

UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudio químico-biológico de nuevos heterociclos nitrogenados derivados de nitroindazoles, dihidro- β -carbolinas y tetrahidro- β -carbolinas con potenciales propiedades tripanocidas.

TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE PROFESOR DE QUÍMICA CON MENCIÓN
EDUCACIÓN EN TECNOLOGÍA

AUTOR: CAMILA ANDREA TARIFEÑO INOSTROZA

PROFESOR GUÍA: JORGE RODRÍGUEZ BECERRA

PROFESOR GUÍA: DR. CLAUDIO OLEA AZAR

SANTIAGO DE CHILE, DICIEMBRE DE 2020
UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudio químico-biológico de nuevos heterociclos nitrogenados derivados de nitroindazoles, dihidro- β -carbolinas y tetrahidro- β -carbolinas con potenciales propiedades tripanocidas.

TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE PROFESOR DE QUÍMICA CON MENCIÓN
EDUCACION EN TECNOLOGIA

AUTOR: CAMILA ANDREA TARIFEÑO INOSTROZA
PROFESOR GUÍA: DR. JORGE RODRÍGUEZ BECERRA
PROFESOR GUÍA: DR. CLAUDIO OLEA AZAR

SANTIAGO DE CHILE, DICIEMBRE DE 2020
UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – DIRECCION DE INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACIÓN DE TESIS/INVESTIGACIÓN

Título de la tesis, memoria o seminario:

Fecha: de 2020

Facultad: Ciencias Básicas

Departamento: Química

Carrera: Licenciatura en Educación Química y Pedagogía en Química con Mención Educación en Tecnología

Título y/o grado: Profesor de Química con mención Ciencias Naturales

Profesor guía/patrocinante: Dr. Jorge Rodríguez Becerra

Dr. Claudio Olea Azar, Universidad de Chile

AUTORIZACIÓN

Autorizo a través de este documento, la reproducción total o parcial de este trabajo de investigación para fines académicos, su alojamiento y publicación en el repositorio institucional SIBUMCE del Sistema de Biblioteca UMCE.

Camila Andrea Tarifeño Inostroza

Santiago de Chile, diciembre 2020

Dedico esta tesis a:

“Mis padres y hermana, quienes han sido los pilares fundamentales para iniciar, continuar y finalizar esta etapa, gracias por confiar siempre en mí, sin su compañía y apoyo en cada uno de mis pasos no lo habría logrado. Gracias por sus palabras de aliento y por querer desde siempre lo mejor para mí.”

Agradecimientos

A lo largo de mi camino académico en la UMCE, tuve el honor de conocer a personas increíbles, capaces de ayudar en todo momento, de brindar una sonrisa, una palabra de ánimo o un abrazo apretado. Gestos que sin duda contribuyeron a lo que soy hoy.

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia; mis padres, Sandra y David, que lucharon desde muy jóvenes para ofrecernos lo mejor a mi hermana y a mí, y que por fin hoy, ya habiéndonos entregado lo mejor, pueden realizarse ustedes que postergaron mucho tiempo de sus vidas por nosotras. Gracias por la incondicionalidad, los consejos para ser siempre mejores personas, gracias porque a pesar de las adversidades siempre nos enseñaron a recomponernos con una sonrisa, porque la esperanza nunca se pierde, porque siempre hay deparado algo mejor para nosotros, gracias por enseñarnos a luchar, a caer y levantarnos con mucha más valentía y coraje, gracias por su infinito amor. Continuando con mi familia, quiero agradecer a Daniela Tarifeño, mi hermana menor/mayor, quien ha estado presente en todos mis logros y fracasos, quien tuvo el coraje desde pequeña para defenderme de toda persona o situación que me afectara, gracias, hermana, eres una gran persona, una mujer hecha y derecha que me ha acompañado incondicionalmente en todas y que de todas sus particulares y diversas formas me entrega su amor.

Quiero extender mis agradecimientos a quienes me acompañaron desde el primer día en la UMCE, Daniela Núñez y Valentina Domínguez, mis grandes amigas, unas hermosas personas, con las que arreglábamos el mundo cada viaje a nuestras casas en la 506, gracias por las carcajadas, los hermosos momentos de conversaciones infinitas y las prolongadas tardes de estudio. Sin duda ha sido una gran aventura coincidir en nuestros caminos.

Agradezco al profesor Jorge Rodríguez, quien confió en mí para trabajar en esta investigación. Agradezco la enorme paciencia, las palabras de ánimo en momentos difíciles, su apoyo y la gran oportunidad que me brindó para trabajar en PachemLab y aprender diversas cosas que en otra instancia no hubiera aprendido. Gracias a su esposa, la profesora Lizethly Cáceres, por su alegría que llena espacios, porque siempre tuvo un chiste que decir para alegrar el día o dar ánimo. Gracias a ambos por enseñarme mucho de lo que sé y por la oportunidad de hacer ciencia.

Agradezco a los funcionarios y docentes de la UMCE, por todo su trabajo y su enorme entrega, cada uno contribuyendo en mi formación personal y académica.

A Michel, quien me guío durante toda la investigación, me enseñó desde pipetear hasta confeccionar y presentar un póster de congreso. Agradezco la simpleza, la calma y paciencia que tuviste conmigo, agradezco la entrega desinteresada de tus saberes y tú tiempo, y sin duda agradezco tu amistad.

A José, miembro emblemático de PACHEM, quien desinteresadamente me ayudó cada vez que no podía hacer correr un programa, gracias por tu paciencia, tu calma, tu bondad, y por siempre responderme mis mensajes cuando estaba en apuros.

Al profesor Claudio Olea, por facilitarme las instalaciones de su laboratorio para desarrollar esta investigación, por presentarme a personas maravillosas que día a día se esforzaban por terminar sus propios procesos, gracias por su comprensión y su ayuda.

Agradezco a los que estuvieron desde el principio de este desafío, y que ya no están, pero que fueron parte importante de todo lo que fui construyendo y lo que soy actualmente.

Agradezco a aquellos que acaban de llegar, que me animan a seguir desarrollándome y creciendo.

Finalmente agradezco a la vida, por mostrarme el camino, por permitirme levantarme con más fuerza luego de un fracaso y hacerme ver que no hay nada más hermoso que estar frente a estudiantes guiándolos en su propio rumbo.

ABREVIATURAS

β -C: β -carbolinas

6-Ni: 6- nitroindazol

Nfx: Nifurtimox

Bnz: Benznidazol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMF: Dimetilformamida

REE: Resonancia de Espín Electrónico

FN: Fenazina

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

ERO: especies reactivas de oxígeno

ROO•: Radical peroxilo.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

PTBA: Perclorato de tetrabutilamonio.

Epa: Potencial de pico anódico.

Ipa: Corriente de pico anódico.

Ipc: Corriente de pico catódico.

E λ : Potencial de switching.

I λ : Corriente de switching.

CAH: Constante de acoplamiento hiperfino

ÍNDICE TEMÁTICO

ABREVIATURAS.....	7
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 Antecedentes de la enfermedad de Chagas	11
2.2 Aspectos Generales de la Enfermedad de Chagas.....	11
2.2.1 Morfología de <i>T. cruzi</i>	12
2.2.2 Ciclo Biológico de <i>T. cruzi</i>	13
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
4. METODOLOGÍA.....	21
4.1 Materiales y Métodos	21
4.1.4 Estudio de actividad biológica en <i>T.cruzi</i> :	27
Cultivo de epimastigote y ensayos de inhibición del crecimiento	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Estudio electroquímico	29
Estudio de reducción de la serie de 6-Ni utilizando Voltametría cíclica (VC) en medio aprótico.	29
Caracterización de las especies radicalarias generadas de 6-Ni, a través de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).	36
Evaluación de la actividad tripanocida selectiva en <i>T. cruzi</i> , y células de mamífero utilizando la metodología de reducción de MTT.	40
Evaluación de formación de especies reactivas de oxígeno mediante la técnica de medición de ERO.	44
6. CONCLUSIONES	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. ANEXOS	51

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana consiste en una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoarios del tipo *Tripanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La tripanosomiasis americana es endémica en toda América Latina, los parásitos son transmitidos al huésped mamífero por heces y orina del insecto vector conocido comúnmente como “Vinchuca”.

Se estima que entre 6-7 millones de personas, alrededor del mundo, se encuentran infectadas y que entre 65-100 millones están en riesgo de infectarse.

Los medicamentos disponibles son nifurtimox (Nfx) y benznidazol (Bnz), estos son efectivos en la fase aguda de la enfermedad, pero ineficaces en la etapa crónica, además generan diversos efectos adversos en los pacientes.

En esta investigación se llevó a cabo el estudio de heterociclos nitrogenados; derivados de nitroindazoles y β -carbolinas con potenciales propiedades tripanocidas.

Particularmente se estudió el comportamiento electroquímico de los derivados de nitroindazoles a través de voltametría cíclica (VC). Además, se evaluó su capacidad de producir radicales libres por medio de la técnica de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).

La citotoxicidad de derivados de nitroindazoles y β -carbolinas se estudió por medio de pruebas en macrófagos RAW 264.7 y parásitos en sus estados epimastigotes y tripomastigotes (cepa Dm28c), usando el método de reducción de sales de tetrazolio (MTT). El estudio de estrés oxidativo en ambas familias de compuestos se realizó por medio de pruebas de mediciones de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Los estudios electroquímicos por medio de VC y REE, muestran que los derivados de nitroindazoles presentan potencial de reducción mayores que el Nfx que posee un potencial de 0.91 V, hecho que da luces de una posible actividad biológica baja o menor a la del tratamiento actual de la enfermedad.

Con respecto a las pruebas de citotoxicidad a través del método de MTT, se identifica a las β -carbolinas como potenciales tripanocidas, a diferencia de los compuestos derivados de

nitroindazoles que no presentaron actividad alguna en *T. cruzi* estado epimastigote. No obstante, el screening realizado en *T. cruzi* estado tripomastigote muestra resultados reveladores con respecto a la citotoxicidad de estos compuestos, ya que el 75% de ellos poseen una interesante actividad biológica.

Para tener un acercamiento a los posibles mecanismos de acción de los compuestos estudiados se realizó estudios de medición de especies reactivas de oxígeno (ERO) en aquellos derivados de β -C que presentan actividad tripanocida sobre la forma epimastigote del parásito, los cuales dejan ver que la serie de compuestos posee un mecanismo de acción que no involucraría la producción de especies reactivas de oxígeno, exceptuando al compuesto MDP04 que muestra un posible fenómeno de disminución de intensidad de fluorescencia (*quenching*).

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes de la enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis americana, más conocida como la enfermedad de Chagas fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. (Schmidt & Dreger, 2011) Esta enfermedad se encontraba limitada en el continente latinoamericano (América del Sur, América Central y partes de América del Norte). No obstante, se ha propagado a otros continentes producto de la migración de personas infectadas, haciéndose parte de un problema de salud pública y mundial de suma importancia. (Rivas, Cassels, Morello, & Repetto, 1999)

En la actualidad esta enfermedad es endémica en 21 países de América Latina, encontrándose principalmente en su parte continental. Sin embargo, en las últimas décadas se han presentado casos con mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá, países de Europa y Pacífico occidental. (R. Cao et al., 2005; Pérez-Molina & Molina, 2018)

Se estima que entre 6 a 7 millones de personas se encuentran infectadas, la mayoría de ellas en Latinoamérica, unos 100 millones en riesgo de contraer la enfermedad y alrededor de 12.000 muertes al año son producto de la tripanosomiasis. (Rihui Cao et al., 2005b)

En el norte de Chile, entre las regiones de Arica-Parinacota y Coquimbo, la enfermedad tiene una incidencia reportada de 3-11 / 100000 habitantes y una mortalidad de 0.3-0.4 / 100000. Sin embargo, la interrupción de la transmisión del vector primario (*Triatoma infestans*, Figura 1) de las viviendas humanas, informada en 1999, debería modificar la dinámica epidemiológica de esta enfermedad. (Canals, Cáceres, Alvarado, Canals, & Cattán, 2017).

2.2 Aspectos Generales de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es provocada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Su principal forma de transmisión en los países de Sudamérica es a través del insecto vector, se trata de un insecto hematófago capaz de transmitir la infección por medio de sus deyecciones en contacto con heridas en la piel o mucosas. (Bern, Kjos, Yabsley, & Montgomery, 2011; Ferreras González, García Cuartero, Gato Díez, & Ferreras Fernández, 2014) En Chile, se describen dos artrópodos de la subfamilia Triatominae como vectores hematófagos: el vector doméstico *Triatoma infestans* (Figura 1) y especies silvestres del género *Mepraia*,

conocidos comúnmente con el nombre de vinchuca. (Canals et al., 2017) En la actualidad se conoce más de 100 especies de este huésped intermediario en toda América Latina. Además, su transmisión puede ser producto de trasplantes de órganos, transfusiones de sangre, transmisión congénita y accidentes de laboratorio. (Ferrerías González et al., 2014; Filigheddu, Górgolas, & Ramos, 2017)



Figura 1. Ejemplar adulto de Triatoma Infestans.

2.2.1 Morfología de *T. cruzi*

El *T. cruzi* es un protozoo flagelado con una sola mitocondria y pertenece a la familia *Trypanosomatidae*. En su mitocondria contiene cinetoplasto que es la red de ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular correspondiente al genoma mitocondrial del parásito. Posee un ciclo de vida complejo que varía de vector a huésped y según el ambiente en el que éste se encuentre. De acuerdo con esto se pueden identificar tres estados morfológicos: amastigote, epimastigotes y tripomastigotes (Tabla 1 y Figura 2). (Momen, 1999; Souza, 1999).

Tabla 1. Descripción de los estados morfológicos de T. cruzi.

Estado	Descripción
Amastigote	Forma intracelular replicativa no infectiva que se encuentran en las células de mamífero.
Epimastigote	Forma extracelular replicativa no infectiva que está presente en el intestino de los triatomíneos.
Tripomastigote	Forma extracelular, no replicativa e infectiva, que se encuentra en la sangre de los mamíferos, en el intestino posterior de los vectores y en sus deyecciones.



Figura 2. Representación de estados morfológicos de Trypanosoma cruzi.

2.2.2 Ciclo Biológico de *T. cruzi*

El ciclo de vida del *T. cruzi* comienza cuando el vector hematófago se alimenta de la sangre de un mamífero infectado, introduciendo a su intestino anterior el estado tripomastigote del parásito (Figura 3A).

Una vez en el intestino medio del triatomino, el parásito se multiplica en estado epimastigote, y entre 15 y 30 días, en el intestino posterior del insecto, se desarrollan los denominados tripomastigotes metacíclicos infectivos (Figura 3B).

El triatomino ya infectado, se alimenta de la sangre de otro mamífero y realiza sus deposiciones en un lugar cercano a la picadura, mucosas o en una herida ya existente, permitiendo de esta manera la entrada del parásito en su estado infeccioso no replicativo (Figura 3C). El tripomastigote migra a través de los tejidos intersticiales del mamífero hasta encontrar e infectar macrófagos y otras células mononucleadas.

Ya dentro de las células, los tripomastigotes cambian a la forma replicativa no infectiva en el huésped; el estado amastigote.

Este ciclo se repite bajo continuas divisiones. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes capaces de provocar una lisis celular y comenzar nuevamente su ciclo, donde son ingeridos por un nuevo triatomino. (Áñez & Crisante, 2020).

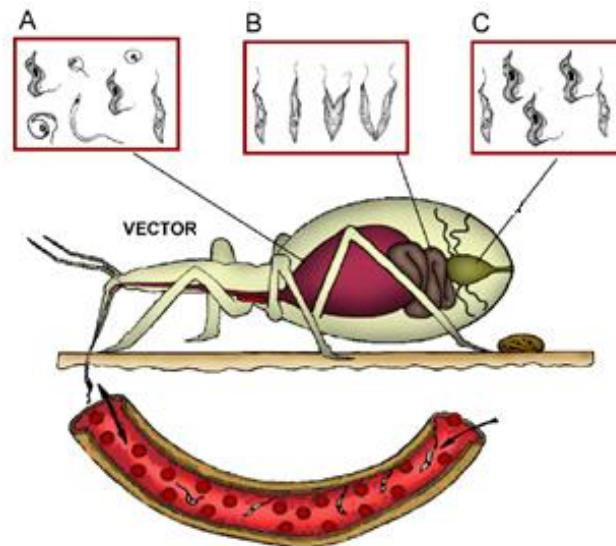


Figura 3. Esquema del ciclo biológico de *T. cruzi*.

2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis se puede caracterizar clínicamente en dos fases: aguda y crónica. En la fase aguda de esta enfermedad el periodo de incubación se prolonga desde los 4 a los 10 días, en esta etapa la mayoría de los pacientes son asintomáticos, no obstante, se desarrollan algunos síntomas dentro de este periodo (Tabla 2). La mayoría de las muertes producidas en esta fase se deben a una insuficiencia cardíaca por miocarditis. (Bern et al., 2011; A. Rassi, de Rezende, Luquetti, & Rassi Jr, 2017) El tratamiento debe iniciarse precozmente para evitar el paso a la fase crónica. (Anis Rassi, Rassi, & Marcondes de Rezende, 2012; Vandermark et al., 2018)

La fase crónica comienza de 2 a 3 meses después de la infección inicial. Gran parte de los casos presenta una forma indeterminada que puede evolucionar a la cardíaca, digestiva, o formas cardiodigestiva después de años o décadas. (Nunes, Dones, Morillo, Encina, & Ribeiro, 2013; A. Rassi et al., 2017) Esta fase se presenta entre 50 y 70% de la población infectada y se caracteriza por ser una etapa con baja parasitemia y elevada cantidad de anticuerpos. Frecuentemente se manifiesta en ausencia de síntomas propios de la enfermedad (Tabla 2) y puede durar más de 30 años. El 30% de pacientes infectados presentan la forma crónica determinada, donde se evidencian síntomas de insuficiencia cardíaca grave que aumenta la tasa de mortalidad en los pacientes infectados con la enfermedad de Chagas. (Pérez-Molina & Molina, 2018; Pুনুকল্লু, Gowda, Khan, Navarro, & Vasavada, 2007)

Tabla 2. *Sintomatología de las diferentes fases de la Trypanosomiasis americana.*

Fase	Síntomas
Aguda	Lesiones cutáneas, fiebre prolongada, malestar general, dolor muscular y articular, somnolencia, calambres, diarrea, edemas, problemas respiratorios, cianosis y coma, aumento del tamaño de hígado, bazo y ganglios linfáticos.
Crónica	Insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas y tromboembolismo venoso o arterial, inflamación crónica, miocitólisis y fibrosis progresiva que compromete las tres capas del corazón, destrucción de células miocárdicas y del sistema excito-conductor (His-Purkinje).

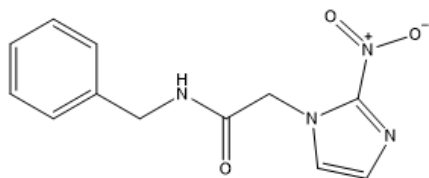
2.4 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Actualmente las drogas utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad son nifurtimox (Lampit®; Baeyer), derivado de nitrofurano, y benznidazol (Rochagan®; Roche), un derivado nitroimidazol (Figura 4), ambas desarrolladas hace más de cuatro décadas. (Maya et al., 2007) No obstante, el tratamiento es insuficiente, ya que estos fármacos causan múltiples efectos secundarios (Tabla 3). Junto con esto, su eficacia disminuye, desde el inicio de la infección, a medida que transcurre el tiempo. (Anis Rassi et al., 2012) Más aun, estas drogas resultan ineficaces en pacientes que presentan la etapa crónica de la enfermedad. (Muschietti, Sülsen, & Martino, 2013) El propósito de este tratamiento es principalmente curar la enfermedad en su fase aguda y evitar daños a los órganos en la fase crónica.

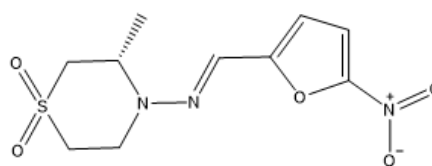
Con base en estos antecedentes, se evidencia la necesidad del urgente del desarrollo de nuevos fármacos más eficaces, menos tóxicos y accesibles a personas de escasos recursos; que son la mayoría de la población infectada. (Alvarez, Niemirowicz, & Cazzulo, 2012) La Tabla 3 resume algunos de los efectos adversos más comunes en el tratamiento con estos medicamentos.

Tabla 3. Efectos secundarios no deseados de fármacos utilizados en el actual tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Benznidazol	Nifurtímox
El efecto adverso más común de este fármaco es una dermatitis alérgica generalizada o localizada, que afecta a alrededor del 20% al 30% de los pacientes y se compone de erupciones eritematosas polimorfas. Otros efectos adversos van desde una neuropatía periférica sensitiva hasta náuseas, vómitos, anorexia, insomnio y pérdida del gusto.	Se postula como generador de estrés oxidativo debido a su capacidad para producir radicales libres de oxígeno y nitrógeno (Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T. et al., 2012). Los síntomas gastrointestinales son los efectos secundarios más comunes, ocurre en aproximadamente un 50% de los pacientes, e incluyen epigastralgia, náuseas, anorexia, vómitos, malestar abdominal. Además, se incluyen síntomas de toxicidad del sistema nervioso central, como insomnio, irritabilidad y desorientación.



N-bencil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida



3-metil-4-(((5-nitrofuran-2-il) metileno) amino) tiomorfolina 1,1-dioxido

Figura 4. Estructuras de fármacos del actual tratamiento para la enfermedad de Chagas; Benznidazol y Nifurtímox. Estos compuestos, Nifurtímox y Benznidazol, no sólo actúan mediante la generación de estrés oxidativo, sino también podrían actuar como inhibidores enzimáticos, en este caso, sobre enzima tripanotión reductasa (TR) que ha mostrado ser un blanco ideal para el diseño de drogas que alteran las defensas del parásito sin interferir en las enzimas del huésped. (da Paixao & da Rocha Pita, 2019). (de Oliveira, Pedrosa, & Filho, 2007; Zacks, Wen, Vyatkina, Bhatia, & Garg, 2005) Los fármacos operan mediante la generación de radicales libres altamente reactivos, o mediante la modificación covalente de moléculas orgánicas generando metabolitos tóxicos en los tejidos mamíferos. (APT B & ZULANTAY A, 2011) La generación de especies radicalarias es producto de la reducción del grupo nitro. (Boiani et al., 2010) Se ha postulado que los radicales libres derivados de Nfx pueden experimentar reciclaje redox con oxígeno y este producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta producción de radicales libres

derivados de oxígeno y metabolitos electrofílicos se enlaza con macromoléculas intracelulares, dañándolas. (Gupta, Wen, & Garg, 2009)

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son generadas continuamente durante varios procesos fisiológicos, tales como: cadena respiratoria, reacciones de inmunización, y metabolismo, jugando un rol importante en regulares funciones celulares. Poseen una función dual en los sistemas biológicos, vale decir, pueden presentar efectos tanto dañinos como beneficiosos. Dentro de los efectos negativos de ERO, podemos encontrar que son mediadores importantes del daño celular, mediante un mecanismo de estrés oxidativo, estando asociados con enfermedades, tales como: problemas cardíacos, hipertensión, diabetes, cáncer, entre otras. Es por esto que los efectos perjudiciales de ERO son balanceados por la acción de antioxidantes no-enzimáticos. (Apt B et al., 2008; Kunrath-Lima et al., 2017; Zacks et al., 2005)

2.4.1 Nitroindazoles y β -carbolinas como potenciales fármacos para la enfermedad de Chagas.

En la actualidad, es conocida la susceptibilidad de *T. cruzi* al estrés oxidativo. Más aun, el tratamiento de la enfermedad, con Nfx y Bnz, ha demostrado cierta efectividad contra *T. cruzi*. Esto debido a que estos compuestos no sólo actuarían mediante la generación de estrés oxidativo, sino también, como inhibidores de la enzima tripanotión reductasa (TR) (Maya et al., 2010)

2.5 Derivados de nitroindazol como agentes antichagásicos

Diversos estudios han mostrado que algunos derivados de nitroindazoles presentan importantes propiedades citotóxicas sobre la forma epimastigote del parásito *T. cruzi* (Rodríguez, Gerpe, et al., 2009).

Las drogas utilizadas como el actual tratamiento contra la enfermedad de Chagas poseen su efecto farmacológico principalmente por la presencia del grupo nitro (-NO₂) en su estructura. Bajo esa consideración es que se continúa sintetizado series de derivados de la estructura 5-nitroindazol con el fin de estudiar la relación entre los diferentes sustituyentes en la estructura y su actividad antichagásica. (Muro et al., 2014) Esta familia de compuestos ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado su actividad antichagásica, actuando bajo un mecanismo que involucraría especies radicalarias generadoras de estrés

oxidativo. (Folch-Cano, Olea-Azar, Arán, & Diaz-Urrutia, 2010; Rodriguez et al., 2009; Rodríguez, Gerpe, et al., 2009) Sin embargo, a pesar de los diversos estudios que reportan el comportamiento de derivados de 5-nitro indazoles como potenciales antichagásicos, no existen estudios que reporten la actividad antichagásica de derivados de 6-nitroindazoles. Al respecto, este trabajo busca estudiar algunos derivados de 6-nitroindazol como potenciales drogas antichagásicas, debido a los antecedentes de las propiedades farmacológicas de los derivados de indazol y a la presencia del grupo nitro en su estructura como especie electroactiva.

2.6 β -carbolinas como agentes antichagásicos

Las β -carbolinas son una familia de alcaloides indólicos que poseen en su estructura un anillo tricíclico plano con diferentes grados de aromaticidad. Estas pueden ser nombradas según su saturación en su anillo piridínico, llamándose β -carbolinas aquellas de miembros totalmente aromatisados. Las parcialmente saturadas son derivadas de 3,4-dihidro- β -carbolinas y las que poseen una saturación completa son conocidas como 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas. (R. Cao, Peng, Wang, & Xu, 2007)

Este tipo de compuestos puede ser sintetizado, y, además, es posible encontrarlas ampliamente en la naturaleza como productos naturales; plantas, insectos, criaturas marinas y mamíferos. (Rihui Cao et al., 2005a; Valdez et al., 2009)

En las últimas décadas, los estudios se han enfocado en la importancia biológica y farmacéutica de esta familia de compuestos. Entre las propiedades farmacológicas reportadas para las β -carbolinas se encuentra su potencial actividad antitumoral, anticonvulsiva, ansiolítica, sedante, antitrombótica, antibacteriana, parasiticida, contra el VIH, entre otras. (Rihui Cao et al., 2005b)

En cuanto a la enfermedad de Chagas, se han evaluado la actividad tripanosomicida *in vitro* de derivados de β -carbolina contra la forma epimastigote de *T. cruzi* pertenecientes a dos cepas diferentes (Tulahuén y LQ) que muestran diferente sensibilidad a Nfx. Los resultados muestran que se observaron diferencias importantes en la susceptibilidad de los parásitos a este tipo de compuestos. La cepa LQ, relativamente nifurtimox resistente, mostró la mayor sensibilidad a las β -carbolinas evaluadas. (Rivas et al., 1999) El mismo estudio, mostró que los derivados de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas evaluados poseen actividades tripanocidas

muy bajas. Por su parte, los derivados de 1,2-dihidro- β -carbolinas exhibieron un considerable poder de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Estos autores, asociaron el poder tripanocida de estas moléculas con de anillos pirinoindólicos insaturados y su estructura plana. Más aun, sostienen que las propiedades que posee esta familia de moléculas varían de acuerdo con la posición de los sustituyentes en su estructura tricíclica. Un grupo metilo en C-1 mejora la capacidad tripanocida debido a un considerable aumento en la lipofilia de la molécula e incluso con un aumento en la interacción específica con un sitio hidrofóbico de la macromolécula objetivo. Una sustitución en C-7 con un grupo metoxilo también contribuye al aumento de la actividad tripanocida, pero si se trata de un grupo hidroxilo como sustituyente, la actividad tiende a disminuir, efecto que puede deberse a la disminución de la lipofilia o la presencia de un grupo hidrofóbico en el sitio de unión donde las β -carbolinas ejercen su acción. (Rivas et al., 1999)

Por otra parte, es conocido que las propiedades antitumorales y antichagásicas se relacionan intrínsecamente. En este sentido, se ha planteado que la presencia de sustituyentes en C-2 y N-9 aumentan en gran medida la actividad antitumoral. La naturaleza de los sustituyentes, especialmente en C-1 y C-3, contribuye significativamente a la disminución de la aguda citotoxicidad de los derivados de β -carbolina. (Shi et al., 2013) Una sustitución en N-9 del esqueleto β -carbolinas con radicales alquilo o bencilo aumentaría su actividad antitumoral y minimizaría su aguda toxicidad, no así su neurotoxicidad. No obstante, derivados con grupos carboxílicos en C-3 muestran una disminución de la toxicidad y neurotoxicidad. (Rihui Cao et al., 2004)

Estudios acerca de la citotoxicidad de derivados de β -carbolinas sugieren que la citotoxicidad de estos derivados ha mejorado con la incorporación de sustituyentes adecuados en C-1 y N-9. La presencia de un grupo metilo en C-1, un grupo pentafluorobenceno en N-9 y un etoxicarbonilo en C-3 han sido una combinación óptima para aumentar las propiedades citotóxicas de estas moléculas. Además de manifestar que la estructura de la β -carbolina, podría ser una base fundamental para el diseño de nuevos fármacos antitumorales y antichagásicos. (Rihui Cao et al., 2005b).

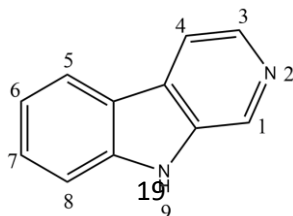


Figura 5. Estructura molecular de β -Carbolina. (Ábrányi-Balogh et al., 2016).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los derivados de 6-nitroindazol: 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo, 3-hidroxi-6-nitro-1H-indazol-1-carboxilato de etilo, 3-hidroxi-1,2-dimetil-6-nitro-1H-indazol-2-onio y 6-nitro-1H-indazol-3-ol poseen una estructura que facilita la formación de especies nitro-anión radicalarias, permitiendo su posible acción tripanocida.

El largo de la cadena alquílica unida al grupo amido de dihidro- β -carbolinas y tetrahidro- β -carbolinas regula la citotoxicidad de éstas β -carbolinas frente a *T. cruzi*.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad tripanocida de heterociclos nitrogenados: derivados nitroindazoles y β -carbolinas en cepas Dm28c de *T. cruzi* en estados epimastigote y tripomastigote.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar el comportamiento electroquímico de la familia de compuestos de nitroindazoles a través de la técnica de voltametría cíclica (VC) en medio aprótico.
- Caracterizar las especies radicalarias generadas de la familia de nitroindazoles en estudio por medio de la técnica espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).
- Evaluar la actividad tripanocida de derivados de nitroindazoles y β -carbolinas, en la forma epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi* mediante la técnica de reducción de sales de tetrazolio (MTT) y obtener IC₅₀ correspondientes.
- Evidenciar la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en sistemas biológicos y evaluar el estrés oxidativo como posible mecanismo de acción de ambas series de compuestos.

4. METODOLOGÍA

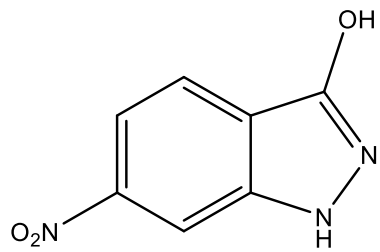
4.1 Materiales y Métodos

4.1.1 Compuestos en estudio

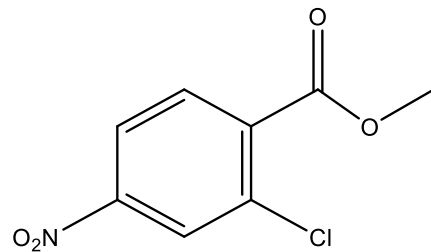
Los derivados de nitroindazol: 6-nitro-1*H*-indazol-3-ol (CM01), 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (CM02), 3-hidroxi-6-nitro-1*H*-indazole-1-carboxilato de etilo (CM03) y 3-hidroxi-1.2.5-1*H*-indazol-2-onio (CM04) fueron suministrados por el laboratorio de investigación Physical & Analytical Chemistry Laboratory (PACHEMLAB), y sintetizados por Riquelme, D. y col. (2015) de acuerdo con los métodos previamente reportados por nuestro grupo de investigación (Castillo, D, (2016)), (Hinojosa, F., (2015)). (Rodríguez, Arán, et al., 2009; Rodríguez, Gerpe, et al., 2009).

La serie de β -carbolinas estudiadas: (*S*)-3-((5-dibencilamonio)pentil)carbamoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP01), (*R*)-3-((5-dibencilamonio)pentil)carbamoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP02), (*S*)-3-((2-(dibencil(metil)amonio)etil)carbamoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP03), (*S*)-3-((2-(dibencil(metil)amonio)etil)carbamoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP04), (*R*)-3-((2-(dibencilamonio)etil)cabamoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP05), (*S*)-*N,N*-dibencil-*N*-metil-9-(2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]índole-3-carboxamido)nonan-1-amino (MDP06), (*R*)-*N,N*-dibencil-*N*-metil-9-(2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]índole-3-carboxamido)nonan-1-amino (MDP07), (*S*)-3-((7-(bencildimetilamonio)heptil)carbamoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP08), (*S*)-3-(dioctilcarbomoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP09), (*R*)-3-(dioctilcarbomoil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io (MDP10), *N,N*-dioctil-9*H*-pirido[3,4-*b*]índole-3-carboxamida (MDP11), proporcionados y sintetizados por (Dal prá, M. & Matteo, 2018).

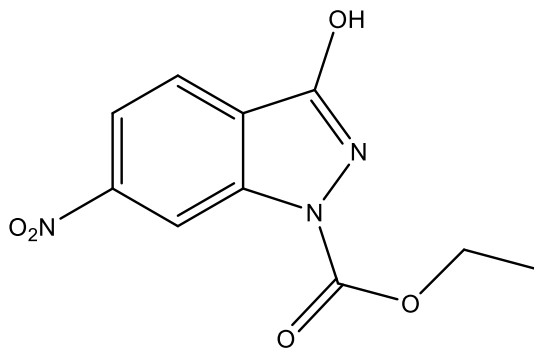
Serie de derivados de Nitroindazol



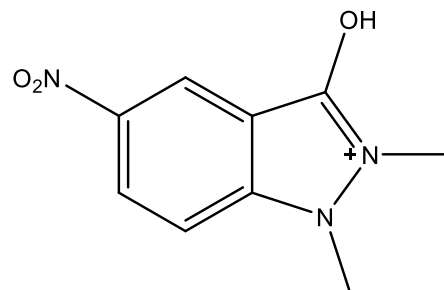
CM01



CM02



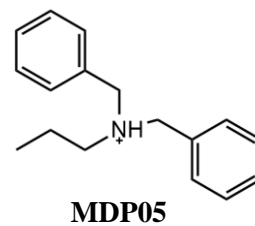
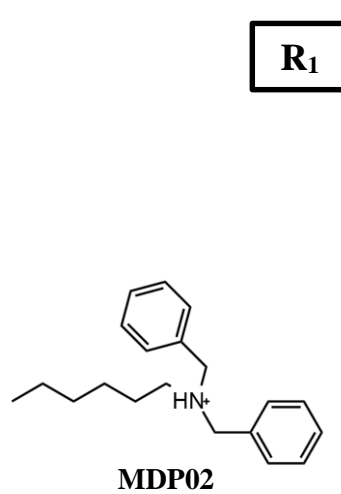
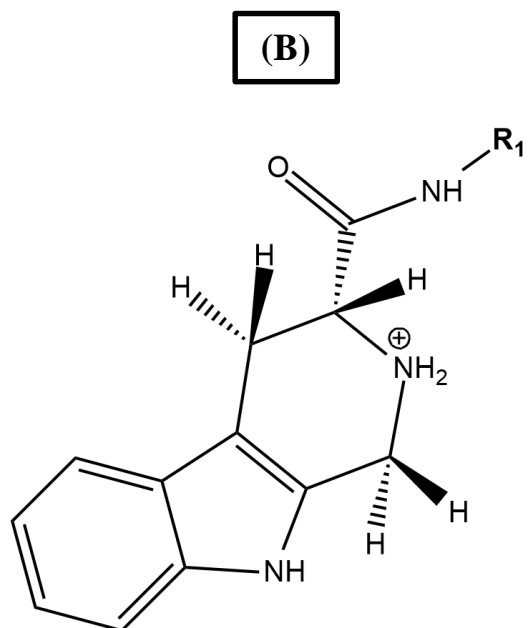
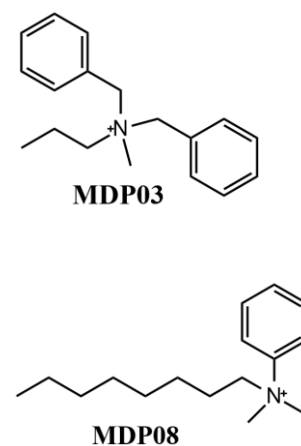
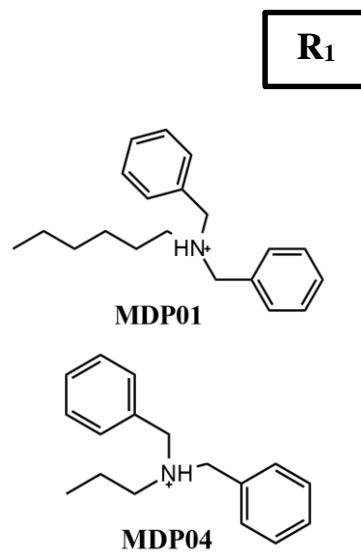
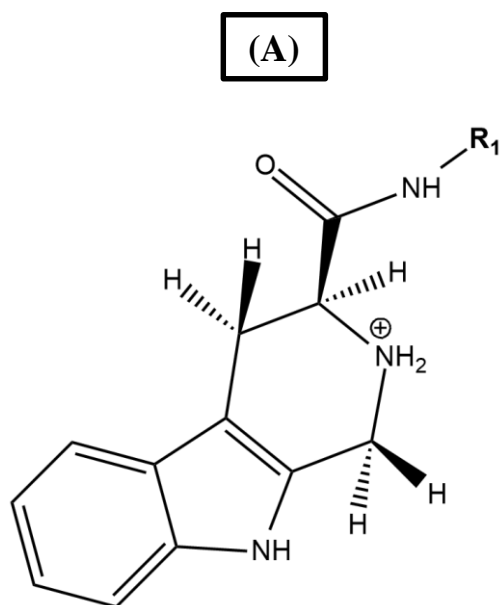
CM03

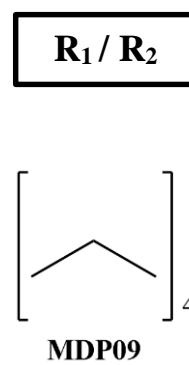
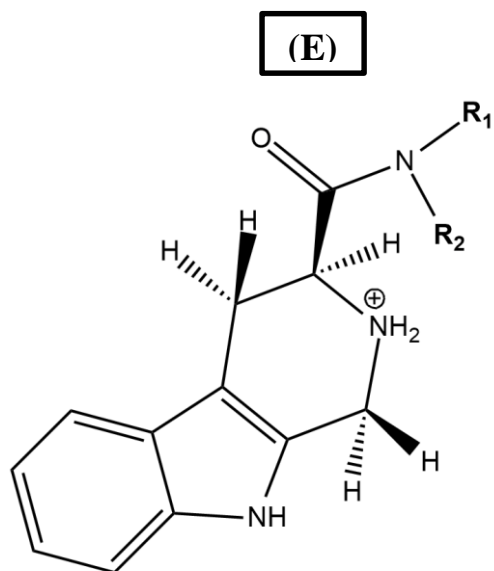
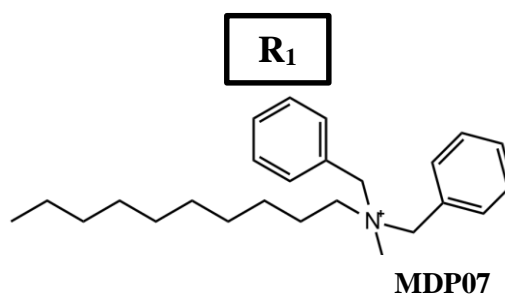
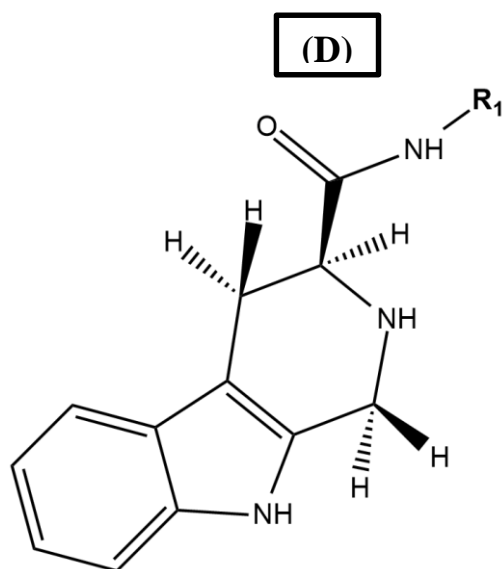
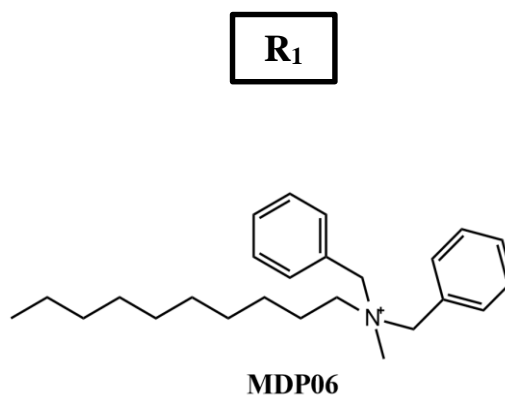
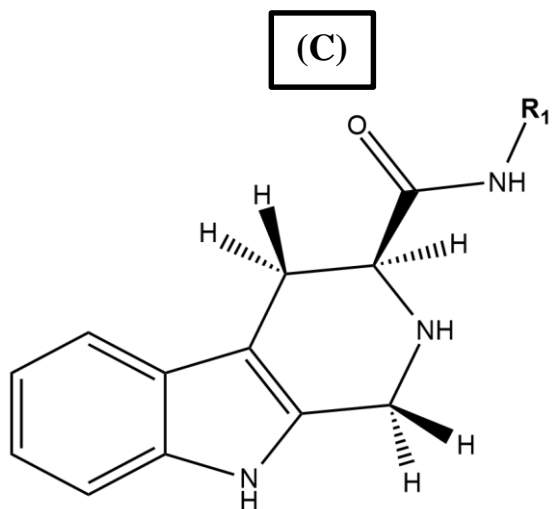


CM04

Figura 6. Estructura de la serie de compuestos derivados de nitroindazol en estudio.

Serie de derivados de β -carbolinas





Cl⁻

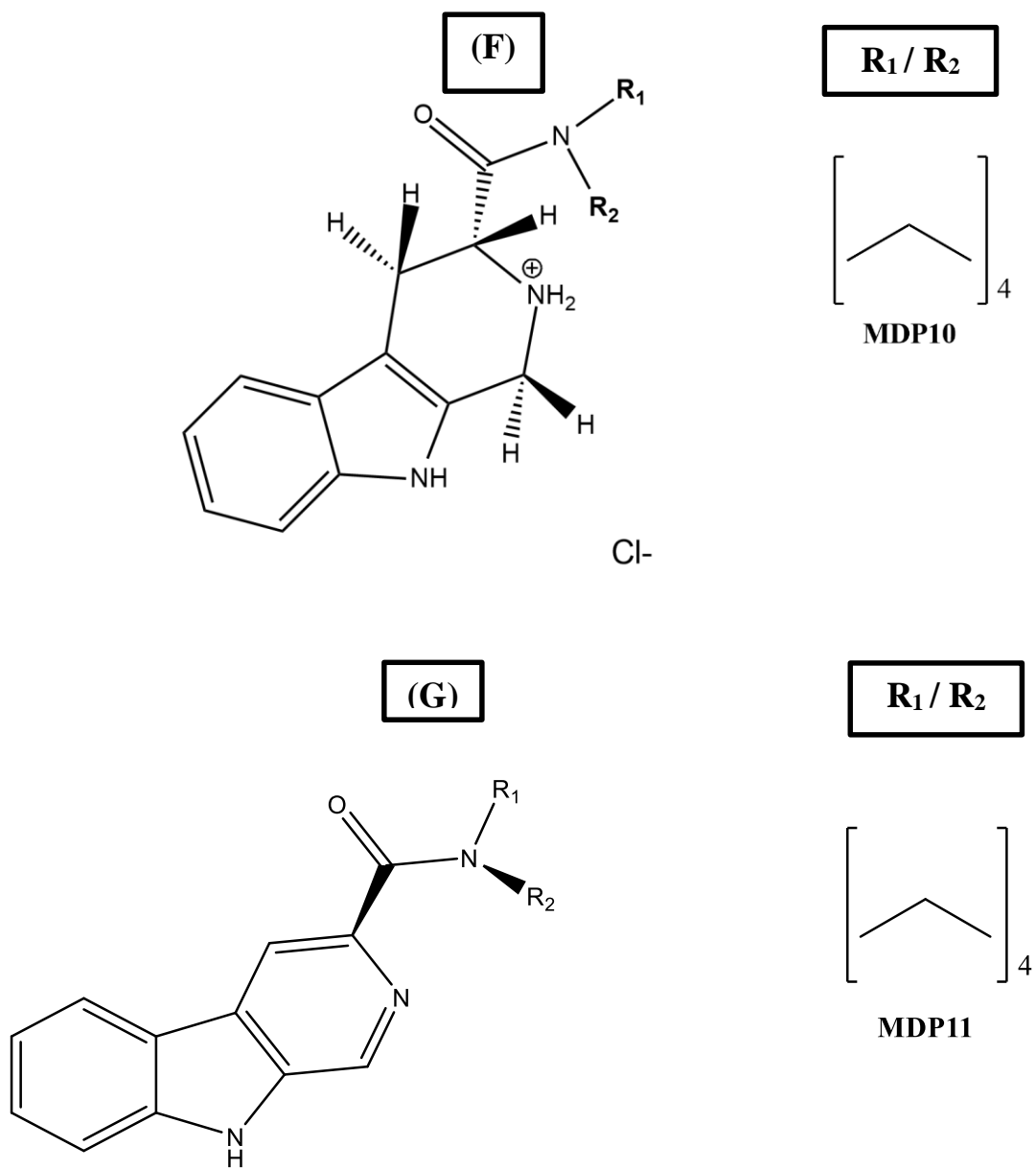


Figura 7. Estructuras de la serie de compuestos derivados de nitroindazol en estudio.

4.1.2 Estudio Electroquímico a través del método de Voltametría Cíclica (VC).

Las mediciones voltamétricas se realizaron en un equipo Metrohm 693 VA instrument. Convertidor 694 VA Stand Convertor. Procesador 693 VA Processor. Utilizado un sistema de tres electrodos: electrodo de trabajo (gota colgante de mercurio, HDME), electrodo de referencia (calomelano saturado, SCE), y finalmente un electrodo auxiliar (alambre de platino). En medio aprótico, usando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO); perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) como electrolito de soporte, en atmosfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Para una mayor descripción del método electroquímico utilizado (ver Anexo 7.1).

Se trabajó en concentraciones de muestra de 1mM con 0,1 M de electrolito de soporte y las velocidades de barrido se efectuaron entre 2,5 V/s a 0,05 V/s, rango permitido por el electrodo de trabajo.

4.1.3 Caracterización de Especies radicalarias generadas a través de espectroscopia de resonancia de spín electrónico (REE).

Los estudios de espectroscopia de REE se registraron en la banda X (9,7 GHz) usando un espectrómetro Bruker 106 ECS con una cavidad rectangular y modulación de campo 50 kHz. Los radicales de aniones se generaron por reducción electrolítica *in situ* utilizando DMSO como solvente y PTBA como electrolito soporte. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Los espectros de REE se simularon utilizando el programa WINEPR Simphonia 1.25 versión. Se aplicó el potencial correspondiente al pico catódico encontrado para cada compuesto en las medidas de su VC y se obtuvo el espectro del radical formado *in situ*.

4.1.4 Estudio de actividad biológica en *T. cruzi*: Cultivo de epimastigote y ensayos de inhibición del crecimiento.

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, cepa Dm28c, se cultivaron a 28 °C en un medio axénico (BHI-Triptosa) como se describió anteriormente, complementado con suero fetal bovino al 5% (SFB). Se inocularon células de un cultivo de 10 días (fase estacionaria) en 50 ml de medio de cultivo fresco para dar una concentración inicial de 1×10^6 células/mL. El crecimiento celular fue seguido midiendo cada día la absorbancia del cultivo a 600 nm. Antes de la inoculación, los medios se complementaron con la cantidad indicada del medicamento de una solución madre en DMSO. La concentración final de DMSO en los medios de cultivo nunca excedió el 0,4% y el control se realizó en presencia de 0,4% de DMSO y en ausencia de cualquier fármaco. No se observó ningún efecto sobre el crecimiento de epimastigotes por la presencia de hasta 1% de DMSO en los medios de cultivo. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera: $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde $A_p = A_{600}$ del cultivo que contiene el fármaco en el día 5; $A_{0p} = A_{600}$ del cultivo que contiene el fármaco justo después de la adición del inóculo (día 0); $A_c = A_{600}$ del cultivo en ausencia de cualquier droga (control) en el día 5; $A_{0c} = A_{600}$ en ausencia de la droga en el día 0. Para determinar los valores de IC_{50} , concentraciones inhibitorias del 50%, se siguió el crecimiento del parásito en ausencia (control) y presencia de concentraciones crecientes del fármaco correspondiente. En el día 5, se midió la absorbancia del cultivo y se relacionó con el control. El valor IC_{50} se tomó como la concentración de fármaco necesaria para reducir la relación de absorbancia al 50%.

Los ensayos de viabilidad se realizaron utilizando el método de reducción de MTT como se describió anteriormente. Se incubaron 1×10^7 epimastigotes en medio de cultivo FBS-RPMI a 37 ° C durante 24 h con o sin los compuestos estudiados. Se extrajo una parte alícuota de la suspensión de parásitos y se incubó en una placa de pocillos de fondo plano de 96 y se añadió MTT a una concentración final de 0,5 mg / mL, se incubó a 28 ° C durante 4 h y luego se hizo soluble con SDS al 10% - HCl 0,1 mM e incubado durante la noche. La formación de cristales de formazán se midió a 570 nm en un lector multipocillo (AsysExpert Plus ©, Austria).

4.1.5 Tripomastigotes y ensayo de viabilidad

Las células VERO se infectaron con el clon Dm28c de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* de cultivos de epimastigotes de 15 días de edad. Posteriormente, los tripomastigotes cosechados de este cultivo se usaron para reinfectar más cultivos de células VERO en una multiplicidad de infección de diez. Los cultivos de células VERO infectados con tripomastigotes se incubaron a 37 ° C en aire humidificado y 5% de CO₂ durante 5-7 días. Luego, se incubaron 3 × 10⁶ tripomastigotes por pocillo, en medio RPMI a 37 ° C durante 24 h bajo los efectos de derivados de β-carbolina y Nitroindazoles a diferentes concentraciones (entre 5 μM a 150 μM). Después de ese tiempo, se recogió el medio de cultivo, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, y el sedimento que contenía tripomastigote se resuspendió en RPMI suplementado con suero fetal bovino al 5% y penicilina-estreptomicina. Los parásitos no tratados se usaron como controles negativos (100% de viabilidad).

Los ensayos de viabilidad de tripomastigotes (Dm28c) se realizaron utilizando el método de reducción de MTT realizado de manera similar a la descrita anteriormente para el ensayo de epimastigote de *T. cruzi*.

4.1.6 Citotoxicidad en células endoteliales de mamíferos

Los macrófagos RAW 264.7 se usaron para determinar la citotoxicidad de los derivados de β-carbolina. Estos macrófagos (2.0 × 10⁶ macrófagos / mL) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 y se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada compuesta de 5% de CO₂ durante 24 horas. Los derivados de β-carbolina y nitroindazoles se disolvieron en DMSO a diferentes concentraciones (entre 5 μM a 100 μM), para realizar el cálculo de IC₅₀, respectivamente. Los macrófagos no tratados se usaron como controles negativos (100% de viabilidad). Los ensayos de viabilidad de macrófagos se realizaron utilizando el método de reducción de MTT realizado de manera similar a la descrita anteriormente para el ensayo de epimastigote de *T. cruzi*.

4.1.7 Estudio de generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de *T. cruzi*.

Los niveles celulares de ERO se cuantificaron usando sondas de sensor intracelular diclorofluoresceín-diacetilado (DCFDA). Alícuotas de la suspensión de parásitos (1.5×10^6 epimastigotes / mL en medio LIT) y macrófagos (5.0×10^4 macrófagos / mL en medio de cultivo RPMI 1640, sin suplemento) se incubaron con solución DCFDA de 20 μM en una placa de pozo de fondo plano de 96, durante 15 minutos a 28 ° C y 37 ° C respectivamente. Estos se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 y se transfirieron a una placa de fluorescencia Nunc® de 96 pocillos, en la que se añadieron los derivados de β -carbolina y Nitroindazoles. Se usó peróxido de hidrógeno (1 mM) como estímulo en el caso de control positivo.

Los derivados de β -carbolina se añadieron en tres concentraciones (1, 10 y 100 μM). La fluorescencia se midió (longitudes de onda de excitación / emisión de 488/528 nm) durante 40 minutos en el espectrofluorómetro BioTek Synergy HT.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio electroquímico

Estudio de reducción de compuestos 6-Ni y 5-Ni utilizando Voltametría cíclica (VC) en medio aprótico.

El estudio de reducción electroquímica se llevó a cabo en condiciones que permitieron la estabilidad del nitro – anión radical, utilizando DMSO como solvente aprótico y PTBA como electrolito de soporte. Bajo estas condiciones se obtuvieron los voltamogramas cíclicos y sus parámetros característicos (Tabla 4). Las velocidades de barrido empleadas se encuentran en el intervalo de 0.5 V s^{-1} y 2.5 Vs^{-1} .

Los voltamogramas cíclicos de los compuestos CM03 (Figura 12) y CM04 (Figura 13) revelaron comportamientos voltamétricos comparables entre sí, arrojando cuplas con presencia de un pico catódico y un pico anódico. Por lo general, en las reducciones del grupo nitro se evidencia un comportamiento electroquímico reversible, correspondientes a la reducción del grupo nitro a su forma nitro-anión radicalaria ($-\text{RNO}_2 / -\text{RNO}_2 \cdot^-$), como indican estudios previos. (Rodríguez et al., 2008) Sin embargo, como se evidencia en la forma de las cuplas evaluadas a diferentes velocidades, los voltamogramas y como indica la

relación I_{pa}/I_{pc} (Tabla 4), éstos compuestos presentan un comportamiento cuasi reversible, en el caso de CM02, CM03 y CM04 e irreversible en el caso de CM03.

Tabla 4. Parámetros electroquímicos característicos de la serie 6-Ni obtenidos por voltametría cíclica en medio aprótico (DMSO), los valores fueron obtenidos a una velocidad de barrido de 1,0 Vs-1.

Compuestos	E_{pc} I	E_{pa} I	E_{pc} II	E_{pa} II	E_{pc} III	E_{pa} III	E_{pc} IV	E_{pa} IV	I_{pa}/I_{pc}	ΔE_p I /V
CM01	-1,37	-0,952	-0,851	-0,358	-	-	-	-	-	-
CM02	-1,33	-1,22	-0,735	-0,65	-0,448	-0,307	-	-0,0604	1.05	0.086
CM03	-1,37	-0,891	-1,04	-	-0,801	-	-	-	0.397	0.081
CM04	-1,13	-0,921	-0,786	-	-	-	-	-	1.19	0.11

* E_{pa} : Potencial anódico. E_{pc} : Potencial catódico. I_{pa}/I_{pc} : Relación entre la intensidad de picos, $\Delta E/V$: diferencia de potencial.

En la tabla 4, se observa que los valores de potencial de reducción de todos los derivados de nitroindazoles estudiados tienen un potencial más catódico que el valor presentado por Nfx (0.91 V). Esto indica que estos compuestos poseen una menor facilidad de reducción que Nfx, droga usada actualmente para el tratamiento de la enfermedad.

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente, para la estabilización del nitro anión radical, la Figura 8 muestra el voltamograma del compuesto CM01, en el que se observa, alrededor de 0.8 V, un pico catódico correspondiendo a la reducción electroquímica del grupo nitro con la consiguiente formación del nitro anión radical, el cual debido al cambio en su polaridad favorecería la transformación tautomérica desde la forma enólica del nitroanión radical a la forma cetónica del mismo. En un previo estudio realizado por Ballesteros et al. (1986) explicaron que en una solución de DMSO, coexisten las dos formas tautoméricas siendo la forma enólica la predominante. En este sentido, para el caso de CM01 el pico anódico IIIa lo atribuimos a la oxidación del nitroanion radial en su forma cetónica aniónicas (Figura 9b).

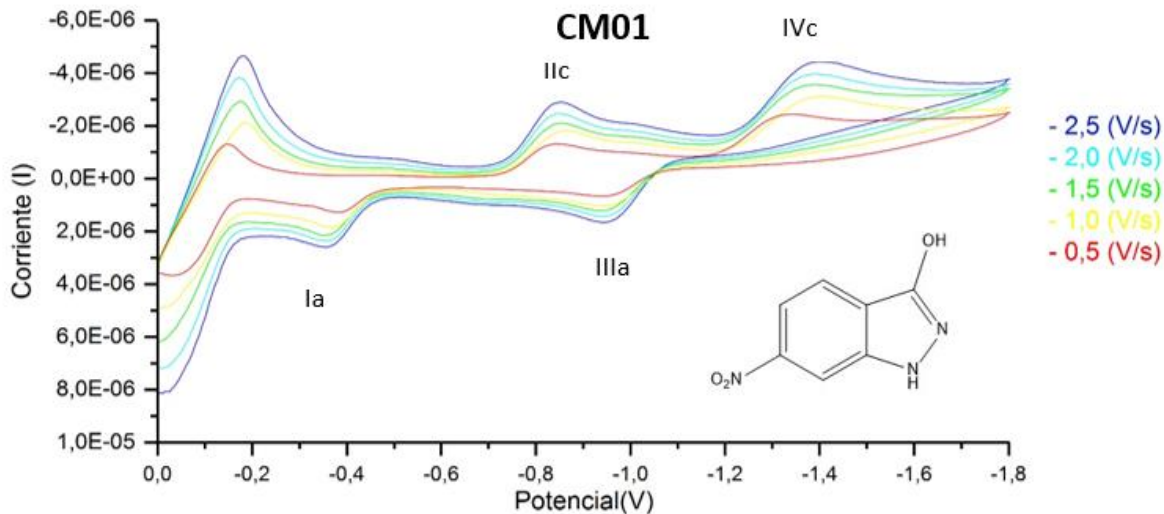
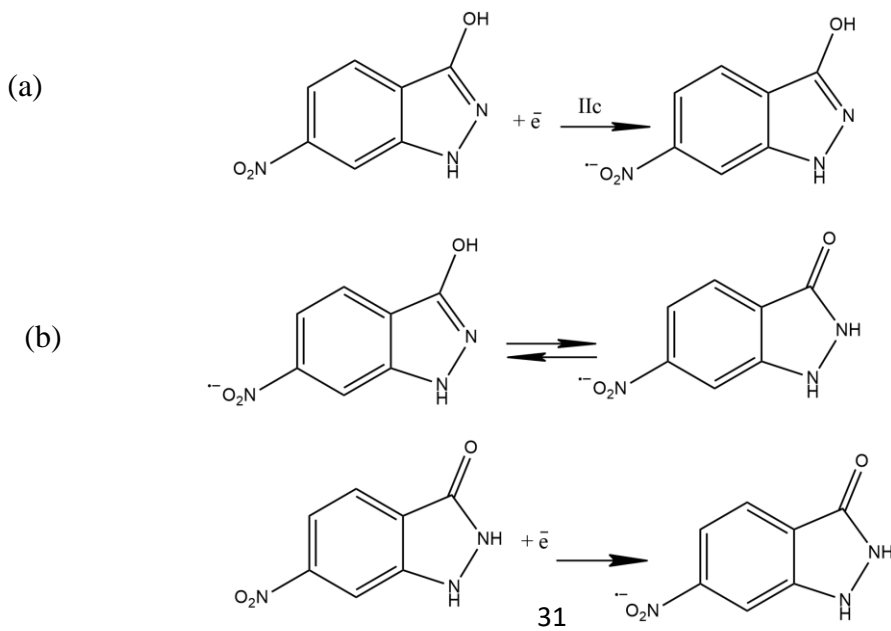


Figura 8. Voltamograma cíclico del compuesto CM01. Realizado a distintas velocidades de barrido de potencial, entre $0,5 \text{ V s}^{-1}$ y $2,5 \text{ V s}^{-1}$.

La presencia de un pico irreversible (IVc) corresponde a la reducción adicional del nitroanión radical al correspondiente derivado de hidroxilamina, proceso que ocurre por una autoprotonación (Figura 9c). Esta reacción corresponde a un equilibrio ácido – base en el medio aprótico. (Rodríguez, J., Olea-Azar, C. et al., 2008)

Es posible observar, además, un pico anódico alrededor de $0,4 \text{ V}$ (Ia), que puede estar relacionado al proceso de reoxidación de la hidroxilamina a derivado nitroso (Figura 9d) y su contraparte, un hombro (Ic) relacionado al proceso de reducción del derivado nitroso (par Ia/Ic).



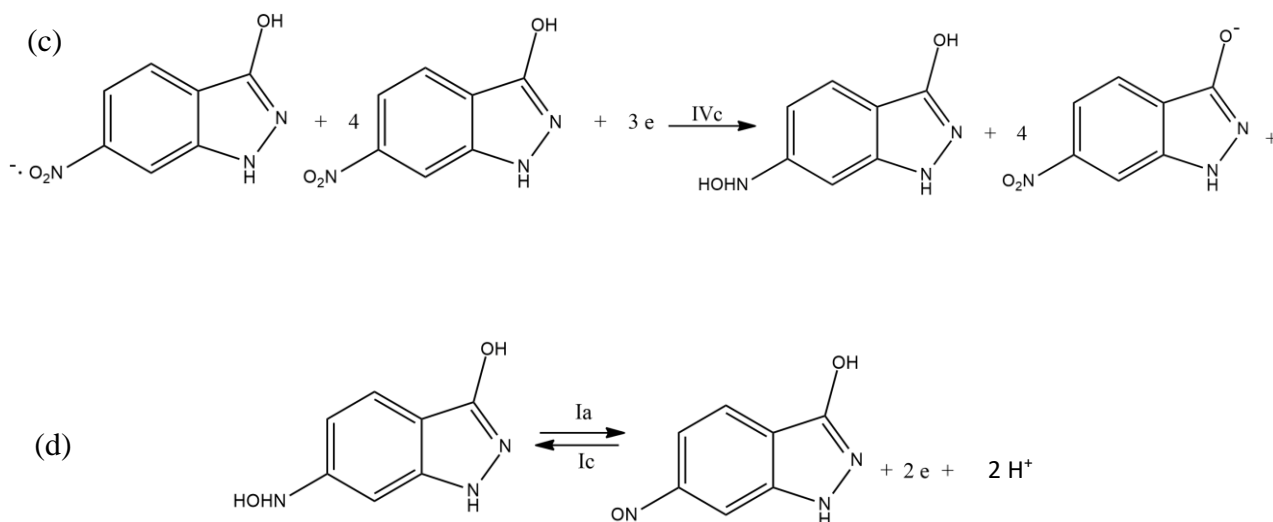


Figura 9. Propuesta de mecanismo de reducción del derivado de nitroindazol CM01.

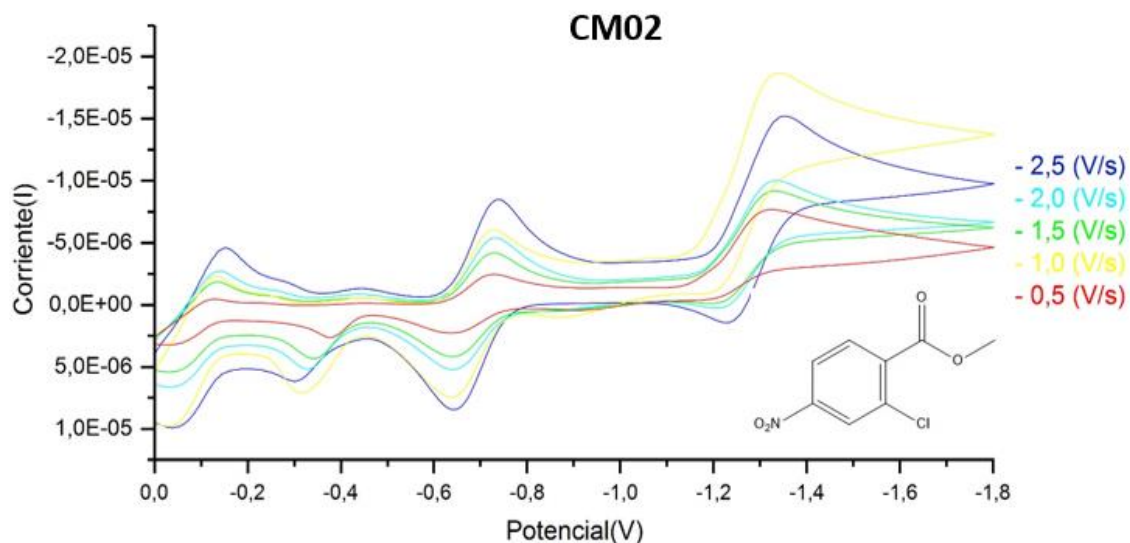


Figura 10. Voltamograma cíclico del compuesto CM02. Realizado a distintas velocidades de barrido de potencial, entre 0.5 V s^{-1} y 2.5 V s^{-1} .

En el voltamograma que se muestra en la Figura 10, para el compuesto CM02, es posible apreciar alrededor de los 0.7 V una cupla (IIc/IIa) cuasi reversible, que se corrobora con el valor de diferencia de potencial superior a 60 mV y una relación de intensidades de corriente de picos por encima de la unidad. Esta cupla (IIc/IIa) corresponde la reducción del

grupo nitro a nitro anión radical ($-\text{RNO}_2^- / -\text{RNO}_2^{\bullet -}$) que se muestra en la figura 11a. Por su parte el par IIC/IIa muestra un comportamiento irreversible a bajas velocidades, pero cuasi reversible a altas velocidades, comportamiento que puede deberse a una posible reducción del grupo carbonílico del éster presente en la estructura molecular de CM02 (mecanismo propuesto en la Figura 11 b). A bajas velocidades desaparece el pico anódico, ya que en la reducción del grupo carbonilo, a estas velocidades, toma más relevancia la disociación del grupo metilo, que pasa a un metilo radical (Figura 11 c).

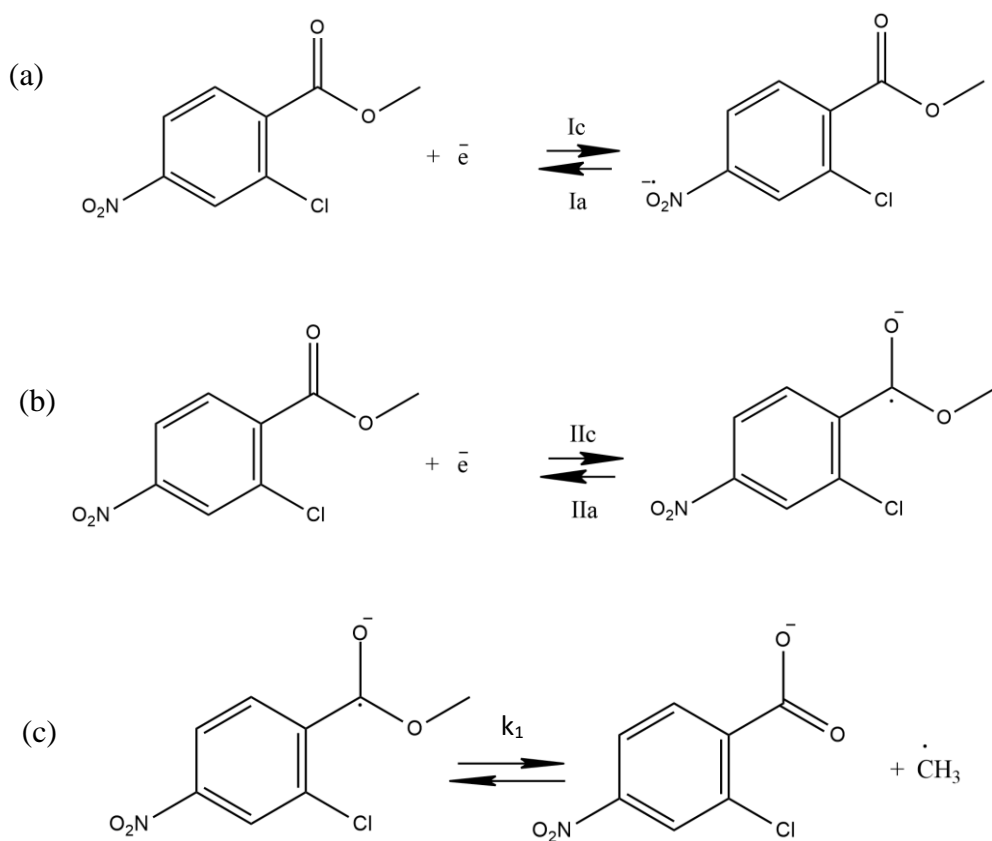


Figura 11. Propuesta de mecanismo de reducción del derivado de nitroindazol CM02.

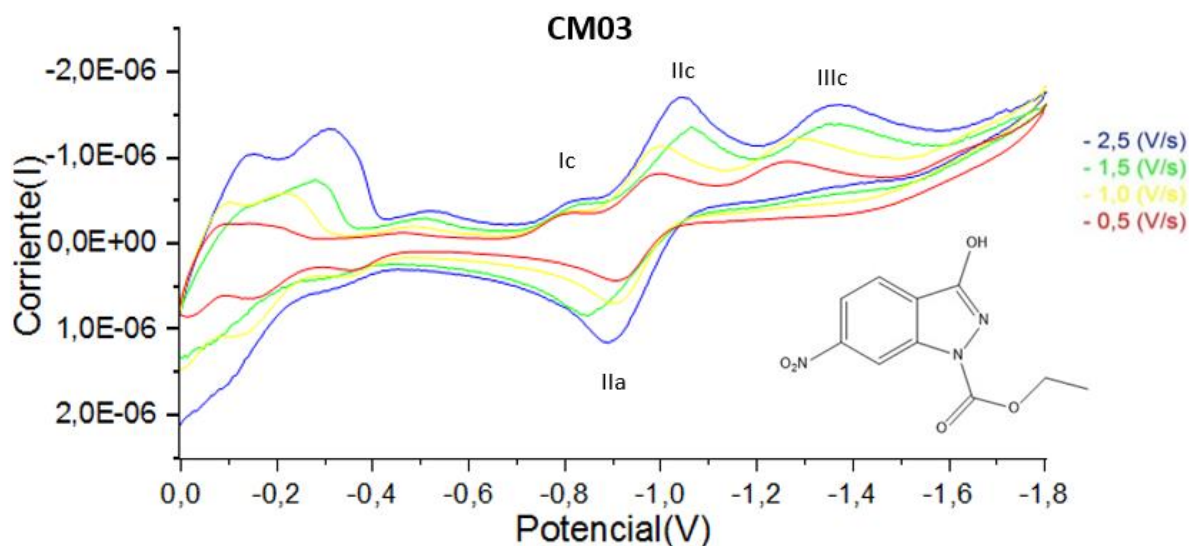
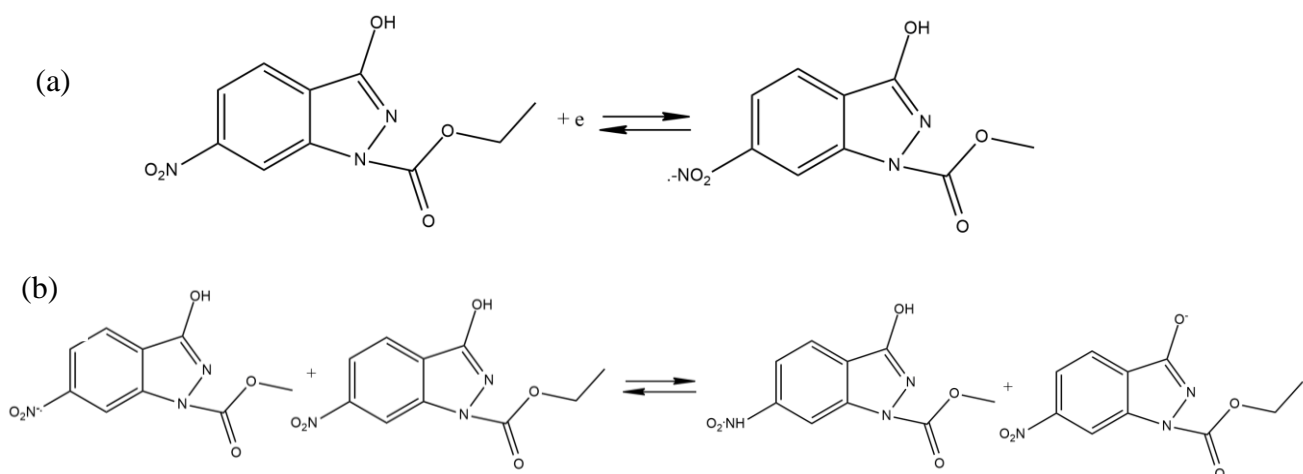


Figura 12. Voltamograma cíclico del compuesto CM03. Realizado a distintas velocidades de barrido de potencial, entre 0.5 V s^{-1} y 2.5 V s^{-1} .

En el caso de CM03 se puede observar la presencia de dos picos de reducción (Figura 12), un pico catódico (alrededor de $-0,8 \text{ V}$) correspondiente a la generación del nitro anión radical $-RNO_2^{\cdot-}$ (13 a) y el par de cuplas IIc/IIa cercanas a -1.0 V correspondiente a la reducción de la especie aniónica, especie generada a través de una reacción de autoprotonación (Figura 13 b). Este proceso corresponde a un equilibrio ácido - base en medio aprótico, una conducta típica de la autoprotonación exhibida por los nitro compuestos con restos ácidos en sus estructuras. (Rodríguez, J., Olea-Azar, C. et al., 2008).



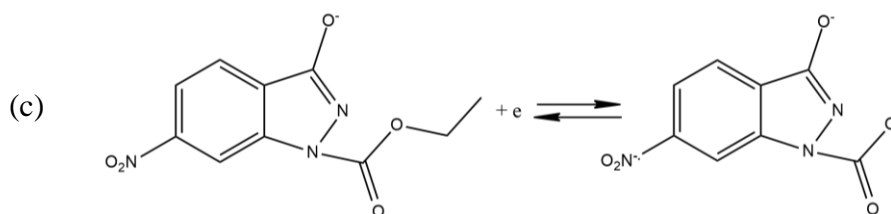


Figura 13. Propuesta de mecanismo de reducción del derivado de nitroindazol CM03.

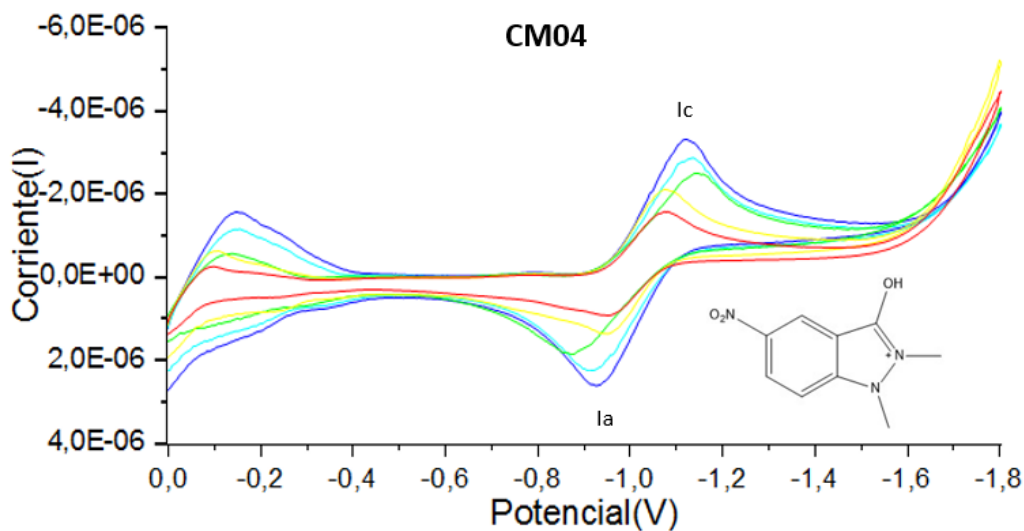


Figura 14. Voltamograma cíclico del compuesto CM04. Realizado a distintas velocidades de barrido de potencial, entre 0.5 V s^{-1} y 2.5 V s^{-1} .

La Figura 14 muestra para CM04 una cupla cuasi -reversible (par I_c/I_a), puesto que su diferencia de potenciales de pico está muy por sobre los 60 mV (Tabla 4), lo que representa una transferencia mono - electrónica que genera la especie radicalaria indicada en la Figura 15. (Mozo, J. D., et al. (2011)).

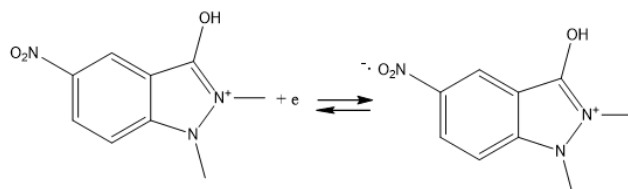


Figura 15. Propuesta de mecanismo de reducción del derivado de nitroindazol CM04.

Al analizar la dependencia de la intensidad de corriente ($\log_{10} I_{pc}$) con respecto al \log_{10} de la velocidad de barrido, se obtiene una recta de pendiente de 0,50 (Figura 16) mostrando que la transferencia monoelectrónica corresponde a un proceso controlado por difusión sin interferencias en el electrodo de trabajo.

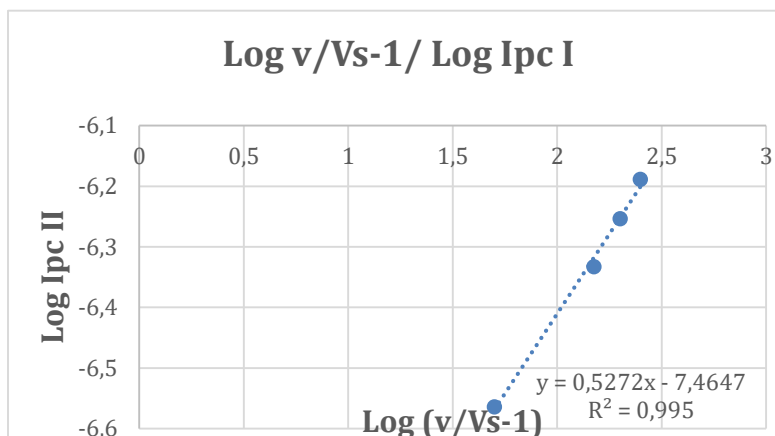


Figura 16. Gráfico Log v/V_s-1 / Log I_{pc} II del compuesto CM04. Realizado para el par de cuplas IIc/IIa a distintas velocidades.

Caracterización de las especies radicalarias generadas de 6-Ni, a través de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).

Para caracterizar por REE las especies radicalarias detectadas por voltametría cíclica, se realizaron experimentos donde se generaron las mismas especies a través de reducción electroquímica in situ, igualando las condiciones experimentales de VC en una cavidad de resonancia, y mediante sus patrones hiperfinos definen los correspondientes espectros REE. Los espectros REE experimentales, se simularon con el software SimFonia V1.25.

La Figura 17 muestra los espectros experimentales y simulados para los derivados CM01, CM02, CM03, CM04, ellos manifiestan cuatro patrones diferentes para los derivados de nitroindazol. Para los espectros experimentales se asignaron CAH mediante la simulación espectral con el programa WINSIM EPR modificando el ancho de la línea y los componentes Lorentziano/ Gaussiano y así obtener un espectro simulado con mayor aproximación al experimental.

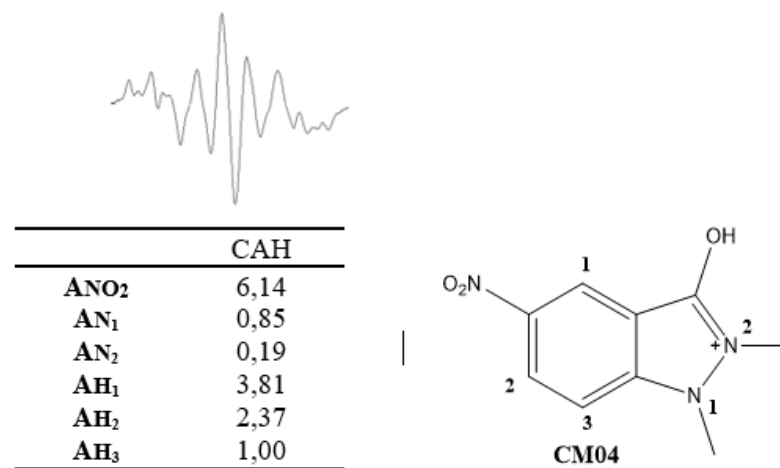
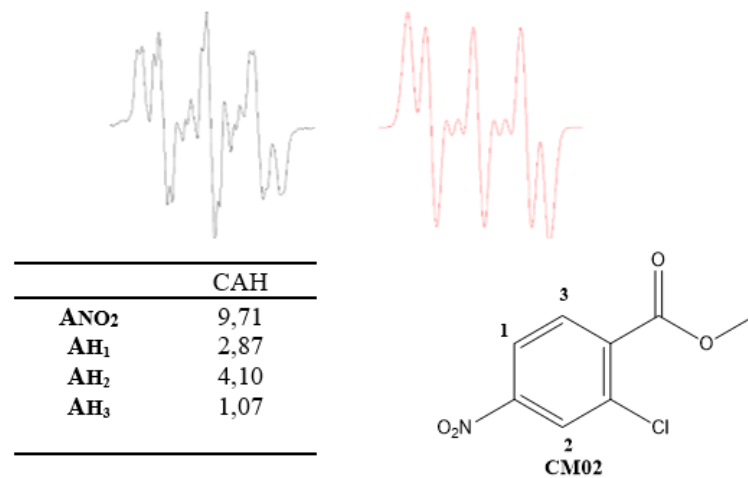
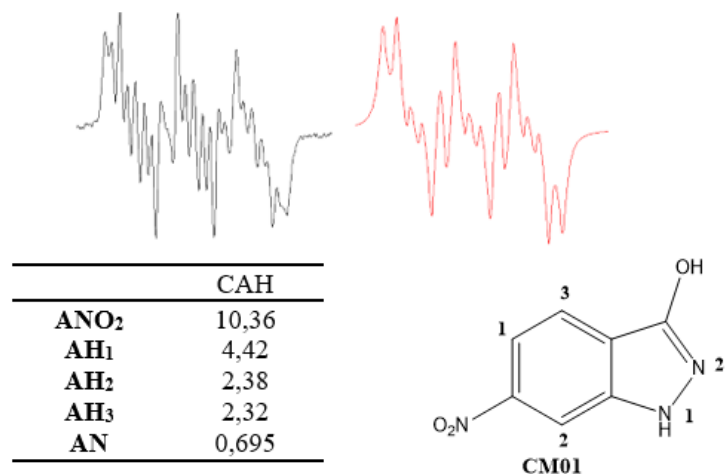
Los resultados expuestos en la tabla 5 indican que la distribución de la densidad de espín se encuentra desplazado hacía el grupo nitro de cada derivado.

Para CM01, la deslocalización del electrón se encuentra fuertemente desplazada hacia el nitrógeno del grupo nitro, arrojando en simulación un valor de CAH correspondiente a 10,36, considerablemente mayor al resto de los componentes del derivado, dando indicios de la alta densidad del spín sobre el grupo antes mencionado.

El espectro de CM02 muestra un fuerte desplazamiento del electrón radicalario hacia el grupo nitro de la molécula, este espectro confirma que es muy probable el mecanismo propuesto para CM02, con respecto a la reducción del grupo carbonilo y la posterior disociación del grupo metilo a radical metilo. y consistente con el voltamograma obtenido (Figura 11 c),

En los casos CM03 y CM04, dado que las constantes de acoplamiento hiperfino de los hidrógenos adyacentes al grupo nitro son de valor cercano a la de este último, da indicio que es altamente probable que la deslocalización del electrón radicalario está entre el nitrógeno del grupo nitro y el o los hidrógenos del anillo aromático.

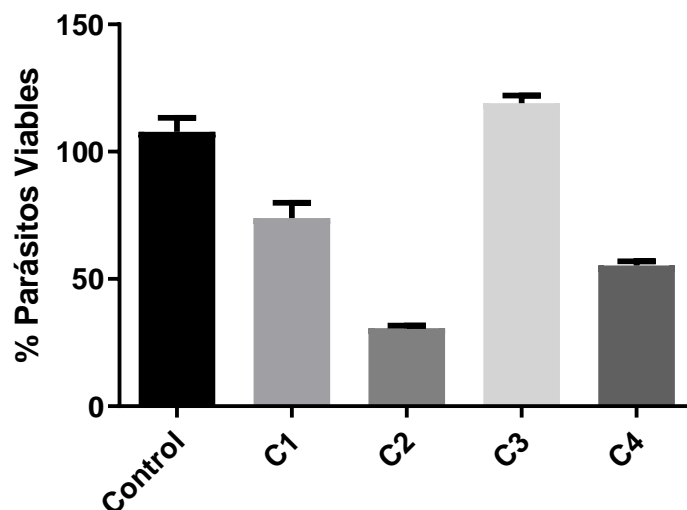
Figura 17. Espectros REE experimental (negro) y espectro REE simulado (rojo). A) espectro REE de las moléculas CM01, CM02, CM03 y CM04. **Tabla 5.** correspondientes constantes de acoplamiento hiperfino (CAH).



Los espectros de los compuestos CM01 y CM03 muestran un comportamiento diferente al del resto de la serie, ya que no presentan una línea espectral central definida, lo que indica que se posee un número de núcleos equivalentes impar, correspondientes a NO₂, H₁, H₂ para CM03 y que coinciden con la deslocalización del electrón radical ya mencionada.

Evaluación de la actividad tripanocida selectiva en *T. cruzi*, y células de mamífero utilizando la metodología de reducción de MTT.

Para evaluar el efecto de las familias de compuestos en estudio (nitroindazoles y β -carbolinas) sobre la viabilidad celular de *T. cruzi* se utilizaron parásitos cepa Dm28c en sus estadios tripomastigotes y epimastigotes y en el caso de células de mamífero se utilizaron macrófagos murinos RAW 264.7. Realizando la técnica de MTT, se determinó el número de células viables a una concentración máxima de 100 μ M para cada compuesto.



*Figura 18. Actividad tripanocida de Nitroindazoles sobre el estado tripomastigote de *T. cruzi*.*

Como se ve en la Figura 18, se realizaron screening en las distintas formas del parásito, donde se aprecia el comportamiento de nitroindazoles frente a tripomastigotes. De esta manera se obtuvieron los compuestos activos para la forma infectiva y no infectiva del parásito.

A partir de los resultados de screening se diseñó un experimento de viabilidad celular (*T. cruzi* mamífero) para determinar los valores de IC₅₀ que permite establecer la concentración a la cual se inhibe el 50% de la viabilidad celular.

En la Tabla 6 se presentan los valores de viabilidad, obtenidos experimentalmente, expresados como el porcentaje de células viables respecto al control. Como control positivo se utilizó el fármaco nifurtimox (Nfx) a una concentración de 100µM.

Tabla 6. Valores porcentuales de IC_{50} del efecto de la serie de Nitroindazoles y β -carbolinas sobre *T. cruzi* y células de mamífero RAW 264.7.

Compuestos	Epimastigotes (IC_{50} µM)	Tripomastigotes (IC_{50} µM)	Macrófagos (IC_{50} µM)	IS (RAW/Epi)	IS (RAW/Tripo)
CM01	I	>100	-	-	-
CM02	I	64,10	-	-	-
CM03	I	I	-	-	-
CM04	I	63,65	-	-	-
MDP01	3,7±0,4	>100	20,3±2,3	5,5	-
MDP02	3,9±1,4	I	23,7±5,1	6,1	-
MDP03	>100	I	-	-	-
MDP04	5,8±1,7	>100	16,2±2,8	2,8	-
MDP05	6,8±1,0	23,2±1,9	13,5±3,5	2,0	0.6
MDP06	>100	I	-	-	-
MDP07	>100	20.0±4,0	-	-	-
MDP08	>100	>100	-	-	-
MDP09	7,8±1,3	18,2±2,1	3,3±2,1	0,4	0.2
MDP10	8,2±0,3	19,9±1,1	10,1±5,3	1,2	0.5
MDP11	>100	I	-	-	-
Nfx	17,4 ± 1,3	21,5±0,3	263,4 ± 25,4	15,14	4.6

*. Nifurtimox (Nfx)

**Índice de selectividad (IS).

***Inactivo (I).

¥Se expresan los valores como porcentajes ± desviación estándar respecto al control, realizados en triplicado.

Para el caso de los compuestos derivados de Nitroindazoles (compuestos CM) se muestra que en la forma epimastigote no resultaron ser activos. No obstante, en la forma infectiva del parásito, que se encuentra en los mamíferos, se evidenció la presencia de actividad

tripanocida con valores de IC_{50} cercanos a $60 \mu M$, y al compáralo con Nfx los valores IC_{50} mostraron ser superiores a éste.

El derivado CM01 muestra cierta actividad frente a la forma infectiva del parásito. Sin embargo, no es suficiente como para clasificarlo como compuesto activo, ya que su IC_{50} es superior a los $100 \mu M$, lo que indica que se requiere de una concentración mayor a ésta para lograr un comportamiento tripanocida efectivo.

Los compuestos CM02 (5-Ni) y CM04 (6- Ni) indican un valor de IC_{50} comparables en la forma tripomastigote del parásito. Como precursor de síntesis, CM02, presenta actividad tripanocida similar al nitroindazol CM04, a pesar de que el primero es un 5-Ni y no posee el anillo de imidazol y las posiciones del grupo nitro son diferentes (Figura 6).

El compuesto CM03 muestra inactividad frente al parásito de *T. cruzi* en sus dos formas, a pesar de ser estructuralmente similar a CM01 y CM04. Dicha inactividad puede deberse al grupo carbonilo presente en la ramificación del anillo imidazol del compuesto.

Al igual que en derivados de Nitroindazoles, se realizó un screening para la serie de compuestos derivados de β - carbolinas en ambas formas del parásito, a partir de éste se determinaron los compuestos activos y se realizó el experimento de viabilidad celular para determinar sus respectivos IC_{50} .

Como muestra la Tabla 6, los derivados de β -C (MDP) que presentaron actividad tripanocida en epimastigotes sobre a los $100 \mu M$, no se consideran activos ya que se requiere de una concentración superior a ésta para que su IC_{50} sea comparable o menores a los de Nfx.

Los compuestos activos en la forma epimastigote del parásito lograron valores muy por debajo del Nfx., mostrando ser más activos que éste, ya que requieren menor concentración para inhibir el 50% de los parásitos.

Los compuestos MDP01 y MDP02 son estructuralmente similares, sólo poseen una diferencia diastereoisomérica de uno de sus hidrógenos (Estructura base (A) y (B)), dicha diferencia no modifica considerablemente su capacidad tripanocida en epimastigotes. Este mismo efecto ocurre para el par de compuestos MDP04/MDP05 y el par MDP09/MDP10.

Los derivados de β -C que manifiestan actividad son los compuestos MDP01, MDP04 y MDP09, presentando entre sí la misma estructura base (estructura base (A)), además de los compuestos MDP02, MDP05 y MDP10 que comparten entre sí la misma estructura base (estructura base (B)).

En el caso de MDP09 y MDP10 las cadenas alquílicas no deben ser las responsables de la capacidad tripanocida manifestada entre estos compuestos, ya que, el compuesto MDP11 posee las mismas cadenas en su estructura y se muestra inactivo inactivo en tripomastigote y en epimastogote posee un IC_{50} superior a los 100 μ M.

En el caso de β -C inactivas para epimastigotes, se presentan los compuestos DMP06 (estructura base (A)), MDP07 (estructura base (B)) y MDP08 (Estructura base (A)), las razones de dicha inactividad pueden atribuirse al largo de la cadena alquílica y/o es posible que el catión de amonio cuaternario en el extremo de la cadena alquílica le quite actividad al compuesto. La razón anterior puede explicar también el comportamiento inactivo del compuesto DMP03 en la misma forma del parásito.

Finalmente, el compuesto MDP11 muestra una similitud estructural a MDP09/MDP10 en cuanto a sus dos cadenas de carbono, aunque poseen diferente estructura base (estructuras base (F) y (G) respectivamente), pero, es posible que la amina terciaria unida a las cadenas alquílicas le quite actividad al compuesto.

Aquellos derivados de β -C que presentaron resultados favorables de IC_{50} (inferiores o comparables a Nfx) sobre el parásito en su forma tripomastigote (infectiva) fueron los compuestos MDP05, MDP07, MDP09 y MDP10.

Los derivados MDP04 y MDP05 son diastereoisómeros entre sí, pero, sólo MDP05 presenta actividad tripanocida comparable a la de Nfx, esta diferencia se puede atribuir a la misma diferencia diastereoisomérica antes mencionada. MDP09 y MDP10 muestran una actividad estrechamente comparable entre sí e inferior a la del Nfx, pero no es posible atribuírsela a las cadenas alquílicas ya que MDP11 es inactivo y presenta las mismas cadenas en su estructura molecular.

El derivado MDP07 posee una buena actividad en comparación a Nfx que puede atribuirse a su estructura base similar a los compuestos MDP05 y MDP10, que igualmente presentan una actividad tripanocida favorable.

Los compuestos MDP01, MD04, MDP05, MDP08 muestran un IC_{50} superiores a 100 μM , por lo que se consideran prácticamente inactivos ya que se requiere de una alta concentración para que su actividad sea comparable al resultado de Nfx.

Por su parte los compuestos MDP02, MDP03 MDP06 y MDP11 entregan resultados negativos en las pruebas de IC_{50} , pues son completamente inactivos frente al parásito en su forma infectiva.

Para realizar las pruebas y obtener los IC_{50} en macrófagos se seleccionaron los compuestos que coincidieron en actividad en epimastigotes y tripomastogotes. Se obtuvo en cada uno de ellos valores de IC_{50} oscilando entre los 10 y lo 23 μM , muy por debajo de lo esperado en comparación a Nfx ($263,4 \pm 25,4 \mu M$), lo que indica que todos estos compuestos son tóxicos sobre las células de mamíferos.

Los IS son relativamente bajos como para considerarlos selectivos y esto se debe a su alta toxicidad en células de mamíferos.

Evaluación de formación de especies reactivas de oxígeno mediante la técnica de medición de ERO.

Para evaluar la formación de ERO se utilizó el sensor intracelular di-clorofluoresceína-diacetilado (DCFDA). El fluoróforo permite identificar y cuantificar la concentración de estas especies en los cultivos celulares. La oxidación de la sonda produce un cambio en su estructura que la transforma en una molécula fluorescente, el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de las especies oxidantes (ERO).

Tabla 7. Efecto de la serie de β -C sobre la generación de ERO especies radicalarias en macrófagos RAW 264.7 y T. cruzi (epimastigotes Dm28c).

Moléculas	ERO	ERO
	Epimastigotes	Macrófagos
MDP01	1,01 ± 0,01	1,38 ± 0,27
MDP02	0,99 ± 0,01	1,24 ± 0,23
MDP04	0,78 ± 0,01	1,22 ± 0,21
MDP05	1,06 ± 0,01	1,05 ± 0,07
MDP09	0,96 ± 0,01	0,98 ± 0,10
MDP10	0,93 ± 0,01	0,97 ± 0,13
Control	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
H₂O₂	1,92 ± 0,01	1,28 ± 0,40

Concentraciones de sonda intracelular DCFDA. (0,05mM) y H₂O₂ (1mM) como control positivo, los compuestos fueron ensayados a 5 µM en epimastigotes y 1 µM en macrófagos. Se presentan los valores como el número de veces del incremento de la pendiente con respecto al control ± la desviación estándar.

El estrés oxidativo es un aumento en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión, y sus efectos dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la lisis celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. (Viada Pupo, E., et al. (2017)).

La célula es capaz de autorregular el estrés oxidativo que se produce por la respiración celular y así disminuye sus efectos tóxicos.

En la Tabla 7 se muestra el control que representa el ERO basal, por otro lado, cuando se utiliza peróxido de hidrogeno (control positivo) se genera un desequilibrio en las especies oxidantes y antioxidantes generando en el estrés oxidativo. Lo anterior, se ve expresado con el aumento de la fluorescencia que es directamente proporcional a la formación de especies oxidantes. (Wardman, P. (2007)).

Con respecto a los compuestos en estudio, los derivados de β-C (MDP) mostraron su incapacidad de generar un aumento en la fluorescencia, lo cual indicaría que no hay un aumento de ERO. En macrófagos, el efecto de los compuestos pudiese ser vía estrés

oxidativo dado que hay un aumento en la fluorescencia similar al producido por peróxido de hidrogeno. Por su parte, en epimastigotes, no existe un aumento en la fluorescencia, por lo tanto, no se genera estrés oxidativo, sin embargo, el compuesto MDP04 muestra una disminución de la fluorescencia, esto puede deberse a un fenómeno químico (quenching) o un fenómeno biológico (antioxidante). Para ahondar en estos mecanismos es necesario determinar a qué fenómeno específico se trata.

Los compuestos derivados de 6-Ni no se les realizó evaluación de generación de ERO debido a su inactividad sobre la forma epimastigote del parásito (Tabla 6).

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha llevado a cabo ensayos electroquímicos y biológicos de una serie de compuestos heterociclos nitrogenados de diferentes familias; derivados de 6- Ni/5-Ni y derivados de β -C en *T. cruzi*. Los ensayos biológicos se realizaron sobre la forma epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi* donde se determinó la actividad tripanocida de los compuestos en estudio.

Los miembros de la serie de derivados de 6-Ni (CM) poseen una estructura que facilita la formación de especies nitro-anión radicalarias y así se comprueba en los estudios electroquímicos realizados a la serie de compuestos, no obstante, resultaron inactivos sobre la forma epimastigote de *T. cruzi*, pero se evidenció una pequeña actividad de los derivados CM02 y CM04 sobre la forma tripomastigote, sin embargo, es casi tres veces inferior a la de Nfx.

Algunos de los compuestos da serie derivados de β -C (MDP01, MDP02, MDP04, MDP05, MDP09, MDP010) mostraron ser antichagásicos más potentes que las drogas tradicionales en la forma epimastigote de *T.cruzi*, dicho comportamiento puede deberse a la estructura que presentan éstos compuestos, específicamente al largo de la cadena alquílica unida al grupos amido de esta serie de compuestos, sin embargo, resultan ser mucho más tóxicos que Nfx en macrófagos RAW 264.7, por lo cual no clasifican para fármacos antichagásicos.

Los resultados obtenidos en el estudio electroquímico a los compuestos derivados de nitroindazoles, revelan la capacidad que posee la serie para reducirse electroquímicamente vía la formación de una especie nitro- anión radicalaria.

El estudio electroquímico bajo el método de REE, en medio aprótico, permitió caracterizar las especies radicalarias y obtener sus CAH, estableciendo patrones característicos para los compuestos derivados de nitroindazoles. Se ha logrado demostrar que, en todos los compuestos en estudio, la deslocalización del electrón se concentra en el grupo nitro de cada molécula, no obstante, las diferencias presentes en dichos compuestos influyen, en menor medida, la estabilización de estas especies.

La evaluación de la actividad tripanocida de los derivados de nitroindazoles por medio de la técnica de reducción de sales de tetrazolio (MTT) mostraron su inactividad total para la forma no infectiva del parásito, en cambio, en la forma infectiva se evidenció un IC_{50} de los compuestos CM02 y CM03 comparables entre sí y activos sobre esta forma del parásito, pero no logran calificar como tripanocidas, producto de valor de IC_{50} superior al de Nfx. Por su parte el compuesto CM01 no califica como activo sobre la forma del parásito ya que su IC_{50} supera los 100 μM y el compuesto CM03 es inactivo en tripomastigote.

El mismo estudio realizado en β -C presentan actividad en la forma epimastigote sobre los 100 μM de los compuestos MDP03, MDP06, MDP07, MDP08, MDP11, por lo que se consideran con baja actividad. El resto de los compuestos han mostrado IC_{50} muy por debajo del Nfx en la forma no infectiva del parásito.

En la forma tripomastigote muestran valores de IC_{50} muy por debajo que Nfx. lo que demuestra una excelente actividad sobre el parásito en su forma infectiva.

Los compuestos derivados de β -C (MDP07, MDP09, MDP10) arrojan resultados favorables en cuanto a inhibición del parásito en su forma tripomastigote (infectiva) en comparación al Nfx que posee un valor superior a éstos en IC_{50} . Sin embargo, en ambas formas del parásito, los valores de IS de cada uno de estos compuestos activos son relativamente bajos ya que son tóxicos en células de mamífero.

La evaluación de especies reactivas de oxígeno se realizó sólo sobre los derivados que presentaron actividad tripanocida sobre la forma epimastigote de *T. cruzi*. En este caso los

derivados analizados fueron: MDP01, MDP02, MDP04, MDP05, MDP09, MDP010, y resultaron ser incapaces de generar ERO en epimastigote comparado con el ERO basal, excepto el compuesto MDP04 que arrojó un posible fenómeno químico de quenching o biológico de antioxidante. Los estudios de medición de ERO sobre macrófagos en MDP01, MDP02 y MDP04 muestran ser cercanos o superiores a la generación respectiva del control positivo y para MDP05, MDP09 y MDP010 cercanas al control de ERO basal. Lo anterior indica que los miembros de la serie de β -C, no actúan vía estrés oxidativo sobre la forma epimastigote de *T. cruzi*.

Finalmente, los resultados de esta investigación permiten sostener que:

- 1- La estructura y la posición del grupo nitro en la serie de compuestos derivados de 6-Ni, influye en la capacidad antichagásica de derivados de nitroindazoles, inactivando a éstos frente a la forma epimastigote y disminuyendo su eficacia en la forma tripomastigote de *T. cruzi*, en comparación a estudios previos de derivados de 5-Ni.
- 2- Los derivados de β -C constituyen un buen sistema y punto de partida para realizar modificaciones estructurales que permitiesen mejorar la actividad antichagásica de la serie y la disminución de su toxicidad en células de mamífero RAW 264.7

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., & Cazzulo, J. J. (2012). The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 195-206. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>
- Apt B, W., Heitmann G, I., Jercic L, M. I., Jofré M, L., Muñoz C. del V, P., Noemí H, I., . . . Zulantay A, I. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Revista chilena de infectología*, 25, 384-389.
- APT B, W., & ZULANTAY A, I. (2011). Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Revista médica de Chile*, 139, 247-257.
- Ballesteros, P., Elguero, J., Claramunt, R. M., Faure, R., de la Concepción Foces-Foces, M. a., Cano, F. H., & Rousseau, A. (1986). The structure of indazolinone and derivatives in the solid state and in solution: an X-ray and nuclear magnetic resonance study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(11), 1677-1681. doi:10.1039/P29860001677
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655-681. doi:10.1128/CMR.00005-11
- Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., & Denicola, A. (2010). Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1736-1745. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>
- Canals, M., Cáceres, D., Alvarado, S., Canals, A., & Cattán, P. E. (2017). Modeling Chagas disease in Chile: From vector to congenital transmission. *Biosystems*, 156-157(Supplement C), 63-71. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.04.004>
- Cao, R., Chen, H., Peng, W., Ma, Y., Hou, X., Guan, H., . . . Xu, A. (2005). Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel β -carboline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(10), 991-1001. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.04.008>
- Cao, R., Chen, Q., Hou, X., Chen, H., Guan, H., Ma, Y., . . . Xu, A. (2004). Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted β -carboline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(17), 4613-4623. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.06.038>
- Cao, R., Peng, W., Chen, H., Hou, X., Guan, H., Chen, Q., . . . Xu, A. (2005a). Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of 1,3-bisubstituted and 1,3,9-trisubstituted [beta]-carboline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(3), 249-257.
- Cao, R., Peng, W., Chen, H., Hou, X., Guan, H., Chen, Q., . . . Xu, A. (2005b). Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of 1,3-bisubstituted and 1,3,9-trisubstituted β -carboline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(3), 249-257. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.11.005>
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z., & Xu, A. (2007). beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14(4), 479-500.
- de Oliveira, T. B., Pedrosa, R. C., & Filho, D. W. (2007). Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *International Journal of Cardiology*, 116(3), 357-363. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.04.046>
- Ferreras González, A., García Cuartero, I., Gato Díez, A., & Ferreras Fernández, P. (2014). Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniasis, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis africana. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(54), 3194-3207. doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70758-9](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70758-9)

- Filigheddu, M. T., Górgolas, M., & Ramos, J. M. (2017). Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clínica*, 148(3), 125-131. doi:<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
- Folch-Cano, C., Olea-Azar, C., Arán, V. J., & Diaz-Urrutia, C. (2010). ESR and electrochemical study of 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and 2-substituted 3-alkoxy-5-nitro-2H-indazoles: Reactivity and free radical production capacity in the presence of biological systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(1), 375-380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.10.044>
- Gupta, S., Wen, J.-J., & Garg, N. J. (2009). Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 8. doi:10.1155/2009/190354
- Kunrath-Lima, M., Repolês, B. M., Alves, C. L., Furtado, C., Rajão, M. A., Macedo, A. M., . . . Machado, C. R. (2017). Characterization of Trypanosoma cruzi MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response. *Infection, Genetics and Evolution*, 55, 332-342. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.030>
- Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., . . . Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 601-620. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>
- Maya, J. D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., López-Muñoz, R., & Morello, A. (2010). Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biological Research*, 43, 323-331.
- Momen, H. (1999). Taxonomy of Trypanosoma cruzi: a commentary on characterization and nomenclature. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 181-184.
- Muro, B., Reviriego, F., Navarro, P., Marín, C., Ramírez-Macías, I., Rosales, M. J., . . . Arán, V. J. (2014). New perspectives on the synthesis and antichagasic activity of 3-alkoxy-1-alkyl-5-nitroindazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 124-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.025>
- Muschietti, L. V., Sülsen, V. P., & Martino, V. S. (2013). Chapter 9 - Bioprospection of Potential Trypanocidal Drugs: A Scientific Literature Survey over the Period 2000–2010. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 39, pp. 297-336): Elsevier.
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767-776. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Punukollu, G., Gowda, R. M., Khan, I. A., Navarro, V. S., & Vasavada, B. C. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, 115(3), 279-283. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.03.004>
- Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi Jr, A. (2017). 28 - Clinical phases and forms of Chagas disease A2 - Telleria, Jenny. In M. Tibayrenc (Ed.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)* (pp. 653-686). London: Elsevier.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275-291. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rivas, P., Cassels, B. K., Morello, A., & Repetto, Y. (1999). Effects of some β -carboline alkaloids on intact Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(1), 27-31. doi:[https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10069-5](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10069-5)

- Rodríguez, J., Aran, V. J., Boiani, L., Olea-Azar, C., Lavaggi, M. L., Gonzalez, M., . . . Cosoy, H. S. (2009). New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(24), 8186-8196. doi:10.1016/j.bmc.2009.10.030
- Rodríguez, J., Arán, V. J., Boiani, L., Olea-Azar, C., Lavaggi, M. L., González, M., . . . Cosoy, H. S. (2009). New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(24), 8186-8196.
- Rodríguez, J., Gerpe, A., Aguirre, G., Kemmerling, U., Piro, O. E., Arán, V. J., . . . Cerecetto, H. (2009). Study of 5-nitroindazoles' anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(4), 1545-1553. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.07.018>
- Rodríguez, J., Olea-Azar, C., Barriga, G., Folch, C., Gerpe, A., Cerecetto, H., & González, M. (2008). Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-Alcoxy, 3-hydroxy and 3-oxo derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *70*(3), 557-563. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.07.052>
- Schmidt, A., & Dreger, A. (2011). Recent Advances in the Chemistry of Pyrazoles. Properties, Biological Activities, and Syntheses. *Current Organic Chemistry*, *15*(9), 1423-1463. doi:10.2174/138527211795378263
- Shi, B., Cao, R., Fan, W., Guo, L., Ma, Q., Chen, X., . . . Song, H. (2013). Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel bivalent β -carbolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *60*, 10-22. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.11.033>
- Souza, W. d. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *94*, 17-36.
- Valdez, R. H., Tonin, L. T. D., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., Morgado-Diaz, J. A., Sarragiotto, M. H., & Nakamura, C. V. (2009). Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, *110*(1), 7-14. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.008>
- Vandermark, C., Ziemann, E., Boyles, E., Nielsen, C. K., Davis, C., & Jiménez, F. A. (2018). *Trypanosoma cruzi* strain TcIV infects raccoons from Illinois. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *113*, 30-37.
- Zacks, M. A., Wen, J.-J., Vyatkina, G., Bhatia, V., & Garg, N. (2005). An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *77*, 695-715.

7. ANEXOS

7.1 Descripción de Métodos

7.1.1 Estudio electroquímico

Se realizan estudios de Voltametría Cíclica (VC) con el fin de estudiar mecanismos del sistema redox, específicamente en búsqueda de la formación nitro

anión radicalaria ya que esta técnica permite obtener información cuantitativa y cualitativa del analito. Se basa principalmente en la relación que existe entre los valores de corriente (I) y potencial aplicado (E). Se aplica un barrido lineal de potencial sobre el electrodo de trabajo, hasta alcanzar un potencial establecido (potencial de switching), una vez alcanzado este potencial se invierte la dirección de barrido hasta llegar nuevamente al potencial inicial. Este proceso electroquímico se registra por un potenciostato que mide la corriente resultante al potencial que se le aplicó. Por medio de estos parámetros se obtiene una representación gráfica llamada voltamograma cíclico.

Los parámetros característicos (Figura 18) de este voltamograma son el potencial de pico catódico (E_{pc}), el potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de switching (E_{λ}), corriente de pico catódico (i_{pc}), corriente de pico anódico (i_{pa}) y corriente de switching (i_{λ}).

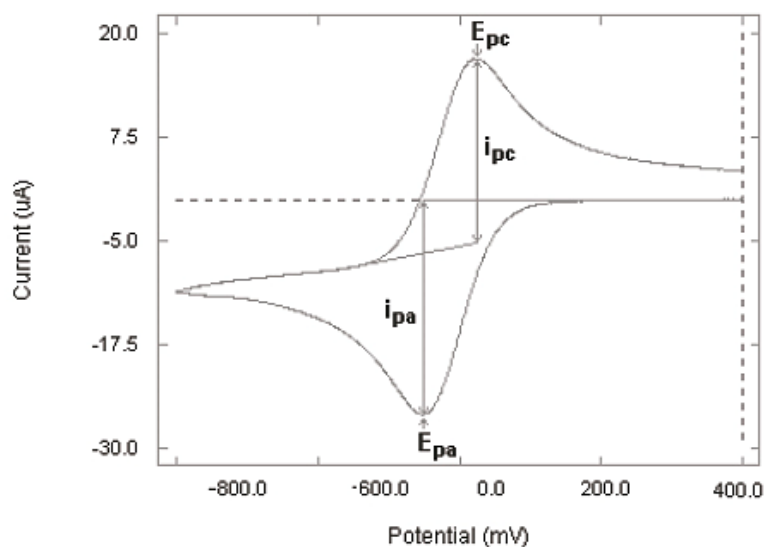


Figura 19. Voltamograma cíclico con sus parámetros característicos.

A partir de ciertos criterios de diagnóstico se puede establecer si la transferencia electrónica es de tipo reversible, cuasi – reversible o irreversible. Si una cupla redox manifiesta un proceso donde las cuplas intercambian electrones rápidamente

con el electrodo de trabajo, es electroquímicamente reversible, su relación de corriente es igual a la unidad y su ΔE $60/n$ mV a 25 °C, donde n es la cantidad de electrones involucrados en la semireacción.

A partir del análisis de los voltamogramas, se puede determinar si las reacciones de transferencia electrónica ocurridas son de tipo reversibles, cuasirreversibles o irreversibles.

Reacciones reversibles

Se caracterizan porque sus intensidades de corriente de picos anódico y catódico son iguales y a su vez los valores de potenciales se mantienen constantes a toda velocidad de barrido.

Los criterios para establecer una reacción reversible son:

- $\Delta E_p = 60$ mV, independiente de la velocidad de barrido a la que se someta el sistema.
- $I_{p_a}/I_{p_c} = 1$, en todo rango de velocidades de barrido de potencial.

Reacciones cuasi-reversibles

Donde las intensidades de pico son diferentes, así mismo los potenciales que varían según la velocidad de barrido.

Los criterios para establecer una reacción cuasi-reversible son:

- E_p , varían con las velocidades de barrido.
- ΔE_p , aproximadamente 60 mV a bajas velocidades y va en aumento a mayores velocidades.
- El voltamograma se aproxima a un sistema irreversible al aumentar las velocidades de barrido.
- $I_{p_a}/I_{p_c} \neq 1$

Reacciones irreversibles

En estos sistemas existe la posibilidad que presenten reacciones acopladas.

Los criterios para establecer una reacción irreversible son:

- E_p , varían con las velocidades de barrido.
- $I_{pa}/I_{pc} \neq 1$, no hay corriente de barrido de vuelta.
- $\Delta E_p \neq 60 \text{ mV}$

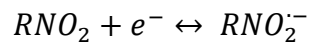
Estas reacciones de transferencia de electrones pueden venir acompañadas de reacciones químicas que tienen lugar antes o después de dicha transferencia, evidenciándose en los voltamogramas.

La relación de corrientes se calcula según el modelo propuesto por R. Nicholson

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = \left| \frac{I_{pa_0}}{I_{pc_0}} \right| + \frac{0,485 (i\lambda)_0}{I_{pc_0}} + 0,085$$

La relación I_{pa}/I_{pc} es igual a 1 cuando no existen reacciones químicas acopladas a la reacción de transferencia electrónica, pero, si el producto de la reacción reacciona posteriormente, esta relación decrece y se ve reflejado en la disminución de la señal de oxidación en el barrido de vuelta.

Los nitro aniones radicales pueden sufrir (en medio aprótico) una reacción de transferencia monoelectrónica acoplada a una reacción química.



7.1.2 Espectroscopia de resonancia de spín electrónico (REE).

La resonancia de spin electrónico es una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados en radicales libres. Es así como provee evidencia directa de la presencia de éste radical libre y su caracterización a través de los espectros de REE. Un espectro, además, puede entregar información como la intensidad del campo magnético aplicado al momento que ocurre la transición, intensidad de señal relacionada con la cantidad de radical libre en la muestra, número de líneas

de espectro que se relaciona con las interacciones hiperfinas, es decir, las interacciones entre el momento magnético electrónico y el momento magnético nuclear.

7.1.3 Estudio de la actividad biológica por medio de la técnica de reducción de sales de tetrazolio (MTT)

Los estudios para determinar viabilidad y proliferación celular son realizados a través de estudios de reducción de MTT. El ensayo colorimétrico basado en MTT (sal de tetrazolio) es una técnica donde el MTT se reduce a cristales de formazán gracias a la acción de la enzima deshidrogenasa mitocondrial, tomando una coloración azul/purpura. Dicho proceso solo se lleva a cabo sólo por células vivas, de tal forma que a través de este ensayo es posible cuantificar proliferación y/o viabilidad celular en presencia de los compuestos estudiados.

7.1.4 Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Durante la respiración celular se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) de manera natural. A pesar de que estas especies pueden resultar nocivas para la célula, existe un complejo mecanismo antioxidante por el cual las células se protegen de estas especies. Este sistema varía dependiendo de la especie, en el caso de los tripanosomátidos es el tripanotión y cumple el papel fundamental en la supervivencia del parásito. Otro importante mecanismo de defensa contra ERO son las tioredoxinas (Trx), sistema antioxidante, que regula el balance de las proteínas que contienen ditiolos/disulfuros. Este sistema es capaz de remover ERO y RNS en cortos tiempos de reacción. Para determinar la formación de ERO se utiliza el sensor intracelular di-clorofluoresceín-diacetilado (DCFDA). Este fluoróforo permite identificar y cuantificar la concentración de estas especies en los cultivos celulares. La oxidación de la sonda produce un cambio en su estructura que la transforma en una molécula fluorescente, por tanto, el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de las especies oxidantes (ERO).