUIS ANGEL CONTRERAS GUTIERREZ



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado.

PRESIDENTE	Profesor: Lino Joel Reyes Trejo
VOCAL	Profesor: Andrés Navarrete Castro
SECRETARIO	Profesor: Francisco Hernández Luis
1er SUPLENTE	Profesor: Elena Guadalupe Ramírez López
2do SUPLENTE	Profesor: María Eva González Trujano

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 208, Departamento de Química Orgánica
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma De México

Asesor del tema

Sustentante

Dr. Lino Joel Reyes Trejo

Luis Ángel Contreras Gutiérrez

Agradecimientos

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento

En primer lugar tengo que agradecer a mi Madre que siempre estuvo ahí con la palabra adecuada en el momento adecuado, ella fue uno de los alicientes más grandes para que yo sea alguien, ha ella le dedico no solo este esfuerzo sino todo lo que haga en mi vida, se que puedo contar contigo siempre. Tú eres la persona más especial de mi vida, solo te quiero decir Gracias Mamá.

Por otra parte se lo dedico a ustedes que me apoyaron en cada momento de mi carrera, a todos ustedes les agradezco palabras, actos, enseñanzas y su amistad, sin ustedes ahí no hubiera sido lo mismo, gracias Alberto, Mónica, Liliana, Patricia, Jovani, Isabel, Diana.

Además mi agradecimiento va dirigido a Dr. Lino, por todo el apoyo que me brindo dura este proceso y sucesos anteriores, gracias por haberme dado la confianza y la oportunidad de haber pertenecido a su grupo de trabajo.

Yo creo que he terminado una etapa de mi vida y es tiempo de continuar.

“La vida no se acaba hasta que el Mundo se Detiene”

CAPÍTULO 1. Introducción	1
CAPÍTULO 2. Objetivos	3
CAPÍTULO 3. Antecedentes	
3.1 Tripanosomiasis	4
3.2 Vectores y reservorios	6
3.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
3.4 Ciclo Biológico	10
3.5 Clínica de La Enfermedad	11
3.6 Diagnostico	13
3.7 Medicamentos de Uso Clínico	
3.7.1 Nifurtimox	
3.7.1.1 Dosis y Vía de Administración	17
3.7.1.2 Contraindicaciones	17
3.7.1.3 Efectos Secundarios	18
3.7.1.4 Mecanismo de acción	18
3.7.1.5 Indicaciones Terapéuticas	19
3.7.1.6 Toxicidad	19
3.7.1.7 Resistencia parasitaria de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
3.7.2 Benznidazol	
3.7.2.1 Dosis y Vía de Administración	21
3.7.2.2 Contraindicaciones	21
3.7.2.3 Efectos Secundarios	22
3.7.2.4 Mecanismo de acción	22

3.7.2.5 Indicaciones Terapéuticas	22
3.7.2.6 Toxicidad	23
3.7.2.7 Eficacia Clínica	24
3.8 Mecanismo de Resistencia Parasitaria de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.9 Enzimas Blanco	
3.9.1 Tripanotiona Reductasa	28
3.9.1.1 Estructura Secundaria	28
3.9.1.2 Sitio Activo	29
3.9.2 Cruzaina	
3.9.2.1 Estructura Secundaria	31
3.9.2.2 Sitio Activo	31
3.10 Química Computacional dentro del desarrollo de nuevos fármacos	
Antichagásicos	32

**CAPÍTULO 4. Nuevos posibles compuestos para el tratamiento de la
Tripanosomiasis Americana**

4.1 Compuestos con actividad a nivel enzimático	
4.1.1 Inhibidores de Tripanotión Reductasa	
4.1.1.1 Derivados del 5-nitrofurilo	35
4.1.1.2 Derivados de 5-nitrofurano- y 5-nitrotiofen- semicarbazona	37
4.1.1.3 Derivados de 2-Amino-4-clorofenil sulfuros	38
4.1.1.4 2-iminobenzimidazoles	39
4.1.1.5 Fenotiazinas	40
4.1.1.6 Derivados de Clorohexidina	41

4.1.1.7 Derivados Tricíclicos	42
4.1.1.8 Derivados de Quinitrina	43
4.1.1.9 Derivados de Fenilpropanona	44
4.1.1.10 Metabolitos de <i>Alternaria sp</i>	45
4.1.1.11 Complejos Paladio Nitrofurilcarbazonas	46
4.1.1.12 Complejos Platino II	47
4.1.1.13 Productos Naturales	48
4.1.2 Inhibidores de Cruzaina	
4.1.2.1 Dipeptodil- α , β -epoxiesteres	50
4.1.2.2 3'-bromopropiofenontiosemicarbozonas	51
4.1.2.3 Inhibidores con base α -ceto	52
4.1.2.4 Peptidilsulfonas	54
4.1.2.5 Derivados de Isatina	55
4.1.2.6 Aril Ureas	56
4.1.2.7 Análogos de Hidroximetilcetona	58
4.1.2.8 Mercaptometilcetonas	59
4.1.2.9 Inhibidores con base de Oxido Nítrico	61
4.2 Compuestos Nitro-Heterocíclicos.	
4.2.1 Nitrofuranos	
4.2.1.1 N-alquil propenamidas	63
4.2.1.2 5-Nitro-2-furancarbohidrazidas	65
4.2.1.3 Derivados del 5-Nitro-2-furil	66
4.2.1.4 Complejos Metálicos de Re y Ru con Nitrofurilsemicarbozonas	67
4.2.1.5 5-Nitrofurilo Tiosemicarbozonas	69
4.2.1.6 Derivados de Nitrofurano y Nitroimidazol	70

4.2.2 Otros heterociclos	
4.2.2.1 bis-2-5-[4-guanidiofenil] tiofenos	72
4.2.2.2 Derivados de β -lapachona	73
4.2.2.3 1 <i>H</i> -pirazol[3,4- <i>b</i>]piridina	74
4.2.2.4 Derivados de Furaxanos	76
4.2.2.5 5-[<i>N</i> -(3-(5- <i>R</i>)- 1,3,4-Tiadiazolil)] Amino-1-Metil-4-Nitroimidazoles	77
4.2.2.6 Benzofuraxanos	78
CAPÍTULO 5. Análisis de Resultados	80
CAPÍTULO 6. Conclusión	87
Referencias	88

Capítulo 1. Introducción

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi*, la cual afecta tanto a los seres humanos, como a otros mamíferos. Esta enfermedad provoca severas lesiones en diversos órganos, entre ellos al corazón e intestino, por ello, si no es tratada adecuadamente puede ocasionar la muerte.

La distribución geográfica de esta enfermedad comprende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el sur de Argentina.^[1] De acuerdo con las investigaciones realizadas durante las últimas décadas en Sudamérica, se ha generado una reducción significativa de la Tripanosomiasis; pues en el año de 1980 la población infectada constituía 24 millones; mientras que para 1990 disminuyeron las cifras a 16 a 18 millones. Cabe señalar que el último monitoreo realizado en el año 2006 mostraron que sólo existen aproximadamente 9 millones de infectados^[2] además de otros 35 millones de personas en riesgo de contraer la infección. Según los estudios, esta disminución se logró debido a diversos factores como: cambios demográficos, campañas de exterminación de los vectores de dicha enfermedad y a los controles de los donadores de sangre. El estudio de esta parasitosis, se remonta a lo realizado por Carlos Chagas en 1909, donde reporta el primer caso de parasitosis en humanos. En nuestro país el primer caso observado data del año 1940 observado por Mazzotti.^[3]

De acuerdo a lo reportado por la OMS^[4] se conoce que actualmente mueren 43 mil personas por año. México no tiene un número oficial de infectados, pero las investigaciones de Velasco Castrejón^[5] calculan aproximadamente 3 millones de infectados con base en las encuestas seroepidemiológicas. Por otra parte, el investigador Goldsmith^[5] reporta un total de 3.8 millones de infectados.

El tratamiento de esta enfermedad se basa generalmente en la utilización de dos fármacos:

- Nifurtimox. Un derivado del nitrofurano, empleado en la fase aguda de la enfermedad de Chagas, actuando de tal manera que induce un incremento en la velocidad respiratoria y una liberación de H₂O₂ de *Trypanosoma cruzi*

- Benznidazol. Un derivado del 2-nitroimidazol (N-bencil-2-nitroimidazol-1-acetamida), éste compuesto se involucra la interferencia directa en la síntesis de macromoléculas vía enlace covalente y daños a nivel del DNA.

Las líneas de investigación que abarcan el estudio la Tripanosomiasis Americana son extensas, no obstante, la mayoría de los investigadores se han enfocado en el estudio de las propiedades electrónicas de los compuestos antichagásicos encontrando relación entre la actividad tripanocida y la facilidad de reducción de una parte de la molécula, esto se puede observar dentro del mecanismo de acción del Nifurtimox y sus análogos.

Otra línea de investigación constante, es la enfocada al diseño de compuestos selectivos a inhibir la actividad enzimática de: Cruzaina y Tripanotiona reductasa, enzimas esenciales de *Trypanosoma cruzi* en su proceso infeccioso.

Capítulo 2. Objetivos

- Desarrollar una fuente de información de las perspectivas actuales del tratamiento de la Tripanosomiasis Americana, resultado de una revisión bibliográfica actualizada del año 2000 al año 2008.
- Analizar el tratamiento actual de dicha enfermedad basado en el Nifurtimox y Benznidazol, incluyendo tanto sus efectos adversos, como las características que llevaron a estas hacer aprobadas con fármacos en contra de la Tripanosomiasis Americana.
- Determinar el grado de avance dentro de las alternativas de tratamiento de dicha enfermedad, empleando tres líneas de investigación: inhibición de Cruzaina, inhibición de la Tripanotiona Reductasa y compuestos Nitro-heterociclos.

Capítulo 3. Antecedentes

3.1 Tripanosomiasis

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad del Chagas es una protozoosis causada por *Tripanosoma cruzi* que afecta al ser humano y a otras especies de mamíferos. Esta enfermedad causa lesiones cardiacas, así como de otros órganos que pueden causar hasta la muerte ^[6,7]. A Carlos Chagas se le atribuye el descubrimiento de esta enfermedad en los seres humanos, esta aportación se desarrolla posteriormente que Chagas observara la abundancia de los artrópodos hematófagos portadores de la enfermedad, dentro de las viviendas rurales. Este hecho lo motivó a dedicarse al estudio profundo de dicho insecto. Chagas se enfoca a la observación de las heces y encuentra en ellas una gran cantidad de flagelados móviles, lo cual le hizo pensar que se trataba de una fase intermedia de un hemoparasito. Más adelante realizó un experimento que consistió en alimentar a diferentes ejemplares del vector con sangre de animales de laboratorio ^[5], este proyecto se llevo a cabo durante 3 semanas, se analizó la sangre de los hospederos y se descubrió una serie de parásitos similares a los observados en las heces de los insectos. Chagas continuó con sus estudios, reportando contundentemente en 1909 que los parásitos observados en las heces de los insectos, se encontraban en humanos ^[8].

En una revisión del año de 2006 realizada por la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para el combate del Chagas ^[2], se hace evidente la preocupación por la enfermedad por lo que se enfatiza la forma de controlar el crecimiento de los vectores, ya que estos son considerados la principal fuente de transmisión de la enfermedad; conjuntamente se hace hincapié en un análisis adecuado de los donadores de sangre, ya que la transfusión sanguínea es otro forma de contraer dicha enfermedad. Las formas de transmisión menos frecuentes son: el trasplante de órganos, la mordedura de animales y la ingesta de insectos.

En naciones como Argentina, Brasil, Chile y Honduras el control del análisis de sangre es obligatorio, lamentablemente en México y Bolivia esa regulación no existe. Según los especialistas aproximadamente se conoce la existencia de 9 millones de enfermos y otros 35 millones en riesgo de contraer la enfermedad, la mayoría de esta población se ubican en zonas rurales, es por ello, que se ha considerado al Chagas como una enfermedad de la pobreza. Sin embargo existe una extensión de la enfermedad fuera de su zona endémica como son los casos dentro del territorio canadiense y europeo; por lo cual La Organización Mundial de la Salud (OMS) ^[4] ha lanzado una nueva iniciativa con el propósito de erradicar el mal de Chagas para el 2010. La enfermedad de Chagas es endémica de América, y se propaga en regiones desde el sur de los Estados Unidos de América, México, Centroamérica y Sudamérica ^[9].



En México se considera como área endémica de la enfermedad a los territorios ubicados entre los 0 y 2200 m de altura sobre el nivel del mar, lo cual significa dos terceras partes del territorio nacional ^[7].

3.2 Vectores y Reservorios

El vector transmisor de la protozoosis que provoca la enfermedad de Chagas es conocida en México como la chinche besucona; que es un insecto hemíptero perteneciente a la familia *Reduviidae* y a la subfamilia *Triatominae*^[10], agrupados en seis géneros y ciento catorce especies. La distribución de estos es amplia por todo el continente americano desde la 43° latitud norte y los 49° latitud sur, especialmente en zonas tropicales y subtropicales.^[10]

Estos insectos poseen una fisionomía, que comprende primeramente la cabeza, tórax y abdomen; también poseen tres pares de patas que nacen del tórax. La mayoría de los triatominos^[5,11] tienen un par de alas membranosas y dos halterios cuerpo aplanado de color pardo o negro, con colores brillantes alrededor del abdomen, cabeza cónica y una longitud de 1.0 a 6.5 cm.



Dentro de los géneros de importancia epidemiológica en relación a la enfermedad de Chagas destacan los siguientes:

1. *Triatoma infestans*^[5,6] considerado el mayor vector en Argentina , Bolivia, Uruguay y Chile.
2. *Rhodnius prolixus*^[5,6] es la especie más importante en Colombia, Ecuador, Venezuela y gran parte de América central
3. *Pastrongylus megitus* se considera el vector principal en Brasil.

4. Las especies mexicanas ^[10] de mayor importancia son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma longipennis* y *Triatoma picturata*, su nombre popular cambia dependiendo de la zona geográfica. Éstos tienen su hábitat debajo de piedras, cuevas, madrigueras de roedores, y en casa rurales (principalmente construidas de bambú, palma, paja, adobe y madera). Estos insectos son hematófagos ^[10, 11] lo cual significa que se alimentan de sangre y son de hábitos nocturnos; su ciclo vital es aproximadamente de un año, durante este tiempo produce aproximadamente 200 huevos.

Sin embargo, los reservorios de la enfermedad van más allá de los insectos, ya que algunos mamíferos (tanto domesticados como silvestres) son hospederos de *Trypanosoma cruzi*. La parasitosis de animales silvestres tales como: armadillos, zorros, murciélagos, zarigüeyas, ratas, ratones y primates resulta importante en el mantenimiento de la enzootia chagásica. Dentro del ciclo vital doméstico de la transmisión parasitaria, el ser humano es el reservorio principal, ^[12] aunque también se considera al gato, perro y cobayo como grandes reservorios domésticos. En la actualidad se tiene conocimiento de que los pollos y palomas son inmunes a dicha enfermedad, mientras que las cabras y algunas especies de roedores, tienen la capacidad de eliminar la infección al cabo de cierto tiempo. ^[12]

En el año de 1995 Rodríguez y colaboradores ^[13] realizaron un estudio en la ciudad de Cuernavaca (México), con el objetivo de explorar la frecuencia de triatominos infectados con *Trypanosoma cruzi*, obteniendo resultados de infección superiores al 80%.

3.3 *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoario *Trypanosoma cruzi* (Fig.1), el cual pertenece al grupo de los estercoráceos.^[12] Los protozoario perteneciente a este grupo se caracterizan porque la forma infectiva se desarrolla en el tracto digestivo del vector, cuyas heces propician una interacción infecciosa con los huéspedes, dentro de estos últimos, el protozoario logra multiplicarse por medio de fases intracelulares, por lo que se clasifica dentro del subgénero *Schizotrypanum*. Su clasificación taxonómica (Cuadro No.1) es:^[13]

Cuadro No.1. Clasificación taxonómica

Reino	Animalia
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Orden	Kinoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Genero	Trypanosoma
Especie	cruzi

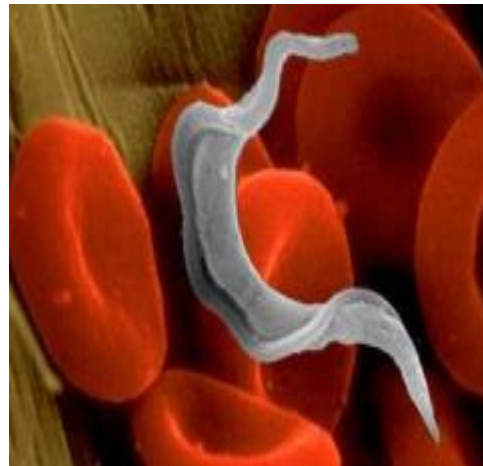


Fig.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi. posee organelos semejantes a las células eucariotas tales como: núcleo, aparato de Golgi, ribosomas y peroxidasas las cuales contienen oxidasas; sin embargo la actividad de éstas es muy baja en comparación a la mostrada por células de mamíferos.

Presenta características especiales como: tener una única mitocondria tubular, que contiene al cinetoplasto que a su vez alberga alrededor del 20% del DNA total. Consta de un flagelo que es un organelo de locomoción y adhesión.

Se menciona que *Trypanosoma cruzi* tiene dos fases en su ciclo vital, la primera dentro del hombre u hospederos y la segunda en el vector; es un organismo pleomorfo cuyos estadios se diferencian por su tamaño, forma, posición del cinetoplasto en relación con el núcleo.

Los cambios morfológicos que presenta *Trypanosoma cruzi* son tres:

- Tripomastigote. En esta etapa el protozoo mide 20 μm de largo, y su cinetoplasto se encuentra en la parte terminal y posterior al núcleo, en donde se origina el flagelo que se prolonga por un borde de una delgada membrana para terminar saliendo por el extremo anterior del cuerpo como flagelo libre.
- Existen dos tipos de Tripomastigote: El primero que es el sanguíneo o protocíclico que circula por la sangre del hospedero. El segundo consiste en la forma metacíclica localizada en el intestino de los triatominos, esta forma no se multiplica pero se considerada infectiva.
- Amastigote. En esta etapa el protozoo es de forma esférica con un diámetro aproximado de 4 μm , cuenta con un pequeño flagelo, el cual no emerge fuera de la membrana plasmática, dentro de este estadio el protozoo se multiplica dentro de las células del hospedero.
- Epigomastigote. Conocida como la última fase del ciclo, aquí el parasito cuenta con una longitud aproximada de 20 μm ; muestra al cinetoplasto por delante del núcleo; dentro de este estadio se produce la multiplicación del protozoo en el intestino del insecto, siendo la forma predominante que se observa en los medios de cultivo, pero no es una forma infectiva.

3.4 Ciclo Biológico

Ubicados en los tejidos de los hospederos, se encuentra la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi*, que se reproduce dentro de las células de tejidos musculares, que al lisarse deja libre a *T. cruzi*. Una vez dentro del torrente sanguíneo se convierten a la forma móvil llamado, Tripomastigote procíclico o sanguíneo, esta nueva forma infectiva parasita nuevas células que aumentan la extensión de la infección. Durante este período los vectores libres de infección, pueden alimentarse de sangre infectada del huésped llevando consigo tripomastigotes, durante este proceso se transforman en epigomastigotes en el intestino del vector, y se reproducen por fisión binaria longitudinal con su subsecuente migración a la parte final del intestino, y una transformación a tripomastigote metacíclico altamente infectiva.^[7]

Posteriormente, el vector infectado se alimenta de un hospedero libre de infección, a través de una defecación simultánea, que contiene una cantidad considerable de protozoarios en forma de tripomastigote; y en consecuencia de una posterior introducción del protozoario por medio de la piel dañada a causa de la mordedura, hace que el protozoario arribe al torrente sanguíneo.^[7,13] A causa de esta situación inicia una invasión de células de tejido muscular, una subsecuente transformación en amastigote, reproduciéndose en la células hasta que éstas se lisan, quedando libres los tripomastigotes sanguíneos, los cuales invaden otras células o pueden ser ingeridos por el vector, cerrando con ello el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Fig. 2).^[7,13]

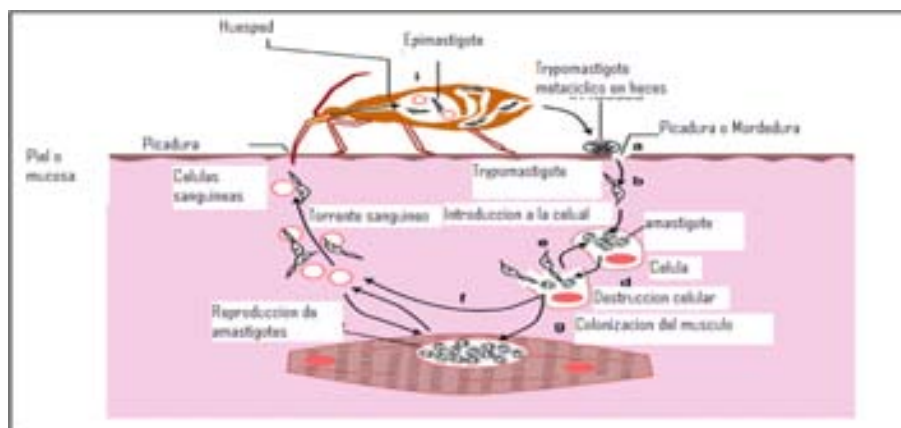


Fig.2 Ciclo Biológico de *Trypanosoma cruzi*

3. 5 Clínica de la Enfermedad

Una vez que el protozoo se ha incorporado en su hospedero, se necesita un periodo de incubación de 4 a 14 días, para que empiece a ejercer mecanismos patogénicos, dañando las células del sistema retinoendotelial y de otros tejidos, esto es provocado por la multiplicación y el crecimiento del protozoo. Koberle ^[7] señala al respecto que la producción de una tripatoxina en la miocarditis chagásica, puede ser un factor que acelere la muerte debido a esta enfermedad. La infección del protozoo es amplia en tejidos y órganos tales como corazón, bazo, cerebro e hígado.

La enfermedad presenta tres fases durante su desarrollo: ^[6]

- ❖ Fase aguda. Esta etapa es caracterizada por una fiebre intermitente, este signo clínico es observado en un 95% de los casos, la fiebre va acompañada de cefalea, astenia, mialgias. Otro síntoma relevante es la aparición de una inflamación oftalmoganglionar conocida como Romaña (Fig.3), la cual consiste en una blefaritis indolora, eritemopapulosa, con reacción conjuntival; hay una inflamación de ganglios satélite o bien conocidos como chagosomas; este padecimiento va acompañado de nerviosismo, alteraciones psíquicas y en ocasiones se presentan signos clínicos de encefalomiелitis o meningoencefalitis. Según las observaciones al rededor del 40% de pacientes presentan un cuadro de hepatoesplenomegalia. La muerte puede presentar alrededor de dos a cuatro semanas debida en su mayoría, a una cardiopatía o la enfermedad pasa a la fase crónica.



Fig.3 Romaña

- ❖ Fase indeterminada. Los signos clínicos que se presentaron dentro de la fase anterior desaparecen paulatinamente durante un periodo de 2 a 3 meses, se transforma en un estado asintomático; sin embargo los resultados que muestran las pruebas diagnósticas realizadas, son de carácter positivos a la infección.
- ❖ Fase crónica. Se presenta en un periodo a largo plazo entre los 10 a 15 años posteriores a la adquisición de la infección. Esta etapa se caracteriza por el signo clínico de cardiopatía chagásica crónica, la cual evolucionó naturalmente hacia una insuficiencia cardíaca, aunque el 40% de los casos que muestran tal evolución, cuentan con un período de supervivencia de más de 20 años después de adquirir la infección. Todo esto fue conocido gracias a los hallazgos electrogracardiograficos o radiológicos, que fueron observados dentro de los electrocardiogramas mostrando alteraciones en la rama derecha del haz de His y hemibloqueo anterior izquierdo indicando un bloqueo completo de las mismas. Así los pacientes asintomáticos solo presentan una aparente disnea, palpitaciones, dolor precordial hasta que se presenta una muerte súbita.

La presencia de megavísceras (Fig.4) también es muy frecuente, la cual se diagnóstica inicialmente por la disminución motora de los segmentos infectados tales como colón, esófago, etc.



Fig.4 Megavísceras

3.6 Diagnóstico

El diagnóstico para dicha enfermedad, se puede llevar a cabo por diferentes métodos: ^[7, 8]

- Epidemiológicos. La evidencia de síntomas clínicos tales como Romaña, chagasomas y fiebres intermitentes, son pruebas evidentes que se ha adquirido la enfermedad.
- Examen de Sangre. Esta prueba se basa en que los tripomastigotes se encuentran en sangre durante la infección aguda. Se toma una muestra del paciente, que con la finalidad de observarla en el microscopio; otra alternativa es la preparación en fresco puede ser de mayor utilidad, ya que muestra la movilidad del protozoo, con una posterior tinción para lograr caracterizar de manera más adecuada la muestra.
- Hemocultivo. Utilizando medios como: el Novy Nicolle McNeal(NNN), se logra el desarrollo de tripanosomatidos; todos esto, sólo empleando una muestra de sangre del paciente y brinda resultados dentro de la fase aguda.
- Inoculación en animales de laboratorio. Utilizando ratones blancos (*Mus musculus*), una especie muy susceptible a la infección por *Trypanosoma cruzi*; se inocula sangre del paciente con la finalidad que el nuevo huésped desarrolle la enfermedad, los resultados son observables en 10 días posteriores a la inoculación.
- Examen inmunológico. Se realiza con la finalidad de encontrar anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*; la pruebas más utilizadas son: fijación de complemento (FC), hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia indirecta (IFI). Todas estas técnicas se aplican a pacientes en fase crónica, ya que en esta fase es más difícil detectar tripomastigotes.
- PCR (Reacción en cadena de polimerasa). Debido a la baja sensibilidad de los exámenes convencionales (xenodiagnóstico y hemocultivo), se implemento otra forma de comprobar la curación. La PCR ha demostrado tener mayor sensibilidad que esto exámenes^[14,15,16] y podría dar resultados con anterioridad en el tiempo con respecto a la serología

3.7 Medicamentos de Uso Clínico

El inicio de la quimioterapia en contra de la Tripanosomiasis Americana se remonta al empleo de un derivado de la quinolina (Bayer 7602) para el tratamiento de la fase aguda de dicha enfermedad; desde ese momento se han probado compuestos con un éxito relativo debido específicamente a la baja eficacia y alta toxicidad de los mismos, entre estos se pueden citar: derivados de quinoleína, arsenobenzoles sulfurados, compuestos de la fenantridina, derivados antimaláricos, sales de oro, bismuto, cobre y estaño, ácido paraminosalicílico, hidrazida del ácido nicotínico, anti-histamínicos, cortisona, etc.

No fue hasta 1957 que se encontraron nuevas alternativas de tratamiento, basado en los estudios realizados por Packchianian^[17] donde se reporta un efecto tripanocida de compuestos 5-nitrofuránicos en contra las formas circulantes de *Trypanosoma cruzi*. Aunado a esto, estudios posteriores de Brener^[17] en 1961 donde se demuestra que el tratamiento con nitrofurazona, por un esquema prolongado de tiempo, tenía un efecto curativo en las infecciones chagásica.

La consecuencia de esto, fue el descubrimiento del Nifurtimox en 1965 y Benznidazol en 1973,^[18] los únicos compuestos aceptados, registrados y comercializados por autoridades de salud en países de América Latina,^[19] los cuales empezaron a utilizarse en el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana a finales de los años setenta.

El tratamiento quimioterapéutico en la actualidad dentro de pacientes infectados crónicamente por *Trypanosoma cruzi* se justifica por las siguientes razones: Se ha demostrado experimentalmente - *in vivo*- la regresión de lesiones en músculo esquelético y cardíaco con el tratamiento basado en Nifurtimox y Benznidazol.^[20,21] a su vez se ha comprobado la presencia del parásito en el miocardio de pacientes con miocardiopatía chagásica crónica^[22,23] y su relación con la intensidad de la inflamación, por técnicas inmunohistoquímicas^[24] y Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR)^[25,26,27]; también - usando PCR- se ha encontrado *Trypanosoma cruzi* en lesiones de Chagas crónico en esófago^[27]; incluso sin descartar el componente autoinmune en la patogenia de la enfermedad, probablemente este mecanismo este inducido por la presencia del parásito; además se ha constatado una mejor evolución

clínica y menor aparición de alteraciones electrocardiográficas en pacientes adultos tratados con Benznidazol y Nifurtimox, comparado con placebo o control, demostrando una disminución significativa de los títulos de anticuerpos e incluso conversión negativa, luego de 10 a 20 años.

Estas normativas fueron avaladas por un documento de la Organización Mundial de la Salud en 1999.

^[28] En dichas normativas el criterio de curación pos-tratamiento es la negativización de las pruebas serológicas, o al menos una disminución de títulos: progresiva, continua y persistente, teniendo en cuenta que se considera disminución de títulos cuando hay una caída de tres títulos de anticuerpos con respecto al original (pre-tratamiento). ^[28]

El tratamiento clínico de esta enfermedad, se basa en la utilización de compuestos Nitro-Heterocíclicos ^[86] tal como el Benznidazol y Nifurtimox. Se sospecha que estos son causantes de mutagenesis y carcinogénesis además de daño al DNA; este tipo de compuestos jamás ha sido evaluado adecuadamente para conocer todos sus probables efectos secundarios. Como consecuencia de lo anterior la regulación de los mismos, ha sido un poco estricta tanto en probables medicamentos tanto para uso humano como animal. Tanto en EUA como en Europa la regulación de algunos compuestos Nitro-Heterocíclicos han sido suspendidos en el uso veterinario, además del uso como aditivos de alimento para animales.

El Nifurtimox uno de los medicamentos usados en la clínica de la Tripanosomiasis Americana produce daño a tejidos del huésped, debido a la producción de radicales libres alterando tanto el ciclo redox del parásito como del huésped. Los radicales libres interactúan con macromoléculas dañando membranas, inactivando enzimas y dañando DNA. Este medicamento se encuentra en plasma en concentraciones entre 10 y 20 μM con un pico en plasma a las 3.5h. Por otra parte el Benznidazol provoca daños a DNA e inhibición de la síntesis de RNA y proteínas tanto en el parásito como en el huésped, su concentración en plasma se encuentra entre 2.2-2.8 mg/L con un pico base en plasma de 4h.

Estudios realizados sobre pacientes infectados tratados tanto con Benznidazol como Nifurtimox, se demostró que existía una disminución afecciones cardiacas en relación a pacientes no tratados independientemente del género, edad o avance de la enfermedad.

Dentro del Cono Sur de América, se han evaluado clínicamente ^[87] recientemente otro tipo de medicamentos en contra de la Tripanosomiasis Americana, dentro de estos encontramos:

- Alopurinol. Se piensa que su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la síntesis *novo* de nucleótidos tipo purina, se ha comprobado tanto serológicamente como xenodiagnosticamente que este medicamento es ineficaz en el tratamiento de esta parasitosis. Este medicamento presenta pocas alteraciones secundarias, se recomienda usar este fármaco después de la reactivación de la enfermedad debida a un trasplante cardiaco. Se conoce que aproximadamente el 44% de pacientes tratados con Alopurinol son curados, manteniendo el criterio de curación de la enfermedad como Xenodiagnostico y Hemocultivo negativo.
- Ketoconazol. Este medicamento utilizado en enfermedades micoticas, ha sido probado como tratamiento de la Tripanosomiasis Americana, se administra en dosis entre 3.7 a 8.7 mg/Kg por vía oral por un periodo de 51 a 96 día. En pacientes tratados por aproximadamente 60 meses, la parasitosis ha sido erradicada, esto es demostrado tanto con Hemocultivo como serológicamente. Se piensa que su mecanismo de acción se base en la lograr la acumulación de metabolitos del esteroles en epigomastigotes. Se ha observado que dentro de pruebas In Vivo, el Ketoconazol cura la fase aguda, pero no cuenta con actividad biológica dentro de la fase crónica de dicha enfermedad.

3.7.1 Nifurtimox

El Nifurtimox (Fig.5) es un derivado del 5-nitrofurano (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilide-neamino)-tetrahidro-4*H*-1,4-tiazina-1,1-dioxido); Bay 2502; Lampit. Patente alemana 1, 170,957. Patente Estado Unidense 3, 262,930 (1964 y 1966 Bayer).^[17]

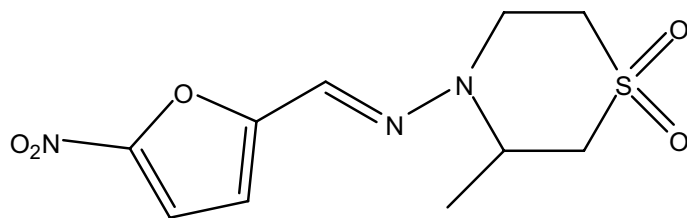


Fig.5 Estructura química del Nifurtimox

3.7.1.1 Dosis y Vía de Administración.

Administración Oral.

Adulto. 8-10 mg/Kg / Día durante 60-90 días.

Niños. 15mg/Kg/Día durante 60-90 días. El total de la dosis por día debe dividirse en tres tomas y administrarse cada ocho horas.

La predilección del Nifurtimox en lugar del Benznidazol se debe al efecto de supresión inmediata sobre los parásitos, tanto a nivel sanguíneo como tisular.^[18]

3.7.1.2 Contraindicaciones.

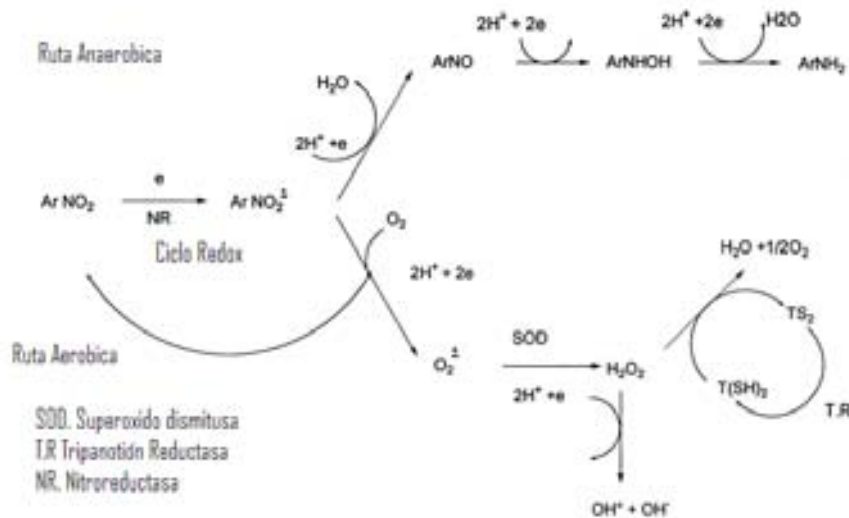
El Nifurtimox no debe ser indicado a pacientes embarazadas ni en caso de pacientes con afecciones consideradas graves asociadas a la enfermedad de Chagas.^[19]

3.7.1.3 Efectos secundarios

- Frecuentes. Reacciones de hipersensibilidad, como dermatitis, fiebre, ictericia, infiltrados pulmonares, y anafilaxis. Problemas gastrointestinales como, náusea y vómito los cuales pueden dar como resultado una pérdida de peso excesiva. Además de causar neuropatías periféricas, mialgias y astenias.
- Poco Frecuente. Cefalea, trastornos psíquicos, parestesias, polineuritis y excitación del SNC.
- Raras. Leucopenia e hipospermia. [20]

3.7.1.4 Mecanismo de acción^[21]

Los derivados del 5-nitrofurano se han usado regularmente en el tratamiento de infecciones parasitarias debido a su actividad antiprotozoaria y bactericida. El Nifurtimox es un derivado del 5-nitrofurano usado por excelencia en el combate de la enfermedad de Chagas y segunda opción para el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea. Su mecanismo de acción como antiparasitario se basa en aumentar la velocidad respiratoria y la liberación de H₂O₂ en las células por medio de la siguiente serie de reacciones



Este mecanismo inicia con la reducción del grupo nitro de los Nitrofuranos por NADPH como donador de electrones en presencia de la enzima Nitro reductasa, dando como resultado la formación del anión

ArNO_2^- . La siguiente reacción se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas, donde el anión ArNO_2^- se oxida rápidamente por medio del oxígeno molecular, para formar al anión radical superóxido O_2^- a esto le prosigue la formación de peróxido de hidrógeno H_2O_2 . Finalmente este mecanismo de reacción conduce a la formación del radical libre hidroxilo HO^\cdot , especie reactiva sumamente tóxica.

3.7.1.5 Indicaciones Terapéuticas

Dentro del marco del Congreso sobre el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas, se establecieron las normas terapéuticas con respecto tanto al Nifurtimox como Benznidazol.^[22]

- Tratamiento de la fase aguda. Existe unanimidad en cuanto al tratamiento de esta fase, independientemente del mecanismo de transmisión de la enfermedad. El índice de cura parasitológico y serológico en esta fase es aproximadamente del 60%.
- Tratamiento de la infección congénita. El tratamiento específico debe iniciarse y es más eficiente cuanto más próximo al parto se realice.
- Tratamiento de la fase aguda. El tratamiento está principalmente indicado en infecciones crónicas recientes (mayor de 10 años), Deben de tratarse todos los niños serológicamente positivos, además de las pacientes con la forma indeterminada tanto cardiaca como digestiva. Cuando hay megaesófago se recomienda efectuar tratamiento sintomático del mismo, para asegurar el libre tránsito del medicamento y en consecuencia la absorción del mismo.
- Infecciones Accidentales. Ante cualquier sospecha o confirmación de contaminación, el tratamiento debe iniciarse inmediatamente después del percance, además una muestra de sangre debe colectarse para reacciones serológicas antes de comenzar el tratamiento, las cuales deberán repetirse en periodos constantes para observar un probable desarrollo de la enfermedad.
- Trasplante de Órganos. En el procedimiento de trasplante de órganos es necesario conocer si el donador o el receptor tienen enfermedad de Chagas. El trasplante de órganos de un paciente

infectado puede producir la transmisión de las parasitosis al receptor, en tanto que un receptor infectado puede experimentar la reactivación de la enfermedad, debido a la inmunosupresión que sufre durante el proceso quirúrgico.

3.7.1.6 Toxicidad

En estudios, al Nifurtimox se le ha asociado con mutagenicidad en *Salmonella thypimurium*.^[23] En pacientes tratados con Nifurtimox se observó un aumento de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos.^[24] Con respecto a la carcinogenicidad del Nifurtimox (8µg/g), éste se ha asociado con la incidencia de linfomas en el ratón.^[25]

3.7.1.7 Resistencia parasitaria de las cepas de *Trypanosoma Cruzi*

Dentro del tratamiento de pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi*, se han observado resultados aleatorios, lo cual se le atribuye a la variabilidad biológica del parásito y a la zona geográfica donde habitan los mismos.

La susceptibilidad hacia el Benznidazol y Nifurtimox, se correlacionó con las características biológicas de la cepa del parásito. La cepa I mostró la mayor susceptibilidad, tanto la cepa II y III mostraron resistencia a ambos medicamentos.^[26]

En un estudio de susceptibilidad de cepas de *T. cruzi* aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas de áreas del centro de Brasil se identificaron cepas de tipo II y III. Los resultados en cuanto al índice de cura en ratones con Benznidazol (5-10 mg/Kg durante 60 días) y Nifurtimox (8-8.7 mg/Kg durante 60-75 días) fue de 66-100% infectados con cepas de tipo II y de 0-9% en aquellos infectados con las cepas del tipo III. La correlación obtenida entre el tratamiento de pacientes infectados y el modelo experimental en modelos murinos fue del 81.8%.^[26]

Algunos autores han atribuido esta resistencia a la mayor concentración de tioles libres encontradas entre las cepas resistentes.^[27] También al realizar una comparación cromosómica entre cepas silvestres

y cepas resistentes se encontraron diferencias en el fenotipo, de este estudio surge una correlación entre la susceptibilidad a los medicamentos y el polimorfismo de los segmentos del gen hipoxantina fosforibosil transferasa y glicoproteína-P. [28]

3.7.2 Benznidazol

Benznidazol o Radinil (Fig.6). Es un derivado del 2-nitroimidazol(*N*-bencil-2-nitroimidazol-1-acetamida); Síntesis: Patente 1, 138,529 (1966 Hoffman- La Roche)

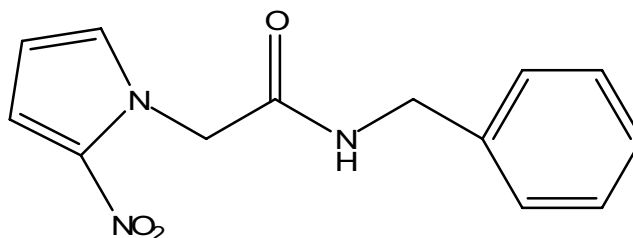


Fig.6 Benznidazol

3.7.2.1 Dosis y vía de administración

Administración Oral.

Adulto. 5 mg/Kg / Día durante 60 días.

Niños. 10mg/Kg/Día durante 60 días. El total de la dosis por día debe dividirse en dos tomas y administrarse cada doce horas.

3.7.2.2 Contraindicaciones

El Benznidazol no debe ser indicado a pacientes embarazadas ni en caso de pacientes con afecciones consideradas graves asociadas a la enfermedad de Chagas. ^[29]

3.7.2.3 Efectos Secundarios

- Frecuentes. Se produce leucopenia y trombopenia, asociadas algunas veces con púrpura y agranulocitosis, además un depresión menor de la medula osea. Dermatitis por hipersensibilidad, polineuropatía periférica. ^[30]
- Poco Frecuente. Cefalea, trastornos psíquicos, parestesias.
- Graves. ^[.87] Agranulocitosis, septicemia y trombocitopenia, además de disminución de plaquetas y hemorragias

3.7.2.4 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del Benznidazol sobre *Trypanosoma cruzi* involucra la interferencia directa en la síntesis de macromoléculas vía enlace covalente además de daños a nivel DNA, otra interacción es la producción de especies reactivas de oxígeno parecido al mecanismo de acción del Nifurtimox ^[21]

3.7.2.5 Indicaciones Terapéuticas

Las normas terapéuticas del Benznidazol son las mismas que las establecidas para el Nifurtimox, conforme a lo establecido en el Congreso sobre el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. ^[31]

3.7.2.6 Toxicidad

La toxicidad del Benznidazol se ha asociado con mutagenicidad tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium* ^[23]. Los resultados contradictorios en estudios realizados *in vivo* en diferentes tipos de células de mamífero, brindan como resultado un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células de medula ósea. ^[32] A comparación de un estudio realizado de manera *in vitro* donde las células humanas incrementaron la frecuencia de formación de micronucleos en células hepáticas, así como el intercambio de cromátides hermanas de linfocitos periféricos y células hepáticas humanas. ^[33]

En la relación a la actividad carcinogénica, el Benznidazol se ha asociado con neoplastias en el ratón, ^[34] junto con una alta prevalencia de neoplastias malignas en el 25-38% de los pacientes sometidos a trasplante de corazón como tratamiento antichagásico. Sin embargo, la ausencia de linfomas o tumores malignos en un gran número de pacientes tratados con este medicamento y observados durante un periodo de tiempo prolongado ^[35] hacen inconsistente la evidencia experimental del efecto carcinogénico del Benznidazol.

3.7.2.7 Eficacia clínica

La controversia en el uso de medicamentos para la enfermedad de Chagas principalmente en la fase crónica, está fundamentada en las dudas sobre la patogenia, la importancia de la eliminación del parásito y la falta de un criterio específico para probar la acción antiparasitaria además de un criterio específico para probar la acción antiparasitaria del tratamiento. La comprobación de la infección en la fase crónica es difícil de demostrar debido a que el parásito rara vez se puede detectar en la sangre periférica o en los tejidos, por lo cual es un tanto complejo establecer una correlación entre la severidad de las lesiones y el nivel de parasitosis.^[36]

Varios autores han propuesto que los componentes de mecanismos autoinmunes juegan un papel importante en el avance de la patología de la enfermedad o en la reactivación de la misma en caso de pacientes inmunosuprimidos ya sea por tener VIH o aquellos que se sometieron a un proceso quirúrgico.

3.8 Mecanismos de Resistencia Parasitaria de *Trypanosoma cruzi*

Los resultados aleatorios del tratamiento de la Tripanosomiasis en América del Sur, se atribuyen a la variabilidad biológica de *Trypanosoma cruzi* en esa zona geográfica, ya que se reporta que la mutación de cepas va en aumento.^[37,38,39] Dentro de un estudio^[38] se demostró que la susceptibilidad hacia Benznidazol y Nifurtimox era dependiente del tipo de cepa en el cual se estudiara, actualmente se conocen varios tipos pero destacan los tipos I, II y III, ya que estas se encuentran presentes en el mayor número de infectados. La cepa I cuenta con una susceptibilidad grande hacia los fármacos Antichagásicos mientras las cepa II y III son aquellas que muestran resistencia hacia los mismos.

Las diferencias más tangibles entre estas cepas, se atañen a las discrepancias en la concentración de tioles libres encontrados entre diferentes cepas y entre epigomastigotes, tripomastigotes y amastigotes de una cepa, lo cual podría ser una explicación de la susceptibilidad creada hacia los fármacos Antichagásicos.^[39]

La resistencia de *Trypanosoma cruzi* se puede atribuir a las funciones del Citocromo P450 (CYPs) el cual esta involucrado dentro de la síntesis de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos y prostaglandinas así como en la activación y detoxificación de otros componentes incluyendo los compuestos de uso terapéutico. Dentro de las características especiales de *Trypanosoma cruzi* se encuentran los genes no alélicos CPR que codifican para las proteínas transmembranales TcCPR-A(68.6 kDa), TcCPR-B(78.4 kDa) y TcCPR-C(71.3 kDa). Estas proteínas colaboran con el Citocromo P450 reductasa, el cual transfiere electrones del NADPH a numerosas hemoproteínas como el CYPs, Citocromo C y Citocromo b5. Se ha demostrado que una sobreexpresión de TcCPR-B en *Trypanosoma cruzi* aumenta la resistencia a la quimioterapia típico de agentes como Nifurtimox y Benznidazol, lo cual sugiere que TcCPR-B participa de manera importante en la detoxificación dentro del metabolismo del parásito. Esto se explico al observar la formación de un complejo TcCPR-B-NADPH-CitocromoP450, el cual aumenta el metabolismo redox del mismo.^[40]

La resistencia de este parásito últimamente es atribuida a la enzima *Old yellow enzyme* (TcOYE)^[41] la cual es una flavin oxidoreductasa de NADPH encargada de catalizar prostaglandinas PGH2 además de estar involucrada en procesos de reducción de algunos compuestos tripanocidas como naftoquinonas y nitroheterociclos; el mecanismo de acción aun no se tiene claro, pero se sabe que la concentración de esta enzima esta relacionada con la resistencia a compuestos antichagásicos como en Benznidazol. Esto fue remarcado dentro de un experimento realizado por Silvano^[42] cuando esta proteína fue inmunoprecipitada de formas epigomátigotas, dando como resultado la abolición de la mayoría de la actividad reductora, demostrando con esto que TcOYE es la llave del metabolismo redox de *Trypanosoma cruzi*.

3.9 Enzimas blanco de *Trypanosoma cruzi*

Como se ha citado con anterioridad, las enzimas involucradas en algunos procesos metabólicos de *Trypanosoma cruzi* son de gran importancia; por lo cual dentro de los últimos tiempos los investigadores se han dedicado a inhibir la acción de las mismas, teniendo como premisa que dentro del diseño de fármacos con base a su estructura ciertas enzimas o receptores del parásito pueden ser blancos selectivos durante la infección del huésped. Esta selectividad puede deberse a vías metabólicas únicas presentes en el parásito, la interacción del compuesto en sitios susceptibles en las enzimas del parásito, o la habilidad para diseñar ligandos específicos y selectivos que se unan al sitio activo del receptor o al sitio alostérico del mismo sin afectar a proteínas homólogas del huésped.

Esta estrategia emplea la combinación de biología molecular, cristalografía radiográfica, modelos computacionales y bioquímicos. El primer paso, siempre es la determinación de la estructura tridimensional del blanco o del complejo blanco-inhibidor, subsecuentemente se utilizan modelos computacionales para crear, modificar y analizar las interacciones de un blanco y su inhibidor.

Por el momento las enzimas blanco estudiadas dentro de esta revisión bibliográfica son: Cruzaina y Tripanotiona reductasa.

3.9.1 Tripanotiona Reductasa⁴³

La Tripanotiona reductasa (TR) es una oxidoreductasa dimérica o flavoproteína dependiente de NADPH, la cual únicamente se encuentra en protozoarios flagelados como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania sp.* La función principal de esta enzima es mantener el equilibrio redox y protección en contra del estrés oxidante. *Trypanosoma cruzi* utiliza un conjunto péptido-poliamina para procesar sus metabolitos celulares con lo cual se regulan los procesos redox intracelulares protegiendo a las moléculas biológicas de procesos oxidativos como productos del metabolismo aerobio.

Tripanotiona reductasa mantiene las condiciones redox celulares mediante un proceso de reducción de disulfuros conservando niveles altos de tioles. TR lleva a cabo el proceso de oxidación de glutatión a glutatión disulfuro mediante la transferencia de electrones a partir de NADPH. A diferencia del huésped, *Trypanosoma cruzi* no puede procesar el glutatión disulfuro formado, por lo cual se ha tomado en cuenta esta característica para llevar a cabo el diseño selectivo de ligandos que puedan aprovechar esta situación y así hacerle frente a una de las enfermedades parasitarias más agresivas.

3.9.1.1 Estructura Secundaria

La TR (Fig.7) es un dímero de aproximadamente 95x66x93 Å, la cual cuenta con 3 dominios, el dominio I comprende dos segmentos de cadenas conocidos como residuos 1-163 y 293-352, mientras los dominios II y III están formados por los segmentos 164-292 y 353-497 respectivamente. El dominio I es el sitio de unión de FAD, el dominio II es el sitio de unión a NADPH mientras el dominio III forma una interface entre las dos subunidades.

El dímero se forma por medio de interacciones de dos dominios III mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, todo esto se ha observado por medio de mapas de densidad electrónica.

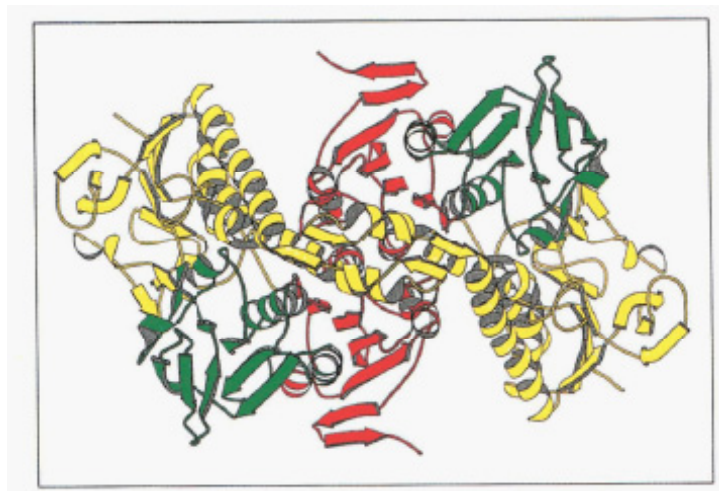


Fig.7 Dominios enzimáticos, unión a FAD (amarillo), Unión a NADPH (verde)
Interface (rojo)

3.9.1.2 Sitio activo

El centro catalítico o sitio activo (Fig.8 y 8a) de dicha enzima lleva a cabo la actividad de la reducción de disulfuros por medio Cys 53 y Cys 58 además de His 461, por lo cual dentro de este proceso participan los dominios I y III.

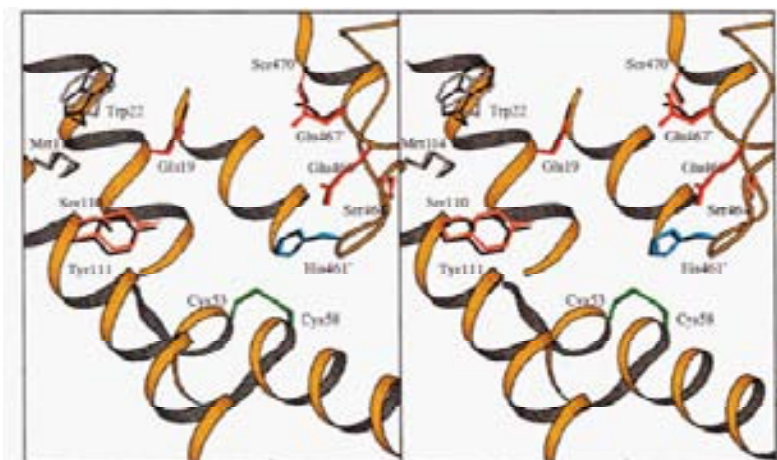


Fig.8 Sitio catalítico, residuos implicados en la unión del sustrato e involucrados en el proceso catalítico

El sitio activo de TR lleva a cabo reacciones redox dependientes de NADPH que asociadas con la actividad de Tripanotona peroxidasa, constituyen un eficaz sistema desintoxicante de hidroperóxidos en tripanosomatídeos.

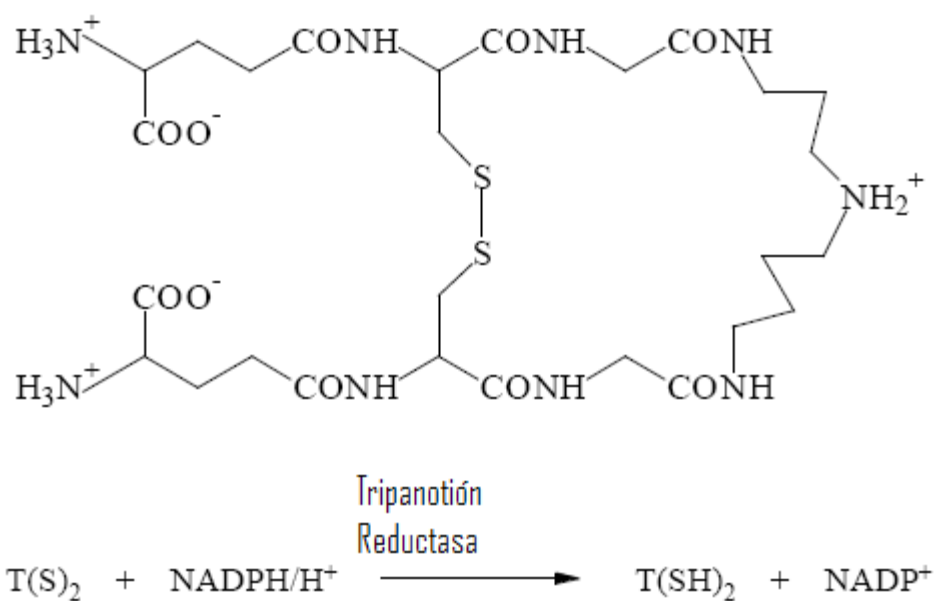


Fig.8a Sitio catalítico de Tripanotona Reductasa, además de reacción llevada a cabo por dicha enzima

3.9.2 Cruzaina⁴⁴

La cruzaina es una proteasa de cisteína la cual se encuentra en todas las formas fisiológicas del parásito, que ha demostrado ser la responsable de la mayor actividad proteolítica en *Trypanosoma cruzi*, esta es una enzima crítica para el desarrollo y supervivencia del parásito en las células del huésped, ya que esta permite penetrar a *Trypanosoma cruzi* al huésped, por lo cual esta enzima es un blanco potencial para el diseño de fármacos tripanocidas.

3.9.2.1 Estructura Secundaria

Cruzaina (Fig. 9) se compone por una cadena de polipéptidos de 215 aminoácidos, las cuales forman dos dominios, el dominio I está constituido básicamente de hélices alfa, mientras en el dominio 2 de hojas beta antiparalelas.

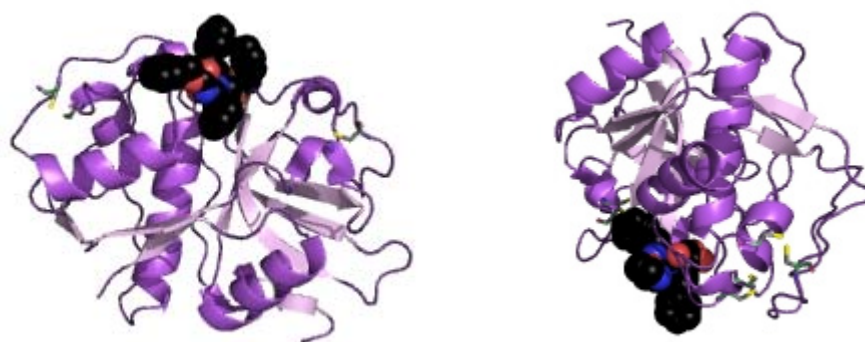


Fig.9 Estructura secundaria de Cruzaina unida con un inhibidor

3.9.2.2 Sitio Activo

El sitio activo se encuentra en los residuos Cys25, His159 y Asn175, este sitio extenso de unión sustrato-enzima cuenta con dos aberturas dentro de los dos dominios. La cadena principal que conforma la actividad proteolítica se concentra en cuatro residuos Pro2, Ala3 Ser92 y Thr178. Dentro de este sitio activo se forma un complejo [enzima-sustrato] de tipo covalente convirtiéndola después de esto en una enzima catalíticamente inactiva.

3.10 Química Computacional dentro del desarrollo de nuevos fármacos Antichagásicos.^{45, 46, 47, 48}

Otra línea de investigación que se ha seguido durante los últimos años, es la síntesis de compuestos análogos al Nifurtimox, ya que *Trypanosoma cruzi* no ha creado una resistencia significativa al mismo. El mecanismo de acción de este compuesto se basa en la producción de especies tóxicas de oxígeno creando niveles altos de estrés oxidativo.

La implicación que ha tenido la Química Computacional dentro de este desarrollo ha sido grande, ya que esta herramienta ayuda al desarrollo de compuestos más específicos o más activos con lo cual se están teniendo mejores resultados en la lucha contra la Tripanosomiasis Americana.

El desarrollo reciente de la computación y la química computacional ha permitido calcular la geometría y la energía molecular, lo cual nos lleva a un amplio nicho de investigación experimental, tanto en la interpretación de los resultados obtenidos como para deducir información no asequible experimentalmente.

En principio se pueden considerar tres tipos de métodos de cálculos teóricos: Los métodos *ab initio*, los semiempíricos y los de mecánica molecular. La elección de uno u otro método depende fundamentalmente del tamaño de la molécula y del tiempo requerido. En el caso de la mecánica molecular se requiere de menos tiempo de cálculo con respecto a los mecánico-cuánticos, y reproducen los valores experimentales referentes a geometrías y energías con buena precisión. Su uso por tanto en la actualidad está destinado al campo de las macromoléculas, en las cuales los métodos de cálculos mecánico-cuánticos se tornan prohibitivos.

Mediante el empleo de los métodos de cálculo mencionados es posible obtener los valores de las propiedades de las moléculas, que son útiles para llevar a cabo un estudio QSAR (Relación Cuantitativa Estructura-Actividad). Estas propiedades pueden ser de tipo electrónicas, estéricas e hidrofóbicas (descriptores moleculares).

Mediante la aplicación de una regresión lineal simple o múltiple a los descriptores moleculares de los cuales la actividad biológica es función, se genera una función matemática que permite predecir la actividad hipotética de una serie nueva de moléculas con estructura relacionada. En un estudio QSAR se emplean un gran número de descriptores moleculares, Pearson ^[49, 50,51] fue uno de los precursores en definir estos y dar un a conocer el sentido químico de los mismos, entre sus aportaciones están uso a los términos: energía de HOMO (Orbital Molecular ocupado de más alta energía) y LUMO (Orbital Molecular desocupado de más baja energía), los cuales son los descriptores químico-cuánticos más utilizados.

A su vez, el estudio SAR (relación estructura-actividad) es aquel donde únicamente se analiza cualitativamente la correlación entre la actividad del compuesto dependiendo de las modificaciones estructurales que se han realizado en él. Por otra parte la química computacional brinda otra herramienta conocida como “DOCKING”. Esta herramienta es una simulación computacional la cual se utiliza para predecir la orientación entre un posible ligando y un blanco específico, con esta simulación se tiene idea de la afinidad entre los mismos dando idea de una probable actividad farmacológica del ligando. Este proceso ha sido relevante dentro de la búsqueda de compuesto que se unan a proteínas, ácidos nucleídos, carbohidratos y lípidos.

4. Nuevos posibles compuestos para el tratamiento de la *Tripanosomiasis Americana.*

Debido a que la problemática de la Tripanosomiasis Americana continua siendo un problema de salud pública dentro de América Latina, la identificación de nuevos compuestos con actividad tripanocida sigue siendo una línea de investigación constante, la cual ha tratado de buscar nuevos agentes quimioterapéuticos más eficaces y con menos efectos secundarios contra esta enfermedad.

4.1 Compuestos con actividad a nivel Enzimático.

Dentro de los blancos potenciales para la quimioterapia de la Tripanosomiasis Americana se encuentran las enzimas Tripanotiona Reductasa y Cruzaina. Estas enzimas son proteínas esenciales del proceso infectivo de *Trypanosoma cruzi*.

La inhibición enzimática es un proceso en el cual se pretende disminuir total o parcialmente la actividad de dicha enzima. Esta inhibición puede ser de varios tipos:

- **Inhibición Irreversible.** Aquella donde el fármaco se une de manera covalente al sitio activo de la enzima y esta deja de ejercer sus funciones.
- **Inhibición Reversible.** A diferencia de la irreversibles, esta se caracteriza por una rápida disociación del fármaco en el sitio activo de la enzima.
- **Inhibición Competitiva.** Dentro de este tipo de inhibición el fármaco compite con el sustrato por ocupar el sitio activo de la enzima, lo cual se observa por el incremento de la cantidad de sustrato en el medio biológico.
- **Inhibición No Competitiva.** Aquella donde el sustrato y el fármaco se pueden unir simultáneamente a la enzima.
- **Inhibición Mixta.** Ocurre cuando el inhibidor se puede unir a diferentes sitios de la enzima

4.1.1 Compuestos inhibidores de Tripanotona Reductasa

En décadas pasadas ^[85] el estudio de compuestos con actividad inhibitoria de Tripanotona reductasa, se baso únicamente en compuestos de características triciclicas, ya que este tipo de compuestos aprovechaban la fuerte unión que sostenían con el sitio hidrofobico de la enzima, para realizar dicho proceso inhibitorio; por citar un ejemplo: El grupo de Fenotiazinas, estudiado por años ha logrado la inhibición de esta enzima con valores nM.

A su vez el empleo de poliaminas para llevar a cabo la inhibición de TR, también fue otra línea de investigación recurrente en los años 90', ya que la estructura de este tipo de compuestos es similar a un sustrato natural de la enzima, por lo cual se aprovecharon estas características para crear análogos estructurales utilizando diversas partes farmacoforicas previamente probadas, obteniendo resultados alentadores.

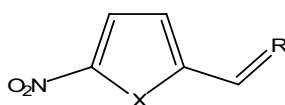
Otra clase de compuestos evaluados dentro del proceso de inhibición dentro de la década de los 90' fueron, los nitro-heterocíclicos, este tipo de compuestos además de producir radicales libres, estrés oxidativo también simultáneamente pueden inhiben a TR, se observó aunado a este tipo de compuestos se le agrega una grupo carbazona o tiocarbazona, la actividad de estos aumenta, debido a las interacción de estos grupos con el sitio activo de la enzima. Por otra parte una gama de diferentes compuestos presenta actividad inhibitoria irreversible, achacado esto a la posesión de un grupo electrofilico que reacciona de manera covalente con el residuo de Cys-53, siendo este el mecanismo de acción más probable de todos los inhibidores irreversibles de TR.

4.1.1.1 Derivados del 5-nitrofurilo⁵²

Los derivados de 5-nitrofurilo se han asociado con una actividad tripanocida, debido a que estos han mostrado un papel importante dentro de la producción de anión superóxido, lo cual conlleva al aumento del ciclo redox dentro del parásito y a su posterior muerte. Basados en estas premisas se realizó un estudio 3D-QSAR en derivados de 5-nitrofuril, buscando una relación entre la energía libre de Gibbs, lipofilia y la actividad mostrada por este tipo de compuestos.

Los resultados obtenidos (Tabla1) mostraron que los derivados de 5-nitrofurilo 4-7, 10, 11, 16 tuvieron mejor actividad que la presentada por el Nifurtimox a una concentración de 5 μ M. También se observa que los compuestos más activos cuentan con una mayor energía de unión (BE) en el sitio activo de Tripanotiona reductasa.

Tabla 1. Actividad tripanocida In Vitro (%Inh), Energía de unión al sitio activo (BE) y coeficiente de partición octanol/agua (LogP)



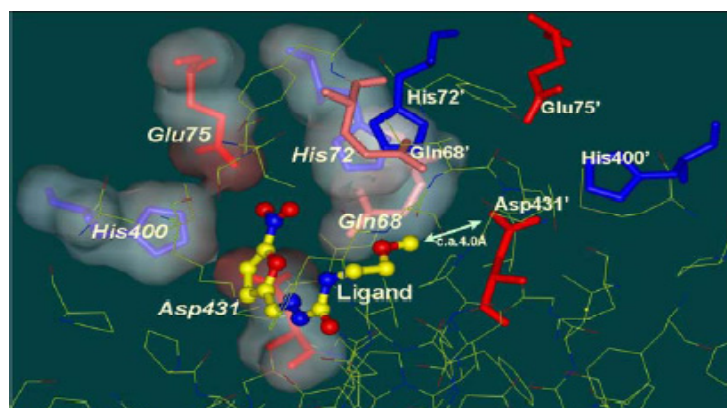
Compuesto X, -R	%Inh	BE (Kcal/mol)	LogP
4) O, =N-NH-CO(CH ₂) ₃ CH ₃	84.2	-40.02	1.22
5) O, =N-NH-CO(CH ₂) ₅ CH ₃	96.2	-47.79	2.27
6) O, =N-NH-CO(CH ₂) ₆ CH ₃	92.7	-52.94	2.80
7) O, =N-NH-CO(CH ₂) ₇ CH ₃	83.7	-57.06	3.33
10) O, =CH-CO-NH(CH ₂) ₃ CH ₃	75.0	-34.00	2.31
11) O, =CH-CO-NH(CH ₂) ₅ CH ₃	82.0	-47.14	3.37
16) O, =CH-CO-O(CH ₂) ₃ CH ₃	42.0	-33.90	3.12

Los compuestos fueron evaluados *in vitro* en contra de epigomastigotes a concentraciones de 5,10 y 25 μ M. Mientras el estudio DOCKING se llevo a cabo con un método SM2-AM1.

4.1.1.2 Derivados de 5-nitrofuran- y 5-nitrotiofen- semicarbazona⁵⁵

Estos compuestos han demostrado tener eficiencia dentro del tratamiento de la Tripanosomiasis Americana, ya que son ligandos selectivos de Tripanotión reductasa. Por lo cual se procedió a realizar una evaluación teórica de la unión entre los compuestos y su receptor tratando de entender el mecanismo de acción de los mismos. Para lo cual fueron modelados cuatro nitrofuranos y cuatro nitrotiofenos, de los cuales se obtuvieron las estructuras cristalinas, esta información más un previo estudio de DOCKING llevo a entender los diferentes mecanismos de acción de los compuestos evaluados.

Después de analizar la estabilidad y orientación de los complejos [enzima-sustrato] con base a las energías totales, se llegó a la conclusión de que cada uno de los compuestos evaluados se unía a diferente parte de la enzima, dependiendo de las características electrónicas del sitio y del compuesto. La energía de Van der Waals es más favorable en el sitio de interface de los dimero de TR que el sitio activo o el sitio de unión del NADPH, ese estudio también fue llevado a cabo en Glutación Reductasa dando los mismos resultados, por lo cual se puede concluir que el sitio de unión de este tipo de compuestos es el sitio interface entre los dímeros de TR. Se piensa que esa interacción se debe a que el sitio de interface presenta anillos multipolares, con lo cual la carga total del sitio hace propenso a esté para llevar a cabo las interacciones con este tipo de compuestos ubicando así el sitio de acción de los mismos.



Sitio de Interface de TR, anillo de nitrofurano ubicado al centro de un anillo multipolar, mostrando las superficies de la E de V.d.Waals

4.1.1.3. Derivados de 2-Amino-4-clorofenil sulfuros⁵³

Los fenilsulfuros (Fig.10) son inhibidores competitivos de Tripanotióna reductasa, los cuales con anterioridad han mostrado buenos resultados inhibitorios. Por lo cual a estos compuestos se le han realizado modificaciones estructurales de cadena, remplazado tanto el grupo piperazina o dimetilamina obteniendo resultados satisfactorios en la inhibición de *Trypanosoma cruzi*.

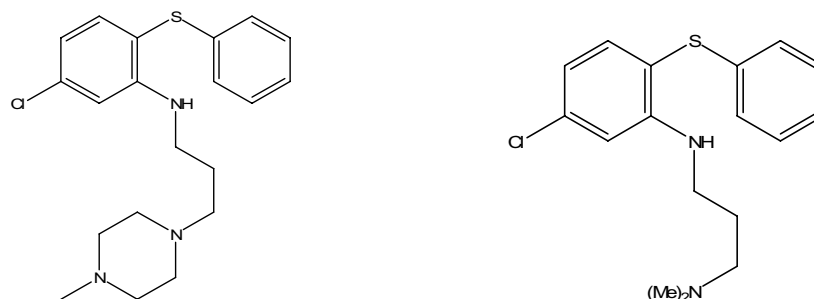


Fig.10 Estructura Química de Fenil Sulfuros

Dentro de las modificaciones estructurales (Tabla. 2) se han encontrado que las sustituciones de anillos aromáticos simples causan una disminución de potencia, mientras la sustitución por difenilmetil, benciloxibencil o 4-ter-butilbencil provoca un incremento de potencia inhibitoria de los fenil sulfuros. Dentro de esta serie, el compuesto (11) con sustituyente 3,4-diclorobencil es el inhibidor más potente.

Tabla.2 Inhibidor competitivo de Tripanotión reductasa (TR) , evaluados a una concentración de 3µg/mL.

Compuesto, sustituyente	Inhibición de TR Ki(µM)
9	66 +/- 6.00
12	14.2 +/- 0.12
11	1.69 +/- 0.22

4.1.1.4 2-iminobencimidazoles⁵⁶

Los 2-iminobencimidazoles (Fig.11) son una nueva clase de inhibidores de Tripanotión reductasa, los cuales surgieron a partir de una optimización y un análisis *Drug-Likeness*.

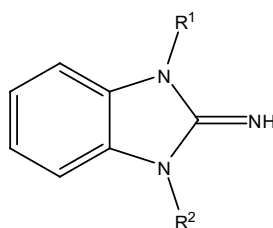


Fig.11 Estructura Química de 2-iminobencimidazoles

En esta primera etapa se observó que los 2-iminobencimidazoles más potentes eran aquellos que contenían en R² un grupo donador de electrones, mientras en R¹ un anillo aromático, esto se comprobó cambiando los grupos donadores de electrones por grupos hidrófobos o removiendo el fenilo de R¹ dando como resultado una pérdida de actividad inhibitoria. Contando con ese conocimiento previo, se comenzaron a realizar modificaciones dentro de la estructura logrando obtener compuestos con valores de IC₅₀ < 10µM los cuales en su estructura contenían un anillo de piperidina o dimetilamina, también se demostró que al reducir el tamaño de la cadena R² la actividad decrecía. Además al realizar cambios en R¹ por alcoholes, carbonilos y éteres, la pérdida de actividad era mínima.

Tabla. 3 2-iminobenzimidazoles inhibidores de TR

Compuesto	R ¹	R ²	CI ₅₀ (µM)
9	PhOCH ₂ CH(OH)	N-piperidina	5
10	PhOCH ₂ CH(OH)	N-morfolina	>100
11	4-Me PhOCH ₂ CH(OH)	N-piperidina	9
14	PhOCH ₂	N-piperidina	4
5	4-(MeO) PhCH(OH)	N-piperidina	24

4.1.1.5 Fenotiazinas⁵⁹

Las fenotiazinas (Fig. 12) son compuestos de característica tricíclica utilizados en psiquiatría como antidepresivo, ansiolítico y antipsicóticos. Este tipo de compuestos posee la habilidad de atravesar la barrera encefálica y acumularse en el cerebro bloqueando los receptores dopaminérgicos; además cuentan con diferentes actividades como potentes antibacteriales, antifúngicos y antiplásmidos, con esta última propiedad se eliminan algunos mecanismos de resistencia de bacterias. Algunas fenotiazinas cuentan con un efecto tripanocida en diferentes estadios de *T. cruzi*, se piensa que dentro de los diferentes mecanismos de acción, este tipo de compuestos actúan a nivel mitocondrial, desorganizan las membranas y condensación citoplasmática.

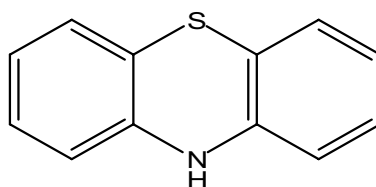


Fig.12 Estructura general de Fenotiazinas

La inhibición de Tripanotión reductasa por las fenotiazinas es tiempo dependiente tanto de la concentración de las mismas como del sistema de peroxidasa, ya que el mecanismo de acción se basa en la producción de cationes radicales de fenotiazinas para lograr la inactivación de la enzima. Dentro de la familia de las fenotiazinas, la Clomipramina y Tioridazina han sido compuestos que presentan una gran actividad en la inhibición de TR dentro de forma epigomastigotas de *T. cruzi*.

Fenotiazina	Inactivación de TR(%)
Promazina	100 +/- 0
Cloropramizina	97 +/- 1.4
Trimeprazina	94 +/- 0.2
Procloroperazina	100 +/- 0.4
Trifluoperazina	37 +/- 0.4
Flufenazina	Sin actividad
Propericina	4.0 +/- 0

Inactivación de Tripanotión Reductasa por peroxidasa generado por Fenotiazinas catión radical.

4.1.1.6. Derivados de Clorohexidina⁵⁴

Dentro de un screening se detectaron potentes inhibidores dependientes de concentración de Tripanotona reductasa (TR). Estos compuestos son derivados de piperazina y un antimicrobiano llamado Clorohexidina (Fig. 13), los cuales reportan un 90% de inhibición de TR a una concentración de 100 μ M. Ambos compuestos cuentan con estructuras similares a inhibidores ya reportados, puesto que tienen una extensa zona hidrofóbica con carga positiva, características primordiales de los inhibidores de TR. Este proceso llevo a la conclusión de que existía una parte farmacoforica similar en ambos compuestos, por lo cual aprovechando esta característica se comenzaron a sintetizar análogos de los mismos.

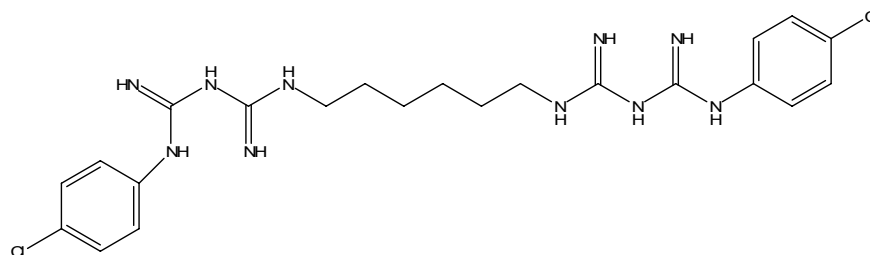


Fig.13 Estructura Química de Clorohexidina

Se comenzó a realizar un proceso de derivatización de Clorohexamida por síntesis paralela, llegando a la conclusión de que independientemente del sustituyente, los compuestos mostraban baja potencia inhibitoria de TR. El compuesto (5) con sustituyentes de anillo indólico y piperazina fue el más potente, logrando una inhibición del 30% de TR a una concentración de 100 μ M. Subsecuentemente se probaron derivados bis-amidinas encontrando 3 compuestos con potencia aceptable 8 , 11 y 14 , los cuales cuentan con un >85% de inhibición de TR a una concentración de 100 μ M. Los tres derivados contaban el mismo sustituyente terminal (Fig.12). La mayor potencia inhibitoria de las bis-amidinas se debe a que estas cuentan con una carga positiva mayor, lo cual juega un punto crucial en la interacción ligante-receptor.

4.1.1.7. Derivados Tricíclicos ⁵⁷

Diferentes heterociclos en especial los tricíclicos como Clomipramina (Fig.14) y Cloropromazina (Fig.15), son buenos ejemplos de inhibidores competitivos de Tripanotona reductasa. Estos compuestos con características anti-depresivas, son muy selectivos como inhibidores de TR debido a que cuentan con características similares en cuanto a estructura y carga de uno de los sustratos de TR.

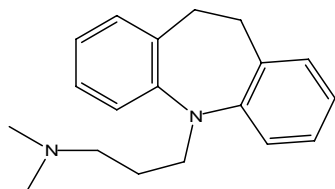


Fig.14 Estructura Química de la Clomipramina

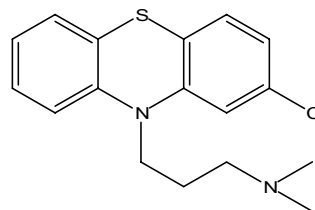
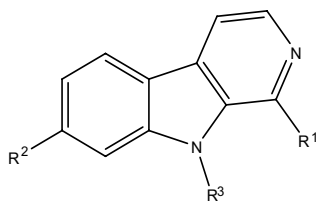


Fig.15 Estructura Química de la Cloropromazina

La evaluación de nuevos análogos tricíclicos (Tabla.4) como solución de la Tripanosomiasis Americana, no ha brindado resultados alentadores ya que las modificaciones estructurales propuestas han llevado a una pérdida de actividad, en consideración a la mostrada por la Cloropromina. Esta pérdida de actividad se le atribuye a la reducción de carbonos del anillo principal, lo cual se piensa que hace más improbable la protonación de la cadena aminoalquílica adjunta al anillo indólico. Por otra parte esta modificación estructural cuenta con diferentes interacciones con el sitio activo por lo cual se modifica la afinidad entre los mismos explicando así la pérdida parcial de la actividad.

Tabla.4 Inhibición de *T. cruzi* por análogos tricíclicos evaluados a una concentración de 85µM, control positivo Cloropromazina [12.2 µM]



Compuesto	R ¹ , R ² , R ³	% Inh.
11	R ¹ =R ² =H	10
15	R ¹ =CH ₃ R ² =OCH ₃ R ³ =(CH ₃) ₂ N(CH ₂) ₃ -	50
21	R ¹ =R ² =(CH ₃) ₂ N(CH ₂) ₃ -	62
18	R ¹ =CH ₃ R ² =OCH ₃	13
Control (+)		70

4.1.1.8 Derivados de Quinitrina ⁵⁸

La quinitrina (Fig.16) es un inhibidor selectivo e irreversible de Tripanotiona reductasa, su mecanismo de acción es dependiente de interactuar con la forma oxidada de la enzima y encontrar en el medio en su forma reducida el NADPH. Este tipo de inhibidor de naturaleza tricíclica, se piensa que interactúa con una porción hidrofóbica ubicada en el sitio activo de la enzima, uniéndose en múltiples sitios al mismo tiempo.

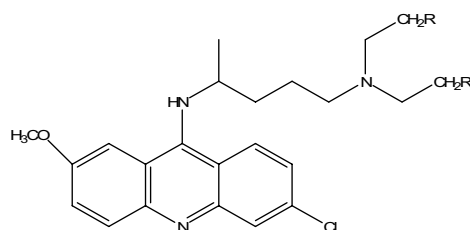
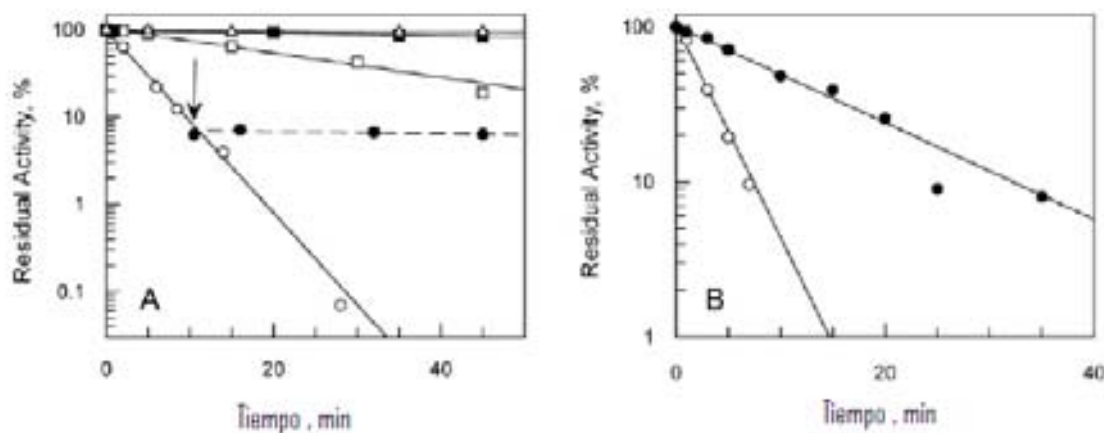


Fig. 16 Estructura Química de Quinitrina (R=H)

Los nuevos derivados de Quinitrina han sustituido la porción dietilamina por grupos bis-(2-cloroetil) amino, estas estructuras continúan con interacciones de tipo covalente dentro de la formación del complejo enzima-sustrato. Dentro de la pérdida de actividad de Tripanotión Reductasa, está continua con una cinética de primer orden, por lo cual se piensa que los análogos sintetizados pueden ser inhibidores competitivos.



Efecto de inactivación por Quinitrina de TR. La 1 μ M TR fue incubada, con 150 μ M de NADPH y 20 μ M de Quinitrina. Se midió la actividad residual de la enzima expresada en %. La grafica con un cuadrado oscuro muestra la acción del NADPH solo, el cuadro blanco la acción de Quinitrina sola y el circulo NADPH mas Quinitrina.

4.1.1.9 Derivados de Fenilpropanona⁶⁰

Basado en un HTS con la finalidad de encontrar inhibidores de Tripanotona reductasa, se llegaron a identificar 24 tipos de compuestos con una actividad mayor al 90% de inhibición de TR a una concentración de 11.1 µg/mL. La similitud entre todos los compuestos identificados consistía en que dentro de su mecanismo de acción reaccionaban con tioles libres presente en el sitio activo de la enzima. Al final del proceso fueron seleccionados tres compuestos (Fig.17) debido a la selectividad sobre TR y la actividad mostrada dentro del proceso de inhibición (Tabla. 5).

En general los nitrobenzenos muestran gran afinidad para la inhibición selectiva de TR, como se puede observar el compuesto 6 a es el más potente inhibidor de esta enzima, además se observó que el remplazo del grupo dimetilamino por grupos arilamino provocan una pérdida de actividad. Tanto los derivados 7 y 8 muestran una baja selectividad hacia TR. De los cuatro tipos de compuestos los más potentes inhibidores son aquellos que se presentan en forma de sal, además los dos compuestos más activos poseen un grupo dimetilamino dentro de su estructura, este grupo ha mostrado su funcionalidad en el proceso de inhibición de TR, como se ha descrito con anterioridad en compuestos como la Clomipramina.

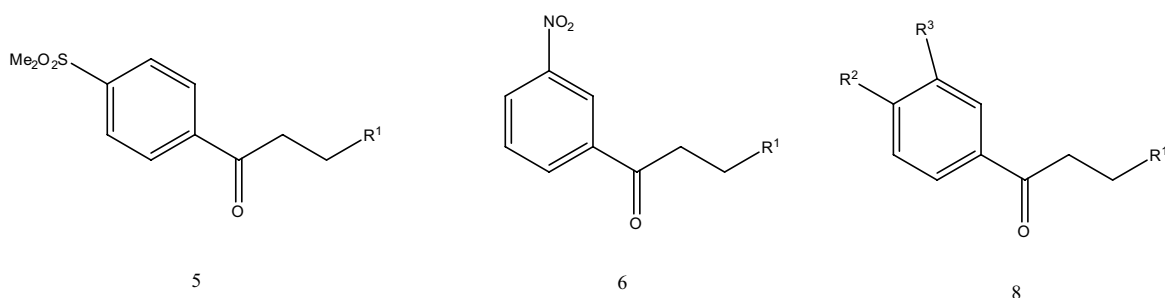


Fig.17 Derivados de Fenil-propanona con actividad inhibitoria de TR identificados por medio de HTS

Tabla.5 Derivados de fenil- propanonas con actividad inhibitoria de TR, Selectividad de TR se obtuvo mediante el cociente de IC₅₀ de GR/TR.

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	TR CI ₅₀ (µM)	GR CI ₅₀ (µM)	Selectividad de TR
5 a	NMe ₂ HCl	-----	-----	2.9	20.4	7.0
5b	N-piperidil	-----	-----	7.8	105	13
6 a	NMe ₂ HCl	-----	-----	0.34	20.3	59
6e	NH-3-FPh	-----	-----	3.3	>173	>52
7b	Propil	NMe ₂	-----	11.8	79.3	6.7
7c	Butil	N-piperidil	-----	38.8	>155	>4
8 a	Cl	Cl	NMe ₂ HCl	148	>212	>1.4
8c	Cl	Cl	NH-4-EtPh	107	>157	>1.5

4.1.1.10 Metabolitos de *Alternaria sp.*⁶¹

Investigaciones previas habían demostrado que estratos crudos de *Trixis vauthieri* contaban con actividad inhibitoria de Tripanotión Reductasa mayor al 90% a una concentración de 20 µg/mL., dicha actividad era atribuida a compuestos como Sakuranetina, 7-metoxi-Aromadendrina, Penduletina y Trixol. Hasta el año 2003 algunos investigadores observaron que la inhibición de TR se debía a la presencia de metabolitos de un hongo endofítico posteriormente conocido como *Alternaria sp.*, dicho hongo ha sido encontrado tanto en plantas terrestres como acuáticas, viviendo dentro de los tejidos de las mismas. Los metabolitos descubiertos (Fig.18) fueron aislados observando que la actividad mostrada por estos era nula cuando se encontraban separados.

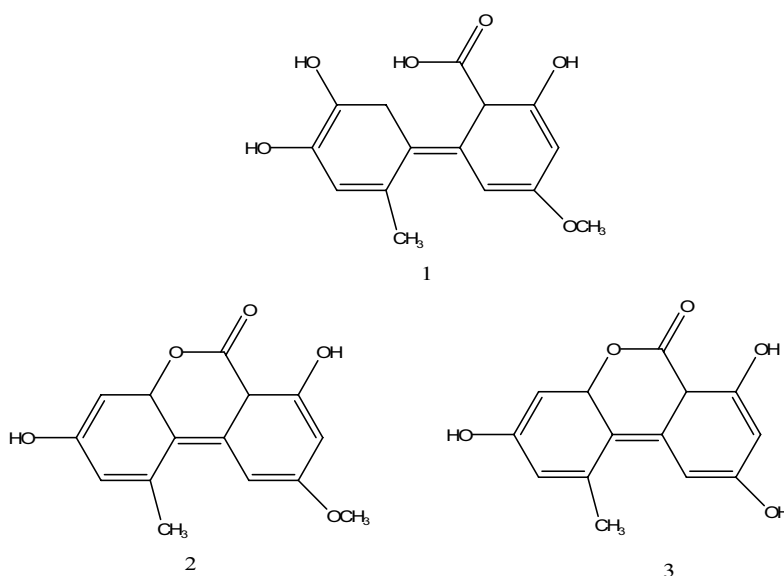


Fig.18 Estructuras Químicas de los metabolitos de *Alternaria sp.* (1)altenusina, (2) Alternariol metileter (3) Alternariol

Altenusina (1) es el metabolito con propiedades antioxidantes además de inhibir varias enzimas como Miosin cinasa, acetilcolenesterasa, HIV-1 intregrsa. Este compuestos fue el más activo en la inhibición de TR en tanto con $CI_{50} = 4.3 \mu M$, este no altera la viabilidad de las formas amastigotes, por lo cual se ha pensado que Altenusina cuenta con la habilidad de tener un blanco intracelular tal como TR.

4.1.1.11 Complejos Paladio Nitrofurilcarbazonas⁶²

Los complejos metálicos han sido estudiados y utilizados como tratamiento de diferentes enfermedades, ya que estos poseen una extensa variedad de actividades biológicas por lo cual dentro de la búsqueda farmacológica para el control de la Tripanosomiasis Americana la utilización de metales no es rara. La obtención de derivados complejo metálicos puede ser aprovechada, ya que cuentan con un mecanismo de acción dual por una parte la actividad mostrada por los ligantes y la actividad del mismo metal. Aprovechando estas características se utilizaron ligantes bioactivos como 5-nitrofuril carbazonas, los cuales con anterioridad han demostrado cualidades inhibitorias sobre Tripanotión reductasa. La utilización de Pd como metal de coordinación se debió a que en estudios similares se observó la efectividad de este metal en células cancerosa, y ya que *Trypanosoma cruzi* cuenta con un metabolismo similar a estas se aprovecho esta característica.

La actividad biológica presentaba por los complejos [Pd-nitrofurilcarbazonas] (Fig.19) se muestra en la tabla 6. La actividad inhibitoria fue evaluada a una concentración de 5µM y un tiempo de 5 días de exposición, los resultados obtenidos fueron complejos activos destacando aquellos con ligante 1 y 7, siendo estos más activos que el Nifurtimox. Mientras los complejos con ligante 4 y 8 no presentan actividad dentro de las mismas condiciones. Siendo puntuales los compuestos 9, 14 y 15 son aquellos que presentan una actividad mayor inhibitoria de TR, por lo cual se puede sugerir que la tendencia indica que la actividad de los complejos es: series de complejos [PdCl₂(HL)] > ligante libre > complejos [Pd(L)₂].

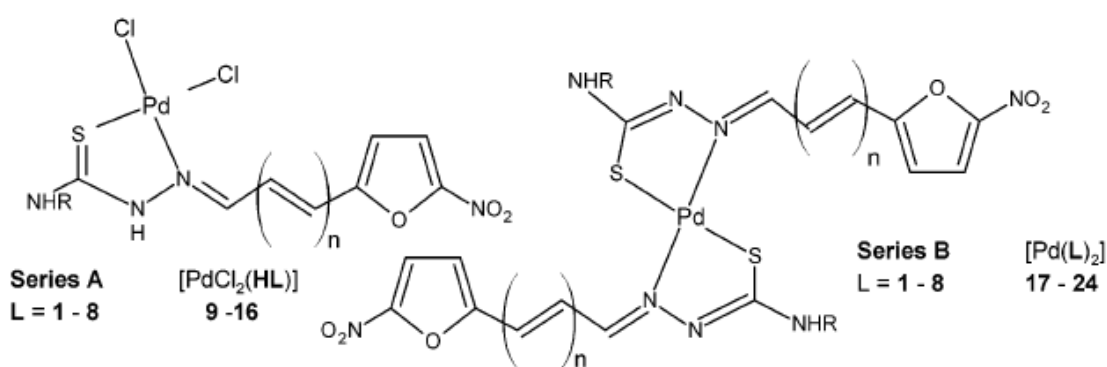


Fig. 19 Complejos de Paladio nitrofurilcarbazonas

Tabla 6. Actividad Inhibitoria de TR por complejos [Pd – nitrofurilcarbazona]

Compuesto	CI ₅₀ (μM)
9 [PdCl ₂ (HL1)]	2.4
17 [Pd(L1) ₂]	4.5
12 [PdCl ₂ (HL4)]	ND
20 [Pd(L4) ₂]	ND
15 [PdCl ₂ (HL7)]	2.4
23 [Pd(L7) ₂]	5.2

La actividad de los compuestos correlaciona con la producción de radicales libres dentro del parásito. Los complejos de Pd son inhibidores reversibles competitivos de TS₂, estos complejos presentan una baja actividad cuando la concentración de NADPH es poca, el mecanismo de acción de los mismos se piensa está basado en modificaciones al sitio activo específicamente modifica Cys52 de la forma reducida de la enzima. Estos complejos también presentaron intercalación en DNA debido a que su estructura es planar reaccionado con bases nucleofílicas de DNA.

4.1.1.12 Complejos Platino II ⁶³

Los complejos de platino se sabe que interactúan a nivel DNA por lo cual han sido ampliamente estudiados como agentes anti cancerígenos ya que cuentan con la habilidad de unión con bases purínicas de DNA. Aproximadamente hace veinte años, se encontró que los análogos de complejos de platino contaban con actividad tripanocida en especial los que contaban con un ligante 2,2';6'2''-terpidirina. La actividad se atañe a que este tipo de ligante actúa como un ácido de Lewis transfiriendo densidad electrónica del Pt II al ligante, lo cual hace al ligante muy susceptible de sufrir reacciones nucleofílicas de los grupos tioles presentes en las proteínas, esta evidencia de que los residuos de guanina pueden desplazar a los cuatro ligante de los complejos de Pt II.

Se ha encontrado que la forma reducida de Tripanotona Reductasa es rápidamente inhibida irreversiblemente por este tipo de complejos (2,2';6'2''-terpidirina) Pt (II) (Fig. 20). El mecanismo de acción se basa en modificaciones al sitio activo en específico a Cys 52 presumiblemente actúa como un grupo nucleofílico desplazando los 4 ligantes de los complejos de Pt II.

La selectividad de este tipo de complejos hacia TR, se ha demostrado ya que los mismos no inhiben a GR presumiblemente por la carga +2 del complejo, esta característica es un importante factor entre los compuestos inhibidores de TR. La actividad inhibitoria ha sido probada en formas tripomastigotes dando como resultados IC₅₀ entre 0.5 a 0.95 µM.

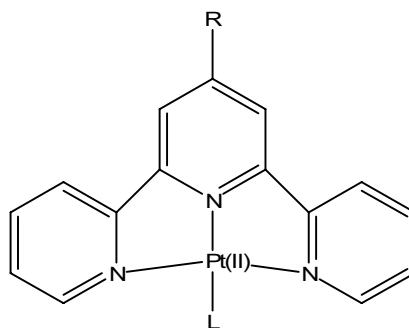


Fig. 20 Complejos de Pt (II) que inhiben la actividad de TR

4.1.1.13 Productos Naturales ⁶³

La actividad tripanocida mostrada por productos naturales en algunos casos es atribuida a la capacidad de estos de inhibir la actividad de Tripanotona reductasa entre esos compuestos encontramos los siguientes:

- ❖ Ajoene. Este compuesto ha mostrado inhibir el crecimiento de amastigotes y epigomastigotes dentro de un rango de 40 a 80 µM. Esto es atribuido a los cambios dentro de la composición de los fosfolípidos de membrana, lo cual es atribuido a la inhibición de la síntesis de los mismos. También se sabe que es un inhibidor selectivo de TR con un mecanismo de inhibición covalente dependiente de la presencia de NADPH, su mecanismo de acción se basa en las modificaciones que sufre la Cys 52.
- ❖ Kukoamina A. Procedente de la tradicional medicina oriental utilizada para el tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades, la Kukoamina A es un inhibidor reversible selectivo de TR, esto es atribuido a su estructura similar a la de un sustrato de esta enzima.

- ❖ Lunarina. Otra poliamida con la capacidad de inhibir la actividad de Tripanotión Reductasa es la Lunarina, este compuesto es un inhibidor competitivo y selectivo el cual presenta una cinética enzimática extraña, su mecanismo de acción se basa en el ataque nucleofílico al sitio activo Cys 52.
- ❖ Bisbencilisoquinolinas. Una gran clase de derivados fitometabólicos cuentan con efectos anti parasitarios, inmunomoduladores y cardiovasculares. Algunos miembros de esta familia de compuestos cuentan con carga positiva y grandes grupos hidrofóbicos que son características indispensables para la inhibición de TR. Compuestos como Pentamidina han mostrado actividad tripanocida $IC_{50} = 0.3 \text{ nM}$, su mecanismo de acción se cree que es una interacción con los canales de calcio afectando las concentraciones del mismo, pero se piensa que este tipo de compuestos cuentan con múltiples mecanismos como la inhibición de TR.

4.1.2 Compuestos inhibidores de Cruzaina

El estudio de la inhibición de las cisteína proteasas, ha sido una línea de investigación constante ^[85] en enfermedades parasitarias, ya que diferentes parásitos emplean este tipo de enzimas dentro sus procesos catalíticos de supervivencia en el huésped. Lo atractivo de estudiar este tipo de enzimas dentro de enfermedades parasitarias es que son enzimas presentes en todos los estadios del parásito, por lo cual los compuestos serán activos independientemente del estadio del este.

Los estudios en décadas pasadas han dejado grandes avances dentro del estudio de compuestos inhibidores de Cruzaina, entre los compuestos más prometedores se encontraron las Acil Hidrazinas y Chalconas, Fenotiazinas, Vinil sulfonas además de compuestos de base cetona, lactona, ureas y tiosemicarbonas. Todos estos compuestos se caracterizan por contar con un grupo químico que interacciona de manera covalente con un residuo de Cys. Por otra parte se observó que la potencia de este tipo de compuestos aumentaba al estar presentes grupos voluminosos o de carácter hidrofóbico, los cuales brindan estabilidad en el momento de la inhibición de la enzima.

4.1.2.1 Dipeptodil- α , β -epoxiesteres ⁶⁴

Basados en un reporte de 1998 donde se publicó que las Dipeptodil- α , β -cetonas contaban con actividad inhibitoria de cisteína proteasa además de tener una gran potencia y selectividad; se sintetizaron una nueva clase de inhibidores basados en estos, incorporando una unidad de epoxiéter dentro de su estructura con la finalidad de conocer el efecto en cuanto actividad y selectividad de este nuevo tipo de compuestos conocidos como Dipeptodil- α , β -epoxiesteres (Fig. 21).

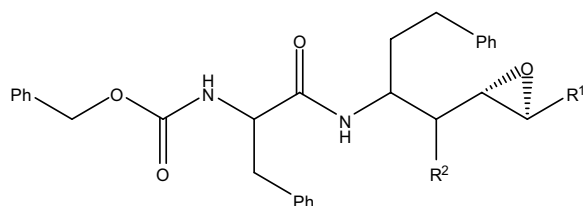


Fig. 21 Estructura Química de Dipeptodil- α , β -epoxiesteres

Los resultados obtenidos (Tabla.7) mostraron que los compuestos con un sustituyente de tipo alcohol en posición R² llevan a la pérdida de actividad a los compuestos. Mientras los compuestos que cuentan con un grupo cetona en la misma posición cuentan con actividad inhibitoria mayor, entre estos compuestos el número 3 es aquel que tiene mayor actividad inhibitoria aunque su estequiometria es opuesta a la del compuesto control. En relación al sustituyente R¹ se demostró que los compuestos con un sustituyente de carácter epoxiéster son más activos que compuestos con sustituyente epoxicetona. En cuanto a la cinética de los compuestos se demuestra que son de carácter tiempo-dependientes.

Tabla.7 Efecto inhibitorio de cruzipaina y determinación de IC₅₀ de Dipeptodil- α , β -epoxiesteres

Compuesto -R ¹ , R ²	Inhib. (%)	IC ₅₀ (nM)
11) R ¹ = OH, R ² = CO ₂ Et	5	n.d
15) R ¹ = OH, R ² = CO ₂ Et	1	n.d
3) R ¹ = O, R ² = CO ₂ Et	93	20
4) R ¹ = O, R ² = CO ₂ Et	55	50
1) R ¹ = H, R ² = O	-----	>1000
K11777 control(+)	100	5

4.1.2.2 3'-bromopropiofenontiosemicarbozonas⁶⁵

Dentro de los compuestos con actividad inhibitoria de Cruzaina por primera vez se prueban las Tiosemicarbozonas, las cuales han demostrado tener efecto inhibitorio en concentraciones no tóxicas para células mamíferas. Anteriormente se pensaba que la extensión de la cadena de carbono tenía correlación con la actividad mostrada por las Tiosemicarbozonas (Fig. 22), ya que los sustratos de las cistein proteasas son de carácter extenso, pero se ha observado que el sitio activo de esta enzima cuenta varias conformaciones estructurales.

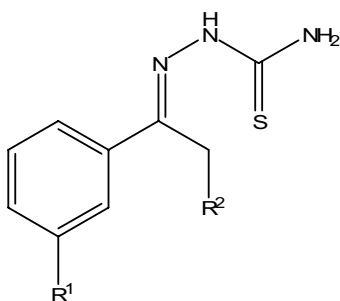


Fig. 22 Estructura química de Tiosemicarbozonas

Dentro de los compuestos sintetizados un gran número de ellos cuenta con IC_{50} menor de $1.5 \mu M$, por ejemplo las benzofenonas tiosemicarbazonas son potentes inhibidores de cruzaina con valores de IC_{50} entre $24 - 80 \text{ nM}$, mientras el compuesto 17 (Fig.23) es el compuesto más activo presentando una $IC_{50} = 17 \text{ nM}$. No se encontró ninguna relación estructura-actividad, ya que tanto los compuestos pequeños y grandes estructuralmente contaron con actividad inhibitoria de cruzaina, con lo cual se demuestra que esta enzima tiene varias conformaciones con lo cual compuestos de diferentes caracteres pueden contar con actividad inhibitoria de la misma.

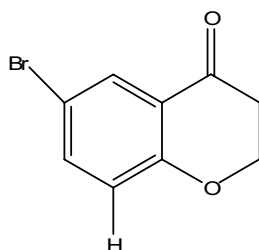


Fig.23 Compuesto más activo de la serie de Tiosemicarbazonas

4.1.2.3 Inhibidores con base α -ceto⁶⁶

Basados en un Screening se llegó a la conclusión de que uno de los ligados covalentes más efectivos son las α -cetoamidas (Fig. 24), ya que en estudios anteriores se había demostrado que la presencia de un átomo de nitrógeno perteneciente a una amida hacia más activo a los compuestos inhibidores de cruzaina además se demostró que este tipo de compuestos cuentan con las características necesarias para ser inhibidores competitivos irreversibles.

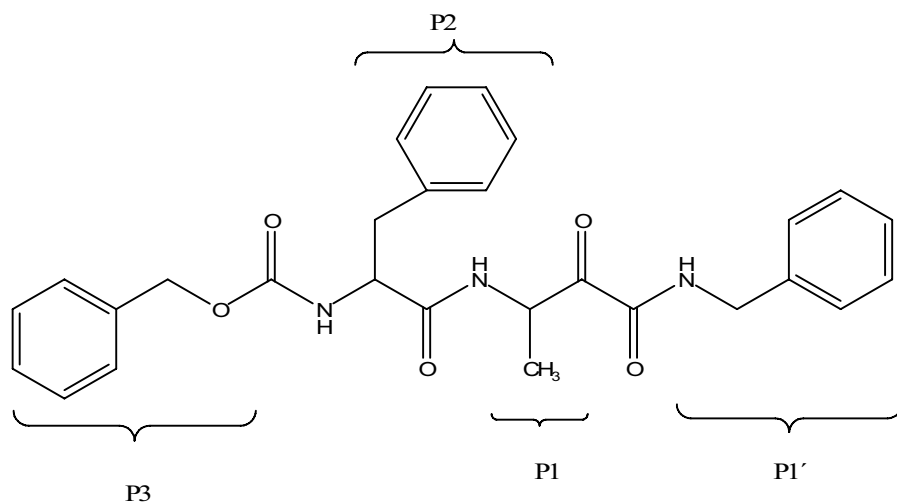


Fig.24 Estructura química de α -cetoamida identificada en el Screening inicial. Porciones Modificables P1,P1', P2, P3 AQ581332 el compuesto más potente con $IC_{50} = 4.7 \text{ nM}$ y una $K_i = 1102.9$.

La optimización de este tipo de compuestos se realizó fraccionadamente, para la modificación estructural de la sección P1 se utilizaron peptidil aldehídos llegando a la conclusión de que aquellos que contaban con una configuración –S- en su centro quiral o L-aminoácidos, eran los compuestos que poseían mayor actividad, además de esto se encontró que los compuestos con sustituyentes aromáticos en esta posición contaban con mayor actividad siendo en este caso el compuesto AQ718084 con $IC_{50} = 0.49$ nM.

La optimización de la fracción 2 se llevó a cabo con sustituyentes de carácter aminoácido- α -cetoésteres conservando la quiralidad –S- en P1. Se observó que hay una correlación entre la actividad y la hidrofilia de esta posición debido a que esta sección de la molécula interactúa con una parte muy hidrofóbica del sitio activo de Cruzaina.

El compuesto que contó con mayor actividad fue el sustituido con L-fenilalanina seguido de aminoácidos poco hidrofóbicos como L-leucina, L-valina, todos estos compuestos contaban con actividades en un rango de IC_{50} entre 2 a 10 nM. La optimización de la fracción P3 rápidamente mostró que la remoción del grupo Cbz provocaba una dramática disminución de la actividad, por lo cual se decidió no modificar esta parte de la molécula.

La optimización de las diferentes fracciones lleva la obtención de tres inhibidores irreversibles con grandes expectativas en la inhibición de Cruzaina: Un α -cetoéster,(AQ616476), α -cetoamida (AQ665183) y vinil α -cetoéster (AQ581332), los tres compuestos mostraron la inhibición de Cruzaina en valores de nM. El compuesto α -cetoéster,(AQ616476) demostró ser el más permeable, mientras el compuesto vinil α -cetoéster (AQ581332) demostró ser un compuesto de lenta unión al sitio activo. Las interacciones de este tipo de compuestos fueron demostradas con base a una cristalografía de la unión de vinil α -cetoéster (AQ581332) con el sitio activo de la enzima.

La inhibición de la cisteína proteasa ocurre por el ataque nucleofílico de un grupo sulfhidrilo o hidroxilo a los residuos de Cisteína o Serina del sitio activo (Fig.25), en el caso de los inhibidores es por el carbono vinílico. El fragmento P3 ocupa la subunidad S3 de la enzima basada en interacciones hidrofóbicas con residuos de Leucina y Alanina.

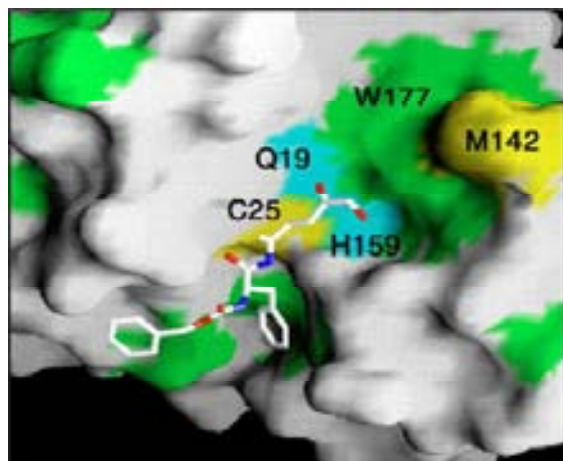


Fig.25 Representación de la superficie del sitio activo de Cruzaina. Residuos hidrofobicos están indicados de verde.

4.1.2.4 Peptidil sulfonas⁶⁷

Cruzaina forma parte de la familia de cisteína proteasa del grupo A, las cuales se caracterizan por ser activadas por Ca^{2+} . Este tipo de enzimas son efectivamente inhibidas por varias clases de compuestos peptidilicos actuando tanto reversible e irreversiblemente. Una nueva clase de inhibidores irreversibles son las peptidil sulfonas (Fig.26), las cuales han tenido gran actividad en la inhibición de Cruzaina, este tipo de compuestos cuentan con un grupo aceptor de electrones, el cual reacciona con la cisteína presente en el sitio activo de la enzima formando un enlace covalente. Esta nueva clase de compuestos ha demostrado moderada inactivación de cisteína proteasa del grupo A, con excepción de Cruzaina

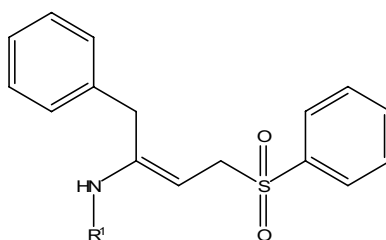


Fig. 26 Estructura química de peptidil sulfonas

La actividad reportada por las peptidil sulfonas (Tabla.8) es dependiente de la secuencia de péptidos presente en R¹, por ejemplo el compuesto más activo con IC₅₀ = 0.06 μM cuenta en su estructura con una secuencia de Leucina-Fenilalanina, otras secuencias como Valina- Fenilalanina o Alanina-Fenilalanina ven disminuida su actividad hasta IC₅₀= 10 μM. Se piensa que los mecanismo de acción involucrado en esta inhibición puede ser la interacción de la cisteína presente en el sitio activo con la porción vinilica, formando un enlace covalente y eliminando ácido sulfónico.

Tabla.8 Actividad inhibitoria de Cruzaina de Peptidil Sulfonas

Compuesto	R-	IC ₅₀ (μM)
7 a	Ala-Phe-	>10
7b	Val-Phe-	6
7c	Leu-Phe-(L)	0.06
6c	Leu-Phe-(R)	2

4.1.2.5 Derivados de Isatina⁶⁸

La Isatina también conocido como 2,3-dioxindol (Fig.27) es un producto natural encontrado en numerosas plantas, además este se puede encontrar como un derivado metabólico de la adrenalina humana. Varios derivados de Isatina se conoce que cuentan con propiedades antiparasitarias y recientemente se sabe que puede funcionar como inhibidores reversibles de cisteína proteasa. Su estructura química consistente en un grupo cetona adyacente a un anillo aromático, lo cual lo hace una estructura similar a las Tiosemicarbozonas, compuestos identificados como inhibidores de Cruzaina.

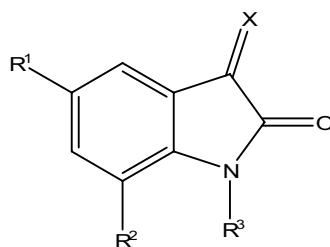


Fig.27 Estructura química general de Isatina

La actividad reportada por estos derivados en cuanto a la inhibición de Cruzaina (Tabla.9) muestran una actividad $IC_{50} > / = 10 \mu M$. Es claro que las sustituciones estructurales de R^1 no provocan una disminución de actividad, en cuanto a la sustitución en R^3 se observa que los grupos de índole aromática aumentan la actividad de los compuestos. El incremento de potencia se ve correlacionado con la N-sustitución, lo cual probablemente se le atribuye al efecto de estrechamiento entre esta fracción y el sitio activo de la enzima.

Tabla. 9 Actividad Inhibitoria de Cruzaina por derivados de Isatina

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	X	IC ₅₀ (μM)
Isatina	H	H	H	O	>> 10
2 a	H	H	H	N-NHC(S)NH ₂	8
2c	F	H	H	N-NHC(S)NH ₂	30
2f	I	H	H	N-NHC(S)NH ₂	9
2i	Cl	Me	H	N-NHC(S)NH ₂	10.5
3g	Me	H	m-OMe-Ph	O	2
3l	Cl	H	p-Cl-Ph	O	6

4.1.2.6 Aril Ureas⁶⁹

Las aril ureas son partes estructurales esenciales de varios fármacos candidatos para la inhibición de enzimas como: transcriptasa reversa HIV, Cruzaina además de receptores agonistas CCK-B. Se sabe que puede actuar como inhibidores no-covalentes dentro de padecimientos como presión arterial inhibiendo la acción de la angiotensina.

Después de realizar un Screening, se obtuvieron 21 candidatos de inhibidores de Cruzaina, de esa cantidad de compuestos únicamente nueve contaron con un $IC_{50} < 10 \mu M$ además de no ser tóxicos en células de mamífero por periodos de diez días. La variedad de estos nuevos compuestos inhibidores de Cruzaina abarca ureas, tioureas, amidas, sulfamidas, triazoles y semicarbozidas lo cual indica que Cruzaina puede interaccionar con una amplia variedad de compuestos que contengan en su estructura dos grupos aril conectados por con un grupo aceptor de electrones. Los nueve compuestos fueron analizados por medio de un DOCKING, donde se encontraron factores en común entre las interacciones de los mismos y el sitio activo de la enzima (Fig.28).

El sitio activo de la enzima se divide en 4 segmentos o subunidades, la subunidad S2 es un lugar extenso que prefiere las interacciones con residuos hidrofobicos con un cierto grado de electronegatividad, mientras las unidades S1 y S3 son lugares muy electronegativos. Las interacciones en S2 se llevan a cabo con residuos de Asp158 la cual contiene un grupo carbonilo que puede ayudar a la formación de puentes de hidrógeno a los ligandos que cuenten con un grupo amino en su estructura. La subunidad S1' se ve involucrada en la orientación de anillos aromáticos.

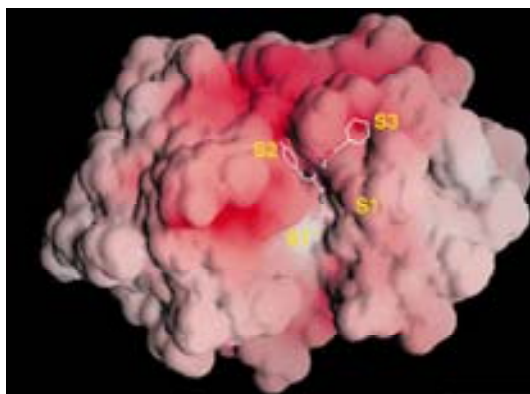


Fig.28 Subunidades de Cruzaina. Zonas electronegativas (Rojo), electropositivas(Morado)

De la actividad mostrada por los compuestos (Tabla.10) se observa que las halogenaciones del anillo aromático causan perdida de actividad inhibitoria, mientras en esa posición grupos con un oxígeno tienen una buena actividad. Se observa que tanto en el caso de contar con dos anillos tanto de seis como de cinco miembros la actividad se ve disminuida, la ramificación apropiada es la unión de cinco y seis miembros lo cual se observa en el compuesto más activo (Tabla.10), esto se explica por que las interacciones de esta parte de la molécula son con la subunidad S2 la cual favorece la formación de puentes de hidrogeno con grupos amino además de interactuar bien con compuestos poco electronegativos.

Tabla.10 Compuestos con actividad inhibitoria de Cruzaina con base estructural de Aril Urea.

Compuesto	Estructura	IC ₅₀ (μM)
D23		1.9
D28		2.7
D37		<10
D51		1.2
D47		< 10

4.1.2.7 Análogos de Hidroximetil cetona⁷⁰

En particular las interacciones que sufre Cruzaina en su subunidad S2 donde se encuentra un sitio hidrofóbico de la enzima, ha permitido aprovechar estas características estructurales para crear una nueva gama de análogos con base cetona para inhibir la acción de esta proteasa. Algunos compuestos con base cetona (Fig.29) han reportado ser una gama de inhibidores reversibles y selectivos con bajo toxicidad en células mamíferas.

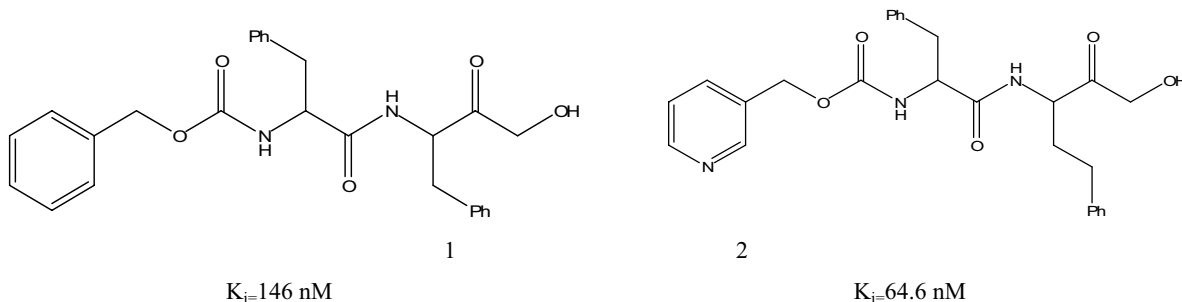


Fig.29 Hidroximetil cetonas activas como Inhibidores de Cruzaina

Basados en una cristalografía se pudo observar que los dos compuestos son inhibidores no-covalentes que poseen dentro de su estructura un grupo cetona, el cual es considerado como la parte farmacófica de este tipo de compuestos, ya que esta fracción de la molécula es estabilizada por puentes de hidrogeno con residuos de Gln19 y Cys25 haciéndola la región de unión entre la ligando y el sitio activo. Esto se confirmó haciendo la sustitución del grupo carbonilo por grupos metileno perdiendo la actividad inhibitoria. Con esto se explica el mecanismo de inhibición del sitio activo de compuestos que poseen como base un grupo cetona dentro de su estructura.

4.1.2.8 Mercaptometil cetonas⁷¹

Las mercaptometil cetonas (Fig.30) son una serie de potentes inhibidores de Cruzaina basados en vinil sulfonas y diazometil cetonas, conservando la parte farmacoforica de las mismas, esta parte estructural es un grupo carbonilo es cual le provee de estabilidad mediante puentes de hidrogeno con el sitio activo de la enzima para ser mas específico con la subunidad S2.

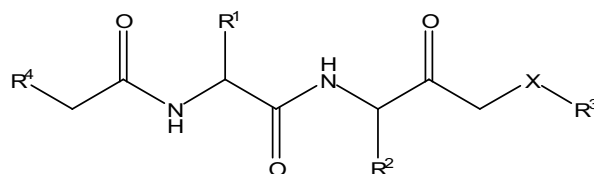


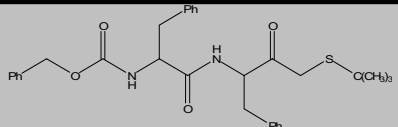
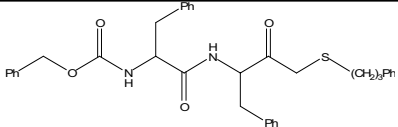
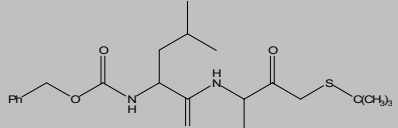
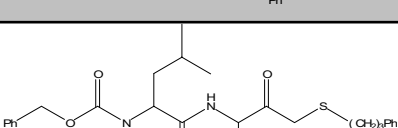
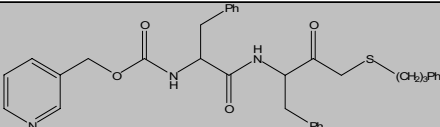
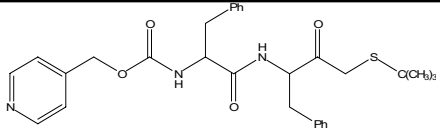
Fig.30 Estructura Química general de Mercaptometil cetonas

Este tipo de inhibidores no cuenta con interacciones con otro tipo de proteasas por lo cual se piensa que son selectivos a Cruzaina. Dentro de los resultados (Tabla. 11) se sugiere que los grupos voluminosos con grandes cadenas de grupos hidrofobicos son los mejores sustituyentes de las mercaptometil cetonas, citando ejemplo de la primera serie sintetizada los compuestos con mayor actividad fueron aquellos con sustituyentes como: isopropil mercaptan, etil-3-mercaptopropionato, tert-butil mercaptan y 3-fenil propil mercaptan.

Capítulo 4. Nuevos Compuestos

La incorporación de un grupo 3-piridil en R⁴ ayudo a lograr un aumento de solubilidad de los compuestos además de obtener compuestos más activos. La incorporación de un grupo fenilalanina en R³ provocó que este tipo de compuestos ya no fuera degradado por proteasas humanas, logrando una selectividad aun mayor sobre Cruzaina, además esta modificación aumento la actividad de lo compuestos.

Tabla.11 Inhibidores de Cruzaina con base de Mercaptometil cetonas

Compuesto	Estructura	K ₁ (nM)
10r		2.5 +/- 0.3
10s		2.0 +/- 0.2
11c		1.3 +/- 0.1
11d		1.0 +/- 0.1
16e		0.9 +/- 0.1
16h		14.1 +/- 0.9

4.1.2.9 Inhibidores con base de Oxido Nítrico⁷²

El oxido nítrico es un pluripontente regulador molecular entre otras cosas es utilizado para el tratamiento de problemas en la arteria coronaria. Aunado a las funciones ya conocidas del mismo se descubrió que el Oxido Nítrico tiene actividad de inhibidor de cisteína proteasas. Se ha observado que el mecanismo de acción del Oxido Nítrico, se basa en las interacciones con Cys25 del sitio catalico de la enzima, formando un enlace covalente entre estos inhibiendo la acción de la misma. Además se sugiere que existen interacciones que pueden facilitar esa unión, como lo son interacciones con residuos de His59, Asn175 las cuales intervienen en la formación y disociación del complejo enzima-sustrato. Por otra partes las interacciones del Oxido Nítrico no son exclusivas ha esos sitios, ya que este actúa con unión a otras residuos de Cys, Tyr y Trp.

Basándose en esa información se probaron una serie de Oxidos (Tabla.12) como: GSNO (S-nitroso-glutación), NOR-3 ((E)-4-etil-2-[(E)-hidroximino]-5-nitro-3-hexamida), SIN-1 (3-morfolinosidnonimina), SNAP (S-nitroso-acetil-penilamina) y SNP (Nitroprusida sódica), los cuales resultaron ser inhibidores dependientes de concentración, uniéndose covalentemente al residuos Cys25.

Tabla.12 Efecto de NO en la actividad catalica de Cruzaina

Inhibidor	Actividad Cruzaina (%)
Ninguno	100 +/- 7
GSNO	6.1 +/- 0.8
SNAP	9.6 +/- 1.2
SNP	6.1 +/- 0.8
SIN	7.8 +/- 1.0
Control (+)	2.9 +/- 1.0

4.2 Compuestos Nitro-Heterocíclicos^[86]

Los compuestos con un grupo Nitro-Heterocíclico, son un grupo de moléculas biológicamente activas, las cuales incluyen 5-,2-nitroimidazoles y 5-nitrofuranos. Este tipo de compuestos han sido probados como agentes anti parasitarios y bactericida, utilizado estos dentro de la terapia de enfermedades como: Giardiasis, Tricomoniasis, Balantidiasis, Histomoniasis y Amibiasis. Dentro de los fármacos más importantes dentro de este tipo de compuestos encontramos: Benznidazol, Furazolidina, Metronidazol, Nifurtimox, Tinidazol, etc.

Durante años se ha demostrado que la eficiencia de este tipo de compuestos esta ligada a la parte farmacoforica Nitro-Heterocíclica, ya que esta fracción de la molécula es importante para la recepción de un electrón, con la cual inicia un proceso de reducción en la molécula, este sitio es aquel donde se inicia el mecanismo de acción, dando como resultado la acción farmacológica de este tipo de compuestos. También se ha demostrado que el grupo nitro dentro de este tipo de moléculas juega un papel importante en los aspectos lipofílicos de la moléculas, ya que se ha observado que este fragmento ayuda a la molécula a penetrar el tejido incluyendo células tumorales. Por otra parte se ha encontrado que este grupo nitro es importante en el reconocimiento por parte de los receptores membranales.

4.2.1 Nitrofuranos

Los primeros compuestos nitro-heterocíclicos utilizados en la quimioterapia fueron los nitrofuranos. Su uso como agentes antibacterianos fue reconocido por primera vez por Dodd y Stilman y colaboradores en 1944; quienes descubrieron que los derivados del 5-nitrofurano poseen actividad biológica debido a la presencia del grupo nitro en el C5 del anillo furano, también se observó que los sustituyentes en la posición 2 del anillo influyen en los cambios del grado de actividad, como consecuencia de ello se han sintetizado un gran número de Nitrofuranos antimicrobianos. De los nitrofuranos, un ejemplo de compuesto que mostro actividad antibacterial fue: Nitrofurazona (semicarbazona del 5-nitro-2-furaldehído), el cual fue el primer nitro-heterocíclico empleado con fines terapéuticos, fue introducido en la segunda guerra mundial, debido a su gran eficacia como antibacteriano en la piel y en las mucosas, así como su uso en quemaduras, infecciones superficiales o úlceras cutáneas crónicas,

después de su uso como antimicrobiano, la Nitrofurazona fue probada contra infecciones tripanosomiales en animales de laboratorio, y se encontró que fue activa contra *Trypanosoma equiperdum* en ratones. Estudios clínicos en humanos establecieron a la nitrofurazona como un fármaco útil en el tratamiento de la enfermedad del sueño africana.

4.2.1.1 N-alkil propenamidas⁷³

Los análogos de Nifurtimox han sido una línea de investigación constante debido a que *Trypanosoma cruzi*, no ha mostrado una resistencia significativa ante ellos. Dentro de esta gama de compuestos se conserva la porción estructural nitro-heterocíclica, que es aquella que brinda la actividad biológica de este tipo de compuestos.

Las amidas α , β insaturadas (Fig.31) acompañadas de nitro-heterociclos como ramificación han sido evaluadas *In Viro* en contra de *T. cruzi* encontrando actividad tripanocida

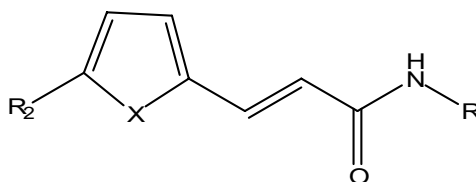


Fig.31 N-alkil-propenamidas

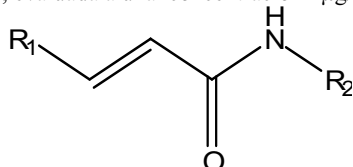
Los resultados de la evaluación *In Vitro* de la actividad Tripanocida de los compuestos se enlistan en la Tabla.13. Los compuestos 6a, 1a, 2a y 3a presentaron una mayor actividad tripanocida, presentando dentro de su estructura un grupo 5-nitrofurano. Por otra parte los compuestos carentes de este grupo, como 4a y 5a presentan una disminución en la actividad tripanocida, lo cual confirma que esta porción de la molécula es una parte clave para la actividad.

La actividad antichagásica de los compuestos se ve alterada dependiendo del heteroátomo presente, ya que los compuestos con un anillo de furano presentan una actividad mayor que sus análogos con un anillo de tiofeno. Al variar el sustituyente R² se observa que los compuestos con un sustituyente de tipo aromático presentan mayor actividad antichagásica que aquellos compuestos con una cadena alifática. La actividad de compuestos análogos al Nifurtimox se encuentra ligada a la capacidad para

Capítulo 4. Nuevos Compuestos

reducirse creando especies tóxicas de oxígeno las cuales, pueden provocar la muerte de *Trypanosoma cruzi*, debido a que dicho parásito presenta una deficiencia enzimática de catalasa y glutatión peroxidasa, las cuales ayudan a eliminar las especies oxidantes del medio, impidiendo que de esta manera se inicien las reacciones de oxidación que llevarían a la muerte al parásito.

Tabla 13. Estructura química de los compuestos sintetizados y actividad biológica reportada como porcentaje de inhibición de crecimiento de epigomastigote *Trypanosoma cruzi*, evaluada a una concentración 1µg/mL, y a un Tiempo 24h.

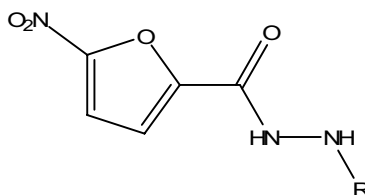


Comp.	R ¹	R ²	% Inhibición
1a			47.83
2a			47.83
3a			39.13
4a			8.7
5a			17.39
6a			52.17
7a			30.44

4.2.1.2 5-Nitro-2-furancarbohidrazidas⁷⁴

En la actualidad la producción de Nifurtimox se ha detenido, por lo cual la necesidad de contar con un nuevo compuesto terapéutico en el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana es grande. La línea de investigación de nitro-heterociclos continúa siendo una de las más buscadas para encontrar este nuevo compuesto. Una nueva gama de derivados de Nitrofuranos ha sido probada con la finalidad de encontrar un nuevo escalafón del cual partir para diseñar nuevos derivados Tripanocidas. Los compuestos han sido evaluados comparando su actividad con lo presentado por Nifurtimox, Benznidazol, fármacos usados en el tratamiento de esta parasitosis. Los resultados (Tabla.14) mostraron que estos nuevos derivados de hidrazidas cuentan con una potencia similar a la de los fármacos utilizados clínicamente fungiendo como aceleradores del ciclo Redox, dentro del parásito con cual su mecanismo de acción continúa siendo la producción de estrés oxidativo además se supo que durante este estudio que los 5-Nitro-2-furancarbohidrazidas no interactúan con Tripanotona Reductasa ni alteran las membranas lipídicas.

Tabla.14 Actividades In Vitro en formas amastigotes de 5-Nitro-2-furancarbohidrazidas



Compuesto	-R	ED ₅₀ (μM)
1	-CO-CH ₂ -2(Napht)	0.4
5	-H	0.5
7	-CO-Ph	16
10	-CO-1(Napht)	3
15	-SO ₂ -Ph	16
Nifurtimox		0.4
Benznidazol		3.13

4.2.1.3 Derivados del 5-Nitro-2-furil⁷⁵

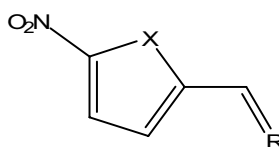
Los dos fármacos utilizados para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana no son útiles durante la fase crónica de este padecimiento, por lo cual la búsqueda de un nuevo fármaco el cual pueda ser utilizado en todas las fases del tratamiento es apremiante.

Se han seleccionado los Nitrofuranos como base para la búsqueda de un nuevo compuesto, debido a que este tipo de compuestos son sustratos de Tripanotiona Reductasa y además algunos de ellos inhiben la acción de esta enzima en su estadio reducido. Tripanotiona Reductasa es el medio para que este tipo de compuestos, sean provistos de un electrón con el cual formaran aniones radicales iniciando así el ciclo Redox del parásito, subsecuentemente estos aniones radicales será oxidados por oxígeno con lo cual se iniciara la formación de superóxido.

Basándose en un estudio 3D QSAR se considero que los derivados de 5-nitrofuril, eran los compuestos apropiados tanto estéricamente como con las propiedades electrónicas para ser evaluados en la búsqueda de un nuevo compuesto, además las interacciones modeladas con un DOCKING fueron favorables energéticamente entre el ligando y la enzima.

La mayoría de los compuestos presentó una actividad entre 10 a 25 μM , algunos de ellos como los son los compuestos 4-7, 10, 11, 16,19 y 20 mostraron una actividad (Tabla.15) mayor a la del Nifurtimox a una concentración de 5 μM , por lo cual se piensa que este tipo de compuestos podrían ser más efectivos tanto en formas infectivas como en formas intracelulares del parásito. Por otra parte estos compuestos son potenciales sustratos de Tripanotiona Reductasa, lo cual se observa con las interacciones favorables entre los compuestos y la enzima observando fuertes energías de enlace entre los mismos. Además por otra parte no se encontró correlación entre la facilidad de reducción y la Energía de Gibbs.

Tabla.15 Actividad Antitripanosomal de derivados de 5-nitrofuril evaluados a una concentración de 5 μ M.



Com	X, -R	Familia	% Inh	ED ₅₀ (μ M)	EGibbs	Log P
1	O, =N-NH-CO-NH(CH ₂) ₃ CH ₃	Semicarbazona	30.0	7.4 +/- 0.5	-46.8	1.94
5	O, =N-NH-CO-O(CH ₂) ₃ CH ₃	Carbazato	96.2	3.2 +/- 0.5	-49.2	2.27
11	O, =CH-CO-NH(CH ₂) ₃ CH ₃	Amida	82.0	2.0 +/- 0.5	-51.6	3.37
16	O, =CH-CO-O(CH ₂) ₃ CH ₃	Ester	42.0	>5	-54.5	3.12
21	O, =C(NH) ₂ -CO-OCH ₂ CH ₃	Amino-ester	0.0	> 10	-48.7	1.30

4.2.1.4 Complejos Metálicos de Re y Ru con Nitrofurilsemicarbazonas⁷⁶

En décadas pasadas el gran interés biológico en los metales de transición como potentes antineoplásicos llevo a varios descubrimientos principalmente en metales como Pt, Ti, Rh, Au, Ru. En particular los complejos de rutenio exhibieron una excelente actividad anti-tumoral por ejemplo la coordinación de Ru (II) con imidazoles muestra gran actividad anti metástasis.

La buena correlación entre el metabolismo de una célula tumoral y una infectada con *Trypanosoma cruzi*, ha llevado a que dentro de la patología Tripanosomiasis Americana se prueben compuestos efectivos en contra de tumores con la finalidad de encontrar un compuesto activo en contra de la misma. En este caso la síntesis de complejos metálicos aunados a ligantes activos puede crear un mecanismo dual en contra de protozoarios.

Los ligandos utilizados en este caso son derivados del 5-nitrofuril, los cuales han sido evaluados anteriormente como agentes Antichagásicos. Además se conoce que la fracción 5-nitrofuril es la parte farmacofórica de este tipo de compuestos. Los nuevos complejos de Ru y Re con N-butil derivados de 3-(5-nitrofuril) acroleína semicarbazona (Fig.32) como ligante.

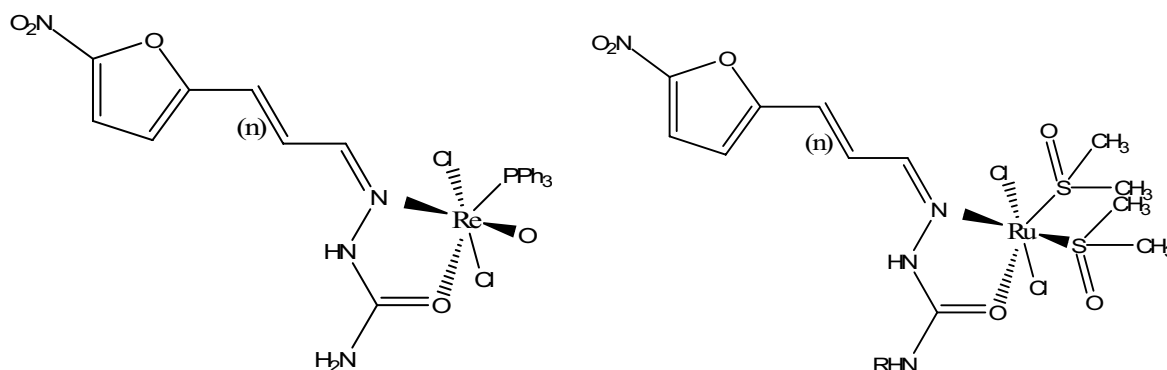


Fig.32 Complejos de Re y Ru

Los resultados obtenidos (Tabla.16) fueron distintos por una parte los complejos de Re con ligandos 3 y 4 se descompusieron inmediatamente, mientras con el ligando 2 la actividad tripanocida aumento. Por otra parte todos los complejos de Ru disminuyeron la actividad mostrada por los ligandos solos, esto se explica por que este tipo de complejos presenta baja lipofilicidad por lo cual se puede pensar que su actividad se vera disminuida. Los ligandos solos fueron los compuestos más activos. La fuerte interacción entre los complejos de Ru con DNA se mantuvo por lo cual este tipo de compuestos podría contar con actividad antitumoral.

Tabla.16 Actividad In Vitro Tripanocida de Complejos de Rutenio

Compuesto	PGI (%) Ligando libre	PGI (%) Complejo Re-L	PGI (%) Complejo Ru-L
1	78	65	0
2	50	64	20
3	25	-----	0
4	84	-----	45

*PGI = porcentaje de inhibición de crecimiento

4.2.1.5 5-Nitrofuril Tiosemicarbozonas⁷⁷

La actividad presentada por los diferentes análogos de 5-nitrofuril, ha sido tomadas en cuenta para sintetizar nuevas tipos de compuestos en el combate de la Tripanosomiasis Americana.

Dentro de esta nueva línea de investigación se realizaron modificaciones estructurales a algunos análogos de Nifurtimox (Fig.33), basándose en la actividad presentada por estos y compuestos inhibidores de Cruzaina, esta modificación en específico fue la sustitución un grupo carbonilo por un grupo sulfuro, este ultimo permite al compuesto unirse de manera covalente al sitio de la enzima siendo así un inhibidor de la misma, además de contar con la parte farmacoforica de los derivados de Nifurtimox, la cual se encarga de producir especies toxicas de oxigeno.

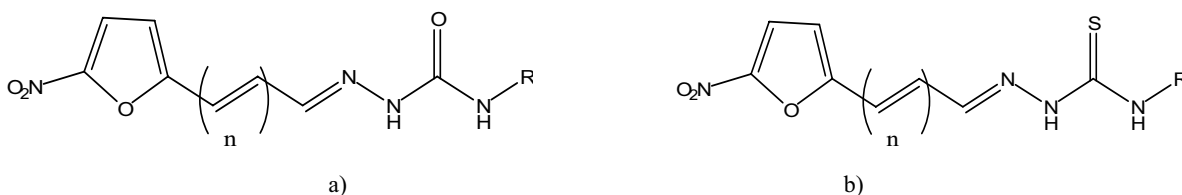


Fig.33 a) Análogo de Nifurtimox, b) Tiosemicarbozonas

La actividad presentada por los nuevos derivados de 5-Nitrofuril (Tabla.16) fue probada en epigomastigotes de *T. cruzi*, algunos de estos derivados fueron más activos que el Nifurtimox, se comprobó que la sustitución del grupo carbonilo por el grupo sulfuro no afecta el mecanismo de acción basados en la producción de radicales libres de oxigeno al medio, esta acción es achacada a la parte 5-Nitrofuril conocida como la fracción farmacofórica de este tipo de compuestos. Las Tiosemicarbozonas presentaron actividad mayor a la de los otros análogos en especial el compuesto 5b que presento un $ID_{50} = 2.7 \mu M$.

Tabla .16 Actividad In Vitro de nuevos derivados de 5-Nitrofuril

Compuesto	n	-R	ID ₅₀ (μM)
3 a	0	-H	3.4
4 a	1	-H	3.9
5b	0	-H	2.7
6b	1	-H	3.5
8b	1	-Me	4.5
12b	1	-Ph	3.6
Nifurtimox			6.1

Aunado a estos resultados se realizó un estudio empleando Química Computacional revelando que una característica dentro de todos estos compuestos era conservar la carga atómica negativa similar en la fracción NO₂. Se encontraron correlaciones lineales entre la actividad y descriptores moleculares entre ellos: Carga en C=S, HOMO y GAP, estas relaciones indican que mientras la carga en la fracción tiocarbonil sean más negativa o el valor total de HOMO lo sea, la actividad que presentaran este tipo de compuestos será mayor.

4.2.1.6 Derivados de Nitrofurano y Nitroimidazol⁷⁸

Los compuestos utilizados dentro de la quimioterapia de la Tripanosomiasis Americana, han sido poco eficientes además de provocar efectos adversos incluyendo entre estos la mutagenesis, dentro de estos compuestos hablamos específicamente del Benznidazol, compuesto con un mecanismo de acción basado en la unión covalente a macromoléculas; por otra parte compuestos como el Nifurtimox y el Megazol, compuestos nitro-heterocíclicos que poseen un mecanismo de acción basado en la producción de especies tóxicas de oxígeno.

Dentro de este estudio se probaron tres diferentes tipos de compuestos 2-nitroimidazoles (análogos del Benznidazol), 5-nitroimidazoles (análogos al Megazol) y nitrofuranos (análogos al Nifurtimox). Los tres diferentes tipos de compuestos lograron la inhibición del crecimiento de *T.cruzi* (Tabla.17) siendo el propio Megazol y uno de sus derivados los compuestos más activos.

Tabla.17 Actividad In Vitro de diferentes tipos de Nitro-heterociclos, formación de especies toxicas de oxigeno

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	K ₂ (L/mol/s)
Benznidazol	11.44 +/- 0.1	8.9X 10 ²
1	10.53 +/- 1.3	7.0X 10 ²
Megazol	3.75 +/- 0.1	1.9X 10 ²
2	38.11 +/-0.1	7.8X 10 ²
3	7.46 +/- 0.3	3.3X 10 ²
4	34.16 +/- 2.9	2.7X 10 ²
Nifurtimox	9.91 +/- 0.2	5.3X 10 ²
5	77.99 +/-1.3	2.3X 10 ²
6	12.26 +/-6.0	8.9X 10 ²

Estos compuestos no son efectivos contra la forma tripomastigote, debido a la baja concentración de tioles, lo cual hace menos efectivo el mecanismo de acción de los compuestos basados en la producción de especies toxicas de oxigeno, explicando así la disminución del ciclo redox del parásito y la menor concentración de iones superóxido.

Los mecanismos de acción basados en la producción de especies toxicas de oxigeno, se basan en la transferencia de un electrón al grupo nitro de la molécula para forma un anión radical, mientras los valores de K₂ indican una disminución de radicales eso significa estabilidad en el medio de reacción. En condiciones anaeróbicas la formación de radicales libres disminuye rápidamente para los compuestos 5-nitroimidazol que para los compuestos análogos de Nifurtimox, esto se explica por que los compuestos 5.nitroimidazoles muestran un producto intermediario donde posiblemente intervenga un segundo electrón, mecanismo único para compuestos análogos al Megazol.

4.2.2 Otros Heterociclos

4.2.2.1 bis-2-5-[4-guanidiofenil] tiofenos⁷⁹

El uso de fármacos en contra de enfermedades parasitarias tiene dentro de sus mayores limitaciones la toxicidad, la eficacia, biodisponibilidad, sus regímenes de dosificación entre otros. La actividad antiparasitaria de moléculas dicationicas ha sido reportada desde 1930, desprendiendo moléculas como: Pentamidina utilizada en el tratamiento de la tripanosomiasis africana, la Pafuramidina utilizada en contra malaria, etc. Se sugiere que las moléculas dicationicas actúan uniéndose al DNA a sitio ricos en A-T, la unión al DNA no es el mecanismo por el cual mata al parasito pero hay evidencia de que esta unión inhibe sitios específicos para la transcripción de enzimas. Por otra parte, las diguanidinas dicationicas (Fig. 34) han sido reportadas con actividad tripanocida siendo tomadas en cuenta como prototipos de nuevos potentes compuestos.

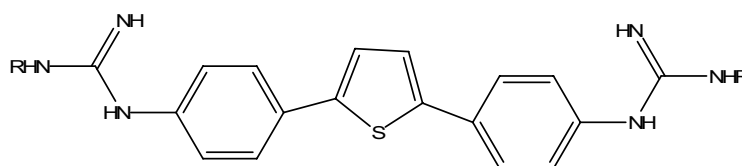


Fig.34 Estructura Química de Di catión Diguanidino

Dentro de la actividad mostrada por los compuestos (Tabla.18), se evaluó la afinidad de los mismos con el DNA. Las sustituyentes pequeños N-alkil exhiben valores pequeños de unión a DNA a comparación del compuesto 3a, todos los compuestos presentan similar unión a DNA, la cual es menor a la presentada por la Furamidina. La actividad tripanocida de los mismos es modesta se encuentra en un rango de 2 a 35 μM , siendo el compuesto más activo el compuesto 3e con un $\text{IC}_{50} = 1.7\mu\text{M}$, la cadena pequeñas cuentan con valores de actividad bajos, pero mientras aumenta la cadena el valor de actividad lo hace al igual. Una sustitución de naturaleza aromática disminuye la actividad pero al ser sustituida su actividad vuelve a ser pequeña; por lo cual se piensa que los compuestos con sustituyentes voluminosos, serán los compuestos más activos.

Tabla. 18 Afinidad a DNA y actividad In Vitro de Di catión Diguandino

Compuesto	R-	ATm	IC ₅₀ (μM)
Pentamidina		12.6	5.35
Furamidina		25.0	23.3
3 a	H	19.9	154.0
3b	Me	16.2	30.5
3e	c-hex	17.8	1.7
3f	Ph	19.5	9.9
3g	4-MePh	16.8	3.7

Atm. Unión a DNA utilizando polyA- polyT

4.2.2.2 Derivados de β-lapachona⁸⁰

Algunos derivados naturales y sintéticos de naftoquinonas han sido evaluados como antiparasitarios, dando como resultado ser posibles compuestos activos en contra de *Trypanosoma cruzi*, entre estos compuestos encontramos: lapachol, β-lapachona y α-lapachona (Fig.35). Estos compuestos inhiben la movilidad del parásito progresivamente además de inhibir el crecimiento de la forma epigomastigota.

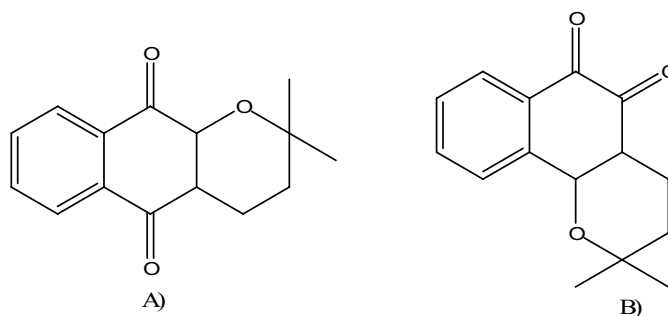


Fig.35 A) β-lapachona, B) α-lapachona

La capacidad tripanocida de los compuestos (Tabla.19) es encabezada por el compuesto 18 (Fig.36), una piranoquinolenquinona derivada de una α-lapachona, este resultado es interesante debido a que los derivados de α-lapachona mostraron contar con una baja actividad, lo cual indica que el nitrógeno presente en el anillo aromático incrementa la actividad tripanocida de este tipo de compuestos. Mientras los derivados β-lapachona 4 y 8 fueron aquellos que presentaron un valor menor de IC₅₀, la peculiaridad de estos compuestos fue presentar un grupo –OH en el carbono 3 y un grupo –Me en el carbono 2. La habilidad de este tipo de compuestos por producir radicales libres dentro del parásito es bien conocida por la manera en que actúan las quinonas inhibiendo la acción de *T. cruzi*.

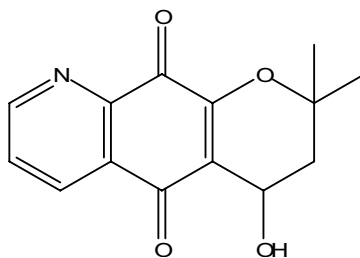


Fig.36 Derivado más activo de lapachona

Tabla. 19 Actividad de Derivados de lachona inhibiendo el crecimiento de epigomastigotes de *T.cruzi*

Compuesto	IC ₅₀ (μM)
Lapachol	31.3 +/- 0.01
β-lapachona	0.21 +/- 0.01
α-lapachona	24.7 +/- 0.36
4	3.75 +/- 1.36
8	1.93 +/- 0.07
18	0.19 +/- 0.02
Nifurtimox	20.6 +/- 0.10

La actividad de estos compuestos tal ves esta ligada por la producción de metabolitos electrofilicos que se podrían unir a macromoléculas de *T. cruzi* además de presentar un daño estructural en la mitocondria del parásito.

4.2.2.3 1H-pirazol[3,4-b]piridina⁸¹

Debido a la poca tolerancia de los efectos tóxicos y de la poca efectividad de los compuestos utilizados para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana, se han buscado nuevas alternativas que no incluyan nitrofuranos y nitroimidazoles, por lo cual se describe una nueva serie de compuestos con posible actividad antichagasica basado en derivados de fenilpirazol, estos han sido descritos anteriormente y se sabe que poseen actividad antiparasitaria desde el año 1900. Dada esta información se llevo la síntesis de una serie de 1H-pirazol[3,4-b]piridina (Fig. 37) que presentaran sustituyentes con diferentes propiedades redox. Toda la serie de compuestos mostraron contar con actividad tripanocida (Tabla. 20), lo cual reforzó la idea de que la estructura pirazolpiridina puede funcionar como un potente antiparasitario. Dentro de las modificaciones de los sustituyentes encontramos que una sustitución en posición Y de grupo OH o átomo de F causa una disminución de la actividad, además dentro de esta misma posición un grupo OCH₃ provoca el decrecimiento de dicha actividad. Dentro de la posición X

se observa que el efecto tripanocida es mayor cuando esa posición no está sustituida; por citar un ejemplo el compuesto más activo **6g** posee como sustituyente un grupo OH en posición Y mientras contiene un protón en X, este presentan una actividad de $IC_{50} = 1.9 \mu\text{g/mL}$.

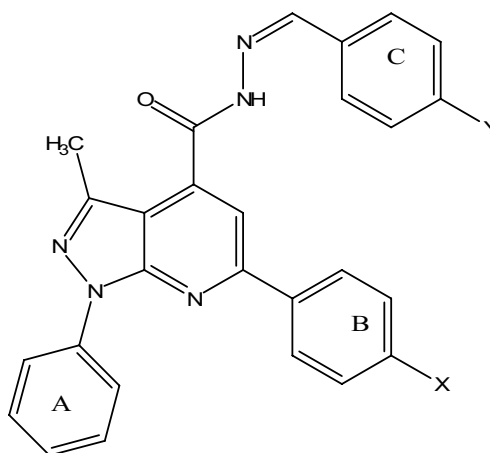


Fig.37 Estructura General de 1H-pirazol[3,4-b]piridina

Tabla.20 Actividad In Vitro de N'-bencilidina-3-metil-1,6-difenil-1H-pirazol[3,4-b]piridin-4-carbohidrazina

Compuesto	Y	X	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
6a	H	H	205.3
6b	F	H	88.9
6f	F	OC_2H_5	39.3
6g	OH	H	1.9
6i	OH	Cl	71.8
6l	NO_2	H	95.3
6m	NO_2	CN	37.3

Analizando la estructura de los compuestos (Fig.38), se encontró que los compuestos más activos poseían densidad electrónica dentro de los tres anillos aromáticos, en contraste los compuestos menos activos solo poseían esta carga en dos de estos anillos. Además se observó que la posición del orbital HOMO dentro de los anillos A y B era crucial para las interacciones con el receptor. Pasando a un plano más general se piensa que el compuesto más activo **6g**, su sustituyente puede actuar formando un puente de hidrógeno con el receptor, además su anillo A presenta una orientación diferente a la de los demás compuestos.

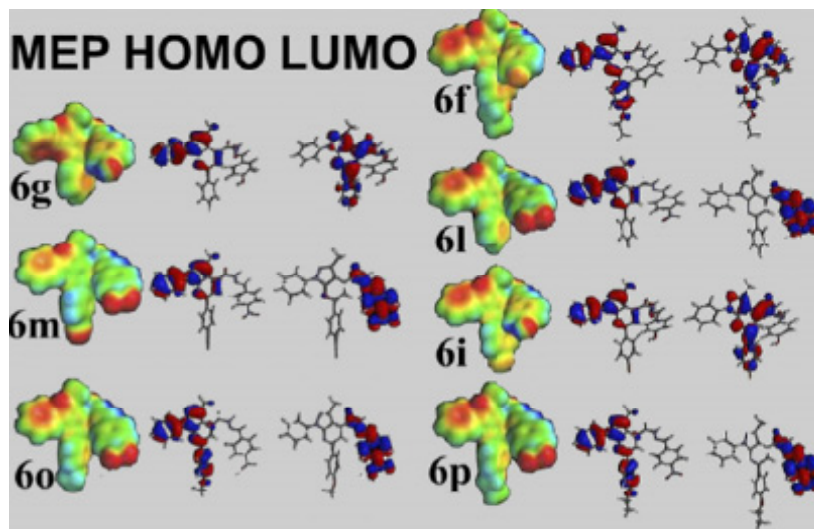


Fig.38 Comparación entre los compuestos más activos y los menos de MEP, HOMO y LUMO

4.2.2.4 Derivados de Furaxanos⁸²

El óxido nítrico endógeno es un potente agente microbiano que junto con intermediarios reactivos de oxígeno, funciona como un potente y tóxico mediador de la actividad de macrófagos, además NO funciona como inhibidor de enzimas. Numerosos donadores de NO como los furaxanos y nitratos orgánicos han resultado citotóxicos en contra de bacterias y protozoarios incluyendo *Trypanosoma cruzi*.

La identificación de dos potentes derivados de furaxanos (Fig.39) con excelentes capacidad inhibitoria probablemente resultado de la habilidad de producir NO, fueron estudiados y evaluados 123 derivados de los mismos.

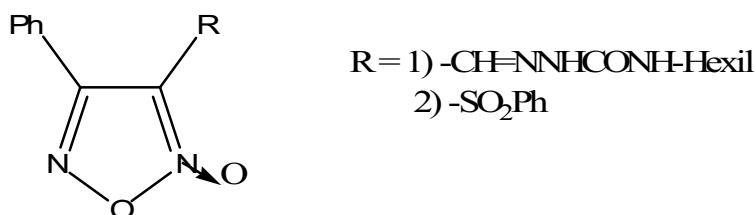


Fig.39 Estructura Química General de derivados de Furaxanos

Dentro de los nuevos compuestos sintetizados se encontraron furaxanos más potentes que el Nifurtimox y Benznidazol. Dentro de las modificaciones estructurales realizadas se pudo observar que la inclusión de la fracción farmacofórica 5-nitroimidazolil como sustituyente no mostró un aumento de actividad de los furaxanos. Además se observa claramente que la ausencia de la fracción N-óxido causa una caída drástica de la actividad de los compuestos; este tipo de compuestos afecta a nivel mitocondrial inhibiendo la SDH (Suc-deshidrogenasa). Adicionalmente los compuestos 3, 4 y 6 presentaron actividad tanto en formas amastigotas como tripomastigotas conservando la intensidad de esta en cada una de las formas de *T. cruzi*, lo cual los convierte en compuestos más específicos que el mismo Nifurtimox. Una gran parte de los compuestos contaban con $ID_{50} > 10 \mu M$, sobresaliendo el compuesto 5 que presentó la mayor actividad tripanocida $ID_{50} = 0.9 \mu M$.

4.2.2.5 5-[N-(3-(5-R)- 1,3,4-Tiadiazolil)]Amino-1-Metil-4-Nitroimidazoles⁸³

Los 1,3,4-thiadiazoles representan un tipo de compuestos de interés médico, ya que estos presentan actividades biológicas para diferentes padecimientos por ejemplo: Megazol es un potente antiparasitario utilizado en la enfermedad del sueño y probado recientemente en el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana. Diferentes combinaciones de nitroimidazoles han sido utilizadas como nuevos agentes antiparasitarios, una nueva clase de estos son: 5-[N-(3-(5-R)- 1,3,4-Tiadiazolil)]Amino-1-Metil-4-Nitroimidazoles (Fig.40), los cuales conservan la fracción 1,3,4-tiadiazol identificada como la parte farmacofórica del Megazol.

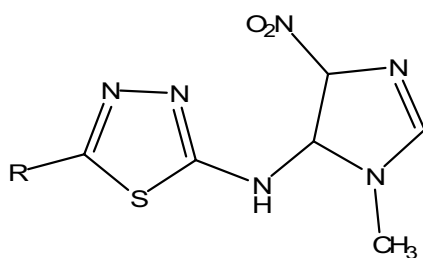


Fig. 40 Estructura Química general de 5-[N-(3-(5-R)- 1,3,4-Tiadiazolil)]Amino-1-Metil-4-Nitroimidazoles

La actividad mostrada por este tipo de compuestos (Tabla. 21) es baja en consideración a otro tipo de compuestos mencionados anteriormente, ya que estos compuestos fueron evaluados a una concentración de 2 mg/mL. Se puede observar que la actividad de los compuestos aumenta cuando hay presente un sustituyente de naturaleza aromática de preferencia sustituido el anillo con un grupo electroattractor.

Tabla. 21 Actividad In Vitro de 5-[N-(3-(5-R)- 1,3,4-Tiadiazolil)]Amino-1-Metil-4-Nitroimidazoles

Compuesto	-R	% Inhibición
6a	H	30 +/- 2.1
6c	CF ₃	53 +/- 0.8
6d	C ₃ H ₇	18 +/- 2.6
6f	p-NO ₂ Ar	50+/- 0.6
6g	p-FAr	15 +/- 0.1
6h	p-ClAr	47 +/- 0.5

4.2.2.6 Benzofuraxanos⁸⁴

En la búsqueda de nuevos compuestos generadores de estrés oxidativo en *Trypanosoma cruzi*, el cual cuenta con un sistema de oxidoreductasa único, el empleo de la fracción farmacofórica N-óxido es muy recurrente; además en trabajos previos, los derivados de Benzofuraxanos han reportado contar con una buena actividad tripanocida. Este tipo de compuestos se piensa que actúan a nivel mitocondrial inhibiendo la respiración celular del parásito. Por lo cual se han sintetizados nuevos derivados de Benzofuraxanos (Fig.41) con la capacidad de inhibir el crecimiento de dicho parásito.

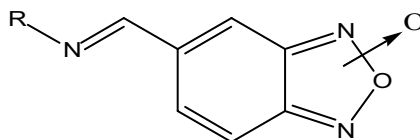


Fig.41 Estructura Química General de Benzofuraxanos

La actividad mostrada por dichos compuestos (Tabla. 22) fue evaluada en epigomastigotes, dando como resultados compuestos activos, entre estos compuestos activos sobresalen aquellos con sustituyentes Tiosemicarbozonas (Compuesto 4) aldehídos (Compuesto 9), isotiosemicarbazona

(Compuesto 10 (Fig.42)), estos compuestos fueron los más activo con un IC_{50} entre los 6.8 y 15 μM . Los compuestos con un sustituyente Tiosemicarbazona unidos a una fracción alil contaron con una pobre actividad, pero si esa fracción esa sustituida por un anillo aromático la potencia de los compuestos aumentaba. Se piensa que un factor que altera la actividad presentada por este tipo de compuestos son la hidrofiliicidad y la presencia de átomos formadores de puentes de H.

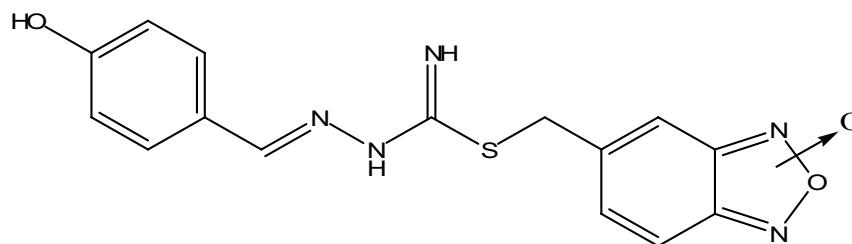


Fig.42 Derivado de Benzofuraxano más activo

Tabla.22 Actividad In Vitro de Derivados de Benzofuraxanos

Compuesto	IC_{50} (μM)
4	8.9
9	8.7
10	6.8
27	>25.0
Nifurtimox	7.7
Benznidazol	7.4

Algunos de estos compuestos fueron probados a su vez como inhibidores tanto de Cruzaina como de Tripanotiona Reductasa obteniendo resultados alentadores, los compuestos más activos fueron aquellos que lograron una producción mayor de especies toxicas de oxigeno pero estos fueron los que menos se asemejaron a inhibidores de estas dos enzimas vitales para los procesos infecciosos de *Trypanosoma cruzi*.

Capítulo 5. Análisis de Resultados

Dentro de la quimioterapia de la Tripanosomiasis Americana se cuenta en la actualidad con diferentes medicamentos para el tratamiento de la misma, los cuales han demostrado no ser lo suficientemente efectivos y potentes dentro de las diferentes etapas de esta parasitosis. Dentro de este grupo de medicamentos encontramos el Nifurtimox y el Benznidazol, como compuestos preferenciales en cuanto a la quimioterapia de dicha parasitosis, estos medicamentos actúan de maneras distintas, pero dentro de las semejanzas que se encuentran entre ellos, es que los dos fármacos producen efectos secundarios riesgosos para el paciente. El Nifurtimox siendo un compuesto Nitro-Heterocíclico actúa produciendo especies tóxicas de oxígeno como resultado de su mecanismo de acción, estas especies tóxicas producidas no son selectivas, por lo cual se provoca que el huésped también sufra daño de las mismas, dentro de las alteraciones más graves reportadas por el Nifurtimox se encuentran mutagenesis y daño a nivel DNA, esto aunado a su largo periodo de dosificación, lo cual ha provocado que el uso de este medicamento vaya en disminución y que la evaluación del mismo sea más extensa. Por otra parte los efectos secundarios presentados por el Benznidazol también involucran daño a nivel DNA, mutagenesis y carcinogénesis aunado esto a que diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* han presentado resistencia a este medicamento, por lo cual su uso del mismo e ha sido cuestionado últimamente.

Por estas razones además del número creciente de personas infectadas fuera de la zona endémica de la enfermedad, la búsqueda de nuevos compuestos en contra de la Tripanosomiasis Americana, es una prioridad para la salud pública mundial según la OMS.^[2]

Dentro de las líneas de investigación sugeridas por esta revisión bibliográfica, se encontraron algunos avances en la quimioterapia de esta enfermedad:

Tripanotiona Reductasa

Acercas de los inhibidores de Tripanotiona Reductasa, una oxidoreductasa dimerica dependiente de NADPH, cuya función principal es mantener el equilibrio tiol-redox además de brindar protección en contra del estrés oxidativo, se encontraron compuestos capaces de inhibir su actividad tanto reversible

como irreversiblemente. Entre los compuestos más prometedores encontramos a los derivados tricíclicos, estos compuestos son utilizados en la clínica como antidepresivos, cuentan con la característica de atravesar la barrera encefálica. Los tricíclicos más prometedores son: Clorohexidina inhibiendo el 90% la actividad de la enzima en una concentración de 100 μM y Cloropromazina inhibiendo el 75% de la actividad a una concentración de 75 μM , además Promozina, Procoloroperazina, Quinitrina presentaron buena actividad In Vitro . Las modificaciones estructurales propuestas por diferentes grupo de investigación ^[54, 57, 59] provocaron una disminución de la actividad tripanocida de los mismos, llegando a la conclusión de que existe una relación entre la potencia inhibitoria de TR y la carga positiva de los compuestos tricíclicos (ver tabla 4), esta carga posiblemente permita interaccionar de manera más estable con residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo. Sin embargo los compuestos tricíclicos son un grupo de medicamentos de uso clínico como antidepresivos, reguladores de trastornos del ánimo y de otras patologías conductuales mediadas por el bloqueo en el normal funcionamiento de los neurotransmisores tales como serotonina y noradrenalina, , por lo tanto en general su utilización está restringida para personas mayores de 18 años aunado a un uso controlado debido a que son un tipo de compuestos que puede provocar epilepsia y conductas suicidas como efectos secundarios más fuertes, también pueden cuásar sequedad bucal, visión borrosa, midriasis, cansancio, retención urinaria(por aumento de la tonalidad del músculo liso), aumento de la temperatura, arritmias, hipotensión postural, convulsiones, shock, coma y muerte. Debido a la absorción retardada, su prolongada vida media y su circulación hepática, el paciente puede encontrarse bajo riesgo en periodos de 4 a 6 días. Por lo cual este tipo de compuestos aunque tengan buenas perspectivas de inhibición de TR, han sido utilizados en padecimientos muy diferentes, por lo cual no se puede pensar que dentro del tratamiento de la Tripanosomiasis Americana se utilicen antidepresivos tricíclicos, ya que este tipo de compuestos cuentan con actividad dentro de otro rubro farmacológico.

Por otra parte se estudiaron los Nitrofuranos como posibles inhibidores de TR, ya que este tipo de compuestos son un tipo de ligando selectivo de esta enzima, se observó que dependiendo de los sustituyentes de este tipo de compuestos, la unión Ligando-Enzima se realizaba en diferentes subunidades, siendo la unión más preponderante a la subunidad II (sitio de unión de NADPH). Se observó que dentro de este tipo de compuestos, los más activos son aquellos que cuentan con una larga cadena alquilica o bien un grupo aril, con esto se llegó a la conclusión de las interacciones presentes en el sitio activo preferentemente son con compuestos que poseen grupos voluminosos,

favoreciendo esta característica la actividad de este tipo de compuestos. Este tipo de compuestos conserva la parte farmacofórica Nitro-Heterocíclica, por lo se puede llegar a pensar que algunas de las características de este tipo de compuestos, se pudieran conservar dentro de la nueva gama de moléculas posiblemente activas, con esto cabe la posibilidad de que algunos de los efectos secundarios característicos de este tipo de compuestos, podrían presentarse, siendo tanto la mutagenesis como daño a nivel DNA, los más graves. Esta línea de investigación es concurrida para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana, pero se ha demostrado que la actividad de este tipo de compuestos, se basa en la producción de especies tóxicas de oxígeno, estas no siendo selectivas pueden perjudiciales para el paciente; por lo cual pensar en recurrir a este mismo grupo de compuesto al final tal vez llevara a encontrar compuestos más activos que el Nifurtimox pero con los mismos problemas en cuanto a efectos secundarios. Por otra parte uno de los derivados de fenil-propanona presentó una actividad de $IC_{50} = 0.34 \mu M$ (ver tabla 5), siendo este compuesto uno de los más activos en general, este posee dentro de su estructura un nitrobenzeno, los cuales han demostrado contar con gran afinidad para la inhibición selectiva de TR, conservan dentro de su estructura un grupo nitro, por lo cual se piensa que algunos de los efectos secundarios mencionados para los derivados del Nifurtimox seguirán presentes dentro de este tipo de compuestos.

Dentro de los derivados de iminobenzoimidazoles, compuestos intermediarios de la biosíntesis de la histidina, el compuesto 14 presentó un $IC_{50} = 4.0 \mu M$ (ver tabla 3), siendo este el más activo de esta serie, así mismo se observó que los sustituyentes de naturaleza aromática provocaban un aumento de potencia, por lo cual la tendencia en cuanto actividad indicaba que los compuestos más activos cuentan con grupos voluminosos dentro de su estructura. Este tipo de compuestos han sido probados tanto como antihipertensores, antihistamínicos, inmunomoduladores, antibacterianos, antihelminéticos y antifúngicos, por lo cual este tipo de compuestos ya cuentan con pruebas tanto de toxicidad como biofarmacéuticas, con cual se podría llegar a tener una idea de los posibles efectos secundarios de este tipo de compuestos además de su distribución por todo el cuerpo; no se reportan mayores problemas con este tipo de compuestos, por lo cual se piensa que esta línea de investigación posiblemente se podría encontrar un buen compuesto en la inhibición de esta enzima.

Los complejos metálicos con base de Pd y ligante Nitrofuril contaron con actividad inhibitoria de TR, pero su mayor característica fue su capacidad de intercalarse a nivel DNA, por otra parte los complejos con base de Pt además de contar con esta capacidad también modifican el sitio de acción de TR interaccionando con un residuo de Cys, con lo cual se inhiben la acción de esta enzima, estos

compuestos contaron con valores de IC_{50} entre 0.5 a 0.95 μM (Ref. 63). Este tipo de compuestos son caros para su elaboración, por lo cual un tratamiento farmacéutico con base en ellos, sería incosteable dependiendo de la duración del régimen de dosificación, además este tipo de compuestos se ha demostrado que se intercalaran con el DNA y al no ser selectivos, se piensa que a lo harán tanto con DNA del parásito como del huésped, por lo cual esta alternativa de fármaco en contra de la Tripanosomiasis Americana, no parece ser viable dentro de la quimioterapia de dicha enfermedad.

Entre los compuesto naturales más activos encontramos un derivado de bisbencilisoquinolina, el cual es un fitometabolito que posee carga positiva y grupos hidrófobos dentro de su estructura, este compuesto es el más activo ya que presenta un $IC_{50} = 0.3 \text{ nM}$ con un mecanismo de acción desconocido aun. La única problemática de esto sería la producción del fitometabolito industrialmente, ya se reproduciendo al organismo que lo produce y luego llevarlo por un proceso químico de purificación, hasta obtener cantidades suficientes del compuesto o lograr una síntesis con la cual se produzca este compuesto, conservando viable el costo de la producción de un nuevo fármaco basado en este compuesto.

Se observa una tendencia clara dentro de los compuestos que pretenden inhibir la actividad de TR, independientemente de la naturaleza química de estos, los compuestos más potentes fueron aquellos que poseen grupos voluminosos con carga positiva, esto se podría explicar basándose en las interacciones de estos con los residuos hidrófobos del sitio activo, la herramienta de “Docking” podría ayudar a explicar mejor estas interacciones, logrando a si compuestos más afines, con cual se lograría aumentar la potencia de los mismos. Analizando los pros y contras de los compuestos encontrados que pretenden inhibir la actividad enzimática de TR, los iminobenzidazoles podrían ser la alternativa más viable para encontrar un compuesto que inhiba la actividad de esta enzima.

Cruzaina

Los compuestos inhibidores de Cruzaina, proteasa de cisteína responsable de la mayor actividad proteolítica en *Trypanosoma cruzi*, se han basado en su mayor parte en compuestos inhibidores de proteasa del grupo A como la papaína. Esta enzima consiste de una subunidad catalítica singular, por lo cual ha sido considerado un blanco selectivo. Las líneas de investigación que se habían seguido

antes del año 2000, se basan en estudios de compuestos que actúan como inhibidores irreversibles tales como las peptidil diazometilcetonas, peptidil fluorometilcetonas, peptidil vinil sulfonas, las cuales interferían con el ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*. Estos tipos de compuestos se caracterizan por no causar lesiones a nivel mitocondrial al parásito, su mecanismo de acción se basa en la acumulación de precursores de Cruzaina dentro del Aparato de Golgi. Este tipo de inhibidores selectivos de esta proteasa son capaces de bloquear la proliferación tanto de la forma extracelular (epimastigotes) como de los amastigotes intracelulares, así como de impedir la metacicloogénesis (transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos), lo que indica que la proteína tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del parásito. ^[88,89]

Las líneas de investigación dentro de la inhibición de Cruzaina, están muy marcadas por lo cual ya sólo se observa que la búsqueda se basa en optimizaciones de los compuestos encontrados en décadas pasadas, con lo cual se espera encontrar un compuesto más eficaz en la acción de inhibir a la enzima catalica más importante de este parásito.

Los compuestos más prometedores dentro de este rubro son aquellos que cuentan dentro de su estructura con un grupo α , β cetona, se sabe que este tipo de compuestos actúan como inhibidores irreversibles y selectivos de Cruzaina dado que dentro de sus estructura cuentan con este grupo carbonilo, el cual provee de estabilidad mediante puentes de hidrogeno con residuos de Gln19 y Cys25 haciéndola esta fracción enzimática, aquella donde ocurre la de unión entre la ligando y el sitio activo, esta región se encuentra ubicada dentro de la subunidad S2, esta subunidad es un lugar extenso de residuos hidrofóbicos con un cierto grado de electronegatividad. Dentro de los compuestos más alentadores se encentra un derivado de α,β epoxiester, el cual mostró un 93% de inhibición de la actividad de Cruzaina y un $IC_{50} = 20$ nM(ver tabla 7), además de un α -cetoester,(AQ616476), α -cetoamida (AQ665183) y vinil α -cetoester (AQ581332), estos tres compuestos con base α -ceto mostraron la inhibición de Cruzaina en valores de nM. Continuando con los inhibidores de cruzaina que cuenta con un grupo cetona en su estructura se encuentran tanto las Hidroximetil cetonas como Mercaptametil cetonas, dentro de estas últimas los compuestos cuentan con actividad inhibitoria en un rango de 0.9 – 2.5 nM(ver tabla 11).

Otro tipo de compuestos inhibidores de Cruzaina son aquellos que dentro de su estructura cuentan con un grupo Tiosemicarbazona, los compuestos más potentes son las benzofenonas tiosemicarbozonas

con valores del orden nM, por citar un ejemplo específico el compuesto 17 presentó una $IC_{50} = 17$ nM; a su vez La Isatina un producto natural encontrado en numerosas plantas, con estructura similar a las Tiosemicarbozonas mostró una alta actividad inhibitoria. No se conoce bien cómo actúan las Tiosemicarbozonas, se piensa que este tipo de compuestos al contar con un grupo aceptor de electrones, el cual reacciona con la cisteína presente en el sitio activo de la enzima formando un enlace covalente, además se observó que los compuestos más activo poseen cadenas extensas lo cual hace pensar de las interacciones con la subunidad 2, las cuales le permiten estabilizar a este tipo de compuestos. Estos compuestos son activos contra la forma amastigote intracelular del *T. cruzi* a concentraciones nanomolares in vitro^[90] y su simplicidad y bajo costo de síntesis los hacen ideales como punto de partida para el desarrollo de nuevos agentes tripanocidas.

Sin embargo, no se han publicado hasta este momento reportes que demuestren que algún tipo de compuesto, es capaz de inducir cura parasitológica radical en modelos animales. Una limitación de los compuestos hasta ahora reportados es su limitada biodisponibilidad oral y cortos tiempos de vida media. Sin embargo, con base a la información disponible en este momento en la literatura científica y de patentes sobre el grado de avance del desarrollo preclínico de estos compuestos, su desarrollo clínico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Compuestos Nitro-Heterocíclicos

En tanto los compuestos que poseen un Nitro-heterociclo se sabe que son ligandos de Tripanotona Reductasa, ahí es donde ocurre la transferencia de un electrón y así inicia en mecanismo de acción de estos desencadenando la producción de especies tóxicas de oxígeno. Estudios Teóricos han demostrado que el mecanismo de acción de este tipo de compuestos puede tener una correlación con la facilidad de reducción del grupo nitro del Nifurtimox y análogos, a su vez esta reactividad se puede asociar con su respectiva energía de LUMO. Además esta correlación puede explicarse mejor con el término (η) dureza química la cual se relaciona con la resistencia de la molécula a la transferencia de carga. Si se considera que en el caso de Nifurtimox y análogos, esta transferencia se refiere al proceso de reducción de su correspondiente grupo nitro, la dureza química podría estar relacionada con la facilidad o dificultad de reducción de este sustituyente y en consecuencia, con su respectiva actividad tripanocida.

La actividad de este tipo de compuestos se basa en la porción farmacofórica Nitro-heterocíclica; todas las variantes de esta serie de compuestos presentan la misma tendencia independientemente de la naturaleza del sustituyente, entre este grupo sea más voluminoso la actividad del compuesto es mayor, esto se observó dentro de los inhibidores de TR de igual manera, la explicación de esto son las probables interacciones de estos grupos con residuos de la zona hidrofóbica del sitio activo. El compuesto más activo de toda esta serie en general fue un derivado de 5-Nitro-2-furancarbohidrazidas, el cual presentó actividad a una concentración de 0.4 μM .

Otro tipo de heterociclos con actividad fueron los furaxanos, Benzofuraxanos e Imidazoles, estos tres compuestos mantenían el grupo nitro en su estructura, demostrando que la ausencia de este grupo químico disminuía la actividad dramáticamente, otros compuestos evaluados fueron los derivados de Lapachona, los cuales contaban con una estructura similar a compuestos tricíclicos, estos contaron con actividad $\text{IC}_{50} = 0.18 \mu\text{M}$, esta actividad es atribuible a las mismas interacciones de los compuestos tricíclicos con el sitio activo de la enzima.

Sin embargo como ya se había discutido antes este tipo de compuestos análogos del Nifurtimox, cuenta con el mismo mecanismo de acción, dando como resultado la producción de especies tóxicas de oxígeno, las cuales no son selectivas hacia el parásito, por lo cual continuar con esta línea de investigación conlleva a encontrar posiblemente con los mismos problemas presentados por el Nifurtimox, se puede pensar que aumentando la potencia de este tipo de compuesto se podría disminuir el régimen de dosificación con lo cual se pueden aminorar los efectos secundarios presentados por este tipo de compuestos.

Capítulo 6. Conclusiones

Dentro de esta revisión bibliográfica acerca de la quimioterapia de la Tripanosomiasis Americana específicamente dentro de tres líneas de investigación, la cual abarco del año 2000 a la actualidad, se puede observar que hay un avance en la búsqueda de compuestos biológicamente activos en contra de *Trypanosoma cruzi*.

La creciente necesidad en la búsqueda de un nuevo compuesto que ayude a tratar esta parasitosis dentro de todas sus etapas es primordial^[2], ya que los medicamentos aprobados en la actualidad son ineficientes^[87] en todas las etapas de esta parasitosis y una creciente población infectada^[2] fuera de la zona endémica de la enfermedad agravan la situación. Dentro de la pocas acciones oficiales realizadas tanto la OMS como gobiernos de América del Sur^[2], se han propuesto medidas para tratar de eliminar esta enfermedad con base a la erradicación del vector aunado a una mejora de vivienda de las personas en zona de riesgo.

Los avances dentro del rubro de inhibición Cruzaina, reportan actividad biológica en concentraciones nM, inhibir esta enzima significa detener la actividad proteolítica hacia el huésped, impidiendo el desarrollo y supervivencia del parásito además de una reducción en el daño a tejido muscular tanto en corazón como en intestinos.

Por otra, se continúa estudiando la probabilidad de inhibir selectivamente la actividad de Tripanotona Reductasa y aumentar la producción de especies tóxicas de oxígeno, con la finalidad de alterar el metabolismo redox del parásito llevándolo a una muerte segura. Esto se ve aunado a tratar de aumentar la potencia de los compuestos Nitro- Heterocíclicos para lograr disminuir el régimen de dosificación de los pacientes llevando con esto una menor exposición a este tipo de compuestos que se ha comprobado que causan tanto mutagenesis, daño a DNA y carcinogénesis.^[87]

Referencias

Referencias

1. Guerra F. *J. Trop. Med. Hyg.* 73 , 105-118
2. Schofield Chris. The future of Chagas disease control. *J. Trends. Parasitology.* 22, 583-588
3. Mazzotti L. *Gac. Med. México*, 70, 417-420
4. www.un.org
5. Velasco C.O. La Enfermedad de Chagas en México. SSA, INDRE, México, 8 , 1-56
6. Ancha P.N Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales. 2ª Edición, Organización Panamericana de la Salud, 503 , 590-600
7. Koberle F. Pathology and pathological anatomy of Chagas disease. *Bol Oficina Sanit Panam.* 51, 404-428
8. Tizard I. Immunology and Pathogenesis of tripanosomiasis. CRCPress, Inc. , 145-194
9. Kirchoff L.V *The New England Journal of Medicine.* , 329(9), 639-644
10. Martínez B.M *Manual de Parasitología Medica.* 2ª Edición, Edit. La Prensa Medica Mexicana., 382-386
11. Chester B.P *Parasitología Clínica.* 2ª Edición, Edit. Salvat., 671-675
12. OMS. Control de la Enfermedad de Chagas. , 1-102
13. Rodriguez R. Lane E.J. Chealing Agent Inhibition of *Tripanosoma cruzi* Epimastigote In Vitro *Journal of Inorganic Biochemistry.*, 60, 277-288
14. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-357.

Referencias

15. Olivares-Vilagomez D, Lane JE, Vnencak-Jones CL. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from human chagasic tissue. *Am J Trop Med Hyg* 59: 563-570,
16. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 60: 726-732
17. Packchanian A, Evens F. Chemotherapy of *T.gambiense* and *T. rhodesiense* infections in guinea pigs with nitrofurazone. *Am J Trop Med Hyg.* 6, 658-664
18. Viotti R, Vigiliano C, Armenti H, Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.* ; 127, 151-162
19. Lopez- Antuñano FJ. *Salud Publica Mex.* ; 39, 463-71
20. Texeira AR, Calixto MA, Chagas Disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mutat Res.* ; 305, 189-96
21. Souza SC, Takahashi CS, Da Silva JS. Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. *Mutat Res.* ; 259, 139-45
22. Fragata Filho A, Luquetti O, Prata A. Etiological treatment for Chagas' disease. *Parasitol Today.* 13, 127-128
23. Gorla N.B, Ledesma O, Barbieri. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with Nifurtimox. *Mut Res.* 224 , 263-267
24. Segura MA, Molina de Raspi E, Basombrío MA. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanomicidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro,* 89, 213-216.
25. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3541-3545.
26. Andrade S, Magalhaes J, Pontes A. Evaluation of chemotherapy with Benznidazol and Nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *World Health Org.* 63, 721-726

Referencias

27. Murta S, Gazzinelli T, Brener Z. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznodazol and Nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 93, 203-214
28. Reppetto Y, Opazo E, Maya J. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp Biochem Physiol.* 115, 281-285
29. Fragata Filho A, da Silva M, Boalnain E. Ethiological treatment of acute and chronic Chagas' heart disease. *Rev. Paul. Med.* 113, 867-872
30. Flores- Viera C, Antunes B. Experimental benznidazole encephalopathy: Clinical neurological alterations. *J. Neurol.Sxi.*150, 3-11
31. Ferreira M, Nishioka S, Silvestre M. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS report of tree new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 25, 1397-1400
32. Santos S, Takahashi C, Natarajan A. Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells in vitro. *Mut Res.* 320, 305-314
33. Souza S, Takahashi C, Da Silva J. Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagásica rodents. *Mut. Res.* 259, 139-145
34. Biocchi A. Belloti G, Ulip D. Long-term follow-up after heart transplantation in Chagas' disease. *Transplant Proc.* 25, 1329-1330
35. Bestetti R.B. Should Benznidazol be used in chronic Chagas' disease [letter; comment] *Lancet.*349, 653
36. Dutra W, Profeta de la Luz M, Cancado J. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunol.* 18 , 579-585
37. Murta S, Krieger M, Montenegro L. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme , a NADPH flavin oxidoreductasa, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 146. 151-162
38. Andrade S. Rasi A. Magalhaes J. Specific Chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animal inoculated with the same strains. *Trans. R. Soc .Trop. Med Hyg.* 86, 624-626

Referencias

39. Portal P, Feranadez S, D.Alonse G. Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* suggested role on drug resistance. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 160. 42-51
40. Marretto J & Andrade S. Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27 , 209-215
41. Kilunga B. Kubututu Z, Nozaki T. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 196, 1241-1245
42. Uchiyama N, Kabututu Z, Kubata BK. Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme.
43. Zhang Y, Bond C, Bailey S. The Crystal structure of trypanothione reductasa from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Science*. 5, 52-61
44. McGrath M, Eakin A, Engel J. The Crystal structure of cruzaina: a therapeutic target for Chagas disease. *J. Mol. Bio.* 247, 251-259
45. Karelson M., Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies, *Chem. Rev.*1996, 96, Págs. 1027-1043
46. Bevan R., QSAR and Drug Design, Department of Biochemistry and Anaerobic Microbiology, <http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature12.html>
47. Cordoba T., Parámetros moleculares y relación estructura actividad hacia *Leishmania Mexicana* de 3-carboetoxi-4-aminoquinolinas. *Ciencia* .2004, 12(4), 298-308
48. Hemmateenejad B. A Mechanistic QSAR Study on the leishmanicidal Activity of 5-Substituted-1,3,4-Thiadiazole Derivates. *Chem. Biol Drug Des.* .2007, 69, .435-443
49. Pearson R.G. *J Am Chem Soc* 1963 ,85, 3533-3543
50. Pearson R.G. *J Am. Chem. Soc.* 1983,105, 7512
51. Pearson R.G *Chem. Educ.* 1987, 64, 561
52. Aguirre G, Cabrera E, Cerecetto H, Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anto-*Trypanosoma cruzi*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39. 421-431

Referencias

53. Parveen S, Khan M, Austin S, Antitrypanosomal, Antileishmanial and Antimalarial Activities of Quaternary Arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides. *Journal Med.Chem* 48, 8087-8097
54. Meiering S, Inhoff O, Mies J. Inhibitors of T.cruzi Trypanothione Reductasa Revealed by Virtual Screening. *J.Med.Chem* , 48 . 4793-4802.
55. Vega-Trujillo M, Caracelli I, Zukerman J. Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofurans and 5-nitrothiopen- semicarbazones. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* , 24 . 349-355
56. Holloway G, Baell J, Fairlamb A. Discovery of 2-iminobenzimidazole as a new class of TR inhibitor . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17, 1422-1427.
57. Galarreta B, Sifuentes R, Carrillo A. The use of natural product scaffolds as leads in the search for TR inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16 , . 6689-6695
58. Saravanamuthu A, Vickers T, Bond C, Two interacting binding sites for quinazolinone derivatives in the active site of TR. *American S. Biochemistry and Molecular Bio.* 279, 29493-29500
59. Rivarola H, Pagliani P, Trypanosoma cruzi TR inhibitors: Phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. *Cardiovascular & Haematological Disorders*. 2. 43-52
60. Martyn D, Jones D, Fairlamb A. HTS affords novel and selective TR inhibitors with trypanosomal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* .17. 1280-1283
61. Barros B, Rosa L, Caligorne R. Altenusin a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. *FEMS Microbiol Lett*, 285. 177-182.
62. Otero L, Vietes M, Boiani L. Novel Antitrypanosomal Agents based on palladium nitrofuranylthiosemicarbazones complex. *J.Med.Chem* .46. 3322-3331
63. O'Sullivan M. The battle against Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Metal- based and Natural Product Inhibitors of TR. *Curr.Med.Chem*. 4. 355-378.
64. Gonzales F, Izquierdo J, Rodriguez S. Dipeptidyl- α,β -epoxiesters as potent irreversible inhibitors of the cysteine proteases cruzain. *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*. 17.6697-6700
65. Silies R, Chen S, Zhou M, Design, synthesis and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas. *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*. 16 , 4405-4409

66. Choe Y, Brien L, Price M, Development of α -keto based inhibitors of cruzaina, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorganic & Medicinal Chem Lett.* 13. 2141-2156
67. Götz M, Caffrey C. Hansell, Peptidy allyl sulfonas: a new class of inhibitors for clan CA cysteine proteases. *Bioorganic & Medicinal Chem Lett.* 12. 5203-5211
68. Chiyanzu I, Hansell E, Gut J. Synthesis and Evaluation of Isatins and thiosemicarbazone derivatives against Cruzain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.* 13, . 3527-3530
69. Xiaohui D, Hansell E, Engel J. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. *Chemistry & Biology.* 7 , 733-742
70. Huang L, Brinen L, Ellman J. Crystal Structure of reversible ketone-based inhibitors of cruzaina. *Bioorganis & Medicinal Chemistry.* 11. 21-29
71. Huang L, Lee A, Ellman J. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* 45. 676-684
72. Venturini G, Salvati L, Muolo M- Nitric oxide inhibits cruzapain the major papain-like cysteine proteinase from T.cruzi. *Biochemical & Biophysical Research Com.* 270, 437-441
73. Pozas R. Carballo J. Castro C., Rubio J, Synthesis and in vitro antitypanosomal activity of novel Nifurtimox Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*15. 1417 -1421
74. Millet R, Maes L, Landry V. Antitypanosomal Activities and cytotoxicity of 5-nitro-2-furancarbohidrazidas. *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 12. 3601-3604
75. Aguirre G, Cabrera E, Cerecetto H. Design synthesis and biological evaluation of new potenet 5-nitrofuril derivades as anti-Trypanosoma cruzi agents. *European J. of Medicianl Chem.* 39 . 421-431.
76. Otero L, Aguirre G, Boiani L. Nitrofurilcarbazone Rhenium and Ruthenium Complex as Anti-trypanosomal agents. *European J. of Medicianl Chem.* 41 .1231-1239.
77. Aguirre G, Bioani L, Cerecetto H. In Vitro and mechanism of action against the protozan parasite Trypanosoma cruzo of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazone. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 12. 4885 – 4893
78. Maya J, Bollo S, Nuñez L. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochemical Pharmacology.* 65, 999-1006

Referencias

79. Gonzales J, Stephens C, Wenzler T. Synthesis and antiparasitic evaluation of bis-2,5-[4-guanidophenyl]thiophenes. *European J of Medicinal Chem.* 42. 552-557
80. Salas C, Tapia R, Cuidad K. Trypanosoma cruzi: activities of lapachol and α and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 16,. 668-674
81. Dias L, Santos M, Albuquerque S. Synthesis in vitro evaluation and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pirazol[3,4-b]piridina. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 15, 211-219
82. Boiani L, Aguirre G, Gonzales M. Furoxan-alkylnitrate –derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: Mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 16 . 7900-7907
83. Carvalho A, Gibaldi D, Pinto A. Synthesis and trypanocidal Evaluation of new 5-[N-(3-(5-R)- 1,3,4-Tiadiazolil)]Amino-1-Metil-4-Nitroimidazoles . *Letters in Drug Design & Discovery.* 3 98-101
84. Porcal W, Hernandez P, Bioani L. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazona moieties and benzofuraxan heterocycle. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*16.6995-7004
85. Chibale K, Musonda C. The synthesis of parasitic Cysteine Protease and Trypanothione Reductase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry.*10 .1863-1889
86. Raether W. Hänel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res.* 90, 19-39
87. Coura J. Castro S. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz , Rio de Janeiro.*97.3-24
88. Caffrey, C.R., Scory, S., Steverding, D., 2000. Cysteine proteinases of trypanosoma parasites: novel targets for chemotherapy. *Curr. Drug Targets* 1,155-162
89. Cazzulo, J.J., 2002. Proteinases of Trypanosoma cruzi: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem* 2(11),1261-1271
90. Du, X., Guo, C., Hansell, E., Doyle, P.S., Caffrey, C.R., Holler, T.P., McKerrow, J.H., Cohen, F.E., 2002. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* 45,2695-2707