



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS

EXPERIMENTALES DERIVADOS DE TRIAZINAS CONTRA

LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN QUÍMICA
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

PRESENTA:

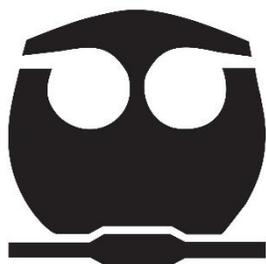
MARIANA MENDOZA CONDE

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

ASESOR TÉCNICO:

M. en C. CITLALI VÁZQUEZ MARTÍNEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX 2025



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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

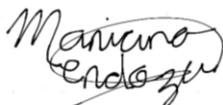
De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado **Evaluación de compuestos experimentales derivados de triazinas contra la infección por *Trypanosoma cruzi*** que presenté para obtener el título/grado de **Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Mariana Mendoza Conde



315294639

(Nombre completo, firma y número de cuenta)

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESORA: MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
VOCAL: PROFESOR: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ
SECRETARIO: PROFESORA: EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
1er SUPLENTE: PROFESORA: BERENICE OVALLE MAGALLANES
2do SUPLENTE: PROFESORA: ESTEFANI YAQUELIN HERNÁNDEZ CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

ASESORA DEL TEMA:

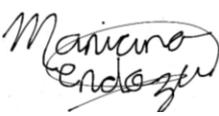
Dra. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

SUPERVISORA TÉCNICA:



M. en C. CITLALI VÁZQUEZ MARTÍNEZ

SUSTENTANTE:



MARIANA MENDOZA CONDE

Agradecimientos

Para la realización de esta tesis agradezco el otorgamiento de una beca de ayudante de proyecto 2022-103/6-909 del donativo de CONAHCyT 282663.

La investigación de esta tesis se realizó con recursos del donativo de CONAHCyT 282663 otorgado a la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira.

Abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina
Bnz	Benznidazol
Cys	Cisteína
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTNB	Acido 5,5´-ditiobis2-nitrobenzoico
DTT	1,4-Ditiotreitol
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GCL	Glutamato cisteína ligasa
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
HFF-1	Fibroblastos de prepucio humano 1
IC ₁₀	Concentración inhibitoria al 10%
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IC ₉₀	Concentración inhibitoria al 90%
LIT	Infusión de hígado y triptosa
LLC	Células epiteliales de mono Rhesus WK-2
NADPH/NADP ⁺	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
Nfx	Nifurtimox
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer salino de fosfatos
SFB	Suero Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutasa
Spd	Espermidina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TryR	Tripanotión reductasa
TryS	Tripanotión sintetasa
TS ₂	Tripanotión oxidado
TSH ₂	Tripanotión reducido
γEC	gamma-glutamil-Cys

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Historia de Chagas.....	1
1.2 Epidemiología.....	1
1.3 Vías de transmisión	4
1.4 Biología del parásito	6
1.4.1 Ciclo de vida	8
1.5 Manifestaciones clínicas	9
1.6 Diagnóstico	10
1.7 Tratamiento	12
1.7.1 Mecanismo de acción del Bnz y del Nfx.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Vía de síntesis del tripanotión.....	16
2.2 Triazinas.....	17
2.2.1 Aplicaciones de las triazinas.....	18
2.3 Antecedentes de derivados de triazina	20
2.4 Importancia del grupo N-óxido	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
6. MÉTODOS	26
6.1 Determinación de la curva de crecimiento de epimastigotes	26
6.2 Protocolo para la cuantificación de los derivados de triazinas.....	26
6.3 Protocolo de exposición de los epimastigotes a los fármacos canónicos y experimentales	28
6.4 Evaluación de la citotoxicidad de los derivados de triazinas en células HFF-1.....	29
6.5 Evaluación de los compuestos en un modelo de infección <i>in vitro</i> de células HFF-1 con tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	30
6.5.1 Protocolo para determinar la concentración de los derivados de triazina que no son tóxicas para las células HFF-1 para usarlas en el modelo de infección <i>in vitro</i> con <i>T. cruzi</i>	30
6.5.2 Determinación del efecto de los derivados de triazina y antichagásicos en monoterapia en un modelo de infección <i>in vitro</i> con tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	32
6.5.3. Exposición de la biterapia de los derivados de triazina en combinación con Bnz y Nfx en un modelo de infección <i>in vitro</i> en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	32

6.6	Determinación del efecto del tratamiento con las triazinas en monoterapia en el contenido de metabolitos tioles en epimastigotes	33
6.6.1	Obtención de curvas patrón de los metabolitos tioles presentes en el sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i>	33
6.6.2.	Exposición de los epimastigotes a los derivados de triazina y fármacos canónicos	34
6.6.3	Preparación de extractos citosólicos para la cuantificación de tioles por HPLC	35
6.6.4	Preparación de las muestras para la medición de tioles por HPLC	36
6.6.5	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	37
6.7	Análisis estadístico	39
7.	RESULTADOS.....	40
7.1	Caracterización del crecimiento relativo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	40
7.2	Cuantificación de los compuestos derivados de triazinas	41
7.3	Efecto de los derivados de triazina sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> después de 24 h de exposición	43
7.4	Efecto de los derivados de triazina en células HFF-1 después de 24 h de exposición	45
7.5	Determinación de la concentración de los derivados de triazina en células HFF-1 a utilizar en monoterapia en un modelo de infección <i>in vitro</i> por <i>T. cruzi</i>	47
7.6	Efecto de los derivados de triazina en un modelo de infección <i>in vitro</i> de monoterapia.....	48
7.7	Efecto de los derivados de triazina en biterapia con Bnz y Nfx en el modelo de infección <i>in vitro</i>	50
7.8	Efecto de los derivados de triazina sobre la concentración de metabolitos tioles de <i>T. cruzi</i>	51
8	DISCUSIÓN	54
8.1	Caracterización del crecimiento de <i>T. cruzi</i>	54
8.2	Efecto antiparasitario de los fármacos canónicos y los derivados de triazina contra epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	55
8.3	Efecto de los fármacos canónicos y las triazinas en monoterapia en un modelo de infección <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i>	57
8.4	Efecto de los fármacos canónicos y las triazinas en biterapia en un modelo de infección <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i>	59
8.5	Efecto de los fármacos canónicos y las triazinas en monoterapia en los metabolitos tioles de epimastigotes	60
9	CONCLUSIONES.....	62
10.	Perspectivas	62
	REFERENCIAS	63
	ANEXOS	70

1.	Preparación de medios para el cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	70
1.1	Preparación de medio LIT.....	70
1.2	Preparación de PBS pH 7.4.....	70
2.	Preparación de medios utilizados para el mantenimiento y realización de experimentos con células HFF-1 y LLC.....	71
2.1	Preparación de medio DMEM	71
2.2	Preparación de buffer PBS-EDTA pH 7.4.....	71
3.	Mantenimiento de medios de cultivo	71
3.1	Mantenimiento de Epimastigotes	71
3.2	Cultivo de células HFF-1	72
4	Obtención de infección primaria y secundaria iniciando con epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con el fin de obtener tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	73
5	Soluciones ocupadas para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry	76
6.	Preparación de soluciones y reactivos ocupados para el uso del HPLC	77
6.1.	Buffer de fosfatos 100 mM.....	77
6.2.	DTNB	77
6.3.	TFA	77
6.4.	DTT	77
6.5.	Buffer de lisis	77

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) la cual afecta a 7 millones de personas en el mundo; se estima la ocurrencia anual de alrededor de 30,000 nuevos casos y 12,000 defunciones. En México se estiman cerca de 4 millones de personas infectadas, mientras que el 88% de la población nacional está en riesgo de infectarse por vivir en zonas endémicas. Esta enfermedad consta de dos fases, la aguda y la crónica. En la fase aguda el diagnóstico es complicado debido a la falta de sintomatología, mientras que en la fase crónica se llegan a presentar complicaciones cardíacas o digestivas. Actualmente se utilizan el benznidazol (Bnz) y el nifurtimox (Nfx) para el tratamiento de la infección. Estos fármacos son efectivos durante la fase aguda de la enfermedad; sin embargo, producen efectos adversos lo que causa desapego al tratamiento de hasta un 40%. Debido a lo anterior, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean efectivas contra el parásito y sin reacciones adversas significativas para el hospedero. En este proyecto se evaluará el posible efecto antitripanocida del grupo N-óxido presente en derivados de triazina del tipo 1,2,3. Las triazinas son compuestos heterocíclicos considerados como estructuras base para el diseño de herbicidas debido a su eficacia. Se ha demostrado que pueden tener actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, antibacteriana y antiparasitaria. Hasta el momento no existen reportes de su efecto contra *T. cruzi*.

En este proyecto se evaluó el efecto de tres derivados de triazina, 2a-T, 2a-R y 2a con diferentes grupos N-óxido sobre el crecimiento relativo de epimastigotes. De lo anterior se determinó que los compuestos ejercen efecto antiproliferativo en las siguientes concentraciones inhibitoras (CI); 2a-T ($CI_{50}=1 \pm 0.9 \mu\text{M}$), 2a-R ($CI_{50}= 12 \pm 3.2 \mu\text{M}$) y 2a ($CI_{50}= 23 \pm 5.6 \mu\text{M}$), las cuales están en el mismo intervalo de concentración que los antichagásicos de referencia Bnz ($CI_{50}= 13 \pm 4.1 \mu\text{M}$) y Nfx ($CI_{50}= 3 \pm 1.5 \mu\text{M}$). Como control de citotoxicidad se determinó la concentración Letal (CL) en fibroblastos de prepucio humano (HFF-1); 2a ($CL_{50}= 43 \pm 12 \mu\text{M}$), 2a-

R ($CL_{50}=11 \pm 5 \mu\text{M}$), 2a-T ($CL_{50}= 0.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$), mientras que para Nfx fue de $8 \mu\text{M}$ y Bnz $> 27 \mu\text{M}$. Estos resultados indican que los derivados de triazina fueron citotóxicos para parásitos y fibroblastos.

En un modelo de infección *in vitro* de *T. cruzi* contra fibroblastos HFF-1: se analizó el efecto de los derivados de triazina sobre la progresión de la infección. El compuesto 2a-T fue el que presentó mejor efecto sobre la inhibición de la liberación de formas infectivas de tripomastigotes y amastigotes ($CI_{50}= 0.07 \pm 0.01$ y $0.06 \pm 0.02 \mu\text{M}$, respectivamente); comportándose igual que los antichagásicos canónicos. Posteriormente, se evaluó el efecto de los derivados de triazinas en un modelo de infección *in vitro*, tratado con biterapia con el fin de determinar si las triazinas pueden disminuir la CL_{50} de Bnz o Nfx, donde de manera interesante los compuestos disminuyeron más del 50% este valor.

Por último, se evaluó si los derivados de triazina pueden afectar la concentración de los metabolitos tioles que participan en la vía de síntesis de $T(\text{SH})_2$ (Cys, GSH y $T(\text{SH})_2$) en los parásitos, se hipotetizó que el grupo N-óxido unido a la triazina podría afectar el sistema antioxidante de *T. cruzi*. Como resultado, se obtuvo que en respuesta a la exposición de los derivados de triazina los parásitos mostraron un incremento en la concentración de GSH (2 veces) y $T(\text{SH})_2$ (50%).

Concluimos que el grupo funcional N-óxido no mejora la eficacia de la triazina como antiparasitario, además los derivados de triazina presentan un efecto citotóxico para ambos tipos celulares. La triazina 2a-T (no presenta el grupo N-óxido) es el compuesto que tiene el mayor efecto antiparasitario ya que presentó un mejor efecto en el modelo *in vitro* de monoterapia con valores iguales a Bnz y Nfx; al analizarlo en un modelo de biterapia mejoraron hasta en un 50% el valor de CI_{50} de Bnz. Por lo tanto, las triazinas son compuestos que no se pueden descartar como blancos terapéuticos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de Chagas

La descripción completa de la enfermedad de Chagas se realizó en 1909 por el médico Brasileño Dr. Carlos Chagas, quién investigó al insecto hematófago (Barbeiro) en el cual halló al parásito. Entre el año 1909 a 1917, Carlos Chagas dio a conocer los aspectos clínicos de esta enfermedad; es decir, las 2 fases (aguda y crónica) de las que consta esta enfermedad junto con sus signos y síntomas (Chao, et al., 2020). Se sabe que esta enfermedad existe desde la antigüedad, esto se confirmó en momias humanas disecadas de sitios arqueológicos de Perú y Chile, donde se amplificó un segmento de ADN del cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Chao, et al., 2020). Entre el año 1930 y 1940, el Dr. Salvador Mazza dio a conocer que el parásito se encontraba en tejidos y en sangre; por lo tanto, éste se podía transmitir por transfusiones sanguíneas. No fue sino hasta el año de 1952 que este modo de transmisión fue aceptado (Steverding, 2014; Angheben, et al., 2015). En 1980 se dio a conocer que *T. cruzi* puede ser transmitido por trasplante de órganos, específicamente el de riñón (Chao, et al., 2020). En 1966, el Bnz se propuso como medicamento antichagásico por la industria farmacéutica de Hoffmann-La Roche, ya que mostró eficacia contra *T. cruzi*; disminuyendo los niveles de parasitemia durante la fase aguda de la enfermedad y se incorporó al mercado en 1970. En este mismo año, el Nfx fue distribuido como antichagásico por la industria farmacéutica Bayer, ya que también presentó buen efecto al disminuir la propagación de este parásito (Steverding, 2014; Chao, et al., 2020).

1.2 Epidemiología

La enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis americana es causada por el parásito protozoario *T. cruzi*. Esta enfermedad es endémica de 21 países de América Latina; entre los que se encuentra México. Inicialmente se consideró como una enfermedad tropical, ya que solo se presentaba en zonas

rurales. Actualmente está clasificada dentro de las 13 enfermedades desatendidas y debido a cuestiones de migración se han observado casos en Estados Unidos de América, Canadá, países de Europa, países africanos, del mediterráneo oriental y del pacífico occidental (OMS, 2023).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen alrededor de 7 millones de personas en el mundo que están infectadas por este parásito, causando alrededor de 10,000 - 12,000 defunciones y de 30,000 a 40,000 nuevos casos al año (OMS, 2023).

En México, se estima que existen 1.1 millones de personas infectadas por este parásito. A su vez se estima que el 88% de la población nacional está en riesgo de contraer la infección; debido a que México se considera un país endémico de la enfermedad, ya que se conoce que en el país habitan 8 diferentes tipos de géneros y 31 especies de triatominos; de las cuales 29 se encuentran infectadas (Figura 1.1) (Rojo-Medina, et al., 2018; Bravo-Ramírez, et al., 2023). El Boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud reportó hasta la semana 52 del 2024; 714 casos en fase crónica (479 hombres y 235 mujeres) y 65 casos en fase aguda (41 hombres y 24 mujeres) (<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/964745/sem52.pdf> recuperado el 06 de enero del 2025).

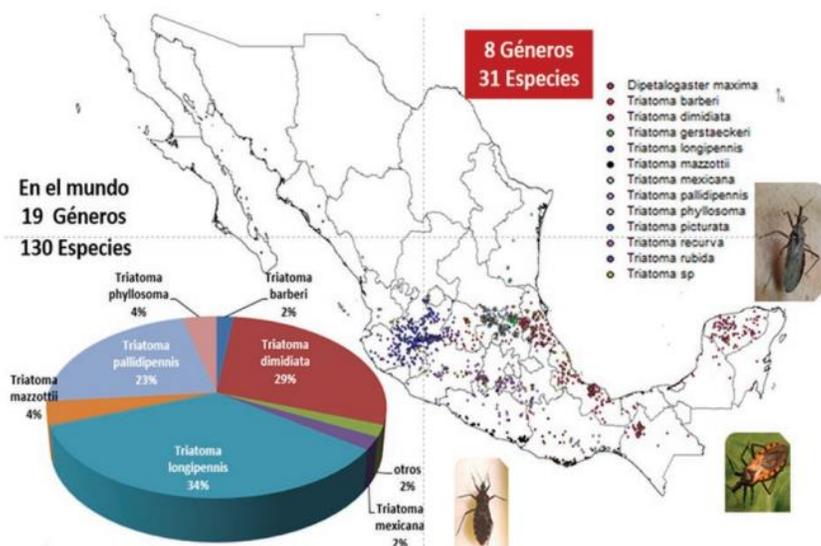


Figura 1.1. **Distribución nacional de diversas especies de triatominos.** Mapa nacional de México que muestra la incidencia de las especies más relevantes de los vectores triatominos causantes de la enfermedad de Chagas. Obtenida de: gm185k.pdf (medigraphic.com)

En 2019 se realizó un análisis de la distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en México; durante 10 años se determinó la incidencia de la enfermedad de Chagas por cada 100,000 habitantes y por estado; encontrando que los estados que presentaron muy alta incidencia son Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Quintana Roo, Yucatán y Morelos (1.1 a 4.4), seguidos por los de incidencia alta: Tamaulipas, Jalisco, Querétaro, Guerrero, Michoacán, Hidalgo y San Luis Potosí (0.51-1.0), posteriormente los de incidencia media: Campeche, Nayarit, Baja California Sur, Sinaloa, Estado de México y Colima (0.21-0.5), los estados restantes se encuentran entre la incidencia baja (0.11-0.2) y muy baja (0.01-0.1) como lo es el caso de la Ciudad de México (Figura 1.2) (Ibáñez-Cervantes, et al., 2019).

Se piensa que el reporte de personas infectadas por este parásito está subestimado, ya que probablemente existe una considerable parte de la población mexicana infectada sin su conocimiento, esto debido a la falta de información y divulgación de la enfermedad (principalmente en zonas rurales) y a que el diagnóstico de esta enfermedad es deficiente (Bravo-Ramírez, et al., 2023).

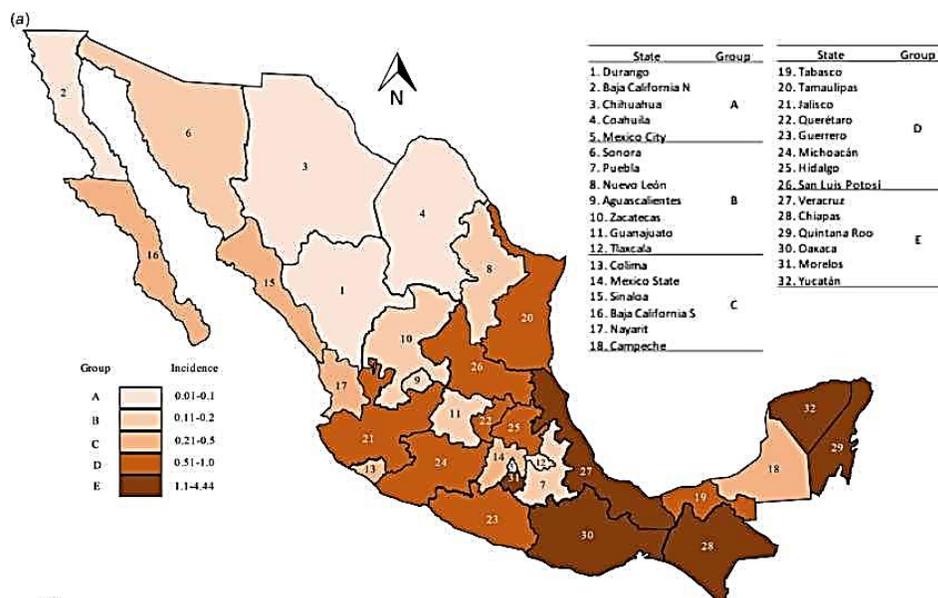


Figura 1.2. **Distribución geográfica en México de la incidencia de personas infectadas por *T. cruzi*.** Mapa nacional de México que muestra la incidencia por estado de la población infectada por *Trypanosoma cruzi*; a través de un análisis de informes del Sistema de Vigilancia Epidemiológico, que abarcó del periodo 2007-2016. Grupo E. Incidencia muy alta. Grupo D. Incidencia alta. Grupo C. Incidencia media. Grupo B. Incidencia baja. Grupo A. Incidencia muy baja. Imagen obtenida en: <https://n9.cl/m0gjm>

1.3 Vías de transmisión

La enfermedad de Chagas se transmite por diversas vías, la principal es la vía vectorial, pero también existen las no vectoriales; como la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos, la vía vertical o congénita, la vía oral y por accidentes en el laboratorio (OMS, 2023).

- Vectorial: Se estima que hasta un 96% de la población diagnosticada se debe a un contacto con el vector (Sánchez-González, et al., 2016). El vector es conocido como triatmino, vinchuca o chinche besucona; que suelen habitar en las grietas que presentan las casas. Salen durante la noche a alimentarse de sangre de mamíferos y defecan al mismo tiempo, en estas heces se encuentra la fase infectiva (tripomastigotes metacíclicos), que da inicio al ciclo de vida del parásito (Rassi, et al., 2012).
- Transfusión sanguínea: Esta forma de transmisión es la segunda vía más frecuente, con un 10% de casos y hasta un 20% de riesgo de infección al recibir sangre de una persona infectada (Prata, 2001). Los parásitos pueden sobrevivir tanto en sangre completa, en glóbulos, placas y plasma (Schmuñis, 1991). Se transmite por personas asintomáticas al momento de donar sangre; debido a un deficiente sistema de vigilancia. Aunado a que la población endémica; que se encuentra principalmente en zonas rurales ha migrado a zonas urbanas por cuestiones económicas y sociales provocando que la incidencia de casos aumente (Sánchez-González, et al., 2016).
- Trasplantes de órganos: No se conoce con exactitud el porcentaje de transmisión por esta vía, pero se conoce que se adquiere la infección debido a las personas que migran y participan en la donación de órganos. Se observó que esta vía también puede provocar la reactivación de la enfermedad de Chagas hasta en un 40%; cuando se realiza trasplante de médula ósea y cordón umbilical (Salvador, et al., 2018). En el caso del trasplante de órganos sólidos, se da principalmente por corazón y riñón; el

riesgo de reactivación va del 26.5 al 42.9% y del 15 al 35%; respectivamente, pero también se han presentado casos de transmisión por trasplante de hígado, páncreas y pulmón (Chagas Disease Argentine Collaborative, 2010).

- Vía congénita: Esta vía tiene aproximadamente el 5% de los casos a nivel mundial y en América hay alrededor de 8,000 casos (OPS, 2021). Se da principalmente en madres que provienen de zonas endémicas que migran a países no endémicos, por ello es considerada una de las principales vías de transmisión en otros países junto con la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos (Carlier, et al., 2019). Debido a la alta parasitemia en las madres *T. cruzi* atraviesa la placenta o durante el parto si ocurre una ruptura de la placenta. Se demostró que *T. cruzi* no es capaz de ser excretado en leche materna (Edwards, et al., 2019).
- Transmisión oral: sucede cuando se consumen alimentos contaminados con las heces u orina del triatomino, como carne de mamíferos e incluso con agua contaminada con una alta confluencia de este parásito (Rueda, et al., 2014). También se ha observado que en Brasil; debido a la falta de medidas de seguridad durante la ingesta de jugo de acaí (fruto que se come crudo y es producido en gran manera en este país), provocó un mayor número de infectados (De Arias, et al., 2022). Debido a lo anterior, esta vía se considera la más grave ya que presenta complicaciones de manera más rápida en comparación a las otras vías. Aunque la incidencia de infectarse por esta vía es mínima; en América se estima alrededor de 900 casos (Rueda, et al., 2014).
- Accidentes en el laboratorio: Esta vía es la que presenta una menor cantidad de casos, se estima que es menos del 1% ya que solo se han reportado 65 casos; siendo el primero en 1938 (Pérez de Ayala, et al., 2009; Herwaldt, 2001). Se da principalmente por falta de implementación de protocolos de bioseguridad, al manipular al parásito; específicamente con el estadio infectivo (De Arias, et al., 2022).

1.4 Biología del parásito

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoo intracelular obligado y uniflagelado que pertenece al reino protista, filo Euglenozoa, clase *Kinetoplastea*, orden *Trypanosomatida*, familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma* y especie *cruzi* (Figura 1.3). Cuenta con una sola mitocondria y un flagelo; el cual se encuentra localizado a lo largo de todo su cuerpo (Andrade-Alviárez, et al., 2022; Moreno, et al., 2019).

Se conoce que *Trypanosoma cruzi*, puede transmitirse por más de 150 especies de triatomíneos que pertenecen a la subfamilia Reduviidae; la cual tiene 15 géneros que transmiten la infección a humanos, pero 4 son los que se consideran de mayor relevancia clínica en México: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* (OMS 2015).

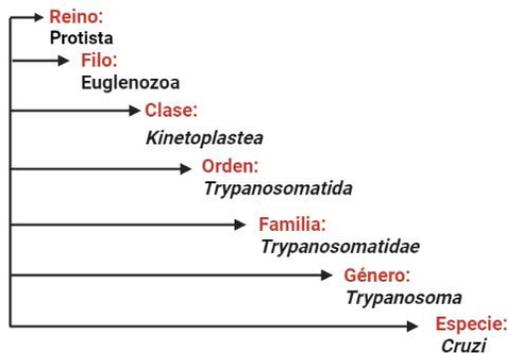


Figura 1.3. **Taxonomía de *Trypanosoma cruzi***. Árbol filogenético que muestra la taxonomía general de *T. cruzi*. Esquema realizado por Mariana Mendoza.

El parásito tiene 3 estadios durante su ciclo de vida. En el vector se encuentra en forma de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, mientras que en el mamífero se encuentra en forma de amastigotes y tripomastigotes circulantes.

- Epimastigote: Es la forma replicativa en el insecto vector y se dividen por fisión binaria. Son alargados, miden 20 μm , tiene un flagelo, una membrana ondulante no tan desarrollada y un cinetoplasto cercano al núcleo (Figura 1.4) (Moreno, et al., 2019; Vianna-Martins, et al., 2012).

- Amastigote: Es la forma replicativa en las células del hospedero mamífero, se dividen por fisión binaria. Tiene forma esférica, miden aproximadamente 2 μm de diámetro, no tienen flagelo ni membrana ondulante y su cinetoplasto se encuentra en posición anterior del núcleo (Figura 1.4) (Maya, et al., 2007; Moreno, et al., 2019; Vianna-Martins, et al., 2012).

Tripomastigote: Existen dos tipos de tripomastigotes los cuales dependen de su localización: los tripomastigotes metacíclicos; se localizan en las heces del vector y son la fase infectiva que se transmiten al hospedero mamífero y los tripomastigotes circulantes; se localizan en la sangre y de manera intracelular en el huésped mamífero (Moreno, et al., 2019; Vianna-Martins, et al., 2012). Son alargados, aproximadamente de 17-20 μm de largo en forma de "c" (Vianna-Martins, et al., 2012; Rodríguez, 2013). El cinetoplasto en este estadio es circular, se encuentra posterior al núcleo y cerca de este sale el flagelo el cual es más alargado en comparación con el de los epimastigotes; que abarca más de la mitad de su cuerpo y presenta una membrana ondulante muy notoria. Esta forma no tiene la capacidad de replicarse (Vianna-Martins, et al., 2012). (Figura 1.4)



Figura 1.4 **Morfología de los diferentes estadios que presenta *Trypanosoma cruzi*.** Estadios que presenta *Trypanosoma cruzi*, se observa de lado izquierdo a los epimastigotes los cuales se tiñeron con Giemsa, seguido de los amastigotes los cuales fueron obtenidos de un paciente que presentaba miocarditis aguda letal. Y, por último; se observa al tripomastigote obtenido a partir de una muestra de sangre periférica y al que se le realizó una tinción de Giemsa. Imágenes obtenidas de Atlas de Parasitología (López, et al., 2012).

1.4.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* se lleva a cabo en dos hospederos; el triatoma (vector) y un hospedero mamífero, como puede ser el humano. Comienza cuando el vector se alimenta de la sangre del hospedero dejando una pequeña lesión en la piel y defeca al mismo tiempo; en las heces se encuentran los tripomastigotes metacíclicos, estos ingresan a través de la lesión por la acción del rascado, llegando así al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes metacíclicos inician el proceso de invasión celular al ser fagocitados por los macrófagos. Posteriormente, pasan al citoplasma donde se diferencian en amastigotes y se dividen por fisión binaria; cuando el número de amastigotes es confluyente en la célula, estos se diferencian en tripomastigotes circulantes los cuales lisan la célula por el movimiento flagelar y pasan nuevamente al torrente sanguíneo e infectan a otras células. En este momento puede llegar un triatomino a alimentarse de la sangre de este hospedero e ingerir los tripomastigotes circulantes, los cuales pasan al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes, estos se dividen por fisión binaria y viajan al intestino posterior donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos dando continuidad al ciclo de vida (Figura 1.5) (Osorio, et al., 2012; De Souza y Barrias, 2020; CDC, 2021).

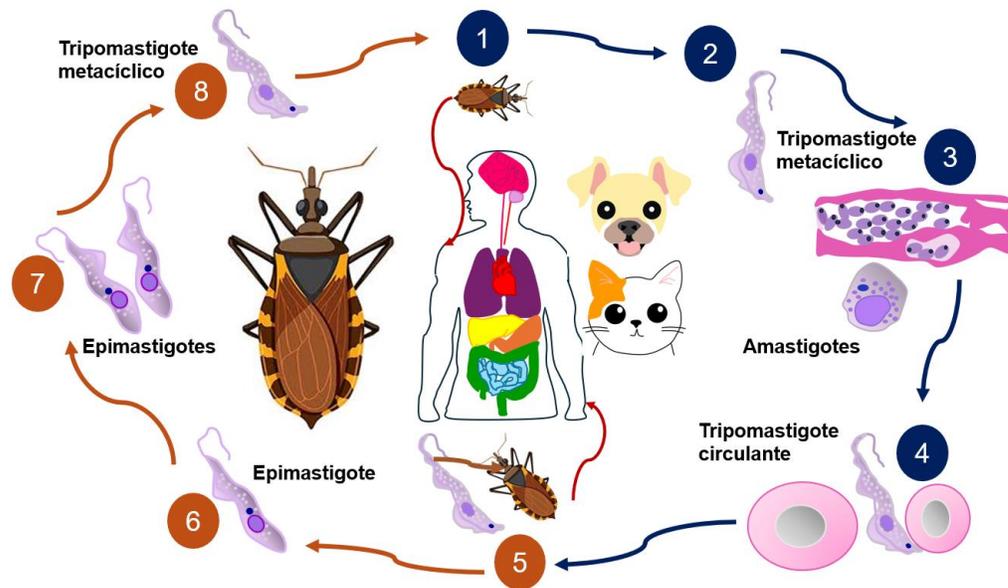


Figura 1.5. **Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***. 1. El triatoma se alimenta del hospedero mamífero. 2. Infección de células con tripomastigotes metacíclicos. 3. Cambio de estadio a amastigotes para su división celular. 4. *T. cruzi* se transforma nuevamente a tripomastigotes y lisan las células. 5. Un triatominio ingiere a los tripomastigotes circulantes, los cuales viajan a su intestino medio. 6. En el intestino medio del triatominio se transforman en epimastigotes. 7. Los epimastigotes se dividen por fisión binaria y viajan hacia el intestino posterior. 8. En el intestino posterior del triatominio se transforman en tripomastigotes metacíclicos dando continuidad al ciclo de vida. Realizado por Mariana Mendoza.

1. 5 Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas tiene dos fases, una aguda y otra crónica. La fase aguda tiene un periodo de incubación de 7 a 10 días a partir de que el parásito entra al torrente sanguíneo, esta puede llegar a durar hasta 2 meses (Molina, et al., 2016; Prata, 2001). Esta fase se caracteriza por una alta proliferación de los parásitos en el sistema circulatorio. Solamente el 5% de las personas infectadas por este parásito presentan síntomas. Los síntomas son poco específicos: fiebre, dolor de cabeza, cuerpo cortado, dolor muscular, hinchazón y/o comezón; por lo que pueden ser fácilmente confundidos con otras afecciones. Se puede presentar algunos signos como el de Romaña y el Chagoma de inoculación (Molina-Morant, et al., 2020). Debido a esto se cree que el número de personas en esta fase debe ser mucho mayor al reportado.

La fase crónica a su vez se diferencia en dos fases, la fase crónica temprana donde no se presentan manifestaciones patológicas; y la fase crónica sintomática que presenta complicaciones cardíacas, digestivas, neurológicas y/o mixtas. Después de 10 a 30 años (Prata, 2001; Gascón, et al., 2007; Molina, et al., 2016). La mayoría de la población infectada (entre el 60 - 70%) es asintomática; sin embargo, un 30 a 40%, presenta manifestaciones cardíacas (la más común en México) como lo son arritmias, taquicardia ventricular, bradicardia secundaria, agrandamiento del corazón, insuficiencia cardíaca (Chao, et al., 2020; Prata, 2001; Molina, et al., 2016). Conforme progresa la enfermedad; hay fibrilación ventricular y se compromete la actividad cardíaca lo que puede ocasionar un infarto o muerte súbita en el 38% de los pacientes (Prata, 2001). Las complicaciones a nivel digestivo se dan en aproximadamente un 15 a 20% de los pacientes; causando padecimientos como megacolon con trastornos de absorción, secreción, obstrucción intestinal y megaesófago; junto con síntomas como regurgitaciones, pirosis y pérdida de contractilidad (Prata, 2001). También se han visto afectaciones neurológicas (menos del 5%) a nivel sistema nervioso periférico y central, el primero está acompañado de polineuritis con hipoestesia y parestesia, junto con la disminución de neuronas motoras y fibras nerviosas sensoriales, mientras que la segunda es causante de la meningoencefalitis y la inmunodepresión y puede haber cambios psíquicos (Gascón, et al., 2007; Prata, 2001).

1.6 Diagnóstico

Los métodos de estudios microscópicos son los más usados durante la fase aguda de la enfermedad; los cuales son a partir de muestras directas como gota gruesa/frotis de sangre que permiten la observación de tripomastigotes, además de las de concentración (Microhematocrito o prueba de Strout). Pero solo presentan una sensibilidad del 80 al 90% (Balouz, et al., 2017).

- Gota gruesa. Permite la búsqueda de tripomastigotes directamente al microscopio por medio de un frotis de sangre sin anticoagulante teñido con colorantes como Giemsa, Wright o Romanosky (Salazar, et al., 2019).

- Microhematocrito. Se utiliza una muestra de sangre con heparina, se utilizan los glóbulos blancos donde se encuentra el parásito y se observa en el microscopio a 40x (Storino, 2023).
- Strout. Se utiliza el suero de la sangre una vez eliminando el coágulo, se centrifuga con el fin de mantener la muestra concentrada y se obtiene el sedimento, el cual se observa en el microscopio (Storino, 2023).

Existen métodos indirectos como el xenodiagnóstico y el hemocultivo; los cuales se basan en la amplificación biológica, pero no son usados con mucha frecuencia debido a que su tiempo de realización es prolongado (10 a 60 días), se necesitan instalaciones adecuadas, son costosos y tienen una sensibilidad del 50% (Balouz, et al., 2017; Storino, 2023).

El diagnóstico durante la fase crónica es realizado principalmente por métodos serológicos, que se basan en la búsqueda de anticuerpos IgG (inmunoglobulinas G) de anti-*T. cruzi*. Alcanzan una sensibilidad de hasta el 95% (Storino, 2023). Entre los métodos serológicos se encuentran:

- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. Se basa en la unión de un antígeno de *T. cruzi* el cual se fija en placas de poliestireno, con anticuerpos de *T. cruzi* de una muestra del paciente. Posteriormente, se adiciona un anticuerpo anti IgG de humano acoplado a una enzima como la peroxidasa. Es positiva si hay una reacción colorimétrica al momento de adicionar el sustrato de la enzima (Salazar, et al., 2019).
- Ensayo de inmunofluorescencia indirecta: Se titula la presencia de anticuerpos de *T. cruzi* en el suero del paciente. Se utiliza un anticuerpo para epimastigote marcado con fluorescencia (Murcia, et al., 2013; Salazar, et al., 2019).

- Ensayo de hemaglutinación indirecta: Se utiliza una mezcla de antígenos de parásitos (Murcia, et al., 2013). Se basa en inducir una aglutinación de eritrocitos que tuvieron un proceso de sensibilización con antígenos de *T. cruzi* (Salazar, et al., 2019).

También existen métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se basa en la amplificación de secuencias de ADN del cinetoplasto de *T. cruzi* en una muestra sanguínea del paciente; aunque esta técnica presenta una sensibilidad aproximada del 80%, no es suficiente para el diagnóstico en fase aguda y crónica (Salazar, et al., 2019; Pascual, et al., 2023; Balouz, et al., 2017).

Debido a que los métodos no dan una sensibilidad del 100% se opta por realizar 2 métodos que sean confirmativos y en caso de que uno de ellos presente alguna incoherencia se opta por realizar un tercer método (Murcia, et al., 2013). Según la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores menciona en el párrafo 7.3.2.3 que una prueba se considera positiva cuando se demuestra la presencia del parásito o por mínimo dos pruebas serológicas positivas (Secretaría de Salud (SSA), 2014, p. 7.3.2.3; https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015#gs.c.tab=0).

1.7 Tratamiento

Actualmente existen dos medicamentos aprobados en México para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*, el benznidazol (N-fenilmetil-2 nitro-1H-imidazol-1-acetamida) (Bnz) y nifurtimox (3-metil-4-[5'-nitrofurfurilidenamina]tetrahydro-4H-1,4,-tiazina-1,1-dióxido) (Nfx); ambos medicamentos son eficaces del 50 al 80% durante la fase aguda de la enfermedad, pero debido al difícil diagnóstico de la infección temprana se administran durante la fase crónica; por lo que su eficiencia disminuye del 8 al 20%. En el caso de niños se muestran mejores resultados en la

fase crónica temprana siendo esta del 94% (Lascano, et al., 2022). Las dosis recomendadas para Bnz son de 10 mg/Kg/día para adultos y de 5 mg/Kg/día para niños, se administran 2 dosis diarias durante un periodo de 30 a 60 días. En el caso de Nfx las dosis recomendadas en adultos son de 8 a 10 mg/Kg/día y en niños es de 15 a 20 mg/Kg/día durante 60 a 120 días (Norman y López, 2019). La administración de estos medicamentos produce una gran cantidad de reacciones adversas que provocan de un 25 a 41.5% de desapego al tratamiento (Sales, et al., 2017). Las reacciones adversas más comunes para el caso de Bnz son a nivel dermatológico como el rash, la erupción cutánea y/o el prurito; también se puede presentar dolor de cabeza, mialgia, artralgia, anorexia, pérdida de peso, malestares gastrointestinales (náuseas, vómitos, dolor abdominal), toxicidad de la médula ósea y con menor frecuencia hepatitis, leucopenia, trombocitopenia, neuropatía periférica e hipersensibilidad a fármacos (Molina-Morant, et al., 2020; Sales, et al., 2017; Norman y López, 2019). En el caso de Nfx las reacciones adversas suelen ser más prolongadas en comparación a Bnz y las más comunes son a nivel gastrointestinal; como la anorexia, náuseas, vómitos, dolores intestinales, la pérdida de peso y parestesia; también es común presentar reacciones asociadas al Sistema Nervioso Central (SNC), como insomnio, confusión, dolor de cabeza, neuropatía periférica y con menor frecuencia se ha visto la presencia de erupción cutánea y trastornos gastrointestinales (Norman y López, 2019; Molina, et al., 2020).

Además de la gran cantidad de efectos adversos que tienen estos medicamentos durante el tratamiento de la infección, su poca disponibilidad también aumenta la dificultad, debido a que son medicamentos muy costosos y controlados, de tal manera que solo son distribuidos por instituciones específicas. En el caso de México, tanto Bnz como Nfx solo se pueden adquirir por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) para casos confirmados ([Enfermedad de Chagas | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx](https://www.gob.mx/enfermedad-de-chagas), recuperado el 25 de junio del 2024).

El Bnz es un compuesto derivado de nitroimidazol y el Nfx de nitrofurano. Ambos tienen en su estructura un grupo nitro (Figura 1.6); el cual se ha observado que tiene

la actividad tripanocida por la formación de intermediarios que afectan las funciones del parásito (Lascano, et al., 2022; Hall, et al., 2011; Hall y Wilkinson, 2012).



Figura 1.6. **Estructura de los fármacos canónicos.** Estructura del Bnz y Nfx, fármacos aprobados en la clínica para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En el lado izquierdo de cada molécula se observa el grupo nitro que le da la capacidad de ser antiparasitario, imágenes obtenidas en: <https://n9.cl/qko36> y <https://n9.cl/3qqr>

1.7.1 Mecanismo de acción del Bnz y del Nfx

El mecanismo de acción del Bnz empieza por la formación de metabolitos electrofílicos los cuales se forman tras la reducción del grupo nitro (NO_2) a amino (R-NH_2) por medio de las nitrorreductasas del tipo I; estos metabolitos electrofílicos se unen a macromoléculas del parásito como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; dañándolos (Maya, et al., 2007; Hall y Wilkinson, 2012). *T. cruzi* se defiende de estos metabolitos electrofílicos por medio de la conjugación con tioles, como el GSH y el tripanotión (T(SH)_2) los cuales se conjugan con el Bnz para ser expulsados de la célula (Maya, et al., 2007).

El Nfx también se reduce por acción de las nitrorreductasas tipo I dando de igual manera un grupo amino (R-NH_2) y la formación de un grupo nitro (R-NO_2), el cual participa en un ciclo redox formando O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de un radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) por acción de la superóxido dismutasa. Tanto el O_2 como el H_2O_2 en presencia del ion férrico (Fe^{3+}) dan como producto un radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (reacción de Haber-Weiss) el cual se une a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del parásito y los daña. Los radicales libres se unen a una molécula de agua (H_2O) que con las reductasas oxidan al GSH reducido (GSH) formando GSH oxidado (GSSG) y/o al tripanotión reducido (T(SH)_2) dando tripanotión oxidado (TS_2) (Figura 1.7) (Hall, et al., 2011; Maya, et al., 2007).

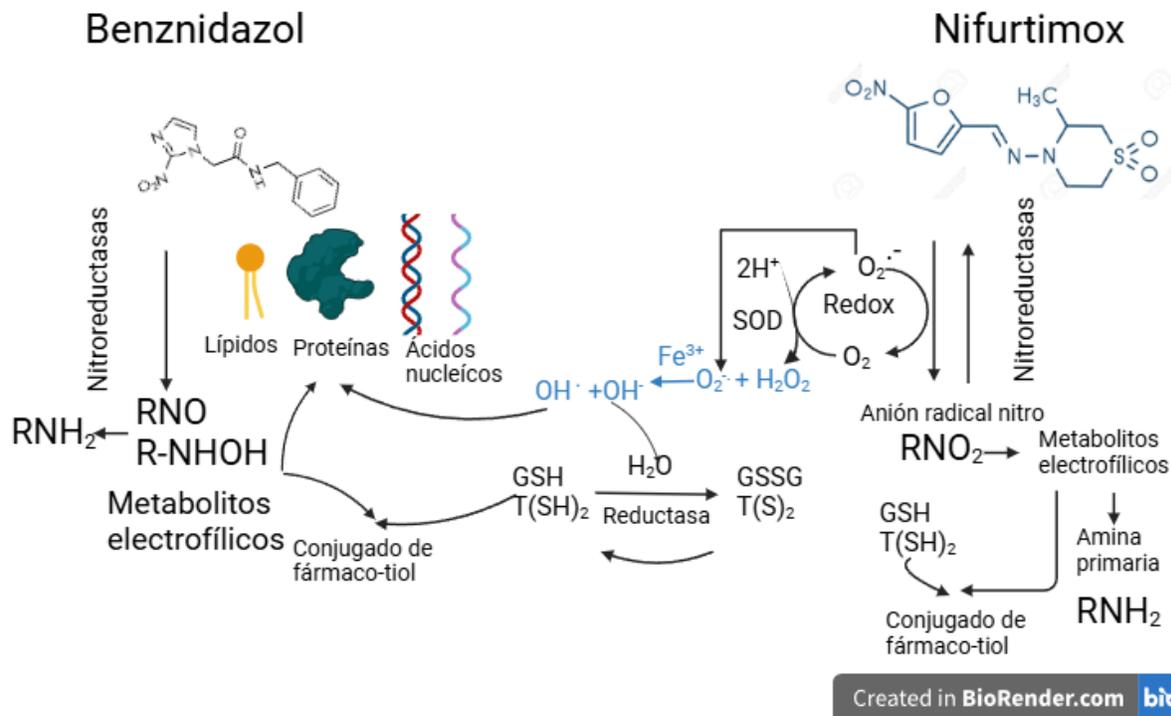


Figura 1.7 **Mecanismo de acción de los fármacos antichagásicos.** Bnz y Nfx forman metabolitos electrofílicos y radicales libres; respectivamente, los cuales se unen a biomoléculas del parásito dañándolas. El parásito se defiende de estos por medio de la formación de conjugados fármaco-tiol. Imagen obtenida de Tesis de Rivera (2023) disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2023/agosto/0843995/Index.html>

Se ha observado que estos medicamentos no solo causan efecto sobre el parásito, sino que también presentan cierta citotoxicidad en las células del huésped; se piensa que es por la expresión de la nitrorreductasa causando las reacciones adversas descritas con anterioridad en el huésped (Hall y Wilkinson, 2012).

Debido a los efectos adversos de los antichagásicos canónicos, distintos grupos de investigadores buscan nuevas alternativas terapéuticas que tengan un efecto tripanocida en ambas fases de la enfermedad, y que presenten una menor citotoxicidad para combatir la enfermedad de Chagas. En este proyecto de tesis se analizarán derivados de triazinas, los cuales fueron diseñados contra la enzima tripanotión reductasa o tripanotión sintetasa, con la finalidad de determinar si tienen actividad tripanocida y son menos citotóxicos en comparación a Bnz y/o Nfx.

2. ANTECEDENTES

2.1 Vía de síntesis del tripanotión

Como se mencionó con anterioridad, la principal forma que utiliza el parásito como defensa ante los radicales libres producidos por los fármacos; es la formación de conjugados con el tripanotión $[T(SH)_2]$, los cuales forman vesículas que envuelven al fármaco y lo expulsan de la célula (Maya, et al., 2007). El $T(SH)_2$ es el metabolito antioxidante de mayor importancia; ya que es fundamental para que se lleve a cabo la desintoxicación de peróxidos causados por el estrés oxidante que producen los fármacos en el parásito y también al que se ve expuesto durante la invasión celular. La vía de síntesis del $T(SH)_2$ consta de 3 enzimas que utilizan ATP para la reacción. La vía comienza con la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), antes llamada gama-glutamilcisteína sintetasa, que necesita a la cisteína (Cys) y al glutamato (Glu) para formar gamma-glutamil-Cys (γ EC), posteriormente la GSH sintetasa (GS) a partir de γ EC y glicina (Gly) forma el GSH. Se necesita de dos moléculas de GSH más una molécula de espermidina (Spd) para formar $T(SH)_2$ por la acción de la tripanotión sintetasa (TryS). El $T(SH)_2$ dona sus electrones a un sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos que reduce a los peróxidos y produce tripanotión oxidado (TS_2), este se regenera a $T(SH)_2$ por medio de la tripanotión reductasa (TryR) que utiliza NADPH como donador de electrones (Figura 2.1) (Vázquez, et al., 2017).

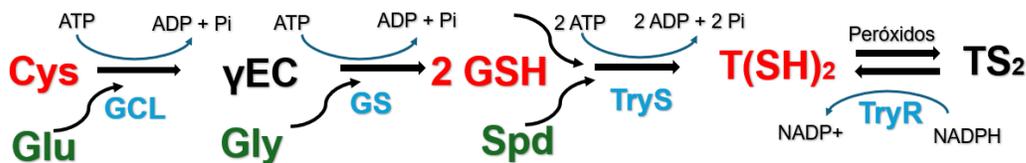


Figura 2.1 **Vía de síntesis de $T(SH)_2$ y reducción de peróxidos.** El $T(SH)_2$ es el tiol principal que se usa para la reducción de peróxidos causados por estrés oxidativo. Esta vía de síntesis involucra tioles marcados en color rojo: Cys, GSH, $T(SH)_2$, en la cual se requieren las enzimas marcadas en color azul: GCL (glutamato Cys ligasa), GS (GSH sintetasa), TryS (tripanotión sintetasa), TryR (tripanotión reductasa) y aminoácidos y poliaminas que están en color verde: Glu (glutamato), Gly (Glicina) y Spd (Espermidina). Realizado por Mariana Mendoza.

2.2 Triazinas

Las triazinas son compuestos heterocíclicos que están conformados por tres nitrógenos, tres carbonos y tres hidrógenos; es decir, su fórmula general es $C_3H_3N_3$ (Rani y Agrawal, 2023) (Figura 2.2).

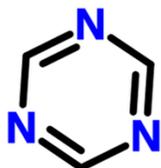


Figura 2.2 **Estructura de la triazina.** Imagen que muestra la estructura de la triazina la cual constan de 3 Nitrógenos, 3 Carbonos y 3 Hidrógenos.

Las triazinas fueron descubiertas por el Dr. Enrico Knüsli, considerado como el principal científico de síntesis química de la empresa química JR, Geigy en Suiza. En 1952 comenzó el proyecto de herbicidas en los laboratorios Geigy, ya que los agricultores tenían el desafío para controlar las malezas de los cultivos, lo que llevó a tomar la iniciativa de mejorar sustancias químicas para este uso. Posteriormente, el Dr. Knüsli fue el que descubrió un amplio panorama sobre estos herbicidas, ya que se dedicó a la modificación molecular de sustancias químicas que ya existían y que anteriormente se había visto que tenían efectos en las plantas. Descubrió una gran variedad de compuestos al modificar molecularmente un anillo de triazina con diversos sustituyentes. Durante aproximadamente 20 años, a estos derivados de triazina se le han adicionado diferentes grupos funcionales que en su mayoría han resultado ser activos y han dado resultados satisfactorios aumentando la producción y disminuyendo costos (Müller, 2008).

Las triazinas son consideradas como un gran descubrimiento en el área de los herbicidas debido a que su estructura es muy versátil; es decir, permite combinarse con otros herbicidas. Actualmente, algunos de los herbicidas derivados de triazinas que más se ocupan mundialmente se muestran en la Figura 2.3 (Müller, 2008; Singla, et al., 2015).

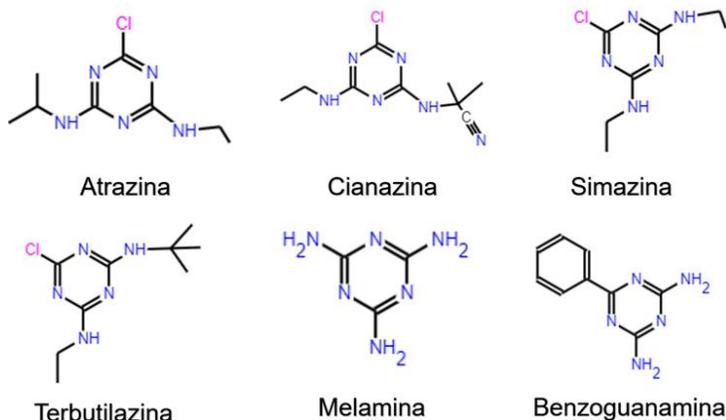


Figura 2.3. **Herbicidas utilizados en la agricultura.** La triazina es considerada como la base para la creación de los herbicidas. En la imagen se muestra las estructuras de algunos de los herbicidas, los cuales son derivados de triazina con diversos sustituyentes.

2.2.1 Aplicaciones de las triazinas

Actualmente existen 3 tipos de triazinas reportadas, las 1,2,3 triazinas también conocidas como triazina asimétrica o vecinal; las 1,2,4 triazinas también llamadas isotriazina y las 1,3,5 triazinas nombradas igualmente como triazinas asimétricas o cianidinas (Figura 2.4-A). Este último tipo de triazina se considera la más importante; debido a que presenta distintas aplicaciones; que posiblemente, se deban a su simetría, lo que les confiere una alta afinidad electrónica; además, se ha observado que es un buen aceptor y donador de electrones; lo que permite la adición de distintos grupos funcionales (Rani y Agrawal, 2023).

Al observar estas características de las triazinas y la efectividad de sus derivados como herbicidas, se ha evaluado su potencial en el área farmacológica, encontrándose diversos derivados con actividades antifúngicas (Conrad, et al., 2023), antibacteriales (Gunasekaran, et al., 2019), antivirales, antiinflamatorias (Singla, et al., 2015), anticancerígenas (Sweeney, et al., 2016) y antiparasitarias (Gupta, et al., 2010). Para el caso de las 1,2,3-triazinas no existen hasta la fecha medicamentos aprobados para su uso, pero existen reportes de sus posibles aplicaciones farmacológicas; por ejemplo, se analizaron diversos derivados de triazina encontrándose actividad antimicrobiana principalmente contra una cepa de *Staphylococcus aureus* (Figura 2.4-B) (Zvarych, et al., 2019).

En el caso de las 1,2,4 triazinas o isotriazinas existen algunos derivados aprobados por la FDA, se aprobaron 65 inhibidores de tirosina cinasa para el tratamiento de diversos tipos de cáncer entre los que se encuentran 2 derivados de triazina el avapritinib (pirrolo [2,1-f] [1,2,4] triazina) (Figura 2.4-C) y el remdesivir un fármaco nucleósido diseñados contra el tumor gastrointestinal y para infecciones virales como COVID-19, respectivamente (Singh, et al., 2022).

Las triazinas del tipo 1,3,5 son las más estudiadas debido a su simetría y también existe un fármaco aprobado por la FDA en 1990; conocido como altretamina (Hexalen) (Figura 2.4-D), el cual es un agente alquilante que actúa dañando el ADN y provocando la muerte de las células que están en proceso de división y; por lo tanto, es utilizado para el tratamiento del cáncer de ovario (Singla, et al., 2015; Altretamine, 2016).

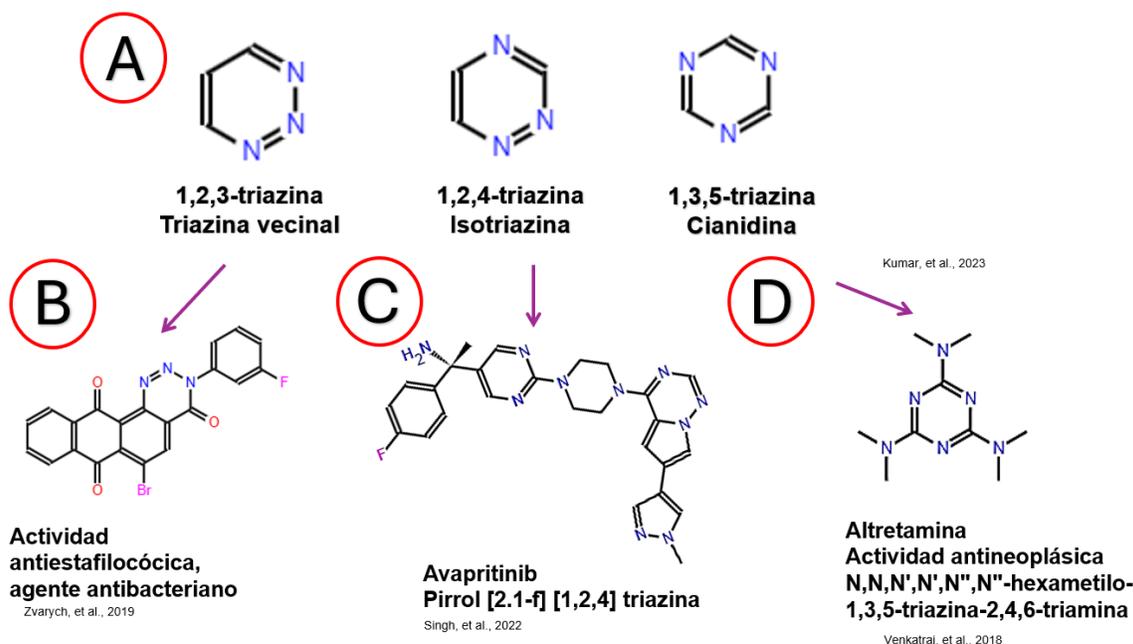


Figura 2.4. **Aplicaciones de las triazinas en el área clínica.** A) Estructuras de los isómeros de triazina. B) Ejemplo de la estructura utilizada para la aplicación de la triazina 1,2,3 como agente antibacteriano. C) Estructura del fármaco Avapritinib aprobado, que corresponde a una triazina 1,2,4 el cual es administrado para tumores gastrointestinales. D) Fármaco altretamina correspondiente a una triazina 1,3,5, utilizado para el tratamiento del cáncer ovárico. Imagen realizada en BioRender.

Se ha reportado que las quinazolinonas tienen actividad contra amastigotes de *Leishmania*; sin embargo, cuando se unen a una triazina se observó que mejoró el efecto antileishmanicida comparado contra la miltefosina, uno de los fármacos establecidos en clínica. Se determinaron valores de CI_{50} menores que la miltefosina; y a su vez presenta un efecto citotóxico contra células de mamífero hasta una concentración de $400 \mu\text{M}$ (Figura 2.5) por lo que se están evaluando en un modelo de hámster dorado encontrando resultados prometedores. Se hipotetiza que actúan contra el factor de crecimiento transformante ($\text{TGF-}\beta$) el cual inhibe al óxido nítrico sintasa responsable de la generación del óxido nítrico (NO) (Sharma, et al., 2013).

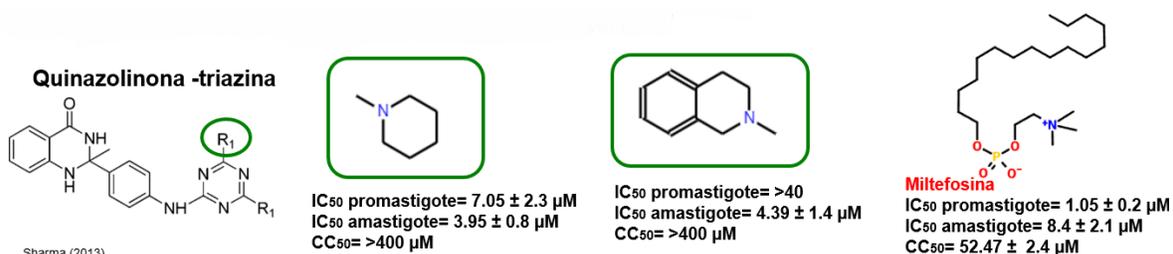


Figura 2.5. **Efecto antiparasitario sobre *Leishmania* a partir de una quinazolinona-triazina.** Se observa la estructura de un ejemplo de triazina que presenta un efecto antiparasitario, las estructuras en recuadros verdes son las colocadas en el R_1 que mostraron los efectos más prometedores ya que incluso no son citotóxicas sobre células Vero en comparación con un control de miltefosina, un medicamento aprobado para la enfermedad de *Leishmania*.

2.3 Antecedentes de derivados de triazina

En este proyecto se estudiaron 3 derivados de triazina del tipo 1,2,3, que tienen en su estructura un grupo N-óxido, los cuales fueron sintetizados por el grupo del Dr. Gildardo Rivera Sánchez (Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México). Previamente se sintetizaron una serie de compuestos nombrados del 2a al 2k (Figura 2.6) para los cuales se evaluó su efecto tripanocida, y se determinaron valores de CI_{50} contra una cepa de *T. cruzi* (Dr. Manuel Chan, Universidad Autónoma de Campeche, México) (Datos no publicados).

La triazina 2a es el compuesto menos sustituido con el grupo N-óxido que tuvo actividad tripanocida, la cual permitirá observar el efecto de la triazina sobre este parásito y a su vez determinar la contribución del grupo N-óxido a la actividad parasiticida, el cual fue diseñado con el fin de que inhibiera a las enzimas TryR O TryS.

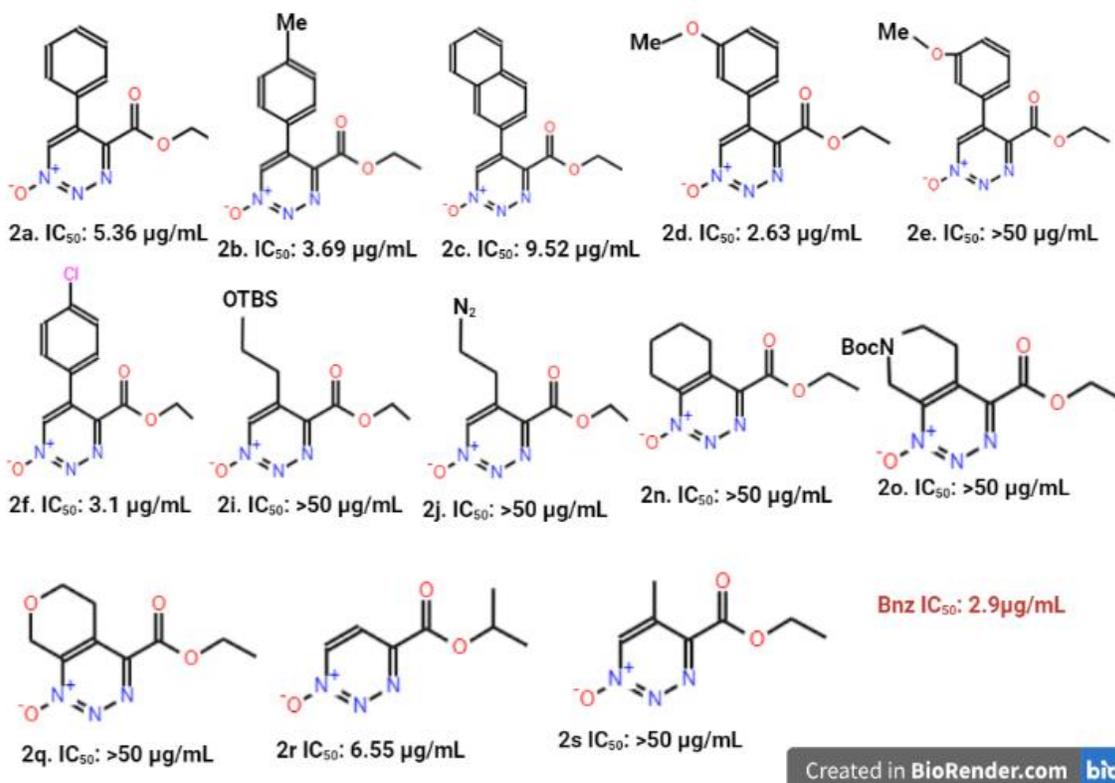


Figura 2.6 **Estructuras de derivados de triazina con un grupo N-óxido.** Estructuras sintetizadas por el Dr. Rivera con los valores de CI₅₀ obtenidas por el Dr. Chan al evaluarlas con una cepa de *T. cruzi*, usando como control a Bnz (Datos no publicados).

La triazina 2a se redujo de tal manera que no presentara el grupo funcional de N-óxido (compuesto nombrado como 2-aT) con la finalidad de determinar si este grupo mejora la actividad antichagásica (Figura 2.7). Este compuesto a su vez se redujo nuevamente rompiendo el anillo de resonancia (compuesto 2a-R) (Figura 2.7) para determinar si al interferir en la aromaticidad del compuesto hay algún cambio en la actividad antiparasitaria.

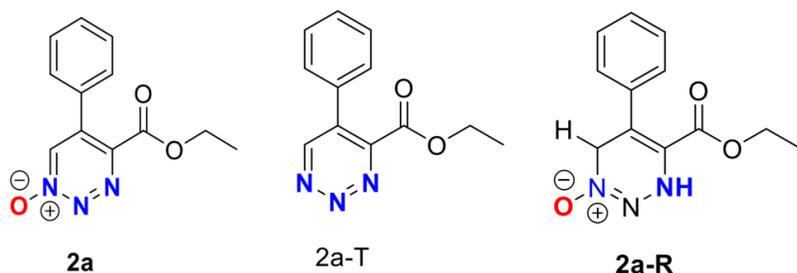


Figura 2.7. Estructuras de los compuestos derivados de triazina estudiados en esta tesis.

2.4 Importancia del grupo N-óxido

El grupo N-óxido se usa ampliamente tanto en; productos farmacéuticos, intermediarios para síntesis y como ligandos para complejos metálicos. Son de interés debido a su facilidad para sintetizarlos por la oxidación del Nitrógeno. Este grupo se ha utilizado en fármacos que tienen actividades anticancerígenas y son comúnmente vistos en quinolinas (Miao, et al., 2003). Además, pueden formar compuestos heteroaromáticos, considerados como bases de Lewis fuertes debido a la presencia del enlace formado entre el nitrógeno y el oxígeno (Wrzeszcz y Siedlecka, 2020).

Los N-óxidos se forman a partir de la oxidación de aminas terciarias, siendo incluso más activas que ellas, lo que permite su uso para fármacos con compuestos alcaloides, quimioterapéuticos, anticancerígenos, antibióticos y psicofármacos. Los principales usos de los N-óxidos es como metabolitos o como intermediarios para el metabolismo de los fármacos, pero hasta el momento no se conoce con exactitud cómo funcionan (Bickel, 1969).

Existen fármacos que contienen a este grupo funcional y que han demostrado efecto antiparasitario como es el caso del N-óxido levofloxacino (Figura 2.8) el cual es una quinolona que pertenece a una categoría conocida como API (Ingredientes farmacéuticos activos) los cuales son conocidos de esta manera porque son utilizados para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones. El principal uso de este medicamento es contra bacterias; su mecanismo de acción se basa en

inhibir la ADN girasa y la topoisomerasa por lo que inhiben la replicación del ADN; también se utiliza como tratamiento para enfermedades antiparasitarias (Pharmaoffer, 2005).

N-óxido levofloxacino

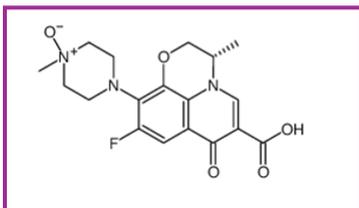


Figura 2.8. **Estructura del API N-óxido levofloxacino utilizado en diferentes infecciones.** Estructura que presenta un fármaco N-óxido el cual se considera un ingrediente farmacéutico activo debido a que se ha observado que tiene diversas actividades biológicas. Estructura obtenida en Pharmaoffer, 2005

También se han reportado compuestos de quinoxalinas que tienen este grupo N-óxido que mostraron actividad contra *Leishmania*, como es el caso de la 3-(3,4,5, trimetoxi-fenil)-1-(3,6,7-trimetil-1,4-dioxi-quinoxalin-2-il)-propenona que tuvo efecto contra amastigotes; si bien no presenta una mejor CI_{50} en comparación con el fármaco control; anfotericina B, se determinó que disminuye el efecto citotóxico en células; por lo tanto, podría ser un tratamiento alternativo (Burguete, et al., 2008).

En este proyecto de tesis se evaluará a los compuestos 2a, 2a-T y 2a-R, con el fin de determinar si la triazina en conjunto con el grupo N-óxido puede ser considerada como una molécula base para el diseño de fármacos antiparasitarios contra *T. cruzi*. Se evaluará el efecto citostático de la triazina y del grupo N-óxido sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y sobre la citotoxicidad en células HFF-1. Posteriormente evaluaremos estos compuestos sobre un modelo de infección *in vitro* de monoterapia y de biterapia; es decir, en conjunto con los fármacos canónicos. Adicionalmente evaluaremos si estos derivados de triazina alteran los metabolitos tioles Cys, GSH y $T(SH)_2$, como indicadores de una posible inhibición de la TryR o TryS, enzimas contra los que fueron diseñados.

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es de relevancia a la sociedad porque hay una gran parte de la población mexicana que está infectada o que corre el riesgo de infectarse, ya que es una enfermedad principalmente endémica. A pesar de su alta incidencia en México (y en el mundo) se considera una enfermedad desatendida y olvidada; asociada a la pobreza. Aunado a lo anterior, debido a que no existe un diagnóstico adecuado de la infección, provoca que esta enfermedad este subdiagnosticada ya que los métodos presentan altas incertidumbres, principalmente durante la fase crónica.

Solo existen 2 tratamientos aprobados por la FDA para el tratamiento de la infección, el Bnz y el Nfx, los cuales son efectivos durante la fase aguda de la enfermedad, pero durante la fase crónica presentan nula eficacia, que es la fase donde los pacientes presentan síntomas cardíacos (como es en el caso de México), digestivos o mixtos. Además, los tratamientos son prolongados, pueden durar hasta 120 días y presentan una gran cantidad de efectos adversos, lo que provocan un desapego al tratamiento de hasta un 40%. Otra limitante es que estos medicamentos son costosos para las instituciones que los expiden, ya que son medicamentos que solo son surtidos por instituciones especializadas.

En esta tesis se analizará si estos derivados de triazina N-óxido 2a, 2a-T y 2a-R presentan un efecto negativo sobre el crecimiento de epimastigotes *de T. cruzi* y cuál es el efecto citotóxico en células HFF-1. Además, se analizará si estos compuestos pueden inhibir a la TryR.

4. HIPÓTESIS

El compuesto 2a tendrá mayor efecto antiparasitario que 2a-T y que 2a-R; debido a la presencia del grupo N-óxido.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto antiparasitario de los derivados de triazina N-óxido en *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos Particulares

Evaluar el efecto de los derivados de triazina con grupo N-óxido sobre el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi*

Evaluar el efecto citotóxico de los derivados de triazina en células HFF-1

Evaluar el efecto de los derivados de triazina en un modelo de infección *in vitro*

Evaluar el efecto de los derivados de triazina sobre los metabolitos tioles del sistema antioxidante de *T. cruzi*

6. MÉTODOS

6.1 Determinación de la curva de crecimiento de epimastigotes

Inicialmente, se sembraron 5 mL de medio LIT suplementado (Anexo 1.1) a una densidad 1,000,000 epimastigotes/mL y se incubaron a 28°C por 9 días. El conteo de parásitos viables se realizó cada 24 horas con un microscopio y una cámara de Neubauer; usando como criterio de viabilidad el movimiento flagelar que presentan los parásitos (Figura 6.1). Un gráfico de densidad de epimastigotes se realizó en función del tiempo y el gráfico del logaritmo de la densidad celular en función del tiempo; con esta última gráfica se determinaron los días en que se da la fase logarítmica de crecimiento.



Figura 6.1 **Caracterización del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi***. Protocolo para la realización de curvas de crecimiento las cuales se inician con una densidad de 1,000,000 de epimastigotes de *T. cruzi* por mL en 5 mL de medio LIT suplementado. Imagen realizada en BioRender.

6.2 Protocolo para la cuantificación de los derivados de triazinas

La cuantificación de cada uno de los compuestos se realizó con la finalidad de asegurar la misma concentración de estos en todos los ensayos. Como control se usaron soluciones de Bnz y Nfx para las cuales se preparó un stock a una concentración teórica de 2.7 mM para Bnz y 0.6 mM para Nfx diluidos en DMSO. La

absorbancia de esta solución stock se determinó en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 325 nm para Bnz y 402 nm para Nfx. A partir de las absorbancias obtenidas y con el valor del coeficiente de extinción molar (el cual se caracterizó con anterioridad en el equipo de trabajo (Bnz $\epsilon = 8.18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y Nfx $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)) se calculó la concentración real en que se encontraba este stock.

Para los coeficientes de extinción molar determinados de los derivados de triazina 2a, 2a-R y 2 a-T, se prepararon a una concentración de 10 mM y se hizo un barrido de absorbancia, las longitudes de onda se obtuvieron de sus picos de máxima absorción (2a= 280 nm, 2a-R= 355 nm y 2a-T= 290 nm). Posteriormente, se realizaron gráficos lineales de absorbancias en función de la concentración teórica, se obtuvo su respectiva ecuación de la recta donde el valor de la pendiente corresponde al coeficiente de extinción molar (2a $\epsilon = 22.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 2a-R $\epsilon = 4.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 2a-T $\epsilon = 3.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Por medio de estos coeficientes de extinción molar se calculó la concentración real del stock de compuesto para cada experimento (Figura 6.2).

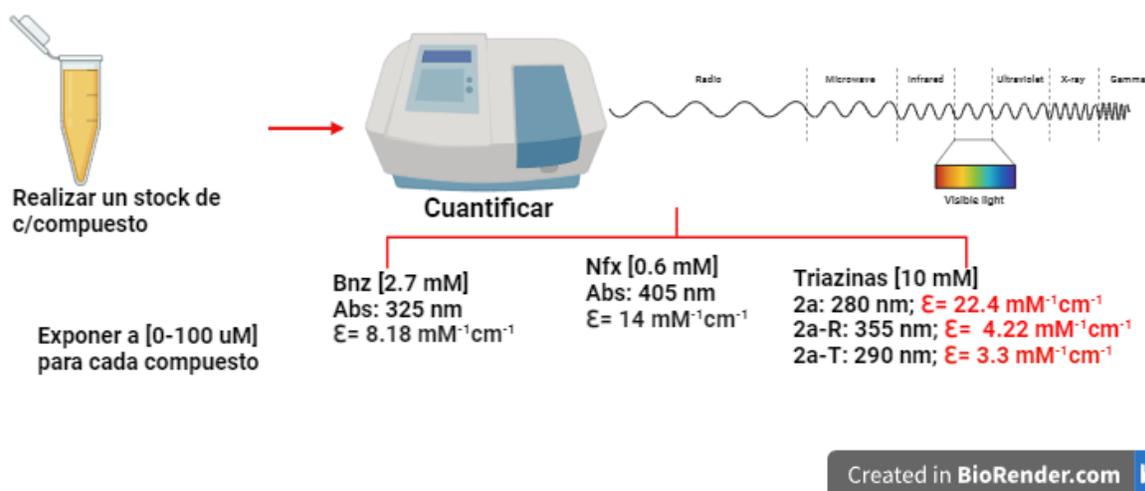
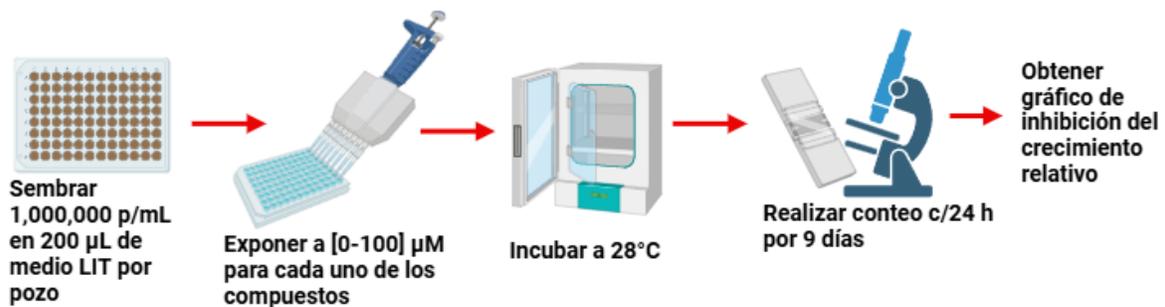


Figura 6.2 **Cuantificación de los derivados de triazina.** Metodología utilizada para la cuantificación de fármacos canónicos (Bnz y Nfx) y de los derivados de triazina, los valores mostrados en color rojo representan los coeficientes de extinción molar calculados al realizar una curva patrón, siendo este valor igual a la pendiente de la recta. Imagen Realizada en BioRender.

6.3 Protocolo de exposición de los epimastigotes a los fármacos canónicos y experimentales

En la figura 6.3 se ilustra el procedimiento. En una placa de 96 pozos se colocaron 200 μL de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento a una densidad de 1,000,000 parásitos/ mL en medio LIT suplementado. Los parásitos se expusieron a diferentes concentraciones de los derivados de triazinas (0 -100 μM) y se incubaron a 28°C durante un periodo de 24 h. Como controles se utilizaron los fármacos canónicos a concentraciones de 0 - 28 μM para Bnz y de 0 a 8 μM para Nfx bajo las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo se realizó un conteo al microscopio de los epimastigotes viables (móviles) usando una cámara de Neubauer. El crecimiento relativo se calculó con la diferencia de parásitos colocados menos la cantidad de parásitos después de 24 h de incubación, siendo este valor el 100%. Se construyeron gráficas del % de crecimiento relativo en función de la concentración del fármaco para determinar las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) y 90 (CI_{90}) que disminuyen el crecimiento de los parásitos.



Created in BioRender.com

Figura 6.3. **Exposición de los epimastigotes de *T. cruzi* a los derivados de triazina.** Protocolo utilizado para la exposición de los epimastigotes a los fármacos canónicos y derivados de triazinas. Imagen realizada en BioRender.

6.4 Evaluación de la citotoxicidad de los derivados de triazinas en células HFF-1

A un cultivo de células HFF-1 (ver anexo 2.2) que se encontraba a una confluencia de crecimiento entre el 80 al 100%, se le realizó dos lavados con una solución de PBS-EDTA (ver anexo 1.4); posteriormente se adicionó 1 mL de solución de tripsina (Sigma, Missouri, Estados Unidos) y se incubó durante 2 min a 37°C para despegar las células de manera química y mecánica. Las células se contaron al microscopio con una cámara de Neubauer a una dilución 1:2 con azul tripano. El azul tripano es un colorante vital que permite determinar si una célula se encuentra viva o muerta, las células vivas tienen una membrana celular completa que no permite la entrada del colorante, mientras que las células muertas tienen dañada esta membrana y; por lo tanto, su citoplasma se tiñe de color azul (Strober, 2015). Una vez determinada la densidad celular y viabilidad en una placa de 96 pozos se sembraron 10,000 células por pozo en un volumen de 200 μ L de medio DMEM suplementado al 10% de SFB (ver anexo 1.2). Las células se incubaron por 24 h en una incubadora con mezcla de gases de 95% de aire con 5% de CO₂ a 37°C con el fin de que se adhirieran a los pozos. Posteriormente, se expusieron a las mismas concentraciones utilizadas en epimastigotes (0 a 50 μ M) y se incubaron en las mismas condiciones. Después de este tiempo se contaron y se determinó su viabilidad con azul tripano; para ello se retiró el medio DMEM, se realizó un lavado con solución de PBS-EDTA y se despegaron las células con tripsina. Se obtuvo gráficos de viabilidad celular contra concentración de los compuestos para determinar los valores de CI₅₀ y de CI₁₀ (Figura 6.4).

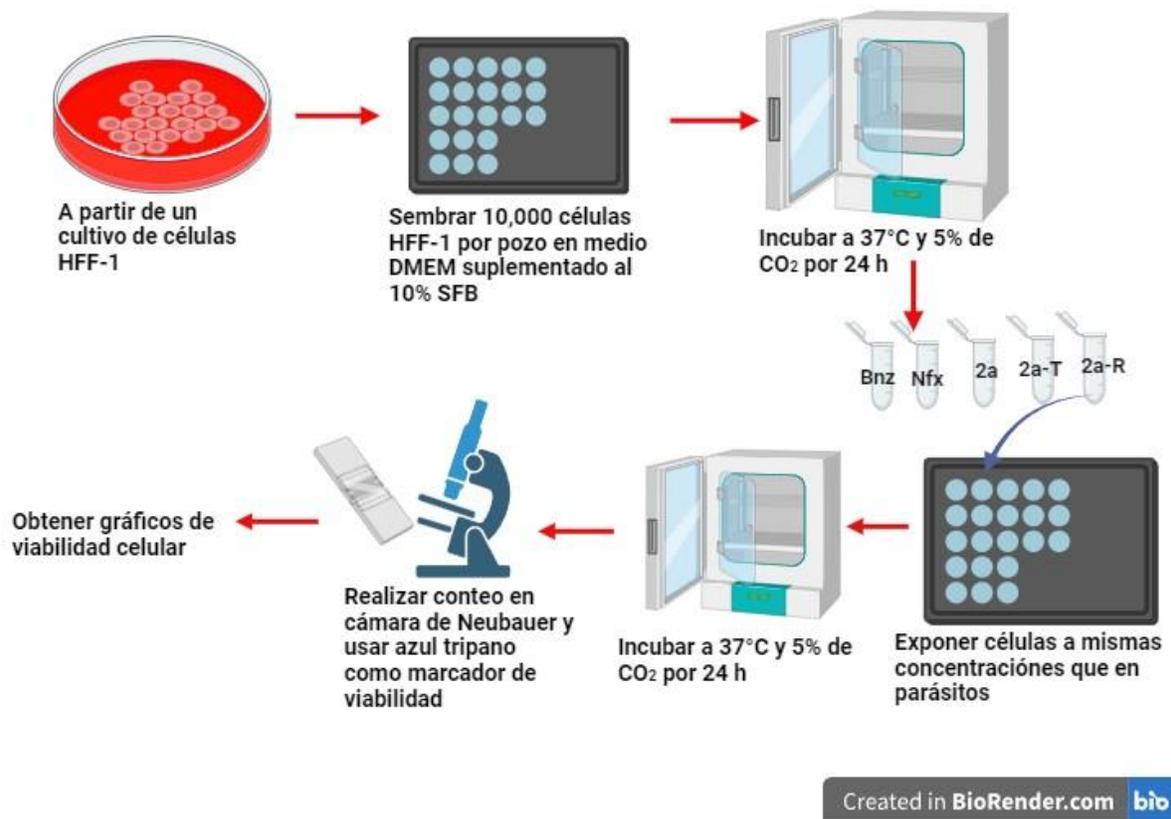


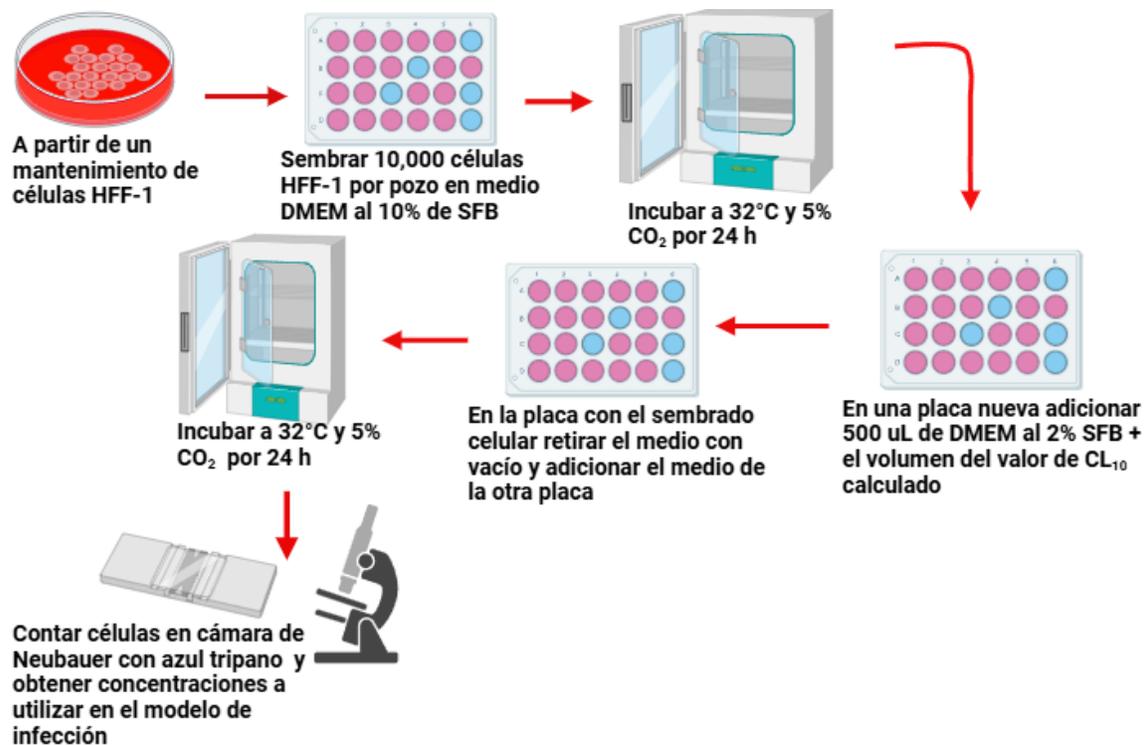
Figura 6.4. **Exposición de derivados de triazina en células HFF-1.** Metodología utilizada para la exposición de fármacos canónicos y derivados de triazinas sobre un cultivo celular de HFF-1. Imagen realizada en BioRender.

6.5 Evaluación de los compuestos en un modelo de infección *in vitro* de células HFF-1 con tripomastigotes de *T. cruzi*

6.5.1 Protocolo para determinar la concentración de los derivados de triazina que no son tóxicas para las células HFF-1 para usarlas en el modelo de infección *in vitro* con *T. cruzi*

El experimento descrito en la sección 6.4 se repitió; pero a concentraciones menores de los derivados de triazina y de los fármacos canónicos con el fin de determinar las concentraciones que se utilizaron en el modelo de infección *in vitro*, para asegurarse que los compuestos solamente inhibieran la proliferación de los parásitos y que no presentaran citotoxicidad en la célula hospedera HFF-1 (Figura 6.5).

En placas de 24 pozos se sembraron 10,000 células en 500 μ L de medio DMEM suplementado al 10% de SFB por cada pozo y se incubaron a 37°C con mezcla de gases 95%aire-5% CO₂ durante 24 h. Transcurrido este tiempo, en otra placa de 24 pozos se prepararon 500 μ L de medio DMEM suplementado al 2% con SFB a los cuales se les adicionó el volumen del compuesto correspondiente a los valores aproximados de las CL₁₀ obtenidas a partir del experimento 6.4. Este medio con los fármacos a diferentes concentraciones se adicionó a las células cultivadas y se continuó el cultivo en las mismas condiciones. Transcurridos 24 h se determinó el número de células y su viabilidad con azul tripano como se describió anteriormente.



Created in BioRender.com

Figura 6.5. **Determinación de la concentración de los derivados de triazina para utilizar en el modelo de infección *in vitro*.** Metodología utilizada para la exposición de células HFF-1 a los derivados de triazinas. Las células se expusieron a los valores obtenidos de las CL₁₀ en el experimento de citotoxicidad en células HFF-1 con la finalidad de determinar las concentraciones máximas a utilizar en el modelo de infección *in vitro*. Imagen realizada en BioRender.

6.5.2 Determinación del efecto de los derivados de triazina y antichagásicos en monoterapia en un modelo de infección *in vitro* con tripomastigotes de *T. cruzi*

En una placa de 24 pozos se sembraron 10,000 células por pozo en 500 μ L de DMEM suplementado al 10% SFB y se incubaron a 37°C bajo atmósfera de aire-5% CO₂ por 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se infectaron con 300,000 tripomastigotes por pozo en 500 μ L de DMEM suplementado al 2% SFB (los tripomastigotes se obtuvieron de una infección parasitaria de mantenimiento que se describe en el anexo 4). Las células-parásitos se incubaron durante 2 h; con el fin de que los tripomastigotes infectaran las células. Después de este tiempo, las infecciones se lavaron 3 veces con DMEM al 2% de SFB y se adicionaron 500 μ L de DMEM al 2% con las diferentes concentraciones de los derivados de triazina (0 – 5 μ M para 2a y 2a-R y de 0 – 0.25 μ M para 2a-T), y del Bnz y del Nfx (0 – 2.5 μ M). Las células infectadas se incubaron en las mismas condiciones descritas y transcurridos 5 días se contaron los tripomastigotes y amastigotes liberados de las células infectadas. Los gráficos de tripomastigotes y amastigotes liberados contra concentración de compuestos fueron construidos y a partir de ellos se calcularon los valores de CI₅₀, que corresponden al porcentaje de inhibición de la liberación de los parásitos (Figura 6.6).

6.5.3. Exposición de la biterapia de los derivados de triazina en combinación con Bnz y Nfx en un modelo de infección *in vitro* en tripomastigotes de *T. cruzi*

El método descrito en la sección anterior se volvió a realizar, pero en este caso se varió la concentración de Bnz y Nfx (0 – 0.04 μ M) en combinación con una concentración de triazina que no fuera citotóxica y que no provocara interferencia con los fármacos canónicos, la cual se determinó con los experimentos descritos en la sección 6.5. Después de 5 días de incubación se contaron los tripomastigotes y amastigotes liberados y se realizaron las gráficas correspondientes para determinar las CI₅₀ como se describió en la sección 6.5.2 (Figura 6.6).

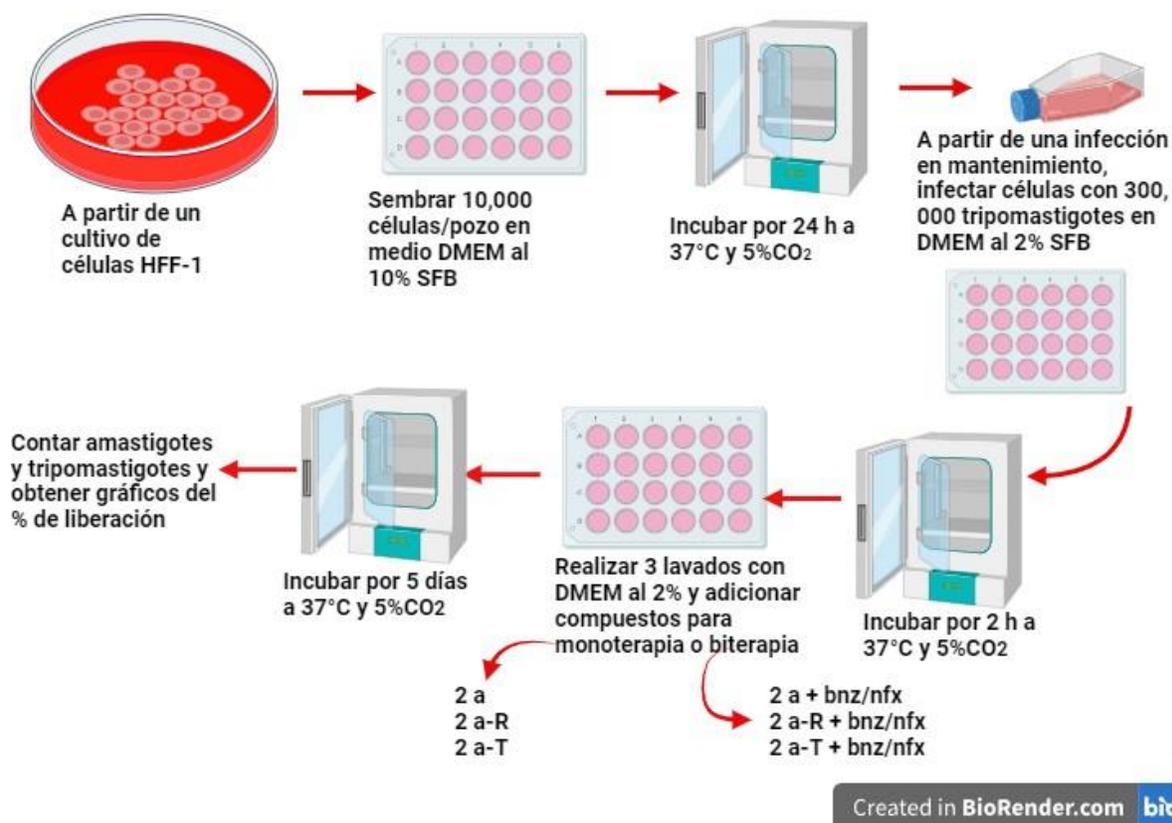


Figura 6.6. **Modelo de infección *in vitro* expuesto a monoterapia y biterapia.** Metodología utilizada para realizar las infecciones con tripomastigotes y posteriormente realizar la exposición a concentraciones de los compuestos derivados de triazina en modelos de monoterapia y biterapia.

6.6 Determinación del efecto del tratamiento con las triazinas en monoterapia en el contenido de metabolitos tioles en epimastigotes

6.6.1 Obtención de curvas patrón de los metabolitos tioles presentes en el sistema antioxidante de *T. cruzi*

Las curvas patrón de estándares correspondientes a los metabolitos tioles que participan en la síntesis de T(SH)₂ se construyeron. En un espectrofotómetro UV-VIS se cuantificó un stock de Cys y GSH a una concentración de 1.5 mM. Para T(SH)₂; se utilizó un stock de T(SH)₂ oxidado que tenía una concentración de 37 mM. A partir de los stock de cada tiol, se prepararon muestras a concentraciones de 0 a 250 µM, los cuales se cuantificaron en el HPLC (Waters-Milford, Estados

Unidos) (apartado 6.6.3, segundo párrafo). En el cromatograma la Cys tiene un tiempo de retención aproximado a 2.5 min, el GSH tiene un tiempo de retención de 5 min y el T(SH)₂ con tiempo de retención de 18 min.

6.6.2. Exposición de los epimastigotes a los derivados de triazina y fármacos canónicos

A partir de un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica, se sembró en 175 mL de medio LIT suplementado una densidad de $2.8 \times 10^6 - 3.2 \times 10^6$ parásitos/mL en frascos de 250 mL. Este cultivo se separó en alícuotas de 25 mL y se agregaron los compuestos a la concentración de CI_{50} determinada con anterioridad; es decir, de 13 μ M para Bnz, 3 μ M para Nfx, 23 μ M para 2a, 12 μ M para 2a-R y 1 μ M para 2a-T. Los parásitos se incubaron a 28°C por 24 h. Al término de la incubación se tomó 1 mL de cada muestra para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (Figura 6.7) y el resto se utilizó para preparar extractos citosólicos (Apartado 6.6.3) para analizarlos por HPLC.

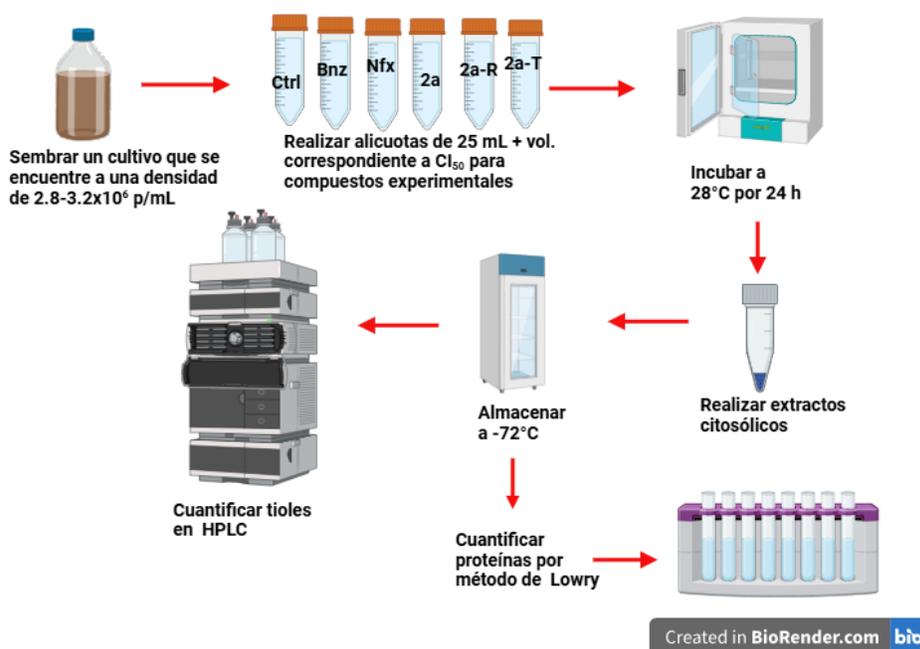


Figura 6.7. Cuantificación de metabolitos tioles de *T. cruzi* expuesto a los derivados de triazina y los compuestos canónicos. Metodología utilizada para la cuantificación de tioles presentes en la vía de síntesis de T(SH)₂. Imagen realizada en BioRender.

6.6.3 Preparación de extractos citosólicos para la cuantificación de tioles por HPLC

Las muestras obtenidas en el inciso 6.6.2 se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C; transcurrido este tiempo se descartó el sobrenadante y el botón de parásitos se lavó dos veces con PBS (anexo 1.3), se descartó nuevamente el sobrenadante y el botón resultante se colocó en N₂ líquido y se almacenó a -72°C hasta su uso en el HPLC (Figura 6.8).

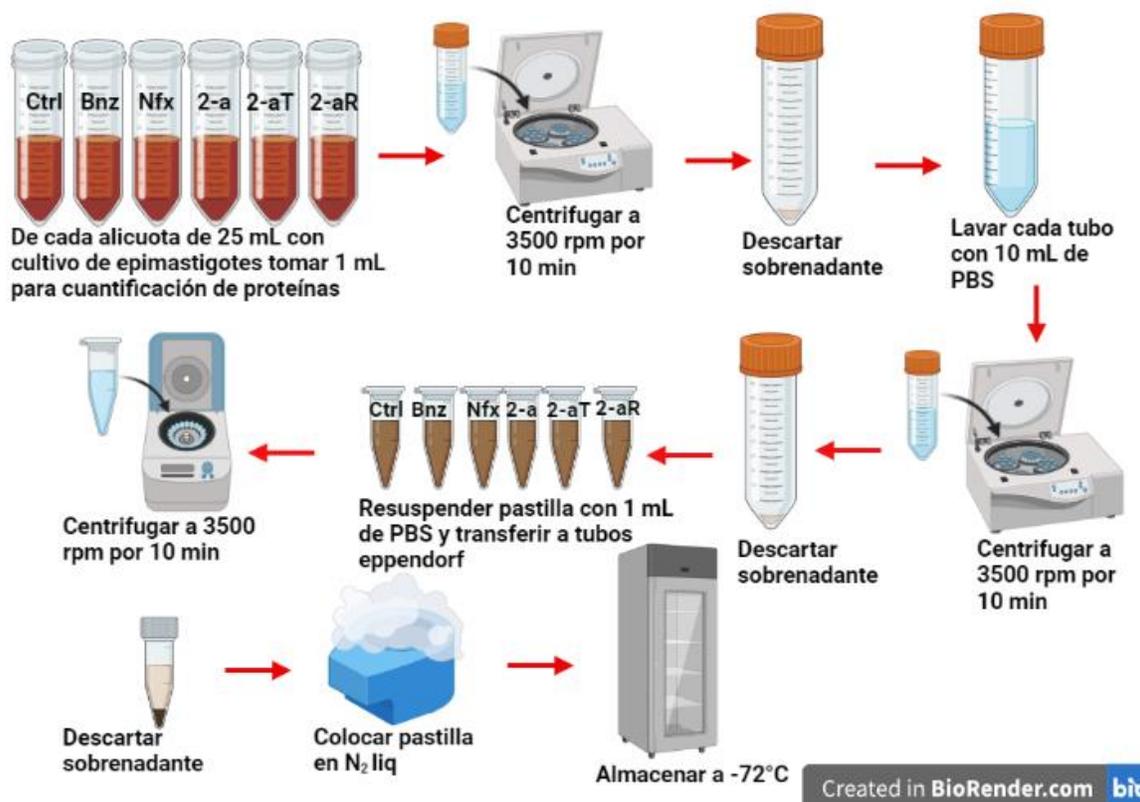


Figura 6.8 **Obtención de extractos citosólicos para su cuantificación en HPLC.** Metodología ocupada para la realización de extractos citosólicos usados para la cuantificación de metabolitos tioles presentes en la vía de síntesis de T(SH)₂. Imagen realizada en BioRender.

6.6.4 Preparación de las muestras para la medición de tioles por HPLC

A los extractos citosólicos almacenados a -70°C se les adicionó $90\ \mu\text{L}$ de una solución que contiene $10\ \text{mM}$ de DTT disuelto en $1\ \text{mL}$ de buffer de lisis (Anexo 6.4). Se sometió a 3 ciclos de $\text{N}_2\ \text{liq}$ / y baño térmico a 37°C . Se centrifugaron durante 10 minutos a $3500\ \text{rpm}$ y se almacenaron en hielo.

El equipo de HPLC; el cual esta acoplado a un detector UV-VIS, donde se midió la absorbancia de las muestras a $412\ \text{nm}$, se preparó para su uso. Las bombas se purgaron y colocaron en las soluciones correspondientes, el electrodo de la bomba A se colocó en un medio de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.15% (Anexo 6.3) y el electrodo de la bomba B en acetonitrilo filtrado. Posterior a la separación de las muestras éstas se pasaron a una bomba C la cual permitió la derivatización de la muestra con una solución de DTNB $0.1\ \text{mM}$ preparado en $250\ \text{mL}$ de buffer de fosfatos $100\ \text{mM}$ (Anexo 6.1).

Para el proceso de separación, se inyectó en el equipo HPLC una muestra de agua y posteriormente los extractos citosólicos tratados antes de inyectarlos al sistema. Para ello se obtuvo el sobrenadante; al cual se le adicionó borohidruro de sodio al 20% y se incubó durante 10 minutos en hielo, después de este tiempo se le adicionó $10\ \mu\text{L}$ de ácido perclórico (PCA) al 30% y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro de $45\ \mu\text{m}$ para HPLC y se inyectaron $50\ \mu\text{L}$ de cada una de las muestras con ayuda de una jeringa Hamilton y se sometieron a la separación, obteniendo los picos correspondientes (Figura 6.9).

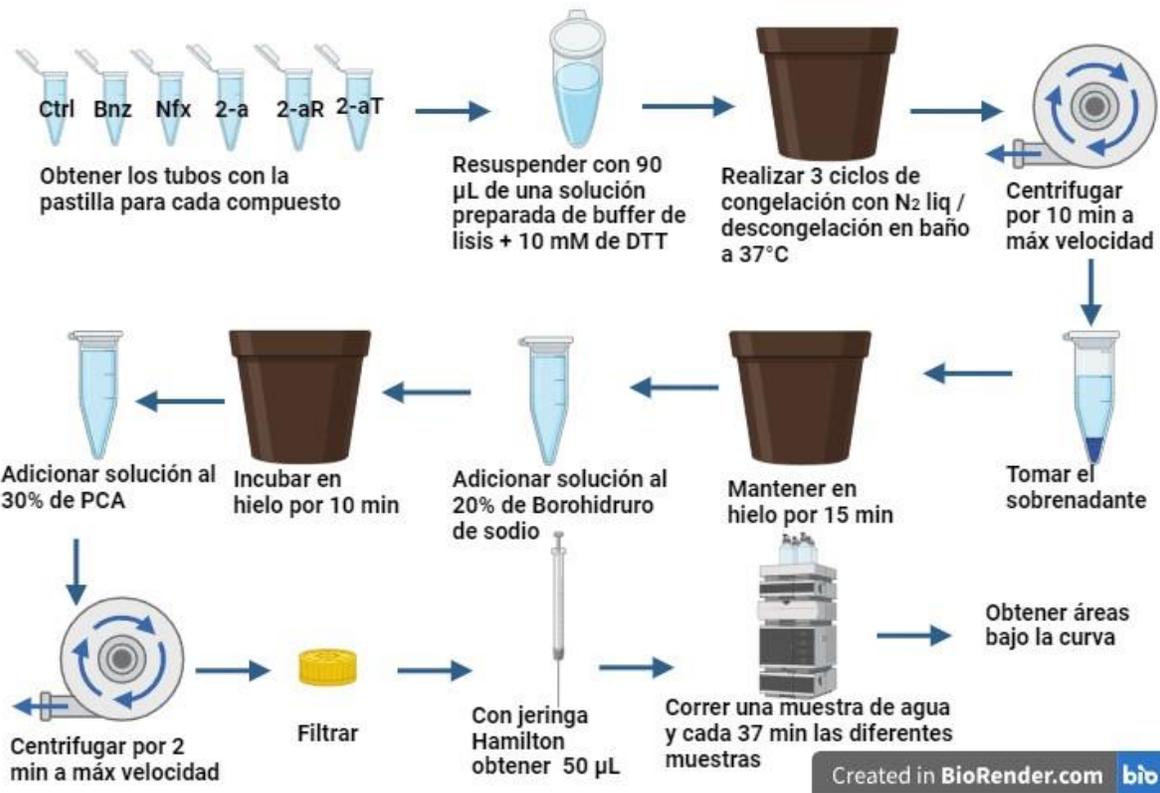


Figura 6.9 **Preparación de muestras para inyectar en un sistema HPLC.** Metodología utilizada para la preparación de las muestras que se inyectaron en el HPLC y la posterior cuantificación de metabolitos tioles presentes en la vía de síntesis de T(SH)₂. Imagen realizada en BioRender.

6.6.5 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

El mililitro de cada una de las muestras de epimastigotes expuestos a los fármacos se colocó en tubos eppendorft de 1.5 mL, se centrifugó a 3500 rpm a una temperatura de 4°C, se eliminó el sobrenadante con vacío y se resuspendió el botón con 1 mL de solución amortiguadora de PBS, se realizó otro centrifugado a 3500 rpm, desechando nuevamente el sobrenadante con vacío y se adicionó 100 µL de solución A de Lowry (Anexo 3).

Posteriormente, se preparó una curva patrón a concentraciones de 0 a 80 µg/µL de BSA (Albúmina de suero bovino).

Al momento se preparó una dilución 50:1 de la solución A (composición en Anexo 5-a) y de la solución B (composición en anexo 5-b) de Lowry en el volumen a ocupar. Posteriormente 1 mL de la solución preparada (Solución C; Anexo 5-c) se adicionó a cada tubo de la curva patrón y de las muestras; en intervalos de 10 s y se mezclaron en un vortex, se dejaron reposar por un periodo de 10 min y se les adicionó 100 μ L de solución de Folin 1:1. Al minuto 30 se realizó la lectura de absorbancias a 660 nm en el espectrofotómetro Cary UV-vis (Agilent; Santa Clara, CA USA) en el programa concentración. La gráfica de absorbancia contra la concentración de albúmina se construyó y se ajustó a una línea recta. Por medio de la interpolación de las absorbancias de las muestras problema en la curva patrón, se obtuvo la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras (Figura 6.10) (Greenfield, 2018).

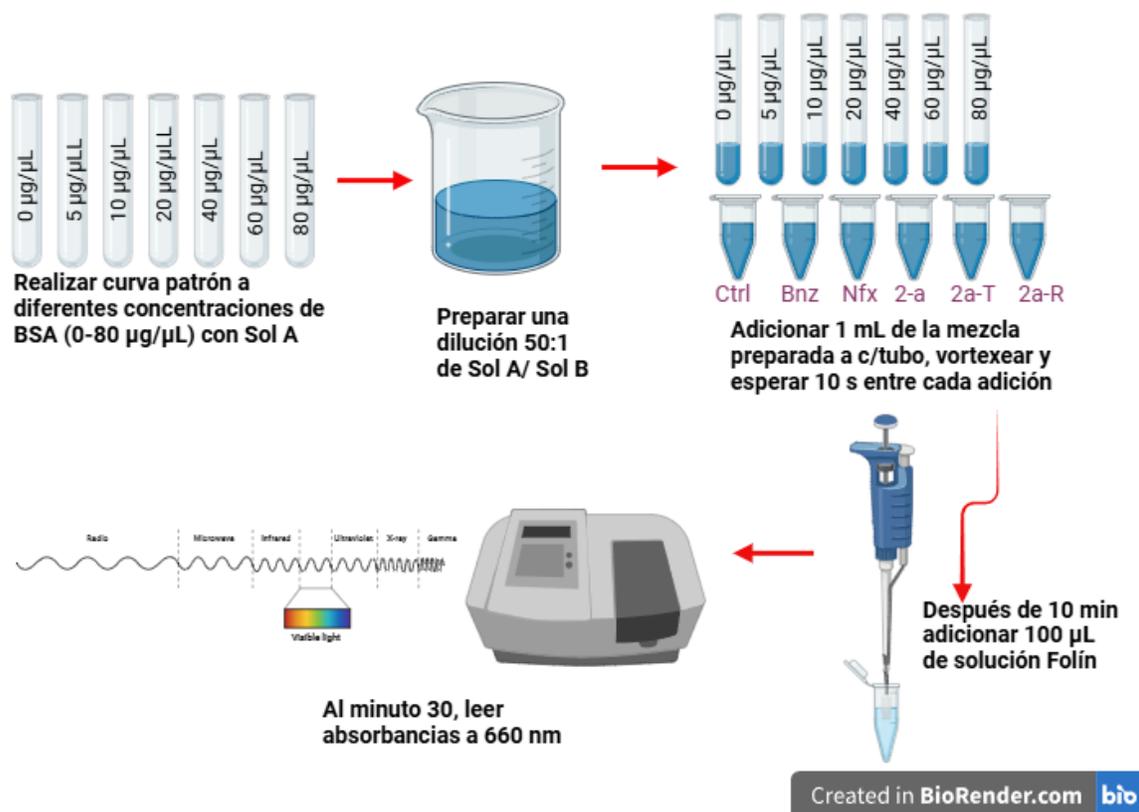


Figura 6.10. **Cuantificación de las proteínas usando el método de Lowry.** Metodología utilizada para la cuantificación de proteínas con el método de Lowry. Imagen realizada en BioRender.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos que se describirán en la siguiente sección fueron analizados con una estadística de t-Student, la cual se realizó con ayuda del programa Excel, en la cual; cada repetición de los valores obtenidos con ayuda del conteo celular dependiente de la concentración de cada compuesto se colocaron en una plantilla de Excel; posteriormente, una vez concluidos los experimentos, en una celda aparte se utilizó el “=Prueba T.N”, que permite obtener la probabilidad asociada a una prueba t-Student, para esta prueba es necesaria la comparación de 2 matrices; siendo la matriz 1 constante y en la cual se ocupó el control; es decir, los parásitos o células que no fueron expuestos a ningún fármaco y la matriz 2 las concentraciones adicionadas de los fármacos. Se analizó a 2 colas y de tipo dos muestras de igual varianza. Se considero significativo cuando * $p \leq 0.05$ y muy significativo cuando ** $p \leq 0.001$.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización del crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi*

La caracterización del crecimiento de la cepa Querétaro de *T. cruzi* se realizó a través de curvas de crecimiento que duraron 9 días con conteo de parásitos cada 24 h. Un gráfico del promedio de la densidad de parásitos/mL se obtuvo en función del tiempo en días.

Como se observa en la Figura 7.1, una fase exponencial con duración de 4 días se determinó seguida de una fase estacionaria temprana la cual incluyó el día 5 – 6, y finalmente, la fase de muerte a partir del día 7, por lo que en este día se presentó el máximo crecimiento de los epimastigotes ($27 \pm 7.9 \times 10^6$ parásitos/mL) (Panel A). A su vez se realizó un gráfico logarítmico de crecimiento, confirmando que la fase logarítmica tiene una duración de 4 días (Panel B). Con este último gráfico se calcularon los parámetros de crecimiento, velocidad de crecimiento ($k= 0.5 \pm 0.04$ días⁻¹), el tiempo generacional ($G=41.4 \pm 3.9$ h) y el número de generaciones ($N= 4.7 \pm 3.9$ generaciones).

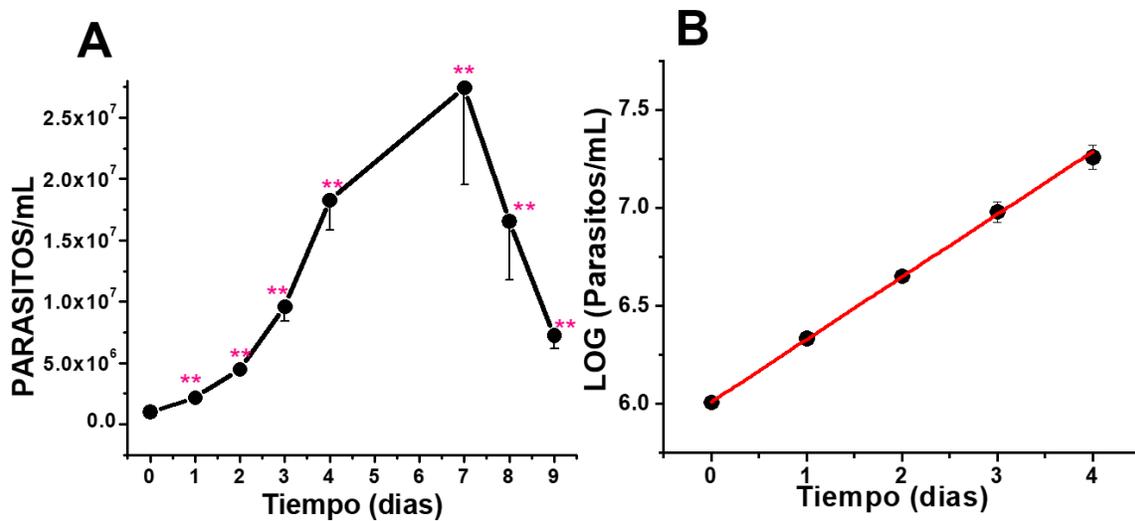


Figura 7.1. **Caracterización del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi***. A) Curva de crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi* ($n=4$). Se observa del día 1 al 4 la fase exponencial, del día 5 al 6 una fase estacionaria y posteriormente la fase de muerte. Gráfico realizado en el programa OriginPro8. Se realizó como prueba estadística una t-Student, * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$. B) Gráfico logarítmico de la densidad de parásitos/ mL obtenido a partir de la curva de crecimiento, al que se le realizó un ajuste de manera lineal con el programa OriginPro8.

7.2 Cuantificación de los compuestos derivados de triazinas

Los espectros de absorción se determinaron para cuantificar los compuestos derivados de triazina, Bnz y Nfx; los dos últimos se utilizaron como fármacos de referencia. La cuantificación de los compuestos se realizó con el fin de asegurar que se adicionó la misma concentración del compuesto en la exposición a parásitos y células.

La solución stock de los fármacos canónicos se cuantificó a una concentración de 2.6 mM para Bnz y de 0.6 mM para Nfx con un pico máximo a una longitud de onda de 325 nm (Figura 7.2. Panel A) y de 405 nm, respectivamente (Figura 7.2. Panel B).

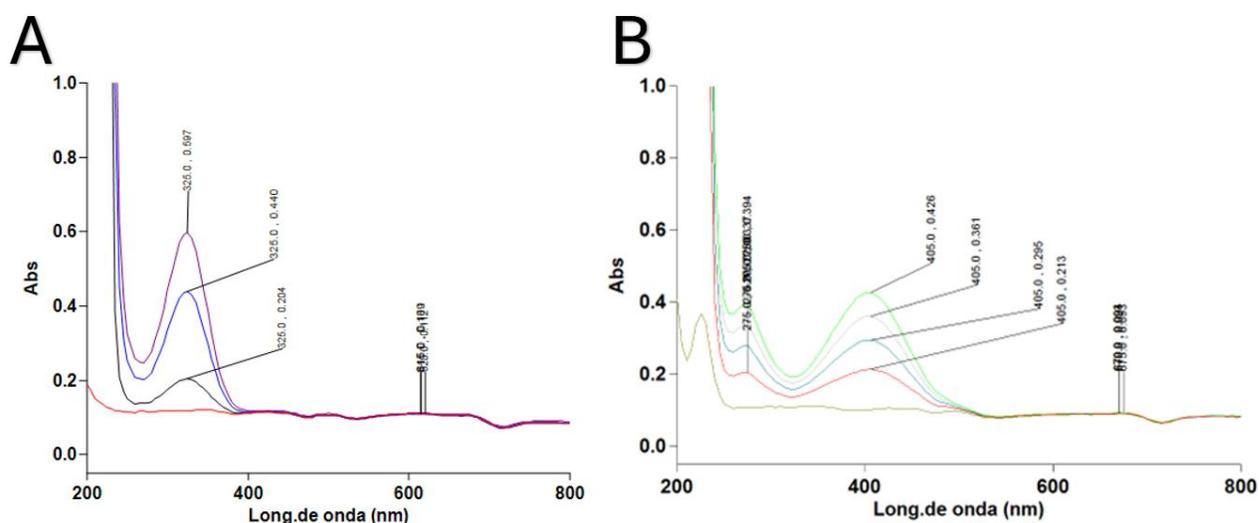


Figura 7.2 **Espectros de absorción del Bnz y del Nfx.** A) Gráfico que muestra las absorbancias correspondientes al fármaco canónico Bnz al que se le adicionó una cantidad de volumen de concentraciones teóricas azul 1 μM , morado 2 μM y rojo 3 μM ; el pico máximo de absorbancia fue de 0.597 en una longitud de onda de 325 nm $\epsilon = 12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obteniéndose una concentración real de 2.7 mM. B) Gráfico que muestra la absorbancia correspondiente al fármaco de Nfx se añadieron diferentes concentraciones, para el rojo 3 μM , azul 4.5 μM , gris 6 μM y verde 7.5 μM el pico máximo de absorbancia fue de 0.426 a una longitud de onda de 405 nm, y un $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obteniéndose una concentración teórica final de 0.6 mM.

Para el caso de los derivados de triazina se prepararon soluciones stock a una concentración teórica de 10 mM, se realizaron los espectros de absorción en el rango de longitud de onda (190-1100 nm). Se graficó la absorbancia en función de la concentración, se realizó el ajuste de los datos a una línea recta donde la pendiente es el coeficiente de extinción molar. Mediante la ley de Lambert-Beer se relacionó la absorbancia emitida por una solución con su concentración. Se obtuvo un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $22.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para 2a a una longitud de onda de 280 nm (Figura 7.3 Panel A), un $\epsilon = 3.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para 2a-R a una longitud de onda de 355 nm (Figura 7.3 Panel B) y para 2a-T un $\epsilon = 4.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a una longitud de onda de 290 nm (Figura 7.3 Panel C).

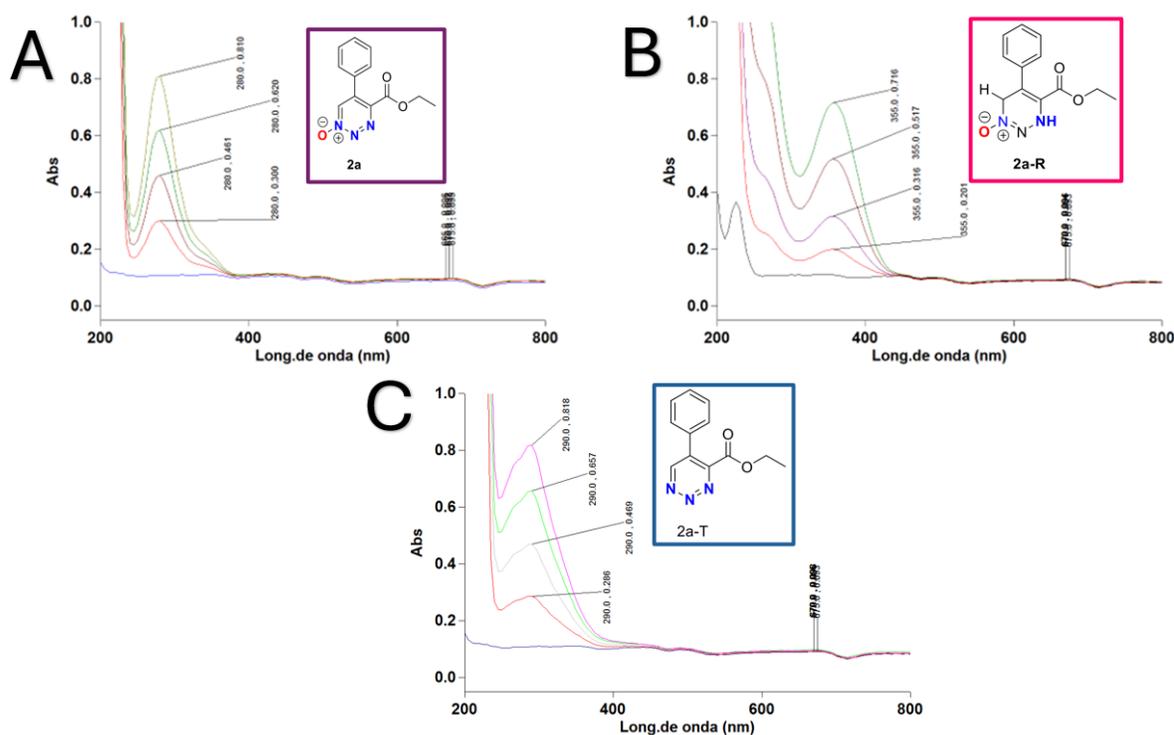


Figura 7.3. **Cuantificación de compuestos derivados de triazina.** A) Gráfico que muestra la cuantificación de la triazina 2a, el pico máximo se observó a una absorbancia de 0.810 a una longitud de onda de 280 nm a diferentes concentraciones; morado 10 μM , rojo 20 μM , azul 30 μM y café 40 μM . B) Representa la cuantificación de la triazina 2 a-R, el pico máximo se observa a una absorbancia de 0.716 a una longitud de onda de 355 nm en diferentes volúmenes rojo 25 μM , morado 50 μM , café 75 μM y verde 100 μM . C) Gráfico que corresponde a la cuantificación de la triazina 2a-T con un pico máximo a una absorbancia de 0.818 a una longitud de onda de 355.0 nm a diferentes volúmenes, rojo 25 μM , gris 50 μM , verde 75 μM y rosa 100 μM .

7.3 Efecto de los derivados de triazina sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* después de 24 h de exposición

El efecto de las triazinas se evaluó sobre el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi* después de exponerlos durante 24 h. Los fármacos Bnz y Nfx se usaron como control, los cuales disminuyeron el crecimiento relativo en 50% a una concentración de $13 \pm 4.1 \mu\text{M}$ (Figura 7.4 Panel A) y de $3 \pm 1.5 \mu\text{M}$ (Figura 7.4 Panel B); respectivamente. Además, el valor de Cl_{90} se calculó para conocer la concentración en la que se ejerce un efecto máximo, siendo este valor cercano a la concentración en que empieza a ejercer un efecto sobre su viabilidad. Un valor de Cl_{90} mayor a $27 \mu\text{M}$ se calculó para Bnz (Figura 7.4 Panel A) y de $10 \pm 3 \mu\text{M}$ para Nfx (Figura 7.4 Panel B).

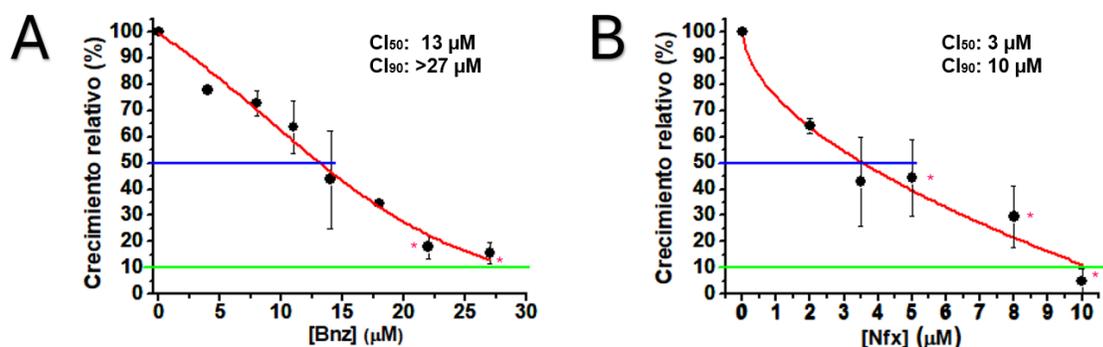


Figura 7.4. Efecto de los compuestos canónicos sobre el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi*. A). Efecto del Bnz sobre el crecimiento relativo de epimastigotes; los datos ($n=4$) se ajustaron a un modelo de dosis respuesta utilizando el programa OriginPro8. B). Efecto del Nfx sobre el crecimiento relativo de epimastigotes; los datos ($n=3$) se ajustaron a un modelo de tipo logistic con el programa OriginPro8. Se realizó como prueba estadística una t-Student de dos colas, * $p \leq 0.05$.

Posteriormente; el efecto en el crecimiento de epimastigotes de los tres derivados de triazina se determinó. El mejor efecto se observó con el tratamiento con 2a-T con un valor de Cl_{50} de $1 \pm 0.9 \mu\text{M}$ y de Cl_{90} mayor a 5 (Figura 7.5 panel C), seguido del compuesto 2a-R con una Cl_{50} de $12 \pm 3.2 \mu\text{M}$ y una Cl_{90} mayor de $18 \pm 3 \mu\text{M}$ (Figura 7.5 Panel B) y finalmente el compuesto 2a con un valor de Cl_{50} de $23 \pm 5.6 \mu\text{M}$ y una Cl_{90} mayor a $50 \mu\text{M}$. La tabla 1 resume los valores obtenidos.

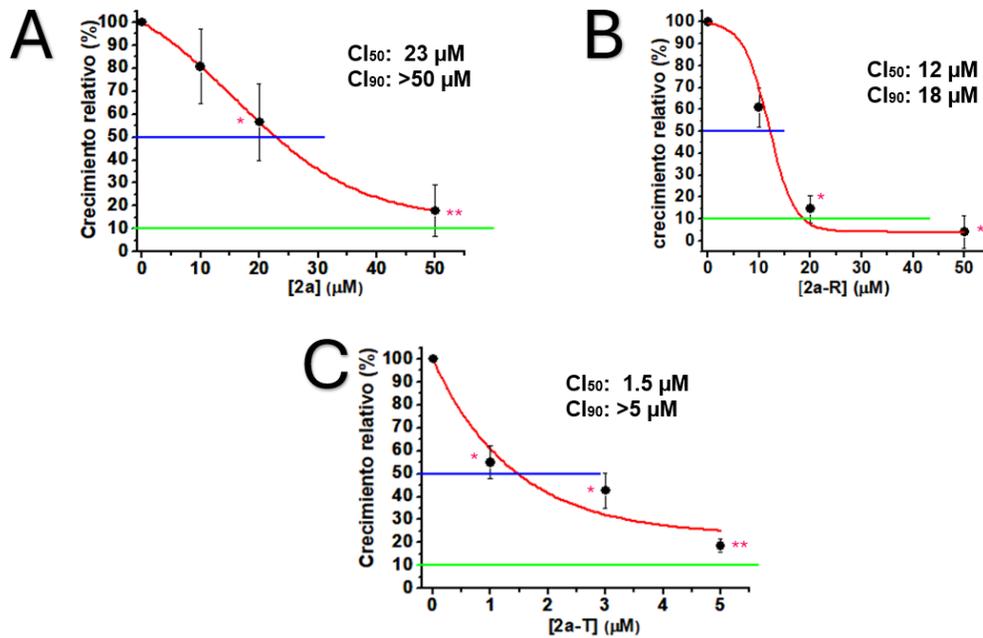


Figura 7.5. Efecto de los derivados de triazina sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. A). Efecto de la triazina N-óxido (2a) (n=4), con un ajuste de tipo dosis-respuesta. B). Efecto de la triazina 2a-R (n=5) con un ajuste de tipo Boltzmann. C). Triazina 2a-T con un ajuste de tipo dosis-respuesta. Todos los ajustes se realizaron en el programa OriginPro8. Se realizó en los 3 gráficos una estadística de t-Student, de dos colas * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$.

Tabla 7.1. Efecto de los derivados de triazina sobre el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi*.

Valores de CI_{50} y CI_{90} obtenidos en los gráficos correspondientes al crecimiento relativo en epimastigotes de *T. cruzi* en función de la concentración de los compuestos derivados de triazinas (2a, 2a-R y 2a-T) utilizando como control a los fármacos canónicos (Bnz y Nfx).

Compuesto	CI_{50} (μM)	CI_{90} (μM)
Bnz	13 ± 4.1	>27
Nfx	3 ± 1.5	10 ± 0.3
2a	23 ± 5.6	>50
2a-R	12 ± 3.2	18 ± 3
2a-T	1 ± 0.9	>5

7.4 Efecto de los derivados de triazina en células HFF-1 después de 24 h de exposición

El efecto de las triazinas, el Bnz y el Nfx se determinó sobre la viabilidad de células HFF-1; después de exponerlas por 24 h. El Bnz y el Nfx disminuyen la viabilidad celular en 50 % a una concentración $>27 \mu\text{M}$ y $>8 \mu\text{M}$, respectivamente. Se calcularon las CL_{10} con el fin de escoger concentraciones para el modelo de infección *in vitro*, obteniendo un valor de CL_{10} para Bnz de $3.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$ y $2.2 \pm 1 \mu\text{M}$ para Nfx (Figura 7.6 Paneles A y B).

Los derivados de triazina también son citotóxicos para las HFF-1; se obtuvo una CL_{50} de $43 \pm 12 \mu\text{M}$ y CL_{10} de $12 \pm 5.5 \mu\text{M}$ para 2a (Figura 7.7 Panel A), una CL_{50} de 11 ± 5 y CL_{10} de $4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ para 2a-R (Figura 7.7 Panel B) y una CL_{50} de 0.8 ± 0.4 y una CL_{10} de $0.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$ para 2a-T (Figura 7.7 Panel C). Se observa la comparación de lo ocurrido en el crecimiento de epimastigotes y en la viabilidad celular en la Tabla 7.2.

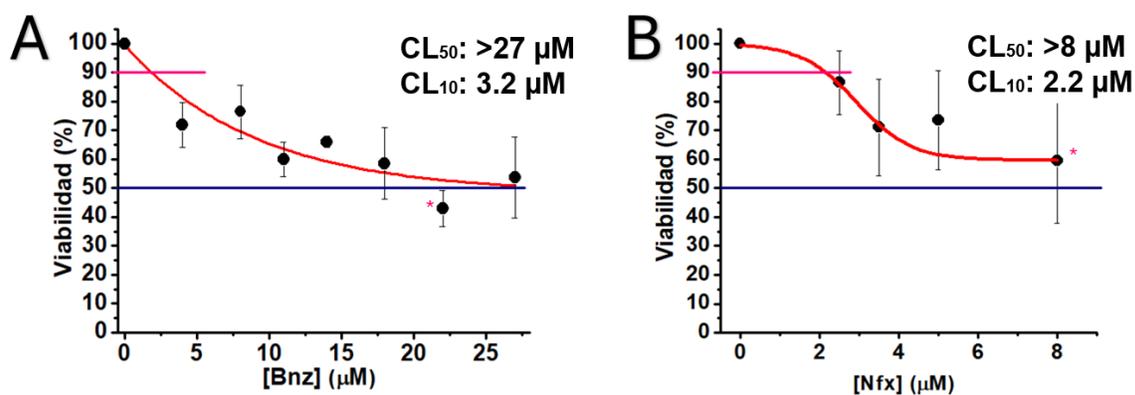


Figura 7.6. **Efecto de Bnz y Nfx sobre la viabilidad en células HFF-1 después de 24 h de exposición.** Gráficos que muestran el efecto de los compuestos canónicos sobre la viabilidad en células HFF-1 A) Bnz (n=6), B) Nfx (n=8). Los gráficos se construyeron en el programa OriginPro8 y los datos se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta. Se realizó como prueba estadística una t-Student, * $p \leq 0.05$.

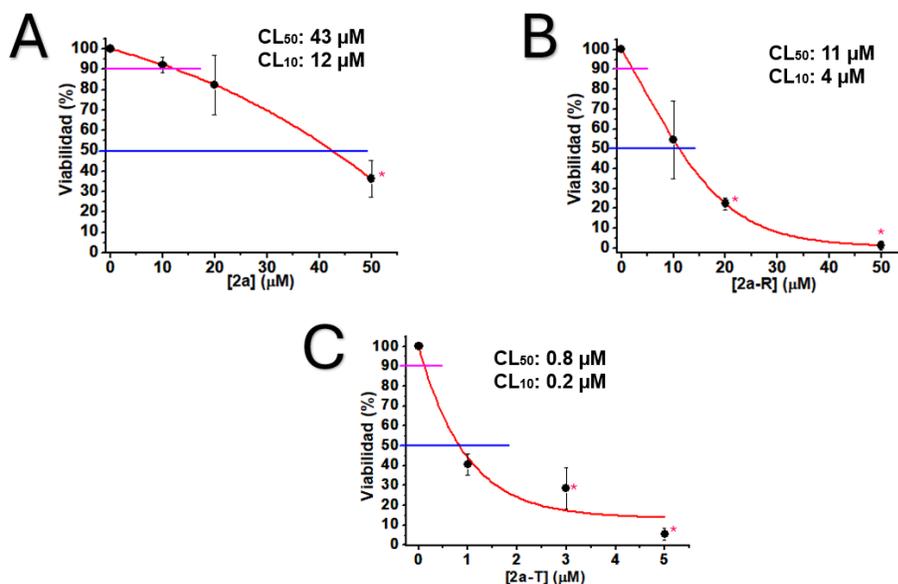


Figura 7.7 Efecto de los derivados de triazina sobre la viabilidad en células HFF-1 después de 24 h de exposición. A) Triazina 2a sobre la viabilidad celular (n=5). B) Triazina 2a-R (n= 4). C) Triazina 2a-T (n=5). Los gráficos se construyeron en el programa OriginPro8 y los datos se ajustaron a un modelo de tipo dosis-respuesta. Para todos los gráficos se realizó una estadística de t-Student a dos colas con *p ≤ 0.05.

Tabla 7.2. Tabla comparativa del efecto de los derivados de triazina sobre la viabilidad en células HFF-1 después de 24 h de exposición. Se muestran los valores obtenidos de Cl₅₀ en el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi* y su efecto citotóxico en la viabilidad de células HFF-1 representado por valores de CL₅₀ y CL₁₀.

Compuesto	Cl ₅₀ en crecimiento de epimastigotes (μM)	CL ₅₀ en viabilidad de HFF-1 (μM)	CL ₁₀ en viabilidad de HFF-1 (μM)
Bnz	13 ± 4.1	>27	3.2 ± 0.9
Nfx	3 ± 1.5	>8	2.2 ± 1
2a	23 ± 5.6	43 ± 12	12 ± 5.5
2a-R	12 ± 3.2	11 ± 5	4 ± 0.5
2a-T	1 ± 0.9	0.8 ± 0.4	0.2 ± 0.05

7.5 Determinación de la concentración de los derivados de triazina en células HFF-1 a utilizar en monoterapia en un modelo de infección *in vitro* por *T. cruzi*

Un modelo de infección *in vitro* con tripomastigotes de *T. cruzi*, se utilizó para determinar si las triazinas pueden disminuir la CL_{50} de los compuestos canónicos. Para ello se determinaron las concentraciones cercanas al valor de CL_{10} en células HFF-1, con el fin de asegurar que el efecto que se observara fuera sobre la liberación de las formas infectivas y no por un efecto citotóxico en las células.

El experimento de la sección 7.4 se repitió manteniendo las condiciones que se utilizaron en el modelo de infección *in vitro*, las concentraciones máximas que se utilizaron para este análisis fueron 2.5 μM para Bnz y Nfx (Figura 7.8 Panel A y B), para los derivados de triazina 2a y 2a-R las concentraciones máximas fueron de 5 μM y para la triazina 2a-T la máxima fue de 0.5 μM (Figura 7.9 Paneles A, B y C). Hasta estas concentraciones analizadas se observó que no hay un efecto significativo sobre la viabilidad celular con ninguno de los compuestos.

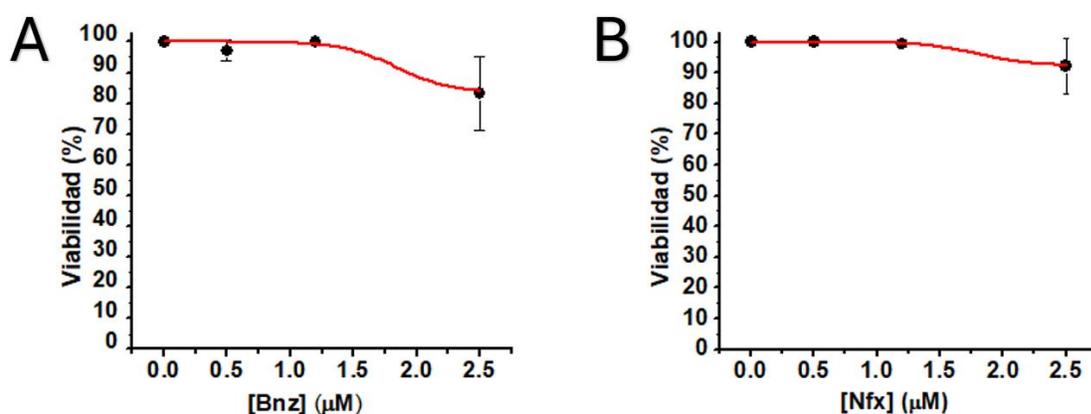


Figura 7.8 **Determinación de la concentración de CL_{10} para Bnz y Nfx en células HFF-1 para utilizarse en el modelo de infección *in vitro* de monoterapia.** Gráficos que muestran que no hay un efecto significativo de la viabilidad celular. A) Bnz hasta una concentración de 2.5 μM ($n=4$) y B) Nfx hasta una concentración de 2.5 μM ($n=5$). Ambos gráficos se realizaron en OriginPro8 con ajuste de tipo dosis-respuesta. Y a ambos se les realizó como estadística una t-Student de dos colas, no se encontró diferencia significativa.

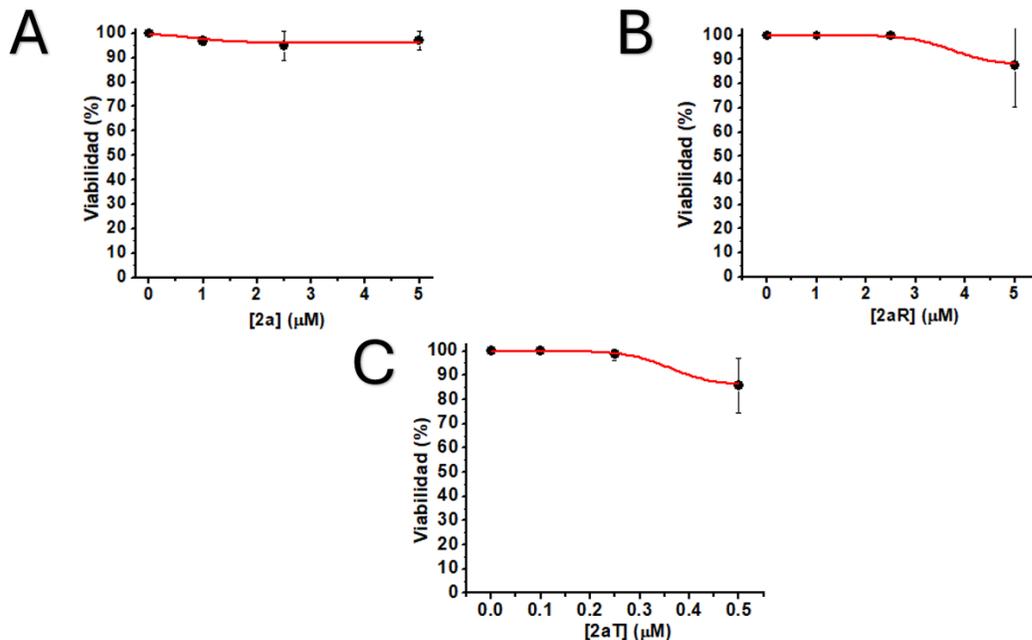


Figura 7.9. **Determinación de la concentración a utilizar de los derivados de triazina sobre células HFF-1 para el modelo de infección *in vitro* de monoterapia.** Gráficos que muestran que no hay efecto significativo de los derivados de triazina sobre la viabilidad de HFF-1 hasta una concentración de 5 μM . A) Triazina 2a (n=5). B) Triazina 2a-R (n=4). C) Triazina 2a-T hasta 0.5 μM (n=4). Todos los gráficos se realizaron en OriginPro8, con un ajuste de tipo dosis-respuesta. Se realizó una prueba estadística de t-Student a dos colas y no se encontró diferencia significativa para ninguna de las triazinas.

7.6 Efecto de los derivados de triazina en un modelo de infección *in vitro* de monoterapia

El efecto en monoterapia de los fármacos canónicos y las triazinas se evaluó en un modelo de infección *in vitro*; en donde la variable a determinar es la liberación de formas infectivas 5 días posteriores al inicio de la infección. A los 5 días los parásitos liberados en ausencia de los fármacos son tripomastigotes $5 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$ y de amastigotes de $1.5 \times 10^4 \pm 8.7 \times 10^3$ totales. El tratamiento con el Bnz y Nfx disminuyeron la liberación de tripomastigotes con valores de CI_{50} de 0.07 μM (Figura 7.10 Panel A y B). En el caso de los derivados de triazina se determinaron valores de CI_{50} de liberación de tripomastigotes de 0.3 μM para 2a, $0.9 \pm 0.02 \mu\text{M}$ para 2aR y de $0.07 \pm 0.01 \mu\text{M}$ para 2aT (Figura 7.11, panel A, B y C, respectivamente). La Tabla 7.3 resume los resultados de CI_{50} .

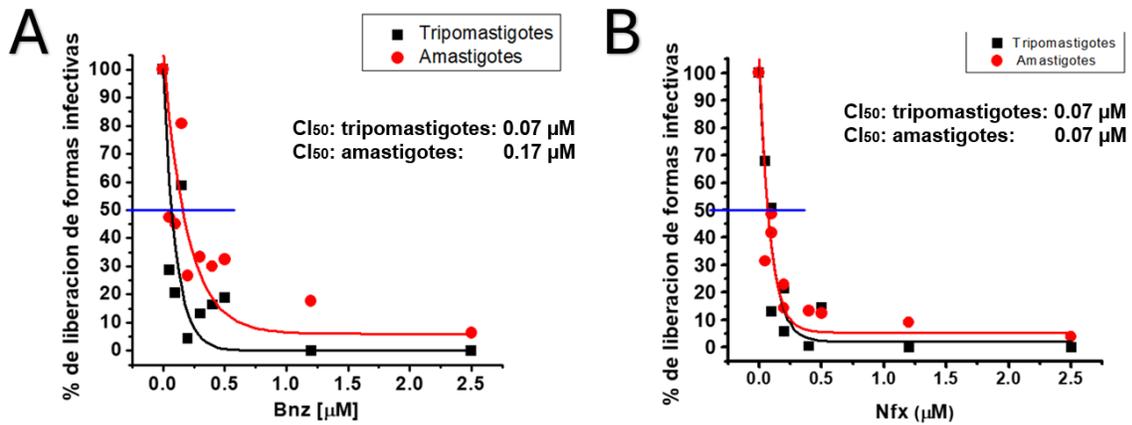


Figura 7.10. Efecto que tienen los fármacos utilizados en la clínica sobre el modelo de infección en monoterapia. A) Bnz (n=4), B) Nfx (n=4). Ambos gráficos se realizaron con el programa OriginPro 8 y se les realizó un ajuste a un modelo exp 1.

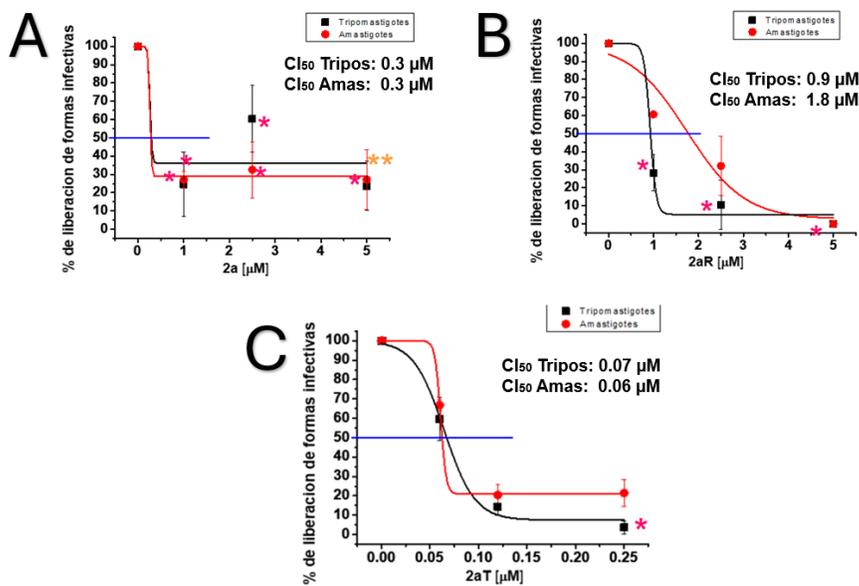


Figura 7.11 Efecto en el modelo de infección de monoterapia de los derivados de triazina. A) Gráfico correspondiente a 2a (n=3). B) Comportamiento del compuesto 2a-R (n=3). C) Efecto del compuesto 2a-T (n=3). Los datos se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta con el programa OriginPro 8 y se les realizó como prueba estadística una t-Student de dos colas con *p≤ 0.05 y ** p≤ 0.001.

Tabla 7.3. **Concentraciones inhibitorias de los compuestos en monoterapia en el modelo de infección *in vitro*.** Valores obtenidos de CI_{50} en la liberación de los tripomastigotes y amastigotes para los fármacos canónicos y las triazinas en monoterapia.

Compuesto	CI_{50} en tripomastigotes (μM)	CI_{50} en amastigotes (μM)
Bnz	0.07	0.17
Nfx	0.07	0.07
2a	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
2a-R	0.9 ± 0.015	1.8 ± 0.7
2a-T	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02

7.7 Efecto de los derivados de triazina en biterapia con Bnz y Nfx en el modelo de infección *in vitro*

En un modelo de infección *in vitro* con *T. cruzi* se evaluó si los derivados de triazina disminuyen las concentraciones inhibitorias de Bnz y Nfx; a este modelo lo definimos como biterapia. Se utilizaron concentraciones de 0 - 0.04 μM para Bnz y Nfx y para los derivados de triazina se utilizó una sola concentración, de 0.15 μM para 2a, 0.6 μM para 2a-R y 0.035 μM para 2a-T; éstas últimas son concentraciones menores a las CI_{50} de triazinas en monoterapia.

La triazina 2a disminuyó la CI_{50} del Bnz 30 nM para tripomastigotes. En el caso de la triazina 2a-R la CI_{50} del Bnz disminuyó a 2 nM para tripomastigotes y a 8 nM para amastigotes disminuyendo la CI_{50} Bnz >50 veces. El efecto que se obtuvo al combinar Bnz + 2a-T fue una disminución del valor de CI_{50} a 15 nM para tripomastigotes y de 35 nM para amastigotes.

Para la combinación del Nfx con triazinas se observó una disminución entre de 5 – 6 veces sus valores en los experimentos en monoterapia. Se calculó una CI_{50} para Nfx + 2a de 12 nM en tripomastigotes y 30 nM en amastigotes; Nfx + 2a-R obtuvo valores de CI_{50} en tripomastigotes de 10 nM y 24 nM en amastigotes; para la combinación de Nfx + 2a-T la CI_{50} del Nfx fue de 60 nM en tripomastigotes. La tabla 7.4 resume los valores.

Tabla 7.4. Efecto de los derivados de triazina en las CI_{50} del Bnz y Nfx en biterapia contra la infección por *T. cruzi*. Concentraciones inhibitorias en la liberación de tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* del Bnz y Nfx en biterapia con triazinas (n=2)

Compuesto de triazina	Concentración (nM)	Bnz (40 nM)		Nfx (40 nM)	
		CI_{50} liberación (nM)		CI_{50} liberación (nM)	
		Tripomastigotes	Amastigotes	Tripomastigotes	Amastigotes
Sin compuesto	0	70	170	70	70
2a	150	30	NA	12	30
2a-R	600	2	8	10	24
2a-T	35	15	35	50	NA

7.8 Efecto de los derivados de triazina sobre la concentración de metabolitos tioles de *T. cruzi*

El efecto de los derivados de triazina sobre los metabolitos tioles de epimastigotes de *T. cruzi* se determinó con la finalidad de establecer si estos compuestos afectaban el sistema antioxidante del parásito.

En primer lugar, se aprendió la técnica para la determinación de los tioles por HPLC. Las curvas patrón de Cys, GSH y $T(SH)_2$ se construyeron graficando el área bajo la curva de los picos del cromatograma obtenidos por HPLC en función de la concentración en picomoles del tiol; se realizó un ajuste lineal para obtener la ecuación de la recta. De los ajustes de los datos experimentales se obtuvo una pendiente para Cys de 312.2 y para GSH de 130.8 (Figura 7.12); el valor de GSH fue semejante a lo obtenido anteriormente en el equipo de trabajo, mientras que Cys varió (Cys= 192 y GSH= 186). Para el caso del $T(SH)_2$ se construyó esta curva por primera vez, ya que antes se realizaba la determinación del $T(SH)_2$ con la curva patrón de Cys por lo que los resultados de esta tesis están calculados con la pendiente directa de $T(SH)_2$ la cual dio un valor de 1404.2 (Figura 7.12). Con dicha ecuación de la recta y las pendientes se determinaron las concentraciones de los metabolitos tioles presentes en extractos de epimastigotes expuestos por 24 h a los fármacos.

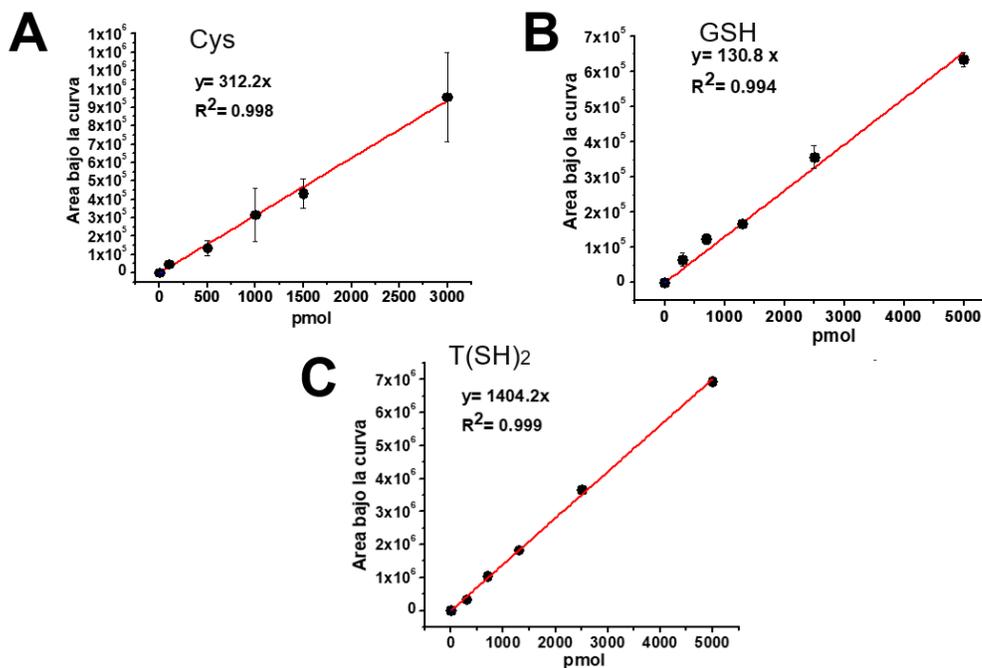


Figura 7.12. Curvas patrón para la cuantificación de los metabolitos tioles presentes en la vía de síntesis de T(SH)₂. A) Gráfico de Cys con una regresión lineal, obteniendo la ecuación de la recta con una pendiente de 312.2 y un valor de R² de 0.998 (n=3). B) Curva patrón del GSH al cual se le realizó una regresión lineal con pendiente de 130.8 y R² de 0.994 (n=3). C) Gráfico correspondiente al metabolito de T(SH)₂ con una pendiente de 1404.2 obtenida a partir de una regresión lineal y con un valor de R² de 0.999 (n=1).

Una vez obtenidas las curvas patrón se procedió a evaluar el efecto de los derivados de triazina sobre los metabolitos tioles en epimastigotes de *T. cruzi* después de 24 h de exposición. Las alícuotas de parásitos se expusieron a los valores de CI₅₀ determinados en el apartado (7.2) de los compuestos de interés y como control se utilizaron parásitos que no fueron expuestos a ningún compuesto. El contenido de tioles se determinó por medio HPLC y se calcularon las concentraciones mediante las curvas patrón descritas anteriormente y se normalizaron por el contenido de proteína de cada muestra.

Los epimastigotes expuestos a los fármacos canónicos no ejercieron un cambio significativo en los tioles totales con respecto a los epimastigotes control. En contraste, los parásitos expuestos a los derivados de triazina mostraron cambios significativos en dichos metabolitos (Figura 7.13 Panel A). Una vez normalizados;

utilizando como 100% los contenidos de tioles en parásitos no expuestos (Figura 7.13 panel B), los derivados de triazina 2a y 2a-R tienden a disminuir hasta un 20% la concentración de Cys, lo cual no se observó en 2a-T; sin embargo, los 3 compuestos incrementaron aproximadamente 2.5 veces la concentración de GSH, así mismo; 2a y 2a-R aumentaron la concentración de T(SH)₂ en un 25 y 50%; respectivamente, pero para 2a-T no tuvo un incremento significativo.

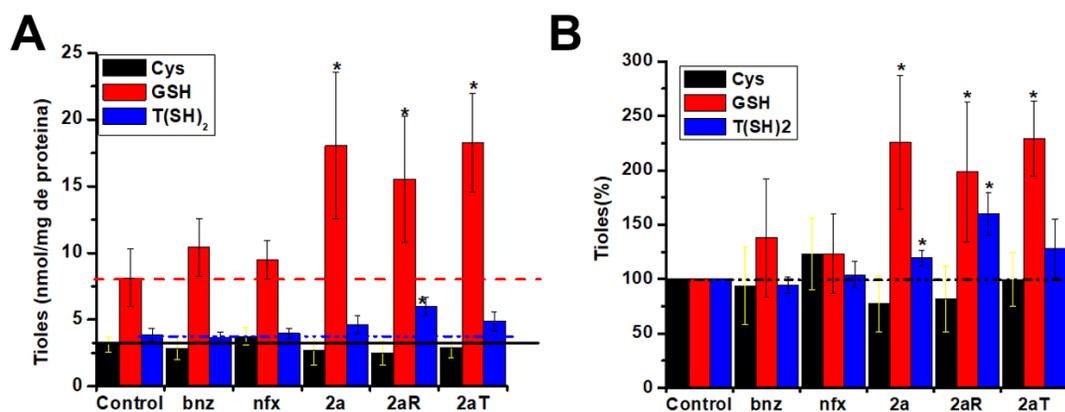


Figura 7.13. **Efecto de los compuestos sobre los metabolitos tioles en epimastigotes de *T. cruzi*.** A) Efecto de los fármacos canónicos y de las triazinas sobre metabolitos tioles en unidades de (nmol/ mg de proteína). B) Efecto de los compuestos sobre el % de metabolitos tioles, el control se utilizó como el 100%. Ambos gráficos se realizaron en OriginPro 8 y se les realizó una estadística de t-Student a dos colas con una * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$.

8 DISCUSIÓN

8.1 Caracterización del crecimiento de *T. cruzi*

Una curva de crecimiento consta de 4 fases, una fase de latencia, fase exponencial o logarítmica (log), seguida de una fase estacionaria y finaliza con una fase de muerte (Prescott, et al., 2004). En la curva de crecimiento de los epimastigotes obtenida en este proyecto (Figura 7.1) no se distingue la fase de latencia (lag) característica ya que los parásitos provienen de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, ya están adaptados al medio y cuentan con sustratos para comenzar a dividirse (Prescott, et al., 2004). En el gráfico obtenido; la fase exponencial empieza a las 24 h; sin embargo, esto sucede debido a que el conteo es cada 24 horas, lo que nos permite deducir que la fase de latencia se da en las primeras horas de iniciado el cultivo y esto se comprueba con el valor obtenido en la velocidad de crecimiento ($k= 0.5 \pm 0.04 \text{ días}^{-1}$) ya que esta constante nos indica la velocidad en el que la población de parásitos en el cultivo crece (Martín, et al., 2019). En el equipo de trabajo se reportó de $0.7 \pm 0.1 \text{ días}^{-1}$; $N= 4.5 \pm 1.2$; $G= 23.4 \pm 2.9 \text{ h}$ (Tesis, Núñez-Moreno, 2022), estos resultados son similares a los obtenidos en este proyecto.

Posteriormente, la fase exponencial de crecimiento se observa con velocidad de crecimiento constante hasta llegar al máximo crecimiento posible debido a la densidad celular y a la disminución en los nutrientes en el cultivo (Prescott, et al., 2004); en el caso de los epimastigotes esta fase duró 4 días. Se asume que a partir del día 5 se llega a la fase estacionaria de crecimiento, aunque no se distinga con certeza en el gráfico; ya que el día 5 y 6 no se realiza un conteo de parásitos, pero se conoce que en esta fase los parásitos disminuyen su crecimiento debido a que las condiciones del medio no son suficientes para sobrevivir y comienza una acumulación de desechos (Tortora, et al., 2017) lo cual provoca que el día de máximo crecimiento sea en el día 7 y conlleve a la fase de muerte debido a la carencia de nutrientes en el medio (Prescott, et al., 2004), esta fase se pudo observar de manera visual, ya que se formó un precipitado de parásitos muertos.

Esto ya se ha observado con anterioridad en otros trabajos de investigación como lo analizó Kunii, et al., 2022 en cepas de *T. cruzi* Tsh 4 y 18; obtenidas a partir de las heces de un *Triatoma sherlocki* de Santo Inácio, Bahía y cultivados en medio LIT, reportando una fase logarítmica de 1 a 5 días seguida de una fase estacionaria temprana del día 6 al 10 en la que se observó una disminución del crecimiento (Kunii, et al., 2022).

De manera interesante se observó que otros tripanosomátidos tienen un crecimiento similar al que obtuvimos con *T. cruzi*, como lo fue en el análisis de las curvas de crecimiento de cepas diferentes de *Leishmania*, en las cuales se realizó el conteo de promastigotes obtenidos a partir de amastigotes de ratones Balb/c y Swiss Webster, ambos fueron infectados con *Leishmania infantum chagasi* y *Leishmania infantum infantum*, encontrando datos similares, ya que se reportó una fase logarítmica del día 3 al 4, siendo el día 4 el de máximo crecimiento, a partir de este día comenzó la fase de muerte y el día 7 ya no se observaron parásitos vivos. Pero no se indicaron valores como la velocidad de crecimiento ni el número de generaciones para este tripanosomátido (Ferreira-Paes, et al., 2020).

8.2 Efecto antiparasitario de los fármacos canónicos y los derivados de triazina contra epimastigotes de *T. cruzi*

En esta tesis se obtuvieron CI_{50} de $13 \pm 4.1 \mu\text{M}$ para Bnz y de $3 \pm 1.5 \mu\text{M}$ para Nfx. Estos resultados son reproducibles, debido a que con anterioridad ya se habían caracterizado los fármacos canónicos por el equipo de trabajo, obteniendo resultados similares en la misma cepa de parásitos (*T. cruzi* cepa Querétaro DTUI), siendo para Bnz = $12 \pm 2 \mu\text{M}$ (González-Chavéz, et al., 2019) y para Nfx $3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ (datos no publicados por el grupo de trabajo). Datos de Revollo, et al., el cual evaluó la susceptibilidad *in vitro* de los compuestos utilizados en la clínica de diferentes cepas de *T. cruzi* las cuales eran de diferentes orígenes y de diferentes tipificaciones de DTU (TcI, TcII y TcV), lo cual puede explicar la diferencia en los datos obtenidos, ya que en este equipo de trabajo se obtuvo el promedio de los valores de CI_{50} de todas las tipificaciones, siendo 4.02 ± 2.82 para Bnz y $2.46 \pm 2.25 \mu\text{M}$ para Nfx, esto

nos permite observar que nuestros valores obtenidos no son tan variables, principalmente para Nfx (Revollo, et al., 2019).

Los resultados obtenidos con las triazinas demuestran que los 3 derivados disminuyen el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi*; en el intervalo micromolar de 1.5 – 23 μM (Figura 7.5; Tabla 7.1). Esto contrasta con la hipótesis planteada en esta tesis, que los compuestos 2a y 2a-R al tener en su estructura al grupo N-óxido afectarían de manera más notable el crecimiento de los epimastigotes; sin embargo, fue precisamente el compuesto 2-aT que no tiene el grupo N-óxido en su estructura el que tuvo mayor efecto antiparasitario con una CL_{50} de 1.5 μM . Comparando el efecto de las triazinas con el de los fármacos canónicos; determinamos que los derivados de triazina 2a y 2a-R necesitan entre 2 – 7 veces la concentración de Bnz para alcanzar el mismo efecto inhibitorio. De manera interesante, el compuesto 2a-T necesitó 13 veces menos la concentración de Bnz o Nfx para tener el mismo efecto inhibitorio (Tabla 7.1). Se ha reportado el efecto que ejerce el grupo N-óxido sobre epimastigotes de *T. cruzi* en la cepa Tulahuen 2, la cual se creció en un cultivo diferente, en un medio axénico que contiene infusión de cerebro-corazón; el conteo de parásitos fue por nefelometría a 610 nm, después de su exposición a diferentes compuestos con grupo N-óxido, encontrando que todas ejercen un efecto en la disminución del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* (Boiani, et al., 2010).

Por otro lado, los 3 derivados de triazina tienen un efecto citotóxico significativo e importante sobre la viabilidad de los fibroblastos HFF-1 (CL_{50} en el intervalo 0.8- 43 μM ; Figura 7.7; Tabla 7.2) en comparación con Bnz y Nfx; estos últimos apenas comienzan un efecto de citotoxicidad al 50% a la última concentración evaluada (27 μM y 8 μM), respectivamente (Figura 7.6). En el caso de Bnz ya se había determinado la CL_{50} con anterioridad en el equipo de trabajo obteniendo un valor de 50 μM aproximadamente (datos no publicados por el grupo de trabajo). Para el caso de Bnz si se ha caracterizado su citotoxicidad en células HFF-1 en otro equipo de trabajo en el cual utilizaron el ensayo de tetrazolio MTS, reportando valores mayores a 64 μM para Bnz (Valli, et al., 2022). Existen estudios de genotoxicidad en Nfx a

corto y largo plazo en leucocitos. A corto plazo no se encontró citotoxicidad para Nfx, mientras que a largo plazo se reportó una citotoxicidad a 56 μM (Buschini, et al., 2009). Al comparar los valores de los derivados de triazina observamos que el compuesto 2a es el que presentó una menor citotoxicidad sobre HFF-1 el cual presenta el grupo N-oxido, y que su reacomodo en la estructura de la triazina nos podría indicar que este grupo ayudó a disminuir el efecto tóxico, aunque hasta el momento no se ha reportado evidencia sobre el efecto que tiene el N-oxido por sí solo.

8.3 Efecto de los fármacos canónicos y las triazinas en monoterapia en un modelo de infección *in vitro* de *T. cruzi*

Para avanzar en entender el posible efecto antiaparasitario de las triazinas, estos primeramente se evaluaron en monoterapia y se compararon con los antichagásicos canónicos en un modelo de infección *in vitro*. En este modelo, se infectan células HFF-1 con tripomastigotes y las células ya infectadas se tratan con los compuestos y se deja progresar la infección por 5 días hasta el inicio temprano de la liberación de los tripomastigotes, los cuales se utilizan como variable para determinar la infección.

Para realizar los experimentos, primero tuvo que identificarse la concentración máxima de triazina que no afectara la viabilidad de las HFF-1 para que no interfiriera en su capacidad de infectarse, por lo que se evaluaron concentraciones menores a la CL_{10} para las triazinas las cuales fueron 5 μM para los compuestos 2a y 2a-R y 0.5 μM para 2a-T (Figura 7.9). Por lo tanto, se utilizaron estas concentraciones mencionadas con anterioridad para el caso de 2a y 2a-R, pero para 2a-T se decidió disminuir a 0.25 μM , debido a que es la triazina que mayor toxicidad presentó.

Cuidando estas condiciones; en el modelo de infección de monoterapia se observó que se necesita concentraciones de 0.3, 0.9, y 0.07 μM para 2a, 2a-R y 2a-T, respectivamente, para inhibir la liberación de formas infectivas para todas las triazinas (Figura 7.11 y Tabla 7.3), afectando de alguna manera el ciclo de vida de

T. cruzi. Sin embargo, el único que podría competir con los fármacos canónicos es la triazina 2a-T. Se sabe que se requieren aproximadamente 20 min para que este parásito penetre en las células y de 2 a 3 h para que se transformen en amastigotes dentro de la célula (Araujo-Jorge, 2019), por ello se deja incubando dos horas para que ocurra este proceso y después de este tiempo se exponen los compuestos a los parásitos. Cabe mencionar que, después de la interacción se les realizan 3 lavados a las células infectadas, lo que evita que queden tripomastigotes contaminantes en el sobrenadante y asegure que esta forma infectiva solo este dentro de la célula. A la vez se sabe que la replicación de amastigotes se da entre las 18 y 27 h después de infectar y por ello el conteo de tripomastigotes se realiza a los 5 días post- infección, esto debido a que en el grupo de trabajo ya se caracterizó este modelo de infección y se conoce que del día 4 al 5 comienza la lisis de la célula por los tripomastigotes para su liberación temprana. Por lo tanto, es en estos días cuando se realiza el conteo de los tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante (González-Chávez, et al., 2019).

Las triazinas contienen en su estructura un grupo éster el cual pudiera ser activado por medio de las esterasas y lipasas, se da la hidrólisis del grupo éster en un alcohol o grupo ácido polar que permite la entrada a la membrana (Lam y Ilies, 2022). La entrada de las triazinas a las células infectadas y posteriormente a los parásitos pudiera provocar una baja en la transformación de tripomastigotes a amastigotes, la replicación de amastigotes o incluso que; mueran los tripomastigotes y evite que estas formas sean liberadas al citosol. Otra opción es por medio de la inhibición de algunas de las proteínas que son esenciales para que el ciclo de vida de *T. cruzi* sea completado y lleve a cabo una infección eficaz (Manning-Cela, et al., 2001).

Al comparar las triazinas con los fármacos clínicos pudimos observar que interesantemente el compuesto 2a-T ejerce el mismo efecto de inhibir la liberación de las formas infectivas a la misma concentración (0.07 μ M) que Bnz y Nfx (Tabla 7.3) mientras que los compuestos 2a y 2a-R necesitan una concentración al menos 4-13 veces mayor comparada con los fármacos antichagásicos. Cabe destacar que ya se tiene registro de los fármacos utilizados en la clínica sobre un modelo de

infección, en el cual se reportó un valor de CI_{50} de Bnz de $5.73 \pm 3.07 \mu\text{M}$ y $4.00 \pm 1.90 \mu\text{M}$ para tripomastigotes y amastigotes, respectivamente y para Nfx de $3.60 \pm 2.67 \mu\text{M}$ para tripomastigotes y $2.62 \pm 1.22 \mu\text{M}$ para amastigotes (Revollo, et al., 2019). Estos resultados son diferentes a los determinados en este proyecto, esto puede deberse a la metodología ocupada.

8.4 Efecto de los fármacos canónicos y las triazinas en biterapia en un modelo de infección *in vitro* de *T. cruzi*

Debido a las bajas concentraciones en que muestran efecto, no se descartó ninguna triazina para el análisis del modelo de infección *in vitro* expuesto a biterapia, ya que se ha visto que en ocasiones un compuesto no ejerce un efecto prometedor por sí solo, pero al usarlo en biterapia con los antichagásicos canónicos, puede mejorar el efecto de estos últimos, siendo una estrategia interesante para la búsqueda de nuevos tratamientos (Planer, et al., 2014). Se tiene reporte de que un compuesto por sí solo puede no ejercer un efecto interesante, pero al momento de realizar terapia combinada producen un efecto positivo. Como sucedió al analizar el efecto sinérgico del alopurinol en combinación con Bnz (Mazzeti, et al., 2019). Por lo tanto, se decidió analizar el Bnz o Nfx en conjunto con los derivados de triazina para determinar si estos últimos disminuyen el valor de CI_{50} de los fármacos clínicos.

Las triazinas 2a y 2a-T a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ y $0.035 \mu\text{M}$; respectivamente, disminuyeron 1.4 - 4.6 veces la CI_{50} del Bnz y del Nfx (los cuales se mantuvieron a una concentración de $0.04 \mu\text{M}$ en conjunto con todas las triazinas). De manera interesante la triazina 2a-R a una concentración de $0.6 \mu\text{M}$ disminuyó más de 50 veces la liberación de parásitos. Por lo tanto, las triazinas ejercen un efecto interesante en conjunto con los antichagásicos, lo cual debe ser analizado con mayor profundidad, con el fin de conocer cuál es el mecanismo que siguen en conjunto para evitar la liberación de los tripomastigotes y amastigotes.

8.5 Efecto de los fármacos canónicos y las triazinas en monoterapia en los metabolitos tioles de epimastigotes

Por último, se analizó el efecto que tienen los derivados de triazina sobre los metabolitos tioles de *T. cruzi* con el fin de explorar posibles modos de acción de los compuestos.

Por ello se comenzó realizando las curvas patrón de los metabolitos tioles presentes en los parásitos que son Cys, GSH y T(SH)₂. Las curvas patrón ya se tienen implementadas en el laboratorio, pero en esta tesis se construyó el protocolo para el T(SH)₂. Vázquez, et al., reportó en 2017 valores similares a los de este proyecto, siendo el 100% de Cys: 4.8 ± 1 , GSH: 5.7 ± 2.2 y T(SH)₂: 3.1 ± 0.9 nmol*(mg/proteína)⁻¹ (Vázquez, et al., 2017).

Como resultado de la cuantificación de los metabolitos tioles después de exponerlos a los derivados de triazina se observó un incremento significativo en el GSH, el precursor del T(SH)₂. Se conoce que el que desintoxica es el tripanotión, no el GSH; por lo tanto, al momento de ser expuesto a la triazina se genera un aumento en los niveles de GSH en los parásitos muy probablemente para mantener las pozas del metabolito antioxidante T(SH)₂ para defenderse de los efectos de estos compuestos.

Anteriormente, se ha observado un aumento en los niveles de GSH causados por triazinas, como lo fue en el caso del tratamiento de ratas con atrazina (una triazina del tipo 1,2,3) que es utilizada como un herbicida. Se sabe que la atrazina actúa bloqueando la transferencia de electrones en el complejo II lo que provoca un aumento del gasto energético y del daño oxidativo debido a esto podemos asumir que hubo un aumento en GSH de hasta el 100%, como resultado de una defensa antioxidante (Zimmerman, et al., 2018). A su vez se sabe que el T(SH)₂ tiene una función homóloga al del GSH en mamífero (Saavedra, et al., 2019) por lo que se esperaba el incremento de dicho metabolito. Recapitulando que el T(SH)₂ se sintetiza a partir de 2 moléculas de GSH y una molécula de espermidina por medio

de la tripanotión sintetasa, siendo esta última la segunda enzima que controla el flujo de la vía de síntesis de T(SH)₂ (Saavedra, et al., 2019) por lo que su incremento no fue tan notable ni equivalente a la concentración de GSH.

9 CONCLUSIONES

- El grupo N-óxido en los compuestos evaluados no mejoró la eficacia de la triazina como antiparasitario, pero permitió menos citotoxicidad para células.
- Los tres derivados de triazina presentaron efecto citotóxico para ambos tipos celulares.
- El compuesto 2a-T fue el derivado de triazina que produjo mejor efecto sobre el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi* y en el modelo de infección *in vitro* con tripomastigotes.
- Los derivados de triazina en un modelo de infección *in vitro* de biterapia mejoraron el efecto de Bnz y Nfx, disminuyendo su valor de CI₅₀.
- Los derivados de triazina ejercieron un efecto significativo sobre el sistema antioxidante de *T. cruzi*, específicamente sobre GSH.

10. Perspectivas

Evaluar la posible inhibición de la TryS y TryR en parásitos expuestos por 24 h a los derivados de triazina.

Evaluar la reproducibilidad del efecto de las triazinas en el modelo de biterapia.

REFERENCIAS

Altretamine. (2016). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

Andrade-Alviárez, D., Bonive-Boscan, A. D., Cáceres, A. J., Quiñones, W., Gualdrón-López, M., Ginger, M. L and Michels, P. A. M. (2022). Delineating transitions during the evolution of specialised peroxisomes: Glycosome formation in kinetoplastid and diplomonid protists. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 979269. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.979269>

Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G and Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 13(4), 540–550. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>

Araújo-Jorge TC. (2019) Biology and ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-year old challenge for scientists. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:131-4. doi: 10.1590/s0074-02761999000700013. PMID: 10677699.

Balouz, V., Agüero, F and Buscaglia, C. A. (2017). Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Advances in parasitology*, 97, 1–45. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.10.001>

Bickel M. H. (1969). The pharmacology and biochemistry of N-oxides. *Pharmacological reviews*, 21(4), 325–355.

Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M and Denicola, A. (2010). Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?. *Biochemical pharmacology*, 79(12), 1736–1745. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>

Boletín Epidemiológico. *Salud Publica Mex* [Sitio web]. 8 de enero del 2024 [citado 17 de marzo de 2024]; Semana epidemiológica 52. Disponible en: <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/3681>

Bravo-Ramírez, I. E., Pech-May, A., May-Concha, I. J and Ramsey, J. M. (2023). Conocimientos actuales sobre *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas en México: una revisión sistemática. *Salud pública de México*, 65(2 mar-abr), 175–180. <https://doi.org/10.21149/14020>

Burguete, A., Estevez, Y., Castillo, D., González, G., Villar, R., Solano, B., Vicente, E., Silanes, S. P., Aldana, I., Monge, A., Sauvain, M and Deharo, E. (2008). Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), 778–780. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000800006>

Buschini, A., Ferrarini, L., Franzoni, S., Galati, S., Lazzaretti, M., Mussi, F., Northfleet de Albuquerque, C., Maria Araújo Domingues Zucchi, T., Poli, P. (2009). Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *Journal of parasitology research*, 2009, 463575. <https://doi.org/10.1155/2009/463575>

Carlier, Y., Altchek, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A. O., Schijman, A. G., Segovia, M., Wagner, N and Albajar Vinas, P. (2019). Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(10), e0007694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007694>

CDC. American Trypanosomiasis. (16 de junio del 2021) Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas (NCEZID), División de Enfermedades Parasitarias y Malaria. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/>

Chagas' Disease Argentine Collaborative Transplant Consortium and Casadei, D. (2010). Chagas' disease and solid organ transplantation. *Transplantation proceedings*, 42(9), 3354–3359. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.09.019>

Chao, C., Leone, J. L and Vigliano, C. A. (2020). Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5), 165689. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>

Conrad, K. A., Kim, H., Qasim, M., Djehal, A., Hernday, A. D., Désaubry, L and Rauceo, J. M. (2023). Triazine-Based Small Molecules: A Potential New Class of Compounds in the Antifungal Toolbox. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(1), 126. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010126>

De Arias, A. R., Monroy, C., Guhl, F., Sosa-Estani, S., Santos, W. S and Abad-Franch, F. (2022). Chagas disease control-surveillance in the Americas: the multinational initiatives and the practical impossibility of interrupting vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210130. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210130>

De Souza, W and Barrias, E. S. (2020). May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective?. *Acta tropica*, 212, 105688. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105688>

Edwards, M. S., Stimpert, K. K., Bialek, S. R and Montgomery, S. P. (2019). Evaluation and Management of Congenital Chagas Disease in the United States. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8(5), 461–469. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz018>

Ferreira-Paes, T., Charret, K. D. S., Ribeiro, M. R. D. S., Rodrigues, R. F and Leon, L. L. (2020). Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. *PloS one*, 15(12), e0230545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230545>

Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez i Prat, J., Herrera, R. N., Lafuente, C. A., Luciardi, H. L., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B and Sergio-Salles, X. (2007). Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica [Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic]. *Revista española de cardiología*, 60(3), 285–293.

González-Chávez, Z., Vázquez, C., Mejía-Tlachi, M., Márquez-Dueñas, C., Manning-Cela, R., Encalada, R., Rodríguez-Enríquez, S., Michels, P. A. M., Moreno-Sánchez, R and Saavedra, E. (2019). Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox biology*, 26, 101231. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101231>

Gunasekaran, P., Fan, M., Kim, E. Y., Shin, J. H., Lee, J. E., Son, E. J., Kim, J., Hwang, E., Yim, M. S., Kim, E. H., Choi, Y. J., Lee, Y. H., Chung, Y. H., Kim, H. N., Ryu, E. K., Shin, S. Y., Kim, E. K and Bang, J. K. (2019). Amphiphilic Triazine Polymer Derivatives as Antibacterial And Anti-atopic Agents in Mice Model. *Scientific reports*, 9(1), 15161. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51561-7>

Gupta, L., Sunduru, N., Verma, A., Srivastava, S., Gupta, S., Goyal, N and Chauhan, P. M. (2010). Synthesis and biological evaluation of new [1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ylthio-1,3,5-triazines and [1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ylthio-pyrimidines against *Leishmania donovani*. *European journal of medicinal chemistry*, 45(6), 2359–2365. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.015>

- Hall, B. S and Wilkinson, S. R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1), 115–123. <https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
- Hall, B. S., Bot, C and Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of biological chemistry*, 286(15), 13088–13095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847>
- Herwaldt B. L. (2001). Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 659–688. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.659-688.2001>
- Ibáñez-Cervantes, G., León-García, G., Castro-Escarpulli, G., Mancilla-Ramírez, J., Victoria-Acosta, G., Cureño-Díaz, M. A., Sosa-Hernández, O and Bello-López, J. M. (2018). Evolution of incidence and geographical distribution of Chagas disease in Mexico during a decade (2007-2016). *Epidemiology and infection*, 147, e41. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002984>
- Introducción a la microbiología / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. (2017). Editorial Médica Panamericana
- Kunii, G. K. W., Falcone, R., Clementino, L. D. C., Rosa, J. A. D., Nascimento, J. D., Belintani, T., Oliveira, J and Ribeiro, A. R. (2022). Growth Curve, Morphological and Molecular Characterization of Two Strains of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55, e05212021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0521-2021>
- Lam, L., Ilies, M. A. (2022). Evaluation of the Impact of Esterases and Lipases from the Circulatory System against Substrates of Different Lipophilicity. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1262. <https://doi.org/10.3390/ijms23031262>
- Lascano, F., García Bournissen, F and Altcheh, J. (2022). Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *British journal of clinical pharmacology*, 88(2), 383–402. <https://doi.org/10.1111/bcp.14700>
- López Páez, M. C., Corredor Arjona, A., Nicholls Orejuela, R. S., Duque Beltrán, S., Moncada Álvarez, L. I., Reyes Harker, P and Rodríguez Toro, G. (2012). Atlas de parasitología (Segunda edición). Editorial El Manual Moderno Colombia
- Manning-Cela, R., Cortés, A., González-Rey, E., Van Voorhis, W. C., Swindle, J and González, A. (2001). LYT1 protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 69(6), 3916–3923. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3916-3923.2001>
- Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A and Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and integrative physiology*, 146(4), 601–620. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>
- Mazzeti, A. L., Diniz, L. F., Gonçalves, K. R., WonDollinger, R. S., Assíria, T., Ribeiro, I and Bahia, M. T. (2019). Synergic Effect of Allopurinol in Combination with Nitroheterocyclic Compounds against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(6), e02264-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02264-18>
- Miao, X.S., March, R.E and Metcalfe C.D. (2003). A tandem mass spectrometric study of the N-oxides, quinoline N-oxide, carbadox, and olaquinox, carried out at high mass accuracy using electrospray ionization. *International Journal of mass spectrometry*, 230(2-3), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.08.012>

Microbiología / Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein, Carlos Gamazo de la Rasilla, Íñigo Lasa Uzcudum. (2004). McGraw-Hill Interamericana de España

Microbiología esencial / coordinadores, Ana Martín, Victoria Béjar, Juan Carlos Gutiérrez, Montserrat Llagostera, Emilia Quesada. (2019). Editorial Médica Panamericana.

Molina, I., Salvador, F., and Sánchez-Montalvá, A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas [Update Chagas disease]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 34(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>

Molina-Morant, D., Fernández, M. L., Bosch-Nicolau, P., Sulleiro, E., Bangher, M., Salvador, F., Sanchez-Montalva, A., Ribeiro, A. L. P., de Paula, A. M. B., Eloi, S., Correa-Oliveira, R., Villar, J. C., Sosa-Estani, S and Molina, I. (2020). Efficacy and safety assessment of different dosage of benznidazol for the treatment of Chagas disease in chronic phase in adults (MULTIBENZ study): study protocol for a multicenter randomized Phase II non-inferiority clinical trial. *Trials*, 21(1), 328. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-4226-2>

Moreno, C. J. G., de Freitas Oliveira, J. W., Branco, J. C., Araújo, L., Queiroz, A. M., Donato, S. T., Júnior, N. J. d. S., Rodrigues, E.T. d. S. and Silva, M. S. (2019). Cell Culture and Maintenance of the Evolutionary Forms of *Trypanosoma cruzi* for Studies of Parasitic Biology. En De Souza, W. (Ed.), *Biology of Trypanosoma cruzi*. (pp. 1-6) IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.84733

Müller, G. (2008). History of the Discovery and Development of Triazine Herbicides. *The Triazine Herbicides*, 13–29. doi:10.1016/b978-044451167-6.50005-2

Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A and Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas [Diagnosis and treatment of Chagas disease]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31 Suppl 1, 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3)

Norman, F. F and López-Vélez, R. (2019). Chagas disease: comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. *Journal of travel medicine*, 26(7), taz060. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz060>

Núñez Moreno, J. O. (2022). Efecto citostático contra *Trypanosoma cruzi* de nuevos compuestos derivados de quinazolina. (Licenciado en Químico de alimentos). UNAM, Facultad de Química.

OMS. (Organización Mundial de la Salud) (2023). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Sitio web. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2021). Enfermedad de Chagas e inmunosupresión. Decálogo para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. (Sitio Web). Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/54561/OPSCDEVT210008_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B and González, J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who?. *Microbes and infection*, 14(15), 1390–1402. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.003>

Parasitología médica / Elba G. Rodríguez Pérez; editor responsable, Carlos Mendoza Murillo. (2013). Editorial El Manual Moderno

Pascual-Vázquez, G., Alonso-Sardón, M., Rodríguez-Alonso, B., Pardo-Lledías, J., Romero Alegría, A., Fernández-Soto, P., Muñoz Bellido, J. L., Muro, A and Belhassen-García, M. (2023). Molecular diagnosis of Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Infectious diseases of poverty*, 12(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01143-7>

Pérez de Ayala, B.A., Pérez-Molina, J.A., Navarro, B.M y López-Veléz R. (2009). Enfermedad de Chagas en personas procedentes de latinoamérica residentes en España. Ministerio de Sanidad y Política Social. II.(4.3), 20. Disponible en <https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/promoSaludEquidad/migracionSalud/docs/enfermedadChagas.pdf>

Pharmaoffer (2005). N-oxide Levofloxacin API Manufacturers with GMP. Sitio Web. Disponible en: <https://pharmaoffer.com/api-excipient-supplier/quinolones/n-oxide-levofloxacin/gmp>

Planer, J. D., Hulverson, M. A., Arif, J. A., Ranade, R. M., Don, R and Buckner, F. S. (2014). Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLoS neglected tropical diseases, 8(7), e2977. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002977>

Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet. Infectious diseases, 1(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)

Rani Kumar, N and Agrawal, A. R. (2023). Advances in the Chemistry of 2,4,6-Tri(thiophen-2-yl)-1,3,5-triazine. ChemistryOpen, 12(1), e202200203. <https://doi.org/10.1002/open.202200203>

Rassi, A., Jr, Rassi, A and Marcondes de Rezende, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). Infectious disease clinics of North America, 26(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>

Revollo, S., Oury, B., Vela, A., Tibayrenc, M and Sereno, D. (2019). *In Vitro* Benznidazole and Nifurtimox Susceptibility Profile of *Trypanosoma cruzi* Strains Belonging to Discrete Typing Units TcI, TcII, and TcV. Pathogens (Basel, Switzerland), 8(4), 197. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040197>

Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M y González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. Gaceta médica de México, 154(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>

Rueda, K., Trujillo, J. E., Carranza, J. C and Vallejo, G. A. (2014). Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos [Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries]. Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud, 34(4), 631–641. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000400017>

Saavedra, E., González-Chávez, Z., Moreno-Sánchez, R and Michels, P. A. M. (2019). Drug Target Selection for *Trypanosoma cruzi* Metabolism by Metabolic Control Analysis and Kinetic Modeling. Current medicinal chemistry, 26(36), 6652–6671. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180917104242>

Salazar, M.P., Bucio, M.I., Rojo, J., Manuel, Y.V., Revuelta, M.A., Pastén, S., Chávez, M., Ramos, C., Becker, I.D., Cabrera, M., Morales, C y López, S. (2019). Manual de procedimientos para la enfermedad de Chagas en México. Secretaria de Salud, 1, 40-43. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf

Sales Junior, P. A., Molina, I., Fonseca Murta, S. M., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R and Carneiro, C. M. (2017). Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. The American journal of tropical medicine and hygiene, 97(5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>

Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Sulleiro, E., Moreso, F., Berastegui, C., Caralt, M., Pinazo, M. J., Moure, Z., Los-Arcos, I., Len, O., Gavaldà, J and Molina, I. (2018). Prevalence of Chagas Disease

among Solid Organ-Transplanted Patients in a Nonendemic Country. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(3), 742–746. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0735>

Sánchez-González, G., Figueroa-Lara, A., Elizondo-Cano, M., Wilson, L., Novelo-Garza, B., Valiente-Banuet, L and Ramsey, J. M. (2016). Cost-Effectiveness of Blood Donation Screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004528. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004528>

Schmuñis G. A. (1991). *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, 31(6), 547–557. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1991.31691306255>.

Secretaria de Salud (SSA). (2014). NOM-032-SSA2-2014: Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades por vectores, Estados Unidos Mexicanos (SSA) Recuperado el 17/02/25, disponible en https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015#gsc.tab=0

Sharma, M., Chauhan, K., Shivahare, R., Vishwakarma, P., Suthar, M. K., Sharma, A., Gupta, S., Saxena, J. K., Lal, J., Chandra, P., Kumar, B and Chauhan, P. M. (2013). Discovery of a new class of natural product-inspired quinazolinone hybrid as potent antileishmanial agents. *Journal of medicinal chemistry*, 56(11), 4374–4392. <https://doi.org/10.1021/jm400053v>

Singh, S., Utreja, D and Kumar, V. (2022). Pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine: a promising fused heterocycle to target kinases in cancer therapy. *Medicinal chemistry research : an international journal for rapid communications on design and mechanisms of action of biologically active agents*, 31(1), 1–25. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02819-1>

Singla, P., Luxami, V and Paul, K. (2015). Triazine as a promising scaffold for its versatile biological behavior. *European journal of medicinal chemistry*, 102, 39–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.037>

SS (Secretaria de Salud). (2016). Enfermedad de Chagas. Información General de la Enfermedad de Chagas. [Sitio web] <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/enfermedad-de-chagas>

Steverding D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites and vectors*, 7, 317. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317>

Storino, R. (2023). *Trypanosoma cruzi*. Enfermedad de Chagas-Mazza. N.E. Radman., M. I. Gamboa y F.L.M. Pedrina (Eds.), *Parasitología comparada. Modelos parasitarios*. (pp. 290-292) Edulp. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/148720>

Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

Sweeney, M., Coyle, R., Kavanagh, P., Berezin, A. A., Lo Re, D., Zissimou, G. A., Koutentis, P. A., Carty, M. P and Aldabbagh, F. (2016). Discovery of anti-cancer activity for benzo[1,2,4]triazin-7-ones: Very strong correlation to pleurotin and thioredoxin reductase inhibition. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 24(16), 3565–3570. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.066>

Valli, M., Souza, J. M., Chelucci, R. C., Biasetto, C. R., Araujo, A. R., Bolzani, V. D. S., Andricopulo, A. D. (2022). Identification of natural cytochalasins as leads for neglected tropical diseases drug discovery. *PloS one*, 17(10), e0275002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275002>

Vázquez, C., Mejía-Tlachi, M., González-Chávez, Z., Silva, A., Rodríguez-Zavala, J. S., Moreno-Sánchez, R and Saavedra, E. (2017). Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS letters*, 591(23), 3881–3894. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12904>

Vianna-Martins, A., Patrícia Gomes, A., de Mendonça, E. G., Rangel Fietto, J. L., Alberto Santana, L., de Almeida Oliveira, M. G and Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infection*, 16(1), 45–58. doi:10.1016/s0123-9392(12)70057-7

WHO. (World Health Organization). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. (2015). *Releve epidemiologique hebdomadaire*, 90(6), 33–43. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/242316/WER9006_3344.PDF?sequence=1&isAllowed=y

Wrzeszcz, Z and Siedlecka, R. (2020). Heteroaromatic N-Oxides in Asymmetric Catalysis: A Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(2), 330. <https://doi.org/10.3390/molecules25020330>

Zimmerman, A. D., Breckenridge, C. B., Yi, K. D., Sawhney Coder, P., Wanders, D., Judd, R. Land Foradori, C. D. (2018). Changes in hepatic phase I and phase II biotransformation enzyme expression and glutathione levels following atrazine exposure in female rats. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 48(9), 867–881. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1374486>

Zvarych, V., Stasevych, M., Novikov, V., Rusanov, E., Vovk, M., Szweda, P., Grecka, K and Milewski, S. (2019). Anthra[1,2-d][1,2,3]triazine-4,7,12(3H)-triones as a New Class of Antistaphylococcal Agents: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(24), 4581. <https://doi.org/10.3390/molecules24244581>

ANEXOS

1. Preparación de medios para el cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

1.1 Preparación de medio LIT

El medio LIT (Infusión de hígado-triptosa) se preparó con: infusión de hígado al 0.5 %, 11.1 mM de glucosa (0.2 %), triptosa al 0.5 %, 68.4 mM de NaCl (0.4 %), 5.4 mM de KCl (0.04 %), 29.6 mM de Na₂HPO₄ (0.42 %) y se disolvió en agua bi-distilada para completar 900 mL y se colocaron 450 mL en frascos de vidrio con capacidad de 500 mL. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.5 atm por 15 min. Antes de su uso se suplementó con suero fetal bovino francés inactivado (SFB) (Nuaille, Francia; Biowest) al 10% (Anexo 1.1.1), hemina (ChemCruz, Dallas, USA) (25 µg/mL) (Anexo 1.1.2) y 0.5 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma; Misuri, USA).

1.1.1 Inactivación de suero fetal bovino

Un frasco de suero fetal bovino que se encontraba almacenado a - 70°C se procedió a descongelarlo a 4°C, una vez descongelado por completo se sometió a una temperatura de 56°C por media hora y cada 10 min se invirtió por 3 veces, posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 30 min y se realizaron alícuotas de 50 mL las cuales se almacenaron a - 70°C.

1.1.2 Preparación de la hemina

Se preparó un stock de 19.2 mM de hemina y se disolvió en 100 mL de una solución NaOH 0.1 N, la cual se esterilizó por medio de un filtro para jeringa de 0.20 µm (Sarstedt; Numbrecht, Alemania).

1.2 Preparación de PBS pH 7.4

Para preparar 1 L de PBS se homogenizaron 136.7 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 9.6 mM de Na₂HPO₄ y 2.1 mM de KH₂PO₄, los cuales se disolvieron en 1 L de agua

bi-destilada, posteriormente se ajustó el valor del pH a 7.4 y se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.5 atm por 15 minutos.

2. Preparación de medios utilizados para el mantenimiento y realización de experimentos con células HFF-1 y LLC

2.1 Preparación de medio DMEM

Para preparar 1 L del medio DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) se utilizó un sobre de DMEM (Gibco; Grand Island, USA) que contiene 25 mM de glucosa, 4 mM de L-glutamina y 0.020 mM de clorhidrato de piridoxina y se adicionó 440 mM de NaHCO₃, y 23.1 mM de Hepes ácido, el cual se disolvió con 900 mL de agua MiliQ con un ultrafiltro Biopak (Merck; Darmstadt, Alemania); y se ajustó a pH 6.8. Se esterilizó por filtración con un filtro (Corning Incorporated; Corning, USA) de 0.22 µM en frascos de vidrio de 500 mL a los cuales se les adicionó 450 mL del medio. Antes de su uso se suplementó con SFB (Gibco; Grand Island, USA) al 10% y antibiótico 0.5% estreptomina/penicilina. O con SFB al 2% y antibiótico 0.5% estreptomina/penicilina.

2.2 Preparación de buffer PBS-EDTA pH 7.4

Para preparar 1 L de PBS-EDTA se pesó 111 mM de NaCl, 16.1 mM de K₂HPO₄, 3.4 mM de KH₂PO₄, los cuales se disolvieron en 1 L de agua bi-destilada y se adicionó una concentración de 0.5 mM de EDTA, se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó por autoclave a 121.5 °C y 1.5 atm por 15 min.

3. Mantenimiento de medios de cultivo

3.1 Mantenimiento de Epimastigotes

Un cultivo de 1,000,000 de epimastigotes de *T. cruzi* que pertenece a la cepa Querétaro DTU1 se sembró en 5 mL de medio LIT suplementado (anexo 1.1) y se le realizó cambio de medio LIT cada tercer día.

3.2 Cultivo de células HFF-1

Se obtuvo un criovial de células HFF-1 las cuales estaban almacenadas en nitrógeno líquido, se descongelaron a temperatura ambiente y se sembraron en condiciones de esterilidad en placas de Petri (Corning; Oneonta, USA) con 5 mL de medio DMEM; el cual se suplementó con 10% de SFB y antibiótico penicilina/estreptomina. Las células se incubaron a 37°C y atmósfera de 5% CO₂-aire, con el fin de que se adhiran a la placa. Después de 24 h se les retiró el medio y se les adicionó DMEM al 10% de SFB. Una vez que las células crecieron y se encontraron en una confluencia entre el 80-100% (Juárez-Saldivar, et al., 2020) se resembraron en una nueva placa Petri a la cual cada tercer día se le realizó mantenimiento celular. Para realizar esto último se retiró el medio DMEM, se realizaron 2 lavados con PBS-EDTA ya que el EDTA tiene propiedades de quelación que protegen a la célula y permiten despegar las células que están adheridas; posteriormente se añadió un 1 mL de tripsina y se incubó a 37° C y 5% CO₂ por 2 min para que se desprendan por acción química y mecánica con una punta de pipeta. Se traspasaron 100 µL a una placa Petri nueva con 5 mL de DMEM al 10% SFB la cual se incubó a las mismas condiciones.

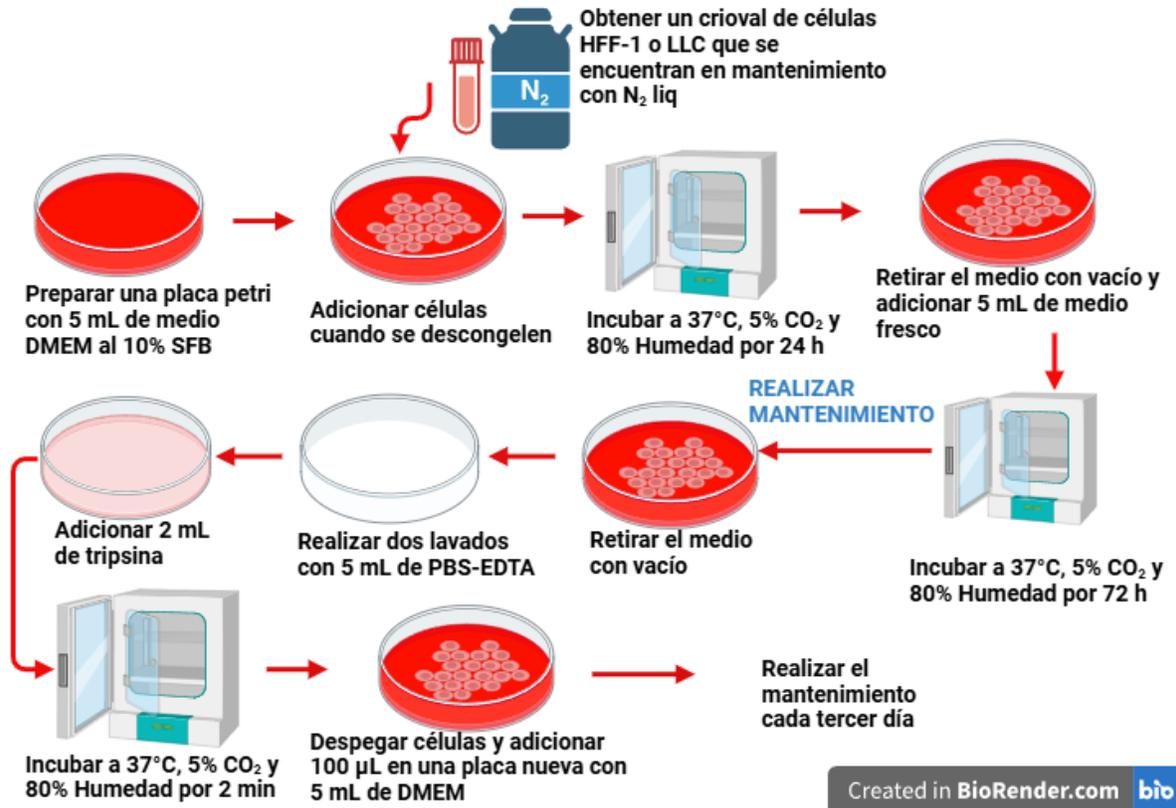


Figura del Anexo 2.1. **Mantenimiento de células HFF-1 y LLC.** Metodología que muestra la forma y condiciones en que se realizan los mantenimientos celulares de HFF-1 y LLC.

4 Obtención de infección primaria y secundaria iniciando con epimastigotes de *T. cruzi* con el fin de obtener tripomastigotes de *T. cruzi*

A partir de una caja de mantenimiento de células HFF-1 con una confluencia del 80 al 100% se sembraron 20,000 células en un frasco para cultivo celular (Corning, USA; Corning) en 5 mL de medio DMEM suplementado al 10 % con SFB, se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

Por otro lado, se usó un cultivo de epimastigotes que se encontraba en fase logarítmica de crecimiento el cual se contó y se ocupó el volumen necesario en el que hubieran 15,000,000 epimastigotes. Se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el botón de parásitos con 10 mL de DMEM sin suplementar, se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a la misma velocidad, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de DMEM

suplementado al 2% de SFB, se realizó nuevamente el conteo de epimastigotes y se calculó el volumen en el que se lograra adicionar 10,000,000 epimastigotes. El frasco que contenía el sembrado de células HFF-1 el cual se dejó en incubación por 24 h se observó al microscopio para confirmar si las células sembradas se adhirieron en la superficie, posteriormente se quitó el medio DMEM suplementado al 10% y se adicionó medio DMEM fresco suplementado con 2% de SFB más el volumen correspondiente a 10,000,000 epimastigotes en un volumen final de 5 mL. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Cada 24 horas se realizó de uno a dos lavados de la infección primaria. Para ello se retiró el medio y se adicionaron 3 mL de DMEM al 2% SFB, se le realizó movimientos con pequeños golpecitos sobre la superficie, cuidando que no se mojara el filtro, se eliminó el medio con vacío y se adicionó 5 mL de DMEM al 2% SFB, se incubaron a las mismas condiciones mencionadas.

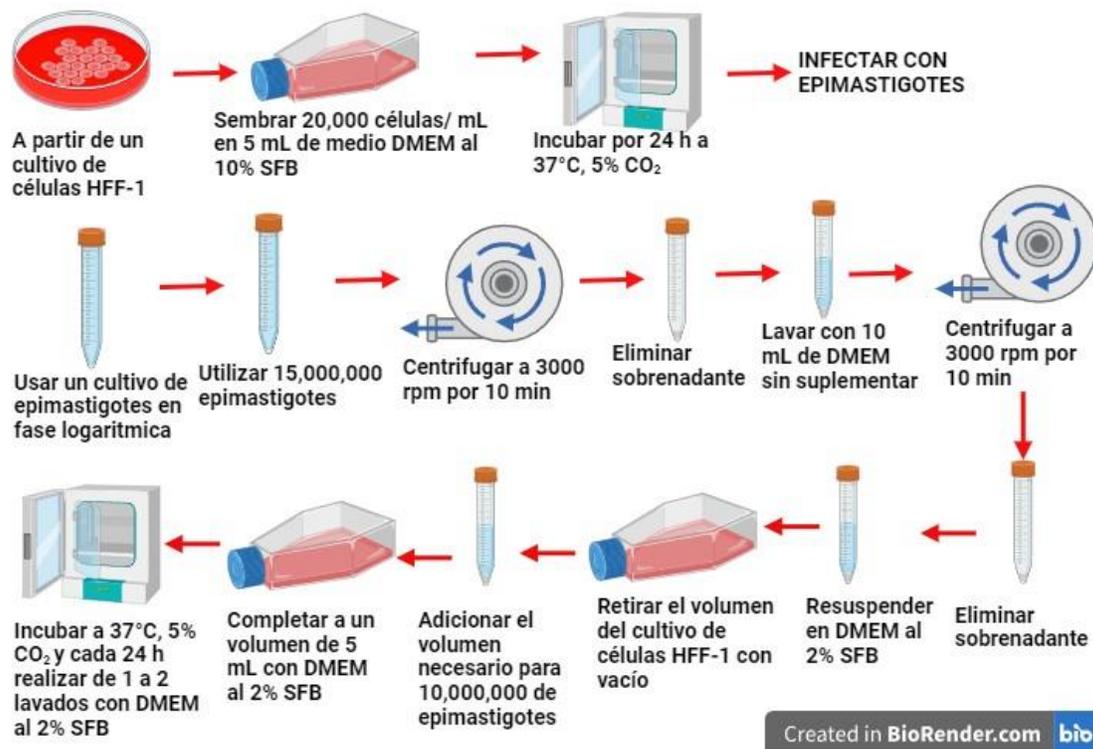


Figura del anexo 3.1. **Infección primaria con epimastigotes de *T. cruzi* en células HFF-1.** Metodología utilizada para la obtención de la infección primaria, empezando con epimastigotes hasta la obtención de la liberación de tripomastigotes que penetran en células HFF-1.

Cada 24 horas se observó el frasco con la infección al microscopio y cuando se observó amastigotes que se estaban transformando a tripomastigotes se sembró un frasco nuevo con 20,000 células LLC en 5 mL de medio DMEM suplementado al 10% de SFB y se incubó en las condiciones habituales. Al haber transcurrido 24 horas a partir del frasco que contiene la infección, se extrajo el medio con los tripomastigotes y se tomó el volumen necesario para adicionar 1,000,000 de tripomastigotes al cultivo de células LLC, para esto se centrifugó el volumen necesario de parásitos y se resuspendió en 1 mL de medio DMEM suplementado al 2% de SFB.

El frasco que contenía el sembrado de células LLC se le retiró el medio al 10% de SFB con vacío y se adicionó medio DMEM suplementado al 2% de SFB más el volumen que contiene 1,000,000 de tripomastigotes en un volumen final de 5 mL y se incubó hasta su uso. Se le realizó un lavado cada 24 h con DMEM al 10%. Se realizó el mantenimiento de la infección secundaria cada 5 días, que es el tiempo en que los tripomastigotes se liberan de las células contados después del primer lavado; es decir, se traspasaron 1,000,000 de tripomastigotes a un frasco nuevo con células LLC sembradas.

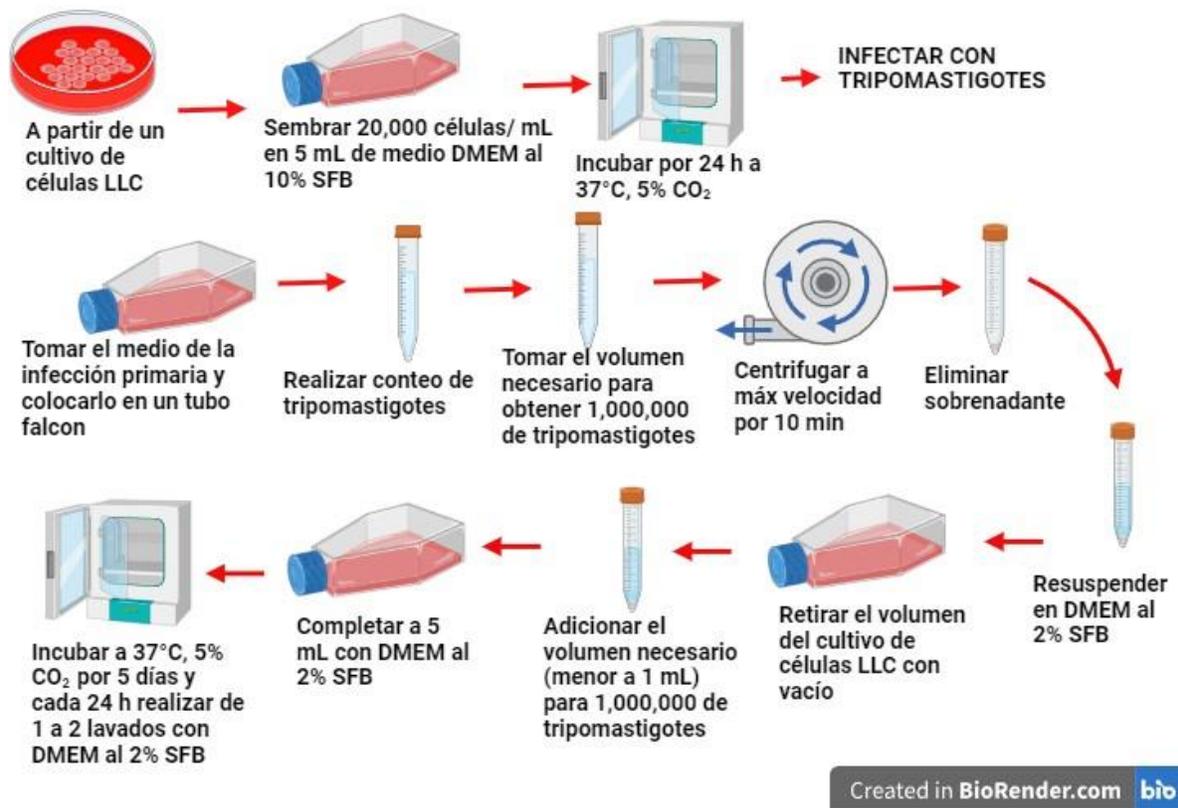


Figura del anexo 3.2. **Obtención de la infección secundaria con tripomastigotes de *T. cruzi* en células LLC.** Metodología utilizada para la obtención de la infección secundaria con tripomastigotes de *T. cruzi*.

5 Soluciones ocupadas para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Para preparar 1 L de la solución A de Lowry se adicionó 0.19 mM Na₂CO₃, 0.05 mM NaOH, 0.003 mM de Tartrato de Sodio y potasio y 1% de SDS para proteínas membranales y se disolvió c.b.p 1 L de agua destilada.

Para preparar 1 L de la solución B de Lowry 4% de CuSO₄, se pesaron 0.25 mM de CUSO₄ y se disolvieron en agua destilada.

Para preparar la disolución C, se calculó el volumen a utilizar y a partir de este se realizó una dilución 1:50 (Sol. A/ Sol. B).

6. Preparación de soluciones y reactivos ocupados para el uso del HPLC

6.1. Buffer de fosfatos 100 mM

Para preparar 1 L de buffer de fosfatos se disolvieron 100 mM de NaH_2PO_4 en 1 L de agua bi-destilada y se ajustó a un pH de 8.0.

6.2. DTNB

De este medio, se prepararon 250 mL; para ello se pesó 0.1 mM de DTNB, el cual se disolvió en 250 μL de DMSO y se completó a un volumen de 250 mL con el buffer de fosfatos 100 mM.

6.3. TFA

1 L de TFA al 0.15% se preparó a partir de un TFA de que se encontraba a una concentración de 10%, por lo tanto, se diluyó, para ello se adicionó 15 mL de TFA al 10% y c.b.p 1 L de agua MiliQ.

6.4. DTT

Se pesó una concentración de 10 mM de DTT y se disolvió en 1 mL de buffer de lisis.

6.5. Buffer de lisis

Para preparar 1 L del buffer de lisis se pesó 20 mM HEPES, 1 mM de EDTA, 0.15 mM de KCl y 20 mM de DTT en 1 L de agua MiliQ.