



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO CITOSTÁTICO CONTRA *Trypanosoma cruzi*
DE NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE
QUINAZOLINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JOSÉ OSWALDO NÚÑEZ MORENO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Martínez Barajas J. Eleazar**

VOCAL: **Profesor: Maldonado Jiménez Perla Deyanira**

SECRETARIO: **Profesor: Saavedra Lira Emma Cecilia**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Cordero Hernández José**

2° SUPLENTE: **Profesor: Jiménez Reyes Genaro**

**El tema se desarrolló en el Departamento de Bioquímica del
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

ASESOR DEL TEMA: Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

SUPERVISOR TÉCNICO: Q. F. B. Citlali Vázquez Martínez

SUSTENTANTE: José Oswaldo Núñez Moreno

Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mi mamá por siempre mostrarme su apoyo incondicional, darme todas las herramientas que necesité para crecer y convertirme en lo que soy ahora, quien es mi principal soporte y motivación para salir adelante. Cada logro mío es también suyo.

Gracias a mi hermano, quien siempre me apoya en todo momento de la vida que lo necesite, agradezco por ser también un amigo en quien puedo confiar que siempre tendrá buenos consejos y para quien siempre querré lo mejor y quien al igual que mi mamá, fue una inspiración y un ejemplo de superación.

Gracias a mi sobrinos, Andrea y Ángel, en quienes veo una pequeña versión de mí que siempre podrán contar conmigo y por quienes trato de ser un ejemplo ya que me motivan a ser mejor persona cada día en todos los aspectos.

Gracias a mi abuelita Conchita, quien siempre creyó en mí y en todo momento encontró la manera de hacérmelo saber para motivarme.

Gracias a la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por prepararme para la vida profesional e inspirarme a ser un Químico en Alimentos que actúe siempre de manera ética y con amor por su vocación y país.

Gracias a todos mis amigos, pero especialmente a Omar, por su amistad tan sincera a lo largo de todos estos años, por todas las aventuras que pasamos juntos en el camino a ser unos profesionistas y por ser una persona que sé que siempre estará en mi vida dándome consejos.

Gracias a Jessica FL, quien en poco tiempo me ha enseñado una nueva manera de amar y de ver la vida; quien me desafía a ser una mejor persona y de quien estoy muy orgulloso. Todo mi amor y cariño para ti.

A la Dra. Emma Saavedra y al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por darme todas las facilidades para realizar este proyecto.

A Citlali y a mis sinodales por darme sus observaciones para hacer de este proyecto el mejor posible y quienes con su experiencia enriquecieron este trabajo.

Esta tesis se realizó con recursos financieros de los donativos de CONACyT 272941 y 282663 otorgados a la Dra. Emma Saavedra.

Se agradece al CONACyT el haber otorgado beca como ayudante de investigador SNI 3 (CVU 893570, expediente 16086).

Abreviaturas

γEC: gama-glutamylcisteína	IC₅₀: concentración del compuesto que inhibe en un 50% el crecimiento
γECS: gama-glutamylcisteína sintetasa	LIT: infusión de hígado-triptosa
μ: Constante de velocidad de crecimiento celular	n: número de generaciones de una población
AdoMetDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa	NaBH₄: borohidruro de sodio
APx: ascorbato peroxidasa	NADP: dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
ATP: trifosfato de adenosina	NADPH: dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina
Bnz: benzimidazol (N-bencil-2-nitroimidazol-1-acetamida)	Nfx: nifurtimox (N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazin-4-il)-1(5-nitro-2-furil)metanimina)
Cat: catalasa	NO•: óxido nítrico
Cys: cisteína	O₂^{•-}: anión superóxido
DHA: dehidroascorbato	OH⁻: ion hidroxilo
DHFR: dihidrofolato reductasa	OMS: Organización Mundial de la Salud
DL₅₀: concentración del compuesto a la que disminuye la viabilidad en un 50%	ONOO⁻: peroxinitrito
DNA: ácido desoxirribonucleico	PCA: ácido perclórico
ERNs: especies reactivas del nitrógeno	PTR: pteridina reductasa
EROs: especies reactivas del oxígeno	Put: putrescina
G: Tiempo de generación celular	R-NO₂[•]: anión radical nitro
Glu: glutamato	SeGPxs: glutatión peroxidasa dependientes de selenio
Gly: glicina	SOD: superóxido dismutasa
GPxA: glutatión peroxidasa A	Spd: espermidina
GPxB: glutatión peroxidasa B	SpdS: espermidina sintasa
GPxs: glutatión peroxidasa	T(SH)₂: tripanotión (N ¹ , N ⁸ -bis(glutathionil)espermidina)
GR: glutatión reductasa	TAQ: 2,4,6-triaminquinazolina
GS: glutatión sintetasa	THF: tetrahidrofolato
GSH: glutatión (L-γ-glutamyl-L-cisteinilglicina)	TryR: tripanotión reductasa
GSSH: disulfuro de glutatión	TryS: tripanotión sintetasa
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	TS₂: disulfuro de tripanotión
HO•: radical hidroxilo	TXN: triparedoxina
HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficiencia	TXNPx: triparedoxina peroxidasa

Resumen

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es endémica de América y es causada por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Debido a la alta tasa de migración de personas infectadas con el protozoo, en las últimas décadas se han reportado casos de infección en Estados Unidos de América, Canadá, países europeos y del Pacífico Occidental; principalmente por la transmisión horizontal, transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos. La Organización Mundial de la Salud catalogó a esta enfermedad dentro de las 13 enfermedades infecciosas olvidadas y desatendidas. En la actualidad hay entre 6 y 7 millones de infectados por el parásito y causa cerca de 12 mil muertes anuales.

La infección por *T. cruzi* presenta dos fases, la aguda y la crónica. La primera es asintomática en el 70% de los casos y dura de 4 – 8 semanas después de la infección inicial. La fase crónica es una infección latente que presenta sintomatologías durante los 20 a 30 años posteriores a la infección. Los medicamentos que actualmente se utilizan para el tratamiento de la enfermedad son el benznidazol (Bnz; N-bencil-2-nitroimidazol-1-acetamida) y el nifurtimox (Nfx; 1,1 dióxido de 4[(5-nitrofurfurilideno) amino]-3-metiltiomorfolino). Estos fármacos son efectivos únicamente en la fase aguda de la infección y son altamente tóxicos para el paciente, por lo que frecuentemente se suspende el tratamiento; además, son poco efectivos para el tratamiento de pacientes con infección crónica. Por lo anterior, es necesario desarrollar nuevos fármacos antichagásicos, así como dilucidar los principales mecanismos de acción de estos compuestos.

Los compuestos heterocíclicos como las quinazolininas tienen una gran importancia en la clínica debido a su amplio espectro de propiedades biológicas y actividades antibacteriana, antifúngica, anticonvulsiva, antiinflamatoria, anti-VIH, anticancerosa y analgésica, entre otras. Así mismo, algunos compuestos derivados de esta molécula se han reportado como agentes potenciales con actividad tripanocida.

En esta tesis se evaluó el efecto parasiticida de la molécula N⁶-(bencil)-2, 4, 6-triaminquinazolina y nueve compuestos derivados de ésta en epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro para identificar si alguno tiene efecto tripanocida a menores concentraciones que los fármacos de uso clínico. Así mismo, se investigó el posible modo de acción de aquellos compuestos con actividad tripanocida.

Para lo cual, se procedió como primera instancia a la caracterización de la cepa de *T. cruzi* y determinación de parámetros de crecimiento celular (n), tiempo de generación (G) y constante de velocidad (μ). Posteriormente, se realizó el cribado de los compuestos a evaluar exponiendo los cultivos de la cepa caracterizada a diferentes concentraciones de los compuestos experimentales; fue necesario que los cultivos estuvieran en un intervalo de concentración de parásitos entre 2.8×10^6 y 3.2×10^6 parásitos/mL para posteriormente exponerse a concentraciones entre 0 y 100 μ M, incubándose durante 24h a 28 °C y determinando la concentración de parásitos viables por conteo en cámara de Neubauer y calculando un primer valor de IC₅₀.

Se identificaron los compuestos con una mayor inhibición del crecimiento de parásitos (compuestos 3b, 3c, 3d, Audi 4b y Audi 4d), para los cuales se realizó una evaluación a concentraciones en un intervalo particular según el comportamiento observado, obteniendo así un valor de IC₅₀ más confiable para cada compuesto, así mismo, se realizó la exposición de parásitos a los fármacos utilizados en clínica para posterior comparación con los compuestos experimentales, obteniéndose que algunos compuestos son igual de eficientes que el Bnz y el Nfx y notando algunas características de los sustituyentes del compuesto base que parecieran ser necesarias para que los compuestos tengan actividad tripanocida.

Para los dos compuestos con mayor inhibición en el crecimiento del parásito (compuestos 3b y Audi 4d) y el compuesto referencia (3a), se decidió evaluar mediante HPLC los metabolitos del sistema antioxidante del parásito como el T(SH)₂ (Tripanotión [N¹-N⁸-bis{glutathionil}espermidina]), el metabolito responsable de combatir contra el estrés oxidante en *T. cruzi*, así como de Cys

(cisteína) y GSH (glutathión [L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina]), metabolitos involucrados en la síntesis de T(SH)₂; con lo cual se quiso conocer si el efecto provocado por estos compuestos es debido a alguna afectación de esta vía antioxidante. Encontrándose una aparente afectación de la vía antioxidante del parásito con los compuestos 3a, 3b y Audi 4d, con un posible efecto adicional de los compuestos 3b y Audi 4d en la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1.2 Biología de <i>T. cruzi</i>	1
1.2 Ciclo de vida del parásito	3
1.3 Enfermedad de Chagas	4
1.3.1 Enfermedad de Chagas en México	5
1.4 Formas de transmisión de la tripanosomiasis	7
1.5 Fases de la enfermedad	8
1.6 Tratamiento de la enfermedad de Chagas	10
1.7 Mecanismo de acción del Benznidazol y Nifurtimox	11
1.8 Sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i>	13
1.9 Síntesis y consumo de tripanotión T(SH)₂	15
2. ANTECEDENTES	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivo particular	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 Síntesis de los compuestos.....	21
5.2 Determinación de la concentración de los compuestos derivados de quinazolina.....	21
5.3 Caracterización del crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	23
5.4 Cribado de los compuestos experimentales.....	23
5.5 Procesamiento de los parásitos para la cuantificación de metabolitos tioles y cantidad de proteína celular.....	24
5.6 Determinación de metabolitos tioles por HPLC	25
6. RESULTADOS	25
6.1 Caracterización del crecimiento de la cepa Querétaro de <i>T. cruzi</i>	25
6.2 Efecto del Bnz y Nfx sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	27
6.3 Efecto de los derivados de quinazolina sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	27

6.4 Efecto de los derivados en el contenido de tioles antioxidantes	32
7.1 Potencial antichagásico	34
7.2 Posible modo de acción	36
8. CONCLUSIONES	38
9. PERSPECTIVAS	38
10. REFERENCIAS	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trypanosoma cruzi*

La familia *Trypanosomatidae* pertenece al reino *Eukaryota* de la clase *Euglenozoa* y orden *Kinetoplastida*. Todos los miembros de este orden tienen la característica de poseer un organelo llamado kinetoplasto que los define, la cual es una estructura compleja compacta y en forma de red, así como un único flagelo y una mitocondria (Levine et al., 1980). Actualmente se conocen varios géneros de Kinetoplástidos, entre los cuales se encuentran tripanosomas de vida libre (*Proleptomonas*), tripanosomas que parasitan únicamente a los invertebrados (*Crithidia* y *Leptomonas*), parásitos de plantas e invertebrados (*Phytomonas*) y, por último, parásitos de vertebrados e invertebrados (*Trypanosoma* y *Leishmania*), siendo este último grupo aquel en el que podemos encontrar a las especies parásitas del hombre (Cevallos y Hernández, 2004).

Dentro del género *Trypanosoma* encontramos a *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) y *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Estos se caracterizan por utilizar un huésped vertebrado y uno invertebrado para completar su ciclo de vida. *T. cruzi* es un parásito intracelular del hospedero vertebrado responsable de causar la enfermedad de Chagas. Debido a que es endémico de América, también se le conoce como tripanosoma americano (Cevallos y Hernández, 2004).

1.1.2 Biología de *T. cruzi*

T. cruzi presenta tres estadios morfológicos durante su ciclo de vida: epimastigote, amastigote y tripomastigote (Fig.1). Estas formas se diferencian entre sí por la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo, así como por la presencia o no de una membrana ondulante (Cevallos y Hernández, 2004; Uribarren, 2011).

Epimastigote: Forma proliferante y no infectiva alargada que se encuentra en el intestino del triatómino, mide de 20 a 25 µm. Se caracteriza por tener el

cinetoplasto antes del núcleo, en la parte media del parásito, además el flagelo forma una pequeña membrana ondulante.

Tripomastigote: Forma infectiva alargada que mide entre 12 – 30 μm incluyendo su flagelo, el cual comienza en la parte posterior del parásito y lo recorre formando una membrana ondulante. Así mismo, presenta un cinetoplasto grande y separado del núcleo. Este estadio se encuentra en el intestino posterior del vector y/o en la sangre de mamíferos infectados.

Amastigote: Forma proliferante que prácticamente carece de flagelo, su morfología es redondeada u ovoide y su tamaño oscila entre los 1.5 – 4.0 μm . Infecta únicamente otras células del hospedero, se encuentra únicamente en vertebrados.

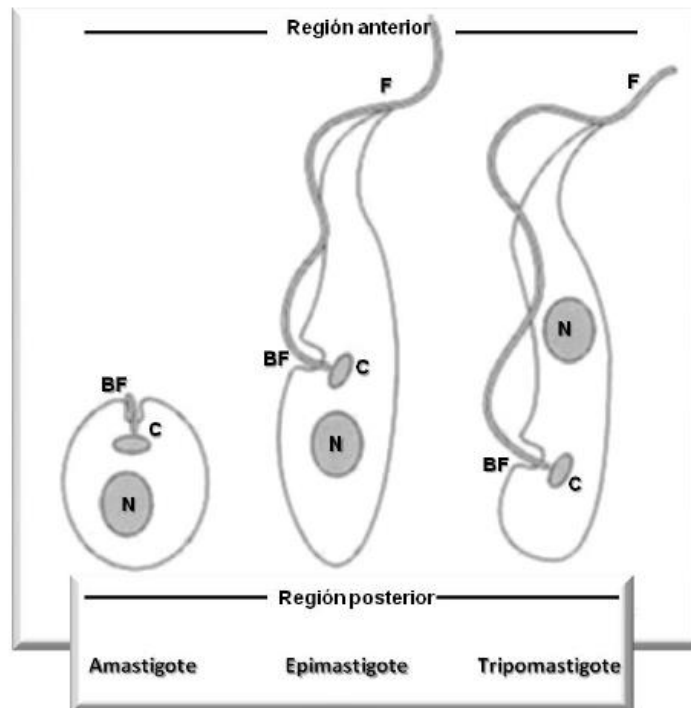


Fig. 1. Estadios que conforman el ciclo biológico de *T. cruzi*.
Organelos característicos: Núcleo (N), cinetoplasto (C), flagelo (F) y bolsa flagelar (BF). (de Souza, 2002).

1.2 Ciclo de vida del parásito

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo, el cual involucra estadios que se diferencian en morfología, fisiología y bioquímica (Stuart et al., 2008). A lo largo de su vida necesita tanto un huésped intermediario invertebrado (insecto hematófago) como un huésped definitivo (el ser humano). El ciclo de vida (Fig. 2) comienza cuando el insecto triatómino se alimenta de la sangre del mamífero y momentos después defeca cerca de la herida provocada por la mordedura (Fig. 2a). Los tripomastigotes metacíclicos que se encuentran en las heces pueden ser introducidos por el mismo triatómino o introducidos por el mamífero cuando instintivamente se rasca, llegando así al torrente sanguíneo (Fig. 2b). El tripomastigote metacíclico infecta células epiteliales, musculares, nerviosas, fibroblastos o macrófagos del hospedero (Maya et al., 2007) donde pierde su flagelo y se transforma en amastigote, el cual se duplica por fisión binaria (Fig. 2c). Después de varios días, los amastigotes intracelulares se transforman en tripomastigotes (Tay-Zavala et al., 2002). La movilidad y la concentración de estos ocasionan que la célula se lise, liberando tripomastigotes al torrente sanguíneo (Fig. 2d), los cuales tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes y de infectar otras células (Fig. 2h).

El ciclo de vida continúa cuando un triatómino que no sea portador de *T. cruzi* se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con el parásito, ingiriendo de esta manera tripomastigotes circulantes (Fig. 2e) y convirtiéndose en vector de transmisión (Tay-Zavala et al. 2002). Una vez dentro del triatómino, el tripomastigote viaja al intestino medio (Fig. 2f), donde se transforma en epimastigote y se replica por fisión binaria. Una vez en el intestino posterior del vector, los epimastigotes continúan hacia el recto, donde se adhieren a la pared celular y se transforman a tripomastigotes metacíclicos (Fig. 2g). El ciclo de transmisión se completa cuando los insectos se alimentan y depositan los parásitos sobre otros mamíferos (Tay-Zavala et al., 2002; Rassi et al., 2010).

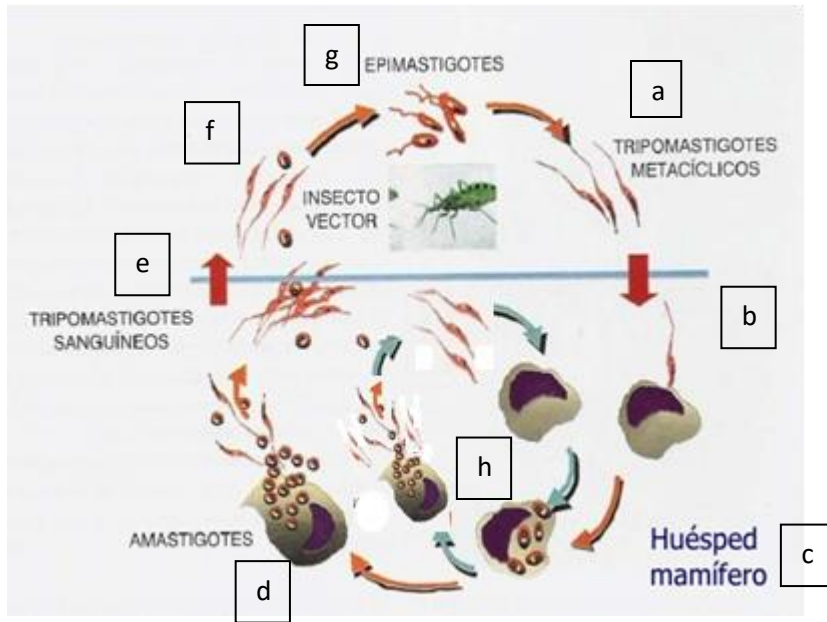


Fig. 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Triatómino se alimenta de sangre del mamífero y defeca cerca de la herida ocasionada (a), tripomastigotes (fase infectiva) entran al torrente sanguíneo (b), infección de células del hospedero, pérdida de flagelo y transformación a amastigote (fase duplicativa) (c), paso de amastigotes a tripomastigotes dentro de la célula infectada y liberación de estos al torrente sanguíneo (d), invasión de células y tejidos adyacentes (h) o triatómino ingiere sangre infectada del mamífero, convirtiéndose en vector de transmisión (e), tripomastigotes viajan al intestino medio del triatómino y se convierten en epimastigotes (fase duplicativa) (f), epimastigotes migran al recto donde se convierten en tripomastigotes (g), alimentación y excreta (depósito de parásitos) sobre algún mamífero, cerrando el ciclo. Imagen modificada de Tagliola, 2010.

1.3 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria causada por el protozoario *T. cruzi*, la cual fue descrita por primera vez en 1909 por el científico Brasileño Carlos Chagas. Esta enfermedad es endémica de 21 países de América por lo que es conocida también con el nombre de tripanosomiasis americana. Sin embargo, el parásito ha llegado a países no endémicos como Canadá, Estados

Unidos de América y algunos países de Europa (España principalmente), Japón y Australia (Carabarin-Lima et al., 2013) debido a la migración de personas infectadas con el parásito de lugares endémicos a otras partes del mundo. La enfermedad provoca entre 6 y 7 millones de infectados, 1000 millones de personas en riesgo de infección y cerca de 12 mil muertes al año (Coura y Albajar, 2010; OMS, 2017) (Fig. 3) <http://beatchagas.org/elchagas.php>.

La tripanosomiasis americana está catalogada como una de las 13 enfermedades infecciosas olvidadas y desatendidas; sin embargo, hay un bajo desarrollo de medicamentos contra esta enfermedad porque afecta principalmente a las personas en las regiones pobres del mundo (Andrews et al., 2014).



Fig. 3. Distribución de la enfermedad de Chagas.
Modificado de <http://beatchagas.org/elchagas.php>

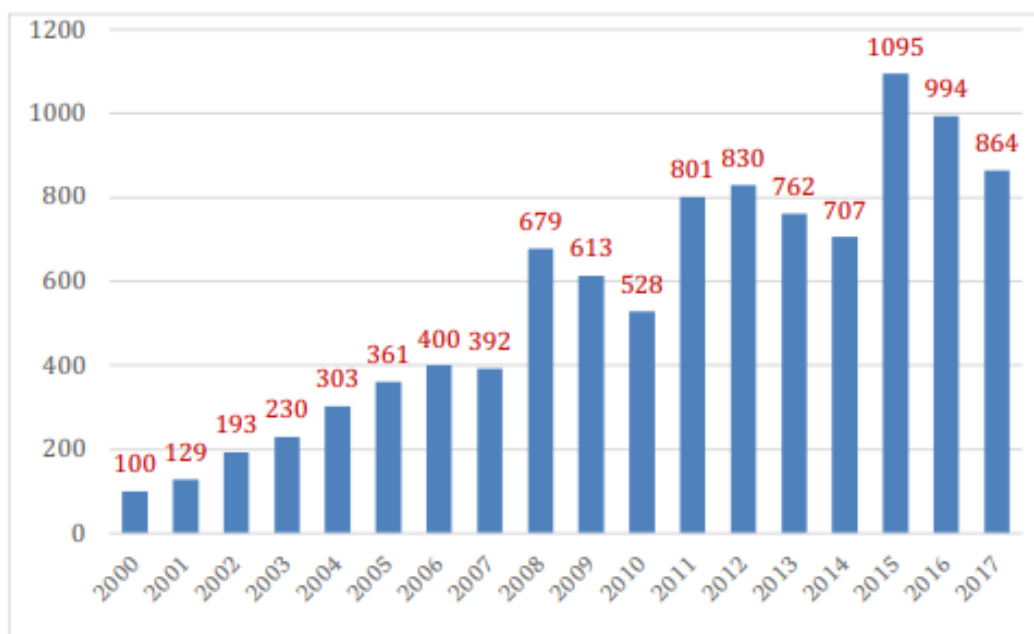
1.3.1 Enfermedad de Chagas en México

En México, la enfermedad de Chagas es un problema grave debido a la extensa diversidad de vectores a lo largo del territorio mexicano (39 especies) (Carabarin-Lima et al., 2013), las principales especies identificadas en México

fueron *Triatoma longipennis* (34%), *Triatoma pallidipennis* (23%) y *Triatoma dimidiata* (29%).

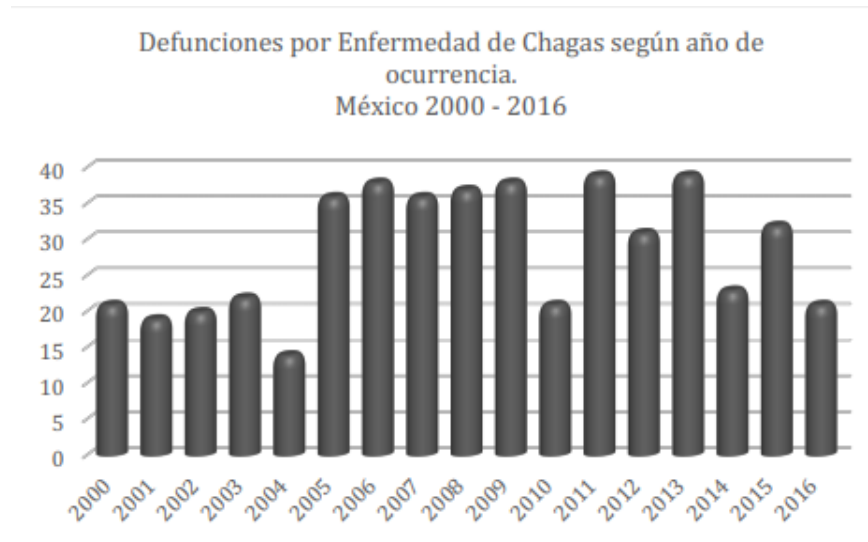
De acuerdo a la OMS, se estima que en el 2006 existían poco más de 1 millón de infectados y cerca de 30 millones en riesgo de contraer la enfermedad (OMS, 2017) (Carabarin-Lima et al., 2013).

Según datos de la Secretaría de Salud (SSA) se ha observado un incremento en la notificación de casos a partir del 2000. En el periodo entre 2000 y 2017 se registraron 9981 casos de Enfermedad de Chagas (agudos y crónicos); en el reporte del cierre del 2017 se informa de 126 casos agudos y 738 casos crónicos que fueron notificados a través del Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología. Se ha observado que el género y grupo de edad más afectado por la enfermedad comprende a varones entre 25 a 44 años y los estados con mayor número de casos reportados fueron Veracruz (17.8 %), Yucatán (10.3 %), Oaxaca (10.5 %), Morelos (9.2 %), Chiapas (8.1 %), Jalisco (5.9 %) y Estado de México (5.2 %).



Perfil epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en México, 2000 – 2017.
Dirección General de Epidemiología, SSA. Anuarios Estadísticos 2000 – 2017

La mortalidad registrada por Enfermedad de Chagas según datos del INEGI entre el 2000 y 2016 fue de 486 muertes (274 masculinos y 213 femeninos) en 18 entidades del país, siendo Oaxaca el estado que encabeza la lista y seguido de Guerrero y Veracruz.



Defunciones por Enfermedad de Chagas en México entre el 2000 y 2016.

<https://www.inegi.org.mx/programas/mortalidad/>

1.4 Formas de transmisión de la tripanosomiasis

Actualmente se sabe que el parásito es transmitido a través del contacto de las heces del insecto del género triatoma con la conjuntiva nasal u oral del hospedero (Tay-zavala et al., 2002), transmitiéndose en más de 150 especies de vertebrados reservorios, entre ellos el ser humano. Existen diversas formas de transmisión del parásito, algunas de las más importantes se dan de las siguientes maneras: (i) la vectorial, a través de heces y orina infectadas de triatóminos portadores del parásito, (ii) las transfusiones sanguíneas en el 5.5% de los casos (Carabarin-Lima et al., 2013), (iii) mediante transmisión vertical congénita entre el 1% y el 12% de los casos (Carlier y Truyens, 2010)], (iv) por accidentes de laboratorio, (v) al manipular animales reservorio del parásito, (vi) la transmisión oral por la ingestión

de alimentos contaminados con el parásito o (vii) la ingesta del mismo insecto (Palace-Berl et al., 2015).

A pesar de que se conocen más de 140 especies de triatóminos, las cuales se dividen en 7 géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma* (Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006)., únicamente 40 especies son vectores del parásito. En México habitan 39 especies de dichos triatóminos, por lo que es considerado como uno de los países con la mayor diversidad de estos. De los cuales, al menos 21 han sido descritos como vectores del parásito, siendo *Triatoma dimidiata* (asociada a cardiopatías) y *Triatoma barberi* (asociada a afecciones de órganos del tracto digestivo) los más importantes. Lo anterior debido a que estos vectores tienen preferencia por habitar en el interior de los domicilios humanos (paredes, pisos, debajo de camas, en ángulos entre pares y pisos) e inclusive entre la ropa, atraídos por la luz (Rassi et al., 2002; Salazar-Schettino et al., 2005; Carabarin-Lima et al., 2013; Murcia et al., 2013).



Triatóminos más importantes. Imagen: Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM

1.5 Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas tiene dos fases claramente diferenciadas (OMS, 2017).

Fase aguda. Se caracteriza por presentar una parasitemia alta poco tiempo después de contraer la infección. Puede aparecer una lesión focal en el sitio de inoculación llamada chagoma, la cual consiste en una zona indurada de eritema e

hinchazón, con inflamación de los ganglios locales. En los casos en los que la mordedura fue cercana a la conjuntiva, hay un edema no doloroso de los párpados y de los tejidos aledaños conocido como signo de Romaña <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/enfermedad.html> (Fig. 4).



Fig. 4. Niño con el signo de Romaña. Foto de WHO/TDR.

El 70% de los pacientes infectados cursan esta fase como asintomáticos (Uribarren 2017) y de haber síntomas, estos se presentan 1 – 2 semanas después de adquirir la infección y son leves y no específicos (OMS 2017). Las manifestaciones clínicas de la fase aguda incluyen fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico (Tay-Zavala et al., 2002; Coura y Borges-Pereira, 2010; OMS, 2017). La parasitemia de la fase aguda desaparece espontáneamente en 4 – 8 semanas, haciendo imposible la detección de la enfermedad al centrarse esta en la búsqueda del parásito en la sangre o mediante pruebas serológicas (Cevallos y Hernández, 2004).

En un pequeño número de pacientes, generalmente niños, se desarrolla afecciones como miocarditis aguda o meningoencefalitis, las cuales pueden ser fatales. Estudios post-mortem han mostrado la presencia de amastigotes en los músculos liso y esquelético, así como en el corazón y en las células gliales del sistema nervioso (Cevallos y Hernández, 2004). Así mismo, la infección congénita con *T. cruzi* puede producir aborto, muerte intrauterina o enfermedad aguda, esta última se puede hacer evidente después de unas semanas del nacimiento, pero en

algunos casos es posible detectarse al momento de nacer (Cevallos y Hernández, 2004).

Fase crónica. Se manifiesta de 10 – 30 años después de la infección inicial; en el 30% de los casos se presentan complicaciones en el corazón y en el 10% en el tracto digestivo (OMS, 2017). Los problemas cardiacos son los más serios y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón, con trastornos de la conducción de la señal eléctrica, lo que produce insuficiencia cardiaca y favorece la producción de tromboembolias. Cabe mencionar que los trastornos cardiacos son los que generalmente se presentan en los pacientes chagásicos sintomáticos en la población mexicana.

La afectación gastrointestinal consiste en la dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) y/o anomalía en los movimientos peristálticos. Estas afecciones se deben muy probablemente a daño local y del sistema neuronal autónomo y es la forma de la enfermedad crónica que se presentan principalmente en países sudamericanos (Cevallos y Hernández, 2004; Coura y Borges-Pereira, 2010; OMS, 2017; Uribarren, 2017).

1.6 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Los fármacos que se utilizan actualmente en la clínica para el tratamiento de la enfermedad son el benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida; Bnz), un derivado del nitroimidazol, y el Nifurtimox (N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazin-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina; Nfx), un derivado del nitrofurano (Coura y Castro, 2002) (Fig. 5a y Fig. 5b). El esquema farmacológico para el caso del Bnz consiste en administrar por vía oral de 5 a 10 mg/Kg de peso corporal/día por un periodo de 30 a 60 días y para el caso del Nfx de 8 a 10 mg/Kg de peso corporal/día por 30 a 120 días (Prata, 2001; Barrett et. al., 2003; Bern et. al., 2007).

El Bnz y Nfx son efectivos únicamente en la fase aguda de la enfermedad, son altamente tóxicos para el paciente y tienen varios efectos secundarios contraproducentes. Los fármacos ocasionan toxicidad sistémica con síntomas

como anorexia, náuseas, vómito, dolor de cabeza, depresión en el sistema nervioso central, síntomas maniacos, convulsiones, vértigo, parestesias, polineuropatías periféricas y/o dermatitis (Kirchhoff, 1996; Prata, 2001). Por estas razones es muy importante desarrollar y/o identificar nuevos fármacos antichagásicos, así como dilucidar los principales mecanismos de acción de los compuestos tripanocidas para entender sus mecanismos de toxicidad. (Wilkinson y Kelly, 2003; Clayton, 2010).

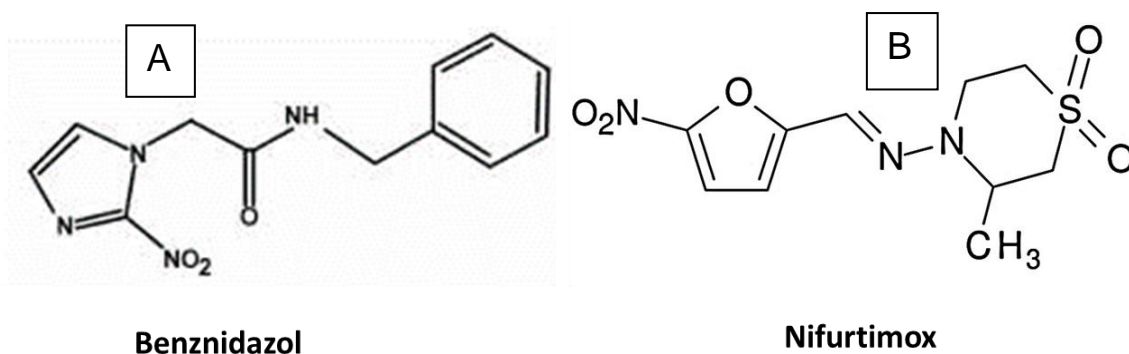


Fig. 5. Estructura de los fármacos utilizados para el tratamiento de tripanosomiasis americana. A) Benznidazol, Bnz; B) Nifurtimox, Nfx

1.7 Mecanismo de acción del Benznidazol y Nifurtimox

El modo de acción del Bnz y Nfx es mediante la formación de metabolitos electrofílicos por la reducción de su grupo nitro por acción de nitroreductasas (Maya et al., 2007); o para el caso del Nfx debido a la formación de radicales libres.

El Bnz es considerado como un pro-fármaco, debido a que es necesario que sea metabolizado por el organismo para que pueda ejercer su efecto tripanocida. Se ha propuesto que dicho efecto no depende de la generación de especies reactivas de oxígeno (Trochine et al., 2014), sino de los metabolitos intermediarios reducidos generados por la nitroreductasa tipo I (del tipo nitroso [R-NO] e hidroxilamina [R-NHOH]). Dichos intermediarios forman el ion nitrenio, que es precursor del compuesto más estable, 4,5-dihidro-4,5-dihidroxi imidazol, el cual se va a ir disociando lentamente, liberando glicoxal (Hall y Wilkinson, 2012), un

metabolito altamente reactivo capaz de unirse a proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y moléculas pequeñas como el glutatión. Estos metabolitos reactivos son tóxicos, resultando en un rápido y localizado efecto tripanocida contra la forma extracelular e intracelular de *T. cruzi*. (Maya et al., 2007; Hall y Wilkinson, 2012; Müller et al., 2018)

Para el caso del Nfx se ha demostrado que su reducción lleva a la formación del anión radical nitro ($R\text{-NO}_2^\bullet$), el cual tiene la capacidad de formar metabolitos electrofílicos, o bien reaccionar con el O_2 provocando la regeneración del Nfx y la formación del anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 6). Este último, por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual en presencia de Fe^{3+} genera más especies reactivas de oxígeno (EROs) como el radical hidroxilo (HO^\bullet), el cual tiene la capacidad de oxidar a proteínas, ácido nucleicos y lípidos (Maya et al., 2007) (Fig. 6). Sin embargo, también se ha determinado que el Nfx se activa por la nitroreductasa tipo I (presente en *T. cruzi*), la cual no genera el radical $R\text{-NO}_2^\bullet$ propuesto en el primer mecanismo, y por consiguiente tampoco genera EROs. De tal manera que este mecanismo tripanocida propone que la reducción del Nfx genera un nitrilo de cadena abierta que junto con metabolitos nitrosos son los responsables de los efectos observados por el Nfx (Hall et al., 2011).

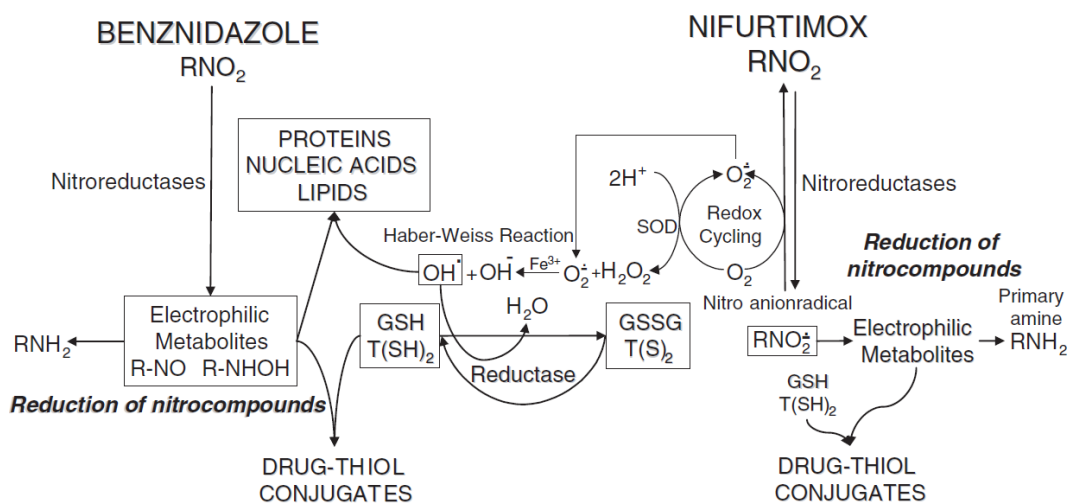


Fig. 6. Esquema de acción propuesto para el Benznidazol y el Nifurtimox en el metabolismo del parásito (Maya et al., 2007).

No obstante, el efecto oxidativo nocivo de estos compuestos resultantes no se limita al parásito, sino que afecta en igual proporción a las células de los mamíferos, lo que lleva al desarrollo de los efectos adversos de estos medicamentos (Urbina, 2010; Bianchi et al., 2015). Por lo tanto, sigue siendo muy importante desarrollar y/o identificar nuevos fármacos antichagásicos, así como dilucidar los principales mecanismos de acción de los compuestos tripanocidas para entender sus mecanismos de toxicidad (Wilkinson y Kelly, 2003; Clayton, 2010). Al respecto, se ha propuesto como estrategia terapéutica inhibir a las enzimas de la defensa antioxidante del parásito.

1.8 Sistema antioxidante de *T. cruzi*

Todos los organismos se encuentran expuestos a especies reactivas de oxígeno (EROs), como son el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) entre otros. También existen las especies reactivas de nitrógeno (ERNs), como el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Hansberg, 2002; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Las EROs y ERNs ocasionan daño al DNA (al reaccionar con bases nitrogenadas y con la desoxirribosa), a las proteínas (causando pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daño en la integridad de proteínas estructurales o irrupción de la regulación de las vías metabólicas) y a los lípidos (lipoperoxidación) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Existen varias diferencias marcadas a nivel genético y bioquímico entre los tripanosomátidos y los mamíferos, algunas de éstas ocurren a nivel del metabolismo antioxidante y de las vías de protección frente al estrés oxidante (Barret et al., 2003). El mecanismo por el que ocurre la infección de las células en mamíferos implica que *T. cruzi* debe sobrevivir y evadir el ambiente altamente

oxidativo generado dentro del fagosoma y de esta forma poder establecer la infección (Piacenza et al., 2012).

El T(SH)₂ (tripanotión) (Fig. 7b) es un conjugado de dos moléculas de GSH (Fig. 7a) unidas covalentemente por una molécula de espermidina (Spd) y es el principal metabolito antioxidante en tripanosomátidos, en lugar del GSH como ocurre en los mamíferos. Si bien ambas moléculas tienen estructuras similares y sus potenciales de reducción son muy parecidos entre sí, siendo -250 mV para el GSH y -242 mV para el T(SH)₂ (Krauth-Siegel et al., 2007), difieren en algunos parámetros que permiten que para *T. cruzi* el T(SH)₂ sea un agente reductor más eficiente, como por ejemplo el pKa, donde existe una diferencia significativa en el valor reportado para el GSH quien posee un valor de pKa mayor (8.7) que su homólogo T(SH)₂ (7.4) (Moutiez et. al., 1994), coincidiendo este último con el pH fisiológico lo que lo hace más reactivo. Además, los ditiolos se ven más favorecidos cinéticamente que los monotioles en la reducción de disulfuros intramoleculares (Dormeyer et al., 2001; Irigoín et al., 2008).

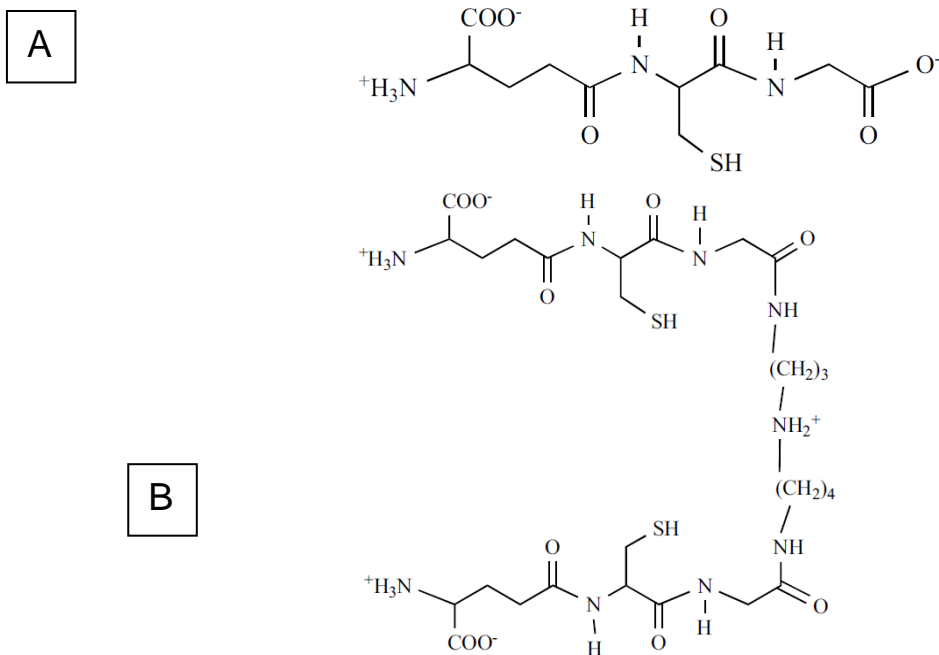


Fig. 7. Estructuras de los principales tioles presentes en *T. cruzi*.
 A) GSH, L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina. (B) T(SH)₂, N¹, N⁸-bis(glutathionil)espermidina.

1.9 Síntesis y consumo de tripanotión T(SH)₂

En la Fig. 8 se muestran las reacciones involucradas en la síntesis de T(SH)₂ en *T. cruzi*, las cuales están estrechamente relacionadas con las vías de síntesis de sus precursores GSH y Spd. El GSH se sintetiza a partir de la acción secuencial de dos enzimas dependientes de ATP, la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ GCS) y la enzima glutatión sintetasa (GS). Como primer paso, la γ GCS es la encargada de catalizar la unión de una molécula de glutamato con una de cisteína dando como producto una molécula de γ -glutamilcisteína (γ EC); posteriormente, la enzima GS incorpora una molécula de glicina (Gly) a la γ EC formada en la reacción anterior, dando paso a la formación de una molécula de GSH, teniendo así el primer metabolito necesario para la formación del T(SH)₂. Respecto a la Spd, se ha postulado que *T. cruzi* es auxótrofo a la Spd debido a la carencia de ornitina descarboxilasa, enzima que es necesaria para la síntesis de putrescina (Put) a partir de ornitina y de su precursor la arginina (Heby et al., 2007). Sin embargo, la Spd también puede sintetizarse a partir de Put y S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC) mediante la acción de la espermidina sintasa (SpdS) (Algranati, 2010; Hasne et al., 2010). Por lo cual, tanto el suministro de Spd y el de otras poliaminas depende del transporte extracelular (Carrillo et al., 2006) y del sintetizado intracelularmente, en el caso de la Spd.

La formación de T(SH)₂ a partir de GSH y Spd ocurre por la unión covalente de dos moléculas de GSH a los grupos NH₂ de la Spd, consumiéndose dos moléculas de ATP en el proceso, al incorporarse el primer GSH el producto formado es la glutationilespermidina y al incorporarse el segundo GSH el producto formado es el T(SH)₂. Estas reacciones están catalizadas por la tripanotión sintetasa (TryS), enzima presente no sólo en *T. cruzi* sino también en otros tripanosomátidos (Oza et al., 2002; Comini et al., 2003).

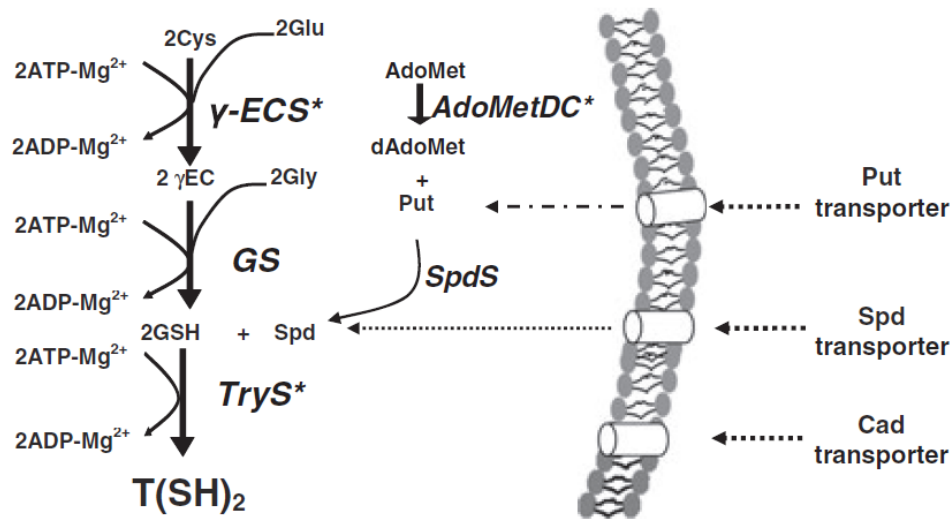


Fig. 8. Vía de síntesis del tripanotión en *T. cruzi*. Olin-Sandoval et al., 2012

T. cruzi utiliza los equivalentes reductores del T(SH)₂ para reducir EROs y ERNs a través del sistema antioxidante enzimático dependiente de este metabolito (Fig. 9). El T(SH)₂ reduce algunas proteínas con grupos tioles reactivos como la triparedoxina (TXN), y ésta a su vez es sustrato de la triparedoxina peroxidasa (TXN Px), la cual es la principal peroxidasa del parásito, y de la enzima glutatión peroxidasa A (GPxA). Estas tres últimas, constituyen el sistema antioxidante de los tripanosomátidos. Posteriormente, la reducción del disulfuro de tripanotión (TS₂), que es la forma oxidada del T(SH)₂, producido durante la reducción de los hidroperóxidos, ocurre por la enzima tripanotión reductasa (TryR) (Fig. 9). La TryR relaciona el metabolismo redox con el NADPH y comparte varias características con la glutatión reductasa (GR) de mamíferos (Ariyanayagam et al., 2003) la cual no está presente en tripanosomátidos. Así como en tripanosomátidos una de las principales es la flavina adenina dinucleótido (FAD) oxidorreductasa, enzima que cumple un rol fundamental en la viabilidad de los tripanosomátidos (Hunter et al., 1992).

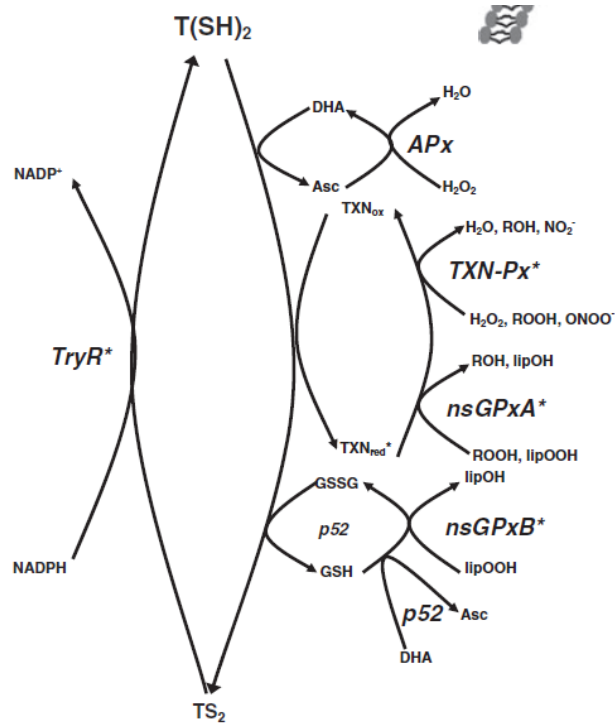


Fig. 9. Vía de reducción de hidropéroxidos dependiente de T(SH)₂. Tomado de Olin-Sandoval et al., 2012.

En la mayoría de los organismos los sistemas GSH/GR y tioredoxina/tioredoxina reductasa (Trx/TxnR) son los encargados de transferir electrones a las peroxirredoxinas, así como también de transferir equivalentes de reducción a la mayoría de las reacciones del metabolismo redox (Holmgren, 1989). En tripanosomátidos, no existen al momento evidencias de la existencia de una GR o de una TrxR (Krauth-Siegel y Comini, 2008); por lo que en un principio se propuso que los parásitos no podían contender con el estrés oxidante (Henderson y Fairlamb, 1987; Carnieri et al., 1993). Posteriormente se descubrió que en los tripanosomátidos existían enzimas antioxidantes específicas como la TryS, TXN y TXNPx, donde las TXNs son mantenidas en estado reducido a expensas de T(SH)₂ (López et al., 2000; Mateo et al, 2008; Arias et al., 2013). Estas TXNs pueden transferir equivalentes de reducción a varios niveles del metabolismo redox en tripanosomátidos, por ejemplo, hacia las peroxirredoxinas (Gommel et al., 1997; Flohe et al., 2002; Reckenfelderbaumer y Krauth-Siegel,

2002), así como a la GPx (Wilkinson et al., 2002). También transfieren electrones a la ribonucleótido reductasa, para la reducción de los ribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, lo que relaciona directamente a esta TXN con la proliferación de los parásitos (Dormeyer et al., 2001).

2. ANTECEDENTES

La búsqueda de moléculas antiparasitarias se ha vuelto importante debido a la aparición de cepas resistentes a los fármacos, la toxicidad de las moléculas conocidas, el aumento de la pobreza y el porcentaje de población afectada (Andrews et al., 2014).

Los compuestos heterocíclicos tienen una gran importancia en la clínica. Dentro de estos, las quinazolininas poseen un amplio espectro de propiedades biológicas que le permiten tener actividad antihipertensiva (Alagarsamy et al., 2008; Jain et al., 2008), antibacteriana (Yang et al., 2017), antifúngica, anticonvulsiva, antiinflamatoria (Chandrika et al., 2008), anti-VIH, antiobesidad (Arienzo et al., 2007), antidepresiva (Mendes da Silva et al., 2008) anticancerosa (Chang et al., 2017; Zhang et al., 2017), prevención de disfunción eréctil (Kim, 2008), analgésica y depresora del SNC (Jatav et al., 2008), por lo que se le considera una molécula farmacófora con estructura privilegiada (Agarwal et al., 2009; Asif, 2014; Jafari et al., 2016)

Mendoza-Martínez et. al. (2015) observaron que algunos compuestos derivados del 2,4,6-triaminquinazolina (TAQ) tienen efecto contra tripomastigotes de *T. cruzi* de las cepas NINOA e INC-5 (habiendo compuestos con IC_{50} de 6.28 ± 0.65 y 40.67 ± 8.96 μ M, respectivamente), teniendo más eficiencia cuando se comparan con el compuesto base TAQ ($IC_{50} = 32.74 \pm 3.4$ y 155 ± 4.78 μ M, respectivamente). Los autores sintetizaron nueve derivados de TAQ basándose en estudios de acoplamiento molecular con la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la pteridina reductasa (PTR). Se eligieron estas enzimas como “sitios blanco” porque tienen importancia en los mecanismos de resistencia a fármacos, esto debido a

que en condiciones de estrés celular o cuando la DHFR (involucrada en la síntesis de DNA) es inhibida, la PTR es capaz de reducir el folato, permitiendo que siga la producción de DNA (Ong et al., 2011). Así mismo, se ha demostrado que las posiciones 2 y 4 en la estructura de quinazolina son fundamentales para el efecto microbiológico, ya que al adicionar grupos amino en estas posiciones se observa un incremento en la actividad biológica y esta se pierde cuando los grupos amino de estas posiciones se sustituyen (Mendoza-Martinez et al., 2015a; 2015b).

Debido a lo anterior, para este trabajo se sintetizaron 10 nuevos compuestos derivados de triaminquinazolininas con un sustituyente N-bencilo en la posición 6 de la TAQ y a este bencilo se le adicionaron diferentes sustituyentes. En esta tesis se evaluó el posible efecto parasiticida de estos nuevos compuestos y se determinó si se incrementa el efecto parasiticida comparado con los fármacos utilizados en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

3. HIPÓTESIS

- Los compuestos experimentales sintetizados a partir de la molécula N⁶-(bencil)-2,4,6-triaminquinazolina tendrán actividad parasiticida en *T. cruzi* cepa Querétaro a valores de IC₅₀ en el rango de los utilizados en la clínica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar el efecto tripanocida de 10 compuestos derivados de quinazolina.

4.2 Objetivo particular

- Determinar el efecto parasiticida de derivados de quinazolina en *T. cruzi* cepa Querétaro.
- Investigar los posibles mecanismos de acción antiparasitaria.

5. METODOLOGÍA

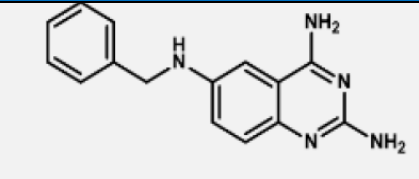
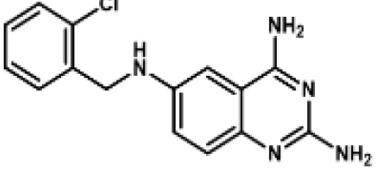
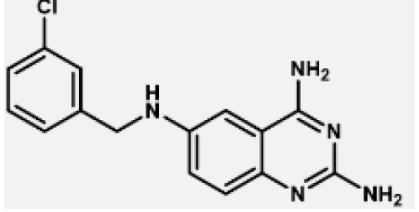
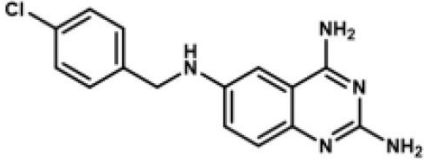
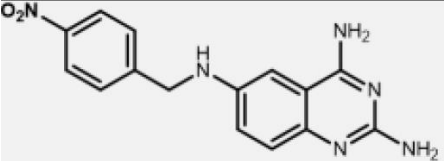
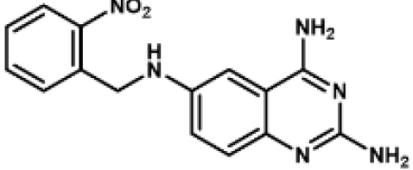
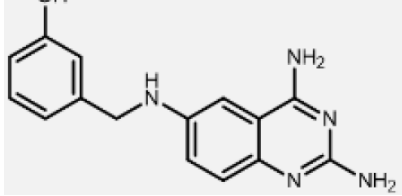
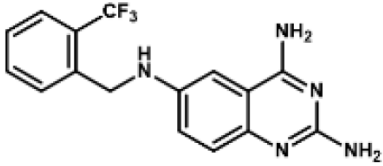

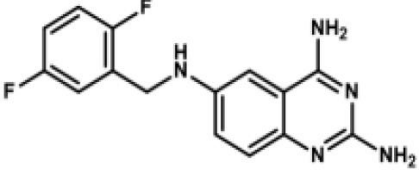
5.1 Síntesis de los compuestos

Los compuestos fueron sintetizados por el Dr. Francisco Hernández Luis, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM. De manera general, la TAQ se sintetizó por métodos previamente descritos y se hizo reaccionar con el benzaldehído, para obtener los productos finales con los sustituyentes deseados. Posteriormente, a los productos finales y a los intermediarios se les midió el punto de fusión y se registró el valor de R_f en una cromatoplaqueta de cromatografía en capa fina. Finalmente se realizó la caracterización estructural de cada compuesto mediante su espectro de infrarrojo (IR), resonancia magnética de hidrógeno (H-RMN) y espectroscopia de masas. Las estructuras se muestran en la Tabla 1.

5.2 Determinación de la concentración de los compuestos derivados de quinazolina

Se determinó la concentración real de las diferentes disoluciones de los compuestos de estudio utilizados para exponer a los parásitos. En celdas de cuarzo con 2 mL de agua MilliQ se adicionaron concentraciones teóricas de los diversos compuestos (0.025 – 0.1 mM). Se realizaron espectros de absorción determinando la absorbancia en un espectrofotómetro (Agilent, USA) a longitudes de onda de 190-1100 nm. Se utilizó la Ley de Lambert-Beer para determinar el coeficiente de extinción molar. Con dicho valor se calculó la concentración real de las disoluciones de los compuestos derivados de N⁶-(bencil)-2,4,6-triaminquinazolina que se utilizaron en los experimentos.

Tabla 1: Estructura de los derivados de quinazolina evaluados

3a	3b
	
3c	3d
	
3g	3l
	
3h	Audi 4b
	
Audi 4i	Audi 4d
	

5.3 Caracterización del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

Se preparó un cultivo de 5 mL de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL en medio de cultivo LIT (Liver Infusion-Tryptose: NaCl 0.4%, KCl 0.04%, glucosa 0.2%, triptosa 0.5%, fosfato de sodio 0.42% e infusión de hígado 0.5%) el cual se suplementó con hemina 0.025 mg/mL, suero fetal bovino 10% (Biowest; México) y una mezcla de antibióticos de estreptomina 100 μ g/mL y penicilina 100 U/mL (Sigma-Aldrich; St, Louis MO, EUA). El cultivo se incubó durante 5 días a 28°C. Se realizó el conteo de parásitos cada 24 h con una cámara de Neubauer y se calculó la concentración de parásitos/mL. Se determinaron los parámetros del crecimiento celular: 1) el número de generaciones (n); 2) el tiempo de generación (G) y 3) la constante de velocidad (μ).

5.4 Cribado de los compuestos experimentales

Se realizó un cribado inicial a concentraciones logarítmicas de cada uno de los derivados de quinazolina. Para cada compuesto se preparó un cultivo de 50 mL a una concentración de 0.7×10^6 parásitos/mL en medio LIT, se incubó por 48 h a 28°C, obteniendo un cultivo de parásitos con un intervalo de concentración de $2.8 \times 10^6 - 3.2 \times 10^6$ parásitos/mL. El cultivo se separó en 8 tubos con 5 mL cada uno y los parásitos se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos (0 – 100 μ M). Los cultivos se incubaron durante 24 h a 28°C y se determinó la concentración de parásitos viables (determinado por su movilidad) por conteo en cámara de Neubauer. Se determinó la IC₅₀ sobre el crecimiento de los epimastigotes graficando el crecimiento relativo vs concentración del compuesto. El crecimiento relativo fue la diferencia entre la concentración final de parásitos después de 24 h de exposición al fármaco menos la concentración de parásitos del día de la exposición. Cada diferencia en la concentración de parásitos se normalizó con respecto a la diferencia de concentración del cultivo control (el

100% correspondió a la concentración de parásitos del cultivo que no se expuso a fármaco).

Posteriormente se evaluaron concentraciones más acotadas para los compuestos donde se observó una inhibición del crecimiento de los parásitos, obteniendo así una IC₅₀ más confiable para estos.

Para efectos de comparación se realizaron experimentos en paralelo y con el mismo protocolo de exposición con los antichagásicos canónicos Bnz (0-27 µM) y Nfx (0-10.5 µM).

5.5 Procesamiento de los parásitos para la cuantificación de metabolitos y cantidad de proteína celular

Se preparó un cultivo de epimastigotes de 50 mL como se describe en la sección 5.4. Posteriormente, se separó el cultivo en 6 tubos con 5 mL en cada uno. Los parásitos se expusieron a las diferentes concentraciones de los compuestos experimentales que tuvieron IC₅₀ similar o por debajo de la concentración que mostró el BNZ. Se incubaron durante 24 h a 28°C, después de lo cual los parásitos se cosecharon para cuantificar la cantidad de proteína celular y el contenido de metabolitos tioletes por HPLC empleando un método por nuestro laboratorio previamente descrito (Vázquez et al., 2017).

La proteína celular se determinó por el método de Lowry (Lowry, 1951). Se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 20 817 x g por 10 min a 4°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se hizo un lavado con 1 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH= 7.4) y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 µL de solución A de Lowry (Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 M) y se guardó a -72°C para su posterior cuantificación. Cuando se requirió, las muestras se descongelaron y se procedió a realizar la cuantificación de proteína.

Para la determinación de los metabolitos tioletes, los cultivos de epimastigotes expuestos a los compuestos se centrifugaron a 4500 x g por 10 min

a 4°C. Los parásitos se lavaron dos veces con PBS y las pastillas celulares se introdujeron en N₂ líquido y se almacenaron a -72°C hasta su cuantificación por HPLC.

5.6 Determinación de metabolitos tioles por HPLC

La determinación de los metabolitos tioles Cys, GSH y T(SH)₂ se realizó mediante HPLC siguiendo la metodología previamente implementada en el laboratorio (Vázquez et al., 2017). Cada muestra se procesó de la siguiente manera justo antes de su inyección en el aparato de HPLC. Al precipitado de parásitos obtenido en la sección 5.5 se le agregaron 90 µL de amortiguador de lisis (HEPES 20 mM, pH=7.4, EDTA 1 mM, KCl 0.15 mM) con DTT 20 mM y se sometió a 3 ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 37°C. El lisado celular se centrifugó a 20 817 x *g* por 10 min a 4°C y el sobrenadante (fracción soluble) se recuperó para concentrarlo con un exceso de borohidruro de sodio (NaBH₄) e incubación en hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo se adicionó ácido perclórico 3% para detener la reacción. La muestra se centrifugó a 20 817 x *g* por 2 min, después el sobrenadante se filtró y se inyectaron 20 µL al HPLC marca Waters (Milford, MA, USA). Los metabolitos se separaron usando una columna de fase reversa de tamaño de partícula de 3 µm y de 30 cm de largo (Altima, Columbia, MD, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización del crecimiento de la cepa Querétaro de *T. cruzi*

El crecimiento de la población de parásitos sigue un comportamiento sigmoide con un crecimiento máximo de 6.5x10⁷ parásitos/mL al séptimo día de cultivo (Fig. 10A). Posteriormente, para observar las fases de crecimiento del parásito se graficó el logaritmo natural de la concentración de parásitos en función del tiempo (Fig. 10B), observándose que la fase exponencial de crecimiento de los

parásitos está en el intervalo del 0 – 4 días de cultivo y posteriormente a este intervalo de tiempo comienza la fase estacionaria.

La parte lineal de la Fig. 10B correspondiente a la fase exponencial de crecimiento del parásito se utilizó para el cálculo de los parámetros del crecimiento celular: número de generaciones (n), tiempo de generación (G) y la constante de velocidad (μ) los cuales se resumen en la Tabla 2.

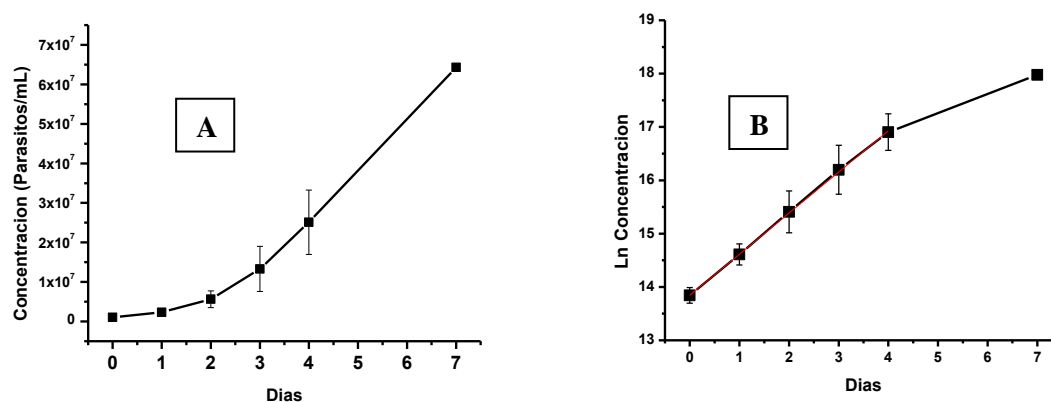


Fig. 10. Crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

A) Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro. Los parásitos se incubaron por 7 días a 28°C en medio LIT. B) Gráfico de linealización de la concentración de parásitos en función del tiempo, de por lo menos 5 muestras biológicas.

Tabla 2: Parámetros de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro.

n	4.5 ± 1.2 generaciones
G	23.4 ± 2.9 h
μ	0.7 ± 0.1 días ⁻¹

Estos parámetros indican que durante el tiempo de incubación de la curva de crecimiento se obtuvieron 4.5 generaciones (n) de epimastigotes, el tiempo de duplicación de los parásitos (G) fue de 23.4 horas y la constante de velocidad de crecimiento fue de 0.7 días⁻¹.

6.2 Efecto del Bnz y Nfx sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

Para poder comparar los resultados con los derivados de quinazolina que se evaluaron en este proyecto y los fármacos utilizados en clínica, se realizó la determinación de la IC_{50} del Bnz y Nfx (Fig. 11) en el protocolo de exposición utilizado y que se describió en la sección 5.4 de métodos. Para el Bnz se obtuvo una $IC_{50} = 13 \pm 2 \mu M$ y para el Nfx un valor de $IC_{50} = 3.5 \pm 0.5 \mu M$.

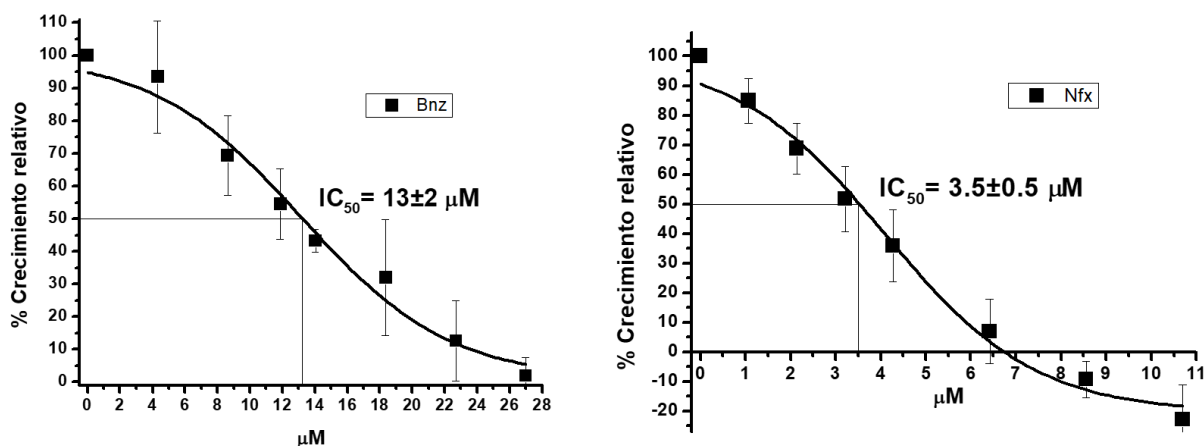


Fig. 11. Efecto de los fármacos utilizados en clínica (Bnz y Nfx) sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro.

Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de 3 exposiciones independientes. La línea representa el ajuste a dosis-respuesta.

6.3 Efecto de los derivados de quinazolina sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

En la Fig. 12 se muestra el patrón dosis-respuesta de diferentes concentraciones de los derivados experimentales de quinazolina sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

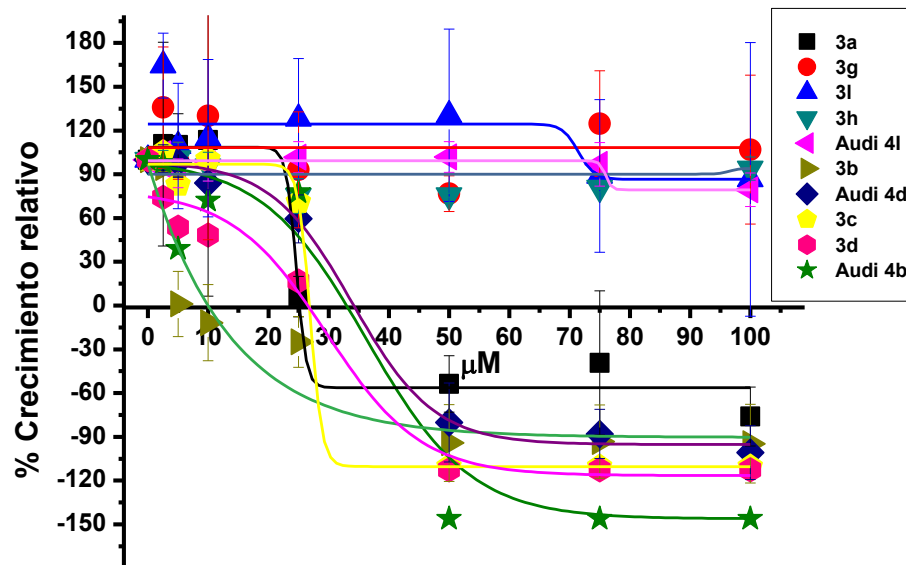


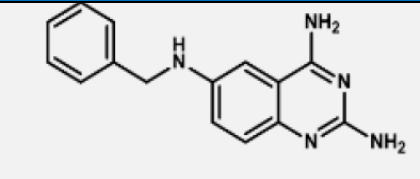
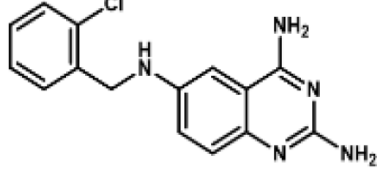
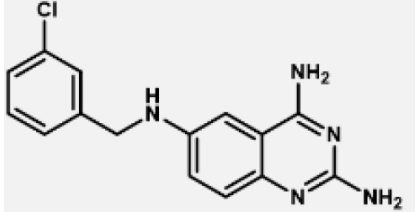
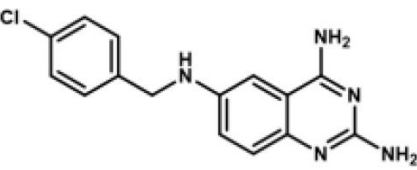
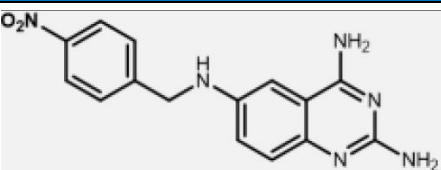
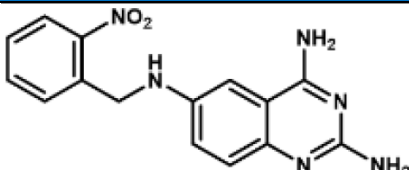
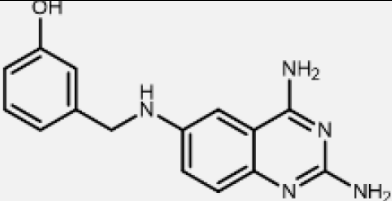
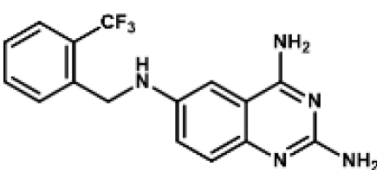
Fig. 12. Tamizaje de los compuestos experimentales.

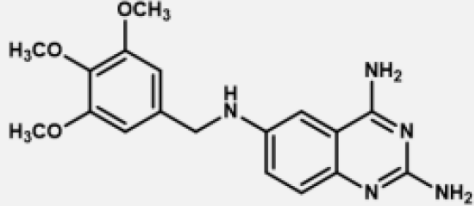
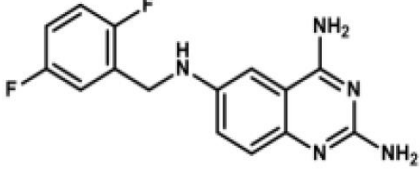
Cada punto de la curva corresponde al promedio (\pm desviación estándar en algunos casos) de 2-3 muestras biológicas. La línea continua corresponde al ajuste realizado a dosis-respuesta.

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos después del tamizaje grueso de los 10 compuestos experimentales derivados de quinazolina. Se incluyen las estructuras de los compuestos para determinar si hay algún patrón de comportamiento inhibitorio.

Se puede observar que, de los 10 compuestos evaluados, únicamente los compuestos 3a (compuesto base), 3b, 3c, 3d, Audi 4b y Audi 4d mostraron efecto citostático sobre *T. cruzi*. Los demás compuestos no tuvieron efecto o con valores de IC_{50} mayores a 100 μ M, lo cual están por arriba de los valores obtenidos para el Bnz y Nfx.

Tabla 3. IC₅₀ de los compuestos experimentales (Tamizaje grueso)

3a	3b
 <p data-bbox="386 571 641 604">IC₅₀= 43.7 ± 4.3 μM</p>	 <p data-bbox="990 571 1226 604">IC₅₀= 5.3 ± 0.4 μM</p>
3c	3d
 <p data-bbox="418 987 609 1020">IC₅₀= 25.5 μM</p>	 <p data-bbox="1015 961 1201 995">IC₅₀= 15.8 μM</p>
3g	3l
 <p data-bbox="422 1360 600 1394">IC₅₀ >100 μM</p>	 <p data-bbox="1006 1369 1209 1402">IC₅₀= 142.5 μM</p>
3h	Audi 4b
 <p data-bbox="422 1774 600 1808">IC₅₀ >100 μM</p>	 <p data-bbox="1015 1753 1201 1787">IC₅₀= 39.4 μM</p>

Audi 4i	Audi 4d
 <p data-bbox="423 520 602 554">$IC_{50} > 100 \mu M$</p>	 <p data-bbox="984 510 1232 543">$IC_{50} = 29.4 \pm 3.1 \mu M$</p>

Para los compuestos 3a, 3b, 3c, 3d, Audi 4b y Audi 4d se hicieron curvas dosis-respuesta (Fig. 13 y Fig. 14) ajustando las concentraciones de exposición en el intervalo de bajas concentraciones para obtener las IC_{50} correctas. En la Tabla 4 se resume las IC_{50} obtenidas al evaluar el efecto citostático de los compuestos evaluados y de los fármacos utilizados en clínica.

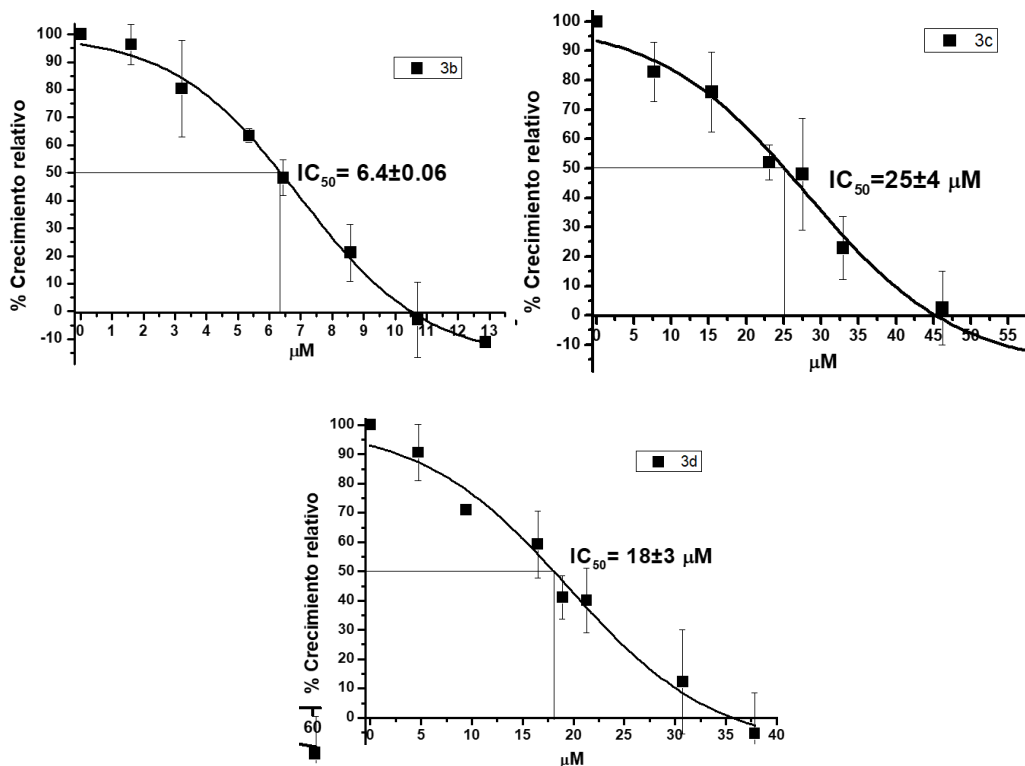


Fig. 13 Efecto de los compuestos clorados (3b, 3c y 3d) en el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro.

Se prepararon cultivos de epimastigotes los cuales se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos experimentales y se determinó la IC₅₀ para cada compuesto evaluado. Se muestra el ajuste realizado a 3 muestras biológicas.

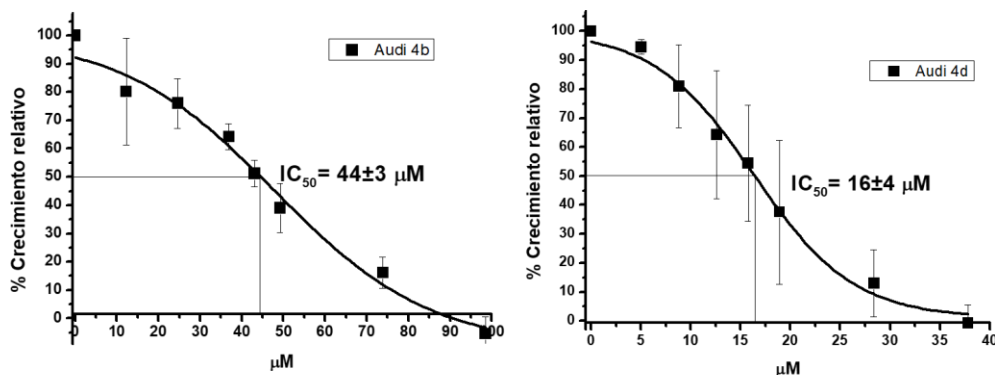


Fig.

14 Efecto de los compuestos fluorados (Audi 4b y Audi 4d) en el crecimiento relativo de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro.

Se prepararon cultivos de epimastigotes, los cuales se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos experimentales y se determinó la IC₅₀ para cada compuesto evaluado. Se muestra el ajuste realizado a 3 muestras biológicas.

Tabla 4. IC₅₀ de los compuestos de interés y fármacos utilizados en clínica.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)
<u>3a (Compuesto base)</u>	<u>44 ± 4</u>
<u>3b</u>	<u>6.4 ± 0.06</u>
3c	25 ± 4
3d	18 ± 3
Audi 4b	44 ± 3
<u>Audi 4d</u>	<u>16 ± 4</u>
Bnz	13 ± 2
Nfx	3.5 ± 0.5

De acuerdo al efecto, los compuestos se pueden clasificar en dos grupos distintos: (i) el primer grupo conformado por los compuestos 3b, 3c y 3d que comparten la característica de estar cloradas en diferente posición del anillo de benceno unido al grupo amino de la posición seis de la molécula de quinazolina (Fig. 13), y (ii) el segundo grupo conformado por los compuestos Audi 4b y Audi 4d (Fig. 14) que comparten la característica de tener un flúor unido en alguna parte del grupo bencílico del amino seis de la molécula de quinazolina.

A pesar de la similitud estructural de los compuestos de la Fig. 13, el compuesto 3b fue el que tuvo el valor de IC_{50} más bajo ($6.4 \pm 0.06 \mu M$) y menor que el Bnz ($13 \pm 2 \mu M$), mientras que los compuestos 3c ($25 \pm 4 \mu M$) y 3d ($18 \pm 3 \mu M$) estuvieron en el mismo intervalo que el canónico.

Dentro de los compuestos con sustituyente flúor de la Fig. 14, el compuesto Audi 4d tuvo una IC_{50} de $16 \pm 4 \mu M$, similar al del Bnz, y menor que el de su homólogo fluorado Audi 4b con IC_{50} de $44 \pm 3 \mu M$.

A pesar de que algunos de los compuestos tuvieron IC_{50} en el mismo intervalo que el Bnz, se decidió seguir estudiándolos por si tienen menor toxicidad que el Bnz.

6.4 Efecto de los derivados en el contenido de tioles antioxidantes

En la siguiente fase del proyecto, los epimastigotes se expusieron a los compuestos 3b, Audi 4d (los compuestos con menor IC_{50}) y el compuesto 3a (compuesto referencia) y se determinaron los metabolitos tioles Cys, GSH y T(SH)₂ para determinar si los compuestos afectaban el sistema antioxidante del parásito (Fig. 15) como un posible modo de toxicidad de los compuestos.

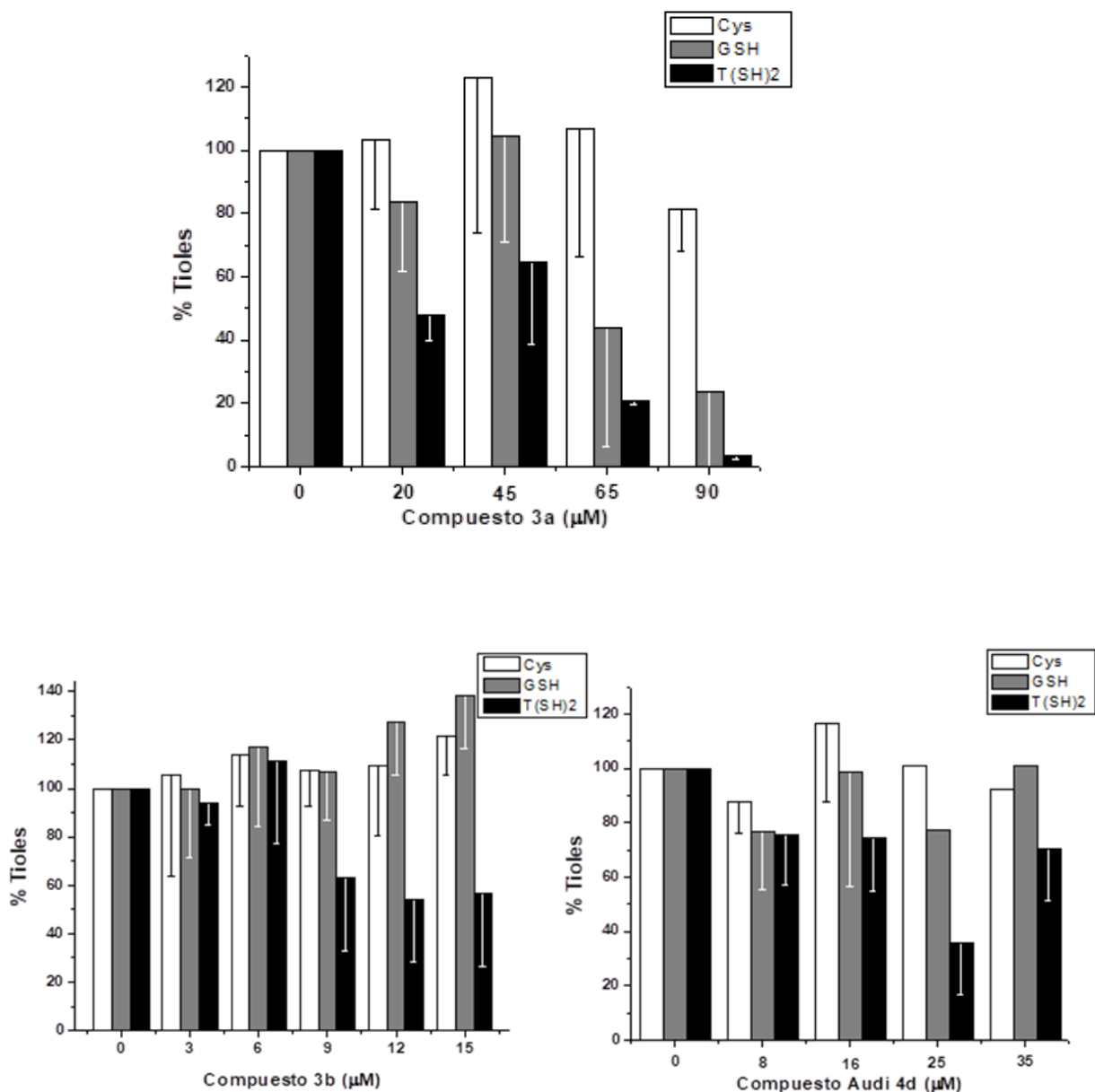


Fig. 15. Contenido de tioles en parásitos expuestos a diferentes concentraciones de los derivados.
 Los epimastigotes se expusieron por 24 h a las concentraciones indicadas de los compuestos y se determinó el contenido de tioles por HPLC donde el 100% corresponde a (nmol tiol/mg prot celular). Los datos representan 5 muestras biológicas.

Se observó que en el compuesto base 3a la poza de Cys se mantiene constante en todas las concentraciones evaluadas, mientras que el GSH se mantiene constante hasta el valor de la IC_{50} ($44 \pm 4 \mu M$) y progresivamente decrece llegando a una disminución del 80% en la última concentración evaluada. El

T(SH)₂ disminuyó drásticamente en un 60% desde 20 μM y a concentraciones superiores a la IC₅₀ (65 y 90 μM) las pozas se redujeron drásticamente hasta que se depletan.

Para el compuesto 3b se observó que las pozas de Cys y GSH se mantienen constantes a lo largo de todas las concentraciones evaluadas (0-16 μM), mientras que el T(SH)₂ disminuye en un 40% a concentraciones mayores a la IC₅₀ (6.4±0.06 μM).

Para el compuesto Audi 4d los niveles de Cys, GSH y T(SH)₂ se mantienen relativamente constantes en todas las concentraciones evaluadas excepto a 25 μM donde hay una disminución reproducible en el T(SH)₂ de un 70%.

7. DISCUSIÓN

7.1 Potencial antichagásico

Se evaluaron 10 compuestos derivados del N⁶-(bencil)-2,4,6-triaminquinazolina, molécula a la cual se le realizaron diversas sustituciones en diferentes posiciones del anillo bencílico. Dentro de los compuestos sintetizados, se encuentran algunos con grupos alquilantes (Cl⁻ y F⁻) y otros con grupos funcionales NO₂, sustituyente presente en los compuestos actualmente utilizados en clínica Bnz y Nfx.

Los compuestos con sustituyentes alquilantes fueron los que tuvieron efecto contra el parásito a concentraciones similares o menores que el Bnz. Los compuestos clorados 3b, 3c, 3d y los fluorados Audi 4b y Audi 4d tuvieron actividad citostática con valores de IC₅₀ entre 6.4 - 44 μM. El efecto puede deberse a que los sustituyentes alquilantes provocan daños en el DNA e interfieren en la replicación celular, esto mediante la formación de enlaces covalentes que afectan bases nitrogenadas (Benedí y Gómez, 2006).

Los compuestos 3b, 3c y 3d comparten la característica de que son clorados en las posiciones orto, meta y para del anillo bencílico unido a la TAQ, respectivamente. Sin embargo, los valores de IC_{50} fueron diferentes entre sí, siendo tres veces menor para el compuesto 3b, en comparación con los otros dos. Al tener todos los compuestos las mismas dimensiones, no se puede considerar que el tamaño sea un factor que intervenga en el valor de IC_{50} . Por lo tanto, se puede proponer que la sustitución del grupo funcional en diferente posición del anillo favorece la eficacia de la molécula, ya que podría repercutir en efectos como solubilidad, internalización a la célula, capacidad para ser metabolizado, etc., ya que la actividad de un compuesto está íntimamente relacionada con su estructura y una modificación de esta implica cambios en el efecto que pudieran tener al ser ya una molécula distinta (Gennaro, 2003). Por lo tanto, el sustituyente en la posición orto del compuesto 3b es el que presenta una mayor actividad citostática con una IC_{50} en el rango del Nfx ($IC_{50}= 3.5\pm 0.5 \mu M$) y menor que el Bnz ($IC_{50}= 13\pm 2 \mu M$).

Por otro lado, los compuestos Audi 4d y Audi 4b comparten la característica de que ambos son fluorados, pero en diferente posición en el anillo bencílico unido a la TAQ, en posiciones orto-meta y orto, respectivamente. Nuevamente se obtuvieron valores de IC_{50} diferentes para cada compuesto, siendo el compuesto Audi 4d con el sustituyente en la posición orto el que tuvo efecto 2.8 veces más potente en comparación con el compuesto Audi 4b. De esta manera, podemos observar que el derivado que tenía el grupo flúor en la posición orto del anillo bencílico fue el que tuvo menor IC_{50} en comparación con su homólogo. Este resultado correlaciona con los resultados obtenidos para los compuestos clorados, en los que el derivado con sustituyente en esta posición fue el que presentó mayor actividad citostática.

Comparando con el compuesto base 3a se observa que los compuestos experimentales presentaron mayor actividad contra *T. cruzi*, demostrando que las sustituciones por grupos alquilantes en el anillo bencílico que está unido al amino

seis de la molécula de 2,4,6-triaminquinazolina aumentan casi hasta siete veces la actividad citostática con respecto al compuesto base.

Por otro lado, las moléculas de Bnz y Nfx poseen en su estructura un grupo funcional NO_2^- , el cual tiene la capacidad de formar ERO o ERN debido a su activación por nitroreductasas del parásito, lo que ocasiona estrés oxidante; por lo cual, se pensó que aquellos compuestos experimentales que tuvieran este sustituyente en su estructura (compuestos 3g y 3l) tendrían el mismo efecto. Sin embargo, no ocurrió de esta manera ya que los compuestos tuvieron IC_{50} mayores a $100 \mu\text{M}$. Esta falta de efecto parasiticida podría deberse a que el grupo nitro es un sustituyente más grande y además tiene una carga negativa deslocalizada que podría interactuar; lo que nos permitiría pensar que además de ser necesario un sustituyente alquilante en la posición orto del anillo bencílico también es importante que este sustituyente sea pequeño y sin cargas negativas deslocalizadas.

En este trabajo se identificaron cinco compuestos que tuvieron un efecto citostático similar o en el mismo intervalo de concentraciones que los utilizados en la clínica. Debido a que algunos otros derivados de quinazolininas ya han demostrado tener diferentes usos clínicos y una extensa variedad de propiedades (Yang. et. al., 2017) y tomando en cuenta las limitaciones y contraindicaciones dermatológicas, hematológicas y neuronales del Bnz y Nfx (Werner, 2008) convierten a los derivados de quinazolinina identificados en este trabajo como compuestos potenciales para sustituir a los fármacos tripanocidas actualmente utilizados en clínica. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar sus efectos tóxicos en los tripomastigotes y amastigotes, que son las formas infectivas en el hospedero humano, así como en células humanas en cultivo o en modelos animales.

7.2 Posible modo de acción

Por otro lado, se evaluaron las pozas de tioles de los parásitos expuestos a los compuestos 3a, 3b y Audi 4d con el propósito de determinar si en el efecto citostático de estos compuestos estaba involucrada la vía antioxidante de *T. cruzi*. De manera interesante, el compuesto base 3a tiene efecto sobre el metabolismo antioxidante de *T. cruzi*, ya que los niveles de T(SH)₂ disminuyeron en un 40% a la concentración de su IC₅₀ y se reducen casi en su totalidad a concentraciones mayores. Esta disminución en el T(SH)₂, podría deberse a que el parásito utilizó este metabolito para contender con el estrés oxidante provocado por este compuesto de estudio y desintoxicar a la célula.

En el caso del compuesto 3b, los niveles de Cys y GSH se mantuvieron constantes y el T(SH)₂ disminuyó en un 50% a 15 µM, esto es un indicativo de que si bien este compuesto afecta el sistema antioxidante del parásito al observarse una disminución en los niveles de T(SH)₂, este metabolito no disminuye por completo como sí ocurre con el compuesto 3a. Por lo tanto, el efecto citostático observado del compuesto 3b podría deberse a algún efecto adicional, posiblemente la síntesis de pirimidinas o inhibiendo la dihidrofolato reductasa (DHFR) ya que uno de los sitios de acción reportado para las quinazolininas es la inhibición de dicha enzima (Mendoza-Martínez et. al., 2015a; Aroonsi. et. al., 2016). La DHFR está implicada en la producción de tetrahidrofolato, el cual es un cofactor esencial en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Mendoza-Martínez. et. al., 2015a; Javeriana, 2016).

Por último, el comportamiento de los tioles en la célula en presencia del compuesto Audi 4d hace pensar que éste causa estrés oxidante al igual que el compuesto 3b. Sin embargo, al no haber un desbalance en los niveles de T(SH)₂ podría suponerse que un efecto tripanocida adicional es debido a alguna afectación relacionada con la síntesis de DNA de *T. cruzi*, por lo que se tendrán que realizar otros ensayos para discernir el mecanismo de acción de este compuesto.

Es importante mencionar que para los compuestos 3a y Audi 4d a concentraciones de 20 µM aproximadamente, se presenta una disminución de las

pozas de T(SH)₂, por lo que se podría pensar que esta concentración es a la que se alcanza un efecto en la vía antioxidante de *T. cruzi*. Este efecto no se observa en la medición de tioles del compuesto 3b debido a que es más potente que los otros compuestos y tiene la IC₅₀ más baja, por lo que no se alcanza dicha concentración.

Se demostró que los compuestos 3b y Audi 4d son mejores que el compuesto base 3a, teniendo un efecto en el metabolismo antioxidante de *T. cruzi* afectando el T(SH)₂. Y para el caso del GSH, los niveles no disminuyen más del 20% para los compuestos 3b y Audi 4d por lo que el efecto pareciera ser únicamente en el T(SH)₂, una característica importante ya que los mamíferos no dependemos de este metabolito para combatir con el estrés oxidante.

8. CONCLUSIONES

- Un sustituyente F⁻ o Cl⁻ en la posición orto del anillo bencílico unido a la molécula de N⁶-(bencil)-2,4,6-triaminquinazolina parece ser importante para tener fármacos con efecto tripanocida ya que aumentan casi hasta siete veces la actividad citostática con respecto al compuesto base 3a.
- Los compuestos experimentales 3b y Audi 4d evaluados demostraron ser igual de eficientes que los utilizados en clínica.
- El compuesto 3a parece afectar el metabolismo antioxidante de *T. cruzi* cepa Querétaro.
- El efecto tripanocida del compuesto 3b y Audi 4d parece deberse a la generación de estrés oxidante y posiblemente a una afectación a nivel de la síntesis de ADN.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la citotoxicidad de los derivados de quinazolina en células humanas.

- Dilucidar alguno de los posibles mecanismos de acción de los derivados de quinazolina evaluados.

10. REFERENCIAS

1. Agarwal, K. C., Sharma, V., Shakya, N., y Gupta, S. (2009). Design and synthesis of novel substituted quinazoline derivatives as antileishmanial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(18), 5474-5477. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.07.081
2. Alagarsamy, V., Solomon, V. R., Murugan, M., Sankaranarayanan, R., Periyasamy, P., Deepa, R., & Anandkumar, T. D. (2008). Synthesis of 3-(2-pyridyl)-2substituted-quinazolin-4(3H)-ones as new analgesic and anti-inflammatory agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 62(7), 454-461.
3. Algranati, I. D. (2010). Polyamine metabolism in *Trypanosoma cruzi*: studies on the expression and regulation of heterologous genes involved in polyamine biosynthesis. *Amino Acids*, 38(2), 645-651. doi: 10.1007/s00726-009-0425-6
4. Alphey, M. S., Leonard, G. A., Gourley, D. G., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., y Hunter, W. N. (1999). The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* trypanothione. *J Biol Chem*, 274(36), 25613-25622.
5. Andrews, K. T., Fisher, G., y Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 4(2), 95-111. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.02.002
6. Arias, D. G.; Marquez, V. E.; Cabeza, M. S.; Iglesias, A. A. y Guerrero, S. A. (2013). Glutathione metabolism in protozoan parasites: making the difference. En *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*. (Labrou, N. y Fliemetakis, E., ed) Nova Science Publishers Nueva York. USA.
7. Arienzo, R., Cramp, S., Dyke, H. J., Lockey, P. M., Norman, D., Roach, A. G., Smith, P., Wong, M., y Wren, S. P. (2007). Quinazoline and benzimidazole MCH-1R antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(5), 1403-1407.
8. Ariyanayagam, M. R.; Oza, S. L.; Mehlert, A. y Fairlamb, A. H. (2003). Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **278** (30):27612-27619.
9. Aroonsri, A., Akinola, O., Posayapisit, N., Songsungthong, W., Uthaipibull, C., Kamchonwongpaisan, S., Gbotosho, G. O., Yuthavong, Y., y Shaw, P. J. (2016). Identifying antimalarial compounds targeting dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFRS) by chemogenomic profiling. *Int J Parasitol*, 46(8), 527-535. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.04.002
10. Asif, M. (2014). Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *Int J Med Chem*, (2014), 395637. doi: 10.1155/2014/395637
11. Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L. E. Jr., Fornaciari, G., y Allison, M. (2004). A

- 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), 2034-2039. doi: 10.1073/pnas.0307312101
12. Augustyns, K., Amssoms, K., Yamani, A., Rajan, P. K., y Haemers, A. (2001). Trypanothione as a target in the design of antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Curr Pharm Des*, 7(12), 1117-1141.
 13. Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., y Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet (01406736)*, 362(9394), 1469-1480.
 14. Benedí, J., y Gómez del Río, MA. (2006) Fármacos antineoplásicos. *Formación Continuada*, 20(2), 60-64.
 15. Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Rassi, A., Jr., Marin-Neto, J. A., Dantas, R. O., Maguire, J. H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L. V., Gilman, R. H., Reyes, P. A., Salvatella, R., y Moore, A. C. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*, 298(18), 2171-2181. doi: 10.1001/jama.298.18.2171
 16. Bianchi, F., Cucunuba, Z., Guhl, F., Gonzalez, N. L., Freilij, H., Nicholls, R. S., Ramírez, J. D., Montilla, M., Flores, A. C., Rosas, F., Saavedra, V., y Silva, N. (2015). Follow-up of an asymptomatic Chagas disease population of children after treatment with nifurtimox (Lampit) in a sylvatic endemic transmission area of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(2), e0003465. doi: 10.1371/journal.pntd.0003465
 17. Carabarin-Lima, A., Gonzalez-Vazquez, M. C., Rodriguez-Morales, O., Baylon Pacheco, L., Rosales-Encina, J. L., Reyes-Lopez, P. A., y Arce-Fonseca, M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta Trop*, 127(2), 126-135. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.04.007
 18. Cárdenas-Rodríguez, N., y Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: Aspectos básicos. *Educación química*, 12(2), 164-173.
 19. Carlier, Y., y Truyens, C. (2010). Maternal-Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. In J. Telleria y M. Tibayrenc (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (pp. 539-581): Elsevier.
 20. Carnieri, E. G., Moreno, S. N., y Docampo, R. (1993). Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol Biochem Parasitol*, 61(1), 79-86.
 21. Carrillo, C.; Canepa, G. E.; Algranati, I. D. y Pereira, C. A. (2006). Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 344 (3):936-940.
 22. Castro, H., y Tomás, A. M. (2008). Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1593-1606. doi:10.1089/ars.2008.2050

23. CDC. (2016). Enfermedad de Chagas. Recuperado el 20 de diciembre de 2019 de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/enfermedad.html>
24. Cavalli, A., Lizzi, F., Bongarzone, S., Brun, R., Luise Krauth-Siegel, R., y Bolognesi, M. L. (2009). Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(11),3031-3035. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.04.060
25. Cevallos, A. M., y Hernández, R. (2004). *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). En E. Martinez y J. C. Martinez (Eds.), *Microbios en línea: Departamento Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.*
26. Chandrika, P. M., Yakaiah, T., Rao, A. R., Narsaiah, B., Reddy, N. C., Sridhar, V., y Rao, J. V. (2008). Synthesis of novel 4,6-disubstituted quinazoline derivatives, their anti-inflammatory and anti-cancer activity (cytotoxic) against U937 leukemia cell lines. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 43(4), 846-852.
27. Chang, J., Ren, H., Zhao, M., Chong, Y., Zhao, W., He, Y., & ... Qi, C. (2017). Development of a series of novel 4-anilinoquinazoline derivatives possessing quinazoline skeleton: Design, synthesis, EGFR kinase inhibitory efficacy, and evaluation of anticancer activities in vitro. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 138, 669-688. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.005
28. Clayton, J. (2010). Chagas disease 101. *Nature*, 465(7301), S4-5. doi: 10.1038/nature09220
29. Comini, M.; Menge, U. y Flohe, L. (2003). Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem* 384 (4):653-656.
30. Coura, J. R., y Albajar, P. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(7301), S6-7. doi: 10.1038/nature09221
31. Coura, J. R., y Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*, 115(1-2), 5-13. doi:10.1016/j.actatropica.2010.03.008
32. Coura, J. R., y de Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(1), 3-24.
33. Cruz-Reyes, A., y Pickering-Lopez, J. M. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(4), 345-354.
34. De Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*, 1(1), 3.

35. Fairlamb, A. H., y Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*, 46, 695-729. doi:10.1146/annurev.mi.46.100192.003403
36. Flohe, L.; Steinert, P.; Hecht, H. J. y Hofmann, B. (2002). Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. *Methods Enzymol* 347:244-258.
37. Gennaro, A. R. (2003) *Remington: Farmacia* (ed. 20) Buenos Aires: Médica Panamericana.
38. Gommel, D. U.; Nogoceke, E.; Morr, M.; Kiess, M.; Kalisz, H. M. y Flohe, L. (1997). Catalytic characteristics of tryparedoxin. *Eur J Biochem* 248 (3):913-918.
39. Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Yockteng, R., Cardenas-Arroyo, F., Fornaciari, G., y Aufderheide, A. C. (1999). Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol*, 108(4), 401-407.
40. Hall, B. S., Bot, C., y Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem*, 286(15), 13088-13095. doi: 10.1074/jbc.M111.230847
41. Hall, B. S., y Wilkinson, S. R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(1), 115-123. doi: 10.1128/AAC.05135-11
42. Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, XXVI, 19-54.
43. Hasne, M. P., Coppens, I., Soysa, R., y Ullman, B. (2010). A high-affinity putrescine cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*, 76(1), 78-91. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07081.x
44. Henderson, G. B., y Fairlamb, A. H. (1987). Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitol Today*, 3(10), 312-315.
45. Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264 (24):13963-13966.
46. Hunter, W. N.; Bailey, S.; Habash, J.; Harrop, S. J.; Helliwell, J. R.; Aboagye-Kwarteng, T.; Smith, K. y Fairlamb, A. H. (1992). Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *J Mol Biol* 227 (1):322-333.
47. Irigoien, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohe, L., y Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med*, 45(6), 733-742. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.028

48. Jafari, E., Khajouei, M. R., Hassanzadeh, F., Hakimelahi, G. H., y Khodarahmi, G.A. (2016). Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Res Pharm Sci*, 11(1), 1-14.
49. Jain, K. S., Bariwal, J. B., Kathiravan, M. K., Phoujdar, M. S., Sahne, R. S., Chauhan, B. S., Shah, A. K., y Yadav, M. R. (2008). Recent advances in selective alpha1 adrenoreceptor antagonists as antihypertensive agents. *Bioorg Med Chem*, 16(9), 4759-4800. doi: 10.1016/j.bmc.2008.02.091
50. Januel, C., El Hentati, F. Z., Carreras, M., Arthur, J. R., Calzada, C., Lagarde, M., y Vericel, E. (2006). Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*, 1761(10), 1228-1234. doi:10.1016/j.bbali.2006.07.015
51. Jatav, V., Mishra, P., Kashaw, S., y Stables, J. P. (2008). CNS depressant and anticonvulsant activities of some novel 3-[5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2yl]-2-styryl quinazoline-4(3H)-ones. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 43(9), 1945-1954. doi:10.1016/j.ejmech.2007.12.003
52. Javeriana, P. U. (2016). Fluoroquinolonas, Sulfonamidas, Trimetoprim y Antisépticos Urinarios. Obtenido el 26 de enero, 2018, de <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c76.htm>
53. Kamal, A., Reddy, K. L., Devaiah, V., Shankaraiah, N., y Reddy, D. R. (2006). Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the benzodiazepine based privileged structures. *Mini Rev Med Chem*, 6(1), 53-69.
54. Kim, Y. H., Choi, H., Lee, J., Hwang, I., Moon, S. K., Kim, S. J., Lee, H. W., Im, D. S., Lee, S. S., Ahn, S. K., Kim, S. W., Han, C. K., Yoon, J. H., Lee, K. J., y Choi, N. S. (2008). Quinazolines as potent and highly selective PDE5 inhibitors as potential therapeutics for male erectile dysfunction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(23), 6279-6282. doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.108
55. Kirchhoff, L. V. (1996). American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am*, 25(3), 517-533.
56. Krauth-Siegel, R. L., Comini, M. A., y Schlecker, T. (2007). The Trypanothione System. In L. Flohe & J. R. Harris (Eds.), *Peroxiredoxin Systems*. (Vol. 44): Springer, Dordrecht.
57. Krauth-Siegel, R. L. y Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1780 (11):1236-1248.
58. Krauth-Siegel, R. L. y Leroux, A. E. (2012). Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal* 17 (4):583-607.

59. Lopez, J. A.; Carvalho, T. U.; de Souza, W.; Flohé, L.; Guerrero, S. A.; Montemartini, M.; Kalisz, H. M.; Nogoceke, E.; Singh, M.; Alves, M. J. M. y Colli, W. (2000). Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* 28 (5):767-772.
60. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal Of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
61. Mateo, H., Marin, C., Perez-Cordon, G., y Sanchez-Moreno, M. (2008). Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(3), 271-276.
62. Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., y Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146(4), 601-620. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.03.004
63. Mendes da Silva, J. F., Walters, M., Al-Damluji, S., & Ganellin, C. R. (2008). Molecular features of the prazosin molecule required for activation of Transport-P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), 7254-7263. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.037
64. Mendoza-Martinez, C., Correa-Basurto, J., Nieto-Meneses, R., Marquez-Navarro, A., Aguilar-Suarez, R., Montero-Cortes, M. D., Noguera-Torres, B., Suárez-Contreras, E., Galindo-Sevilla, N., Rojas-Rojas, A., Rodríguez-Lezama, A., y Hernandez-Luis, F. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti trypanosomatid and anti-plasmodial agents. *Eur J Med Chem*, 96, 296-307. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.028
65. Mendoza-Martinez, C., Galindo-Sevilla, N., Correa-Basurto, J., Ugalde-Saldivar, V.M., Rodríguez-Delgado, R. G., Hernández-Pineda, J., y Hernández-Luis, F. (2015). Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *Eur J Med Chem*, 92, 314-331. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.12.051
66. Moutiez, M., Meziane-Cherif, D., Aumercier, M., Sergheraert, C. y Tartar, A. (1994). Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chempharm bull* 42 (12).
67. Müller J., García F., Forsyth C. y Sosa-Estani S. (2018). Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. DOI: 10.1080/17512433.2018.1509704
68. Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz-Davila, M. J., Thomas, M. C., Lopez, M. C., y Segovia, M. (2013). Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. *Clin Infect Dis*, 56(4), 496-502. doi: 10.1093/cid/cis910

69. Olin-Sandoval, V., Moreno-Sanchez, R., y Saavedra, E. (2010). Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr Drug Targets*, 11(12), 1614-1630.
70. OMS. (2017). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Recuperado el 02 de enero, 2020, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
71. Ong, H. B., Sienkiewicz, N., Wyllie, S., y Fairlamb, A. H. (2011). Dissecting the metabolic roles of pteridine reductase 1 in *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. *J Biol Chem*, 286(12), 10429-10438. doi:10.1074/jbc.M110.209593
72. Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S. y Fairlamb, A. H. (2002). A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 277 (39):35853-35861.
73. Palace-Berl, F., Mesquita, K., Doria, S., Zingales, B., Rocha, R., Nunes, M., Kleber, A., Alexandre de Azevedo, R., Fernandes, S., Costa, L. (2015) Designing and exploring active N'-[(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients. *European Journal of Medicinal Chemistry* (96) 330-339
74. Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Martinez, A. y Radi, R. (2012). *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxid Redox Signal* 19 (7):723-734.
75. Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, 1(2), 92-100. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2
76. Rassi, A., Jr., Rassi, A., y Marcondes de Rezende, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*, 26(2), 275-291. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.002
77. Rassi, A., Jr., Rassi, A., y Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388-1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
78. Salazar Schettino, P. M., de Haro Arteaga, I., y Cabrera Bravo, M. (2005). Importance of three triatoma vectors of *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *Medicina (B Aires)*, 65(1), 63-69.
79. Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gurtler, R. E.; McKerrow, J.; Reed, S. y Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118 (4):1301-1310.
80. Tay, J., Lara, R., Velasco, O., y Gutierrez, M. (2002). *Parasitología médica* (ed. 7). México: Méndez Editores.
81. Trochine, A., Creek, D. J., Faral-Tello, P., Barrett, M. P., y Robello, C. (2014). Benzimidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi*

revealed by metabolomics. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(5), e2844. doi:10.1371/journal.pntd.0002844

82. Urbina, J. A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115(1-2), 55-68. doi:10.1016/j.actatropica.2009.10.023
83. Uribarren, T. (2017). Enfermedad de Chagas. Recuperado en enero, 2020, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>
84. Vázquez, C., Mejia-Tlachi, M., González-Chávez, Z., Silva, A., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R., y Saavedra, E. (2017). Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters*, 591(23), 3881-3894. doi:10.1002/1873-3468.12904
85. Velasco-Castrejon, O., Valdespino, J., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzman Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutierrez, G., y Sepulveda, J. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. 34(2), 186-196. <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5487/5839>
86. Werner, A. B., Ingrid, H. G., M. Isabel, J. L., Leonor, J. M., Patricia, M. V., Isabel, N. H., & Inés, Z. A. (2008). Guidelines for the Chagas disease: Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease. *Rev Chil Infect*, 25(5), 384-389. doi:10.4067/S0716-10182008000500013
87. Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Taylor, M. C.; Bromley, E. V.; Miles, M. A. y Kelly, J. M. (2002). The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem* 277 (19):17062-17071.
88. Wilkinson, S. R., y Kelly, J. M. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem*, 384(4), 517-525. doi: 10.1515/BC.2003.060.
89. Yang, L.; Ge, S.; Huang, J.; Bao, X. (2017) Synthesis of novel (E)-2-(4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)styryl)-4-(alkyl/arylmethyleneoxy)quinazoline derivatives as antimicrobial agents. *Mol. Divers.* 22(1), 71-82. DOI 10.1007/s11030-017-9792-1
90. Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, J., Chen, L., Zhao, L., Li, B., y Wang, W. (2017). Synthesis and in vitro biological evaluation of novel quinazoline derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 27(7), 1584-1587. doi:10.1016/j.bmcl.2017.02.027