

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA



**“Evaluación química biológica de derivados bis [1,2,3] triazolo [1,5 α] piridin cetonas,
como agentes antichagásicos.”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en

Química

Por:

Michel Andrés Lapier Quezada

Director de Tesis

Dr. Claudio Olea Azar

Co Director de Tesis

Dr. Rodrigo Lopez-Muñoz

SANTIAGO, CHILE

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Michel Andrés Lapier Quezada

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de.....de 2015.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Co director de Tesis

Dr. Rodrigo Lopez Muñoz

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Soledad Bollo (Presidente)

Dra. Ulrike kemmerling

Dra. Margarita Aliaga

Dr. Patricio Iturriaga

Durante esta tesis se contó con el financiamiento de las

Siguientes Becas otorgadas por:

Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Beca de Facultad, 2011

Beca rebaja de Arancel 2011 al 2015

CONICYT

Beca Doctorado Nacional N° 21130455 (2013)

Beca de eventos y cursos cortos en Chile (2012-2013-2014)

Beca de evento internacional (2013)

Beca de pasantía doctoral en el extranjero (2014)

Beca de gastos operacionales (2013-2014)

Extensión de Beca doctoral (2015)

Publicación de la tesis

2015: Michel Lapier, Benjamín Aguilera-Venegas, María Carolina Zuñiga, Rosa Adam, Belén Abarca, Rafael Ballesteros, Rodrigo López-Muñoz. Juan Diego Maya and Claudio Olea-Azar. "Evaluation of the novel antichagasic activity of [1,2,3]Triazolo[1,5-*a*]pyridine derivatives". Pre-acceptada.

Publicaciones en el periodo doctoral.

- **2011:** Benjamín Aguilera-Venegas, Claudio Olea-Azar, Ester Norambuena, Vicente J. Arán, Fernando Mendizábal, **Michel Lapier**, Juan Diego Maya, Ulrike Kemmerling, Rodrigo López-Muñoz. "ESR, electrochemical, molecular modeling and biological evaluation of 4-substituted and 1,4-disubstituted 7-nitroquinoxalin-2-ones as potential anti-Trypanosoma cruzi agents." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011 Mar;78(3):1004-12. doi: 10.1016/j.saa.2010.12.017. Epub 2010 Dec 16.
- **2012:** Christian A. Díaz-Urrutia, Claudio A. Olea-Azar, Gerald A. Zapata, **Michel Lapier**, Francisco Mura, Vicente J. Arán, Rodrigo A. López-Muñoz, Juan D. Maya. Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2012 Sep;95:670-8. doi: 10.1016/j.saa.2012.04.076. Epub 2012 Apr 25.
- **2012:** Pérez-Cruz F, Serra S, Delogu G, **Lapier M**, Maya JD, Olea-Azar C, Santana L, Uriarte E. "Antitrypanosomal and antioxidant properties of 4-hydroxycoumarins derivatives." *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Sep;22(17):5569-73. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.07.013. Epub 2012 Jul 13.
- **2013:** Pérez-Cruz F, Aguilera-Venegas B, **Lapier M**, Sobarzo-Sánchez E, Uriarte Villares E, Olea-Azar C. "Host-guest interaction between new nitrooxoisoporphine and β -cyclodextrins: synthesis, electrochemical, electron spin resonance and molecular modeling studies." *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013 Feb;102:226-34. doi: 10.1016/j.saa.2012.09.068. Epub 2012 Oct 26.
- **2013:** Urra FA, Martínez-Cifuentes M, Pavani M, **Lapier M**, Jaña-Prado F, Parra E, Maya JD, Pessoa-Mahana H, Ferreira J, Araya-Maturana R. "An ortho-carbonyl substituted hydroquinone derivative is an anticancer agent that acts by inhibiting mitochondrial bioenergetics and by inducing G₂/M-phase arrest in mammary adenocarcinoma TA3." *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Mar 15;267(3):218-27. doi: 10.1016/j.taap.2012.12.023. Epub 2013 Jan 17.
- **2013:** Molina-Berríos A, Campos-Estrada C, **Lapier M**, Duaso J, Kemmerling U, Galanti N, Leiva M, Ferreira J, López-Muñoz R, Maya JD. "Benzimidazole prevents endothelial damage in an experimental model of Chagas disease." *Acta Trop*. 2013 Jul;127(1):6-13. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.03.006. Epub 2013 Mar 23.

- **2013:** Molina-Berríos A, Campos-Estrada C, **Lapier M**, Duaso J, Kemmerling U, Galanti N, Ferreira J, Morello A, López-Muñoz R, Maya JD. “Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease.” *Parasitol Res.* 2013 May 17. PMID:23681190
- **2013:** Saleta Vazquez-Rodriguez, Roberto Figueroa-Guñez, Maria João Matos, Lourdes Santana, Eugenio Uriarte, **Michel Lapier**, Juan Diego Maya and Claudio Olea-Azar. “Synthesis of coumarin–chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties” *Med. Chem. Commun.*, 2013,4, 993-1000 DOI: 10.1039/C3MD00025G
- **2013:** Rodrigo Arancibia, A. Hugo Klahn, Gonzalo E. Buono-Core , Daniel Contreras, German Barriga, Claudio Olea-Azar, **Michel Lapier**, Juan D. Maya, Andrés Ibañez, Maria Teresa Garland . “Organometallic Schiff bases derived from 5-nitrothiophene and 5-nitrofurane: Synthesis, crystallographic, electrochemical, ESR and antiTrypanosoma cruzi studies” *Journal of Organometallic Chemistry.* 10/2013; DOI: 10.1016/j.jorganchem.2013.06.014
- **2013:** Fabián Jaña, Francesca Faini, **Michel Lapier**, Mario Pavani, Ulrike Kemmerling, Antonio Morello, Juan Diego Maya, José Jara, Eduardo Parra, Jorge Ferreira.” Tumor cell death induced by the inhibition of mitochondrial electron transport: The effect of 3 -hydroxybakuchiol” *Toxicology and Applied Pharmacology* 272 (2013) 356–364, DOI: 10.1016/j.taap.2013.06.005
- **2013:** Rodrigo Arancibia, A. Hugo Klahn, **Michel Lapier**, Juan D. Maya, Andrés Ibañez, Maria Teresa Garland, Séverine Carrère-Kremer, Laurent Kremer, Christophe Biot. ”Synthesis, characterization and in vitro anti-Trypanosoma cruzi and anti-Mycobacterium tuberculosis evaluations of cyrhetrenyl and ferrocenyl thiosemicarbazones”. *Journal of Organometallic Chemistry* 755 1-6. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2013.12.049
- **2014:** Cynthia Sarniguet, Jeannette Toloza, Micaella Cipriani, **Michel Lapier**, Marisol Vieites, Yanis Toledano-Magaña, Juan Carlos García-Ramos & Lena Ruiz-Azuara, Virtudes Moreno, Juan Diego Maya, Claudio Olea Azar, Dinorah Gambino, Lucía Otero.” Water-Soluble Ruthenium Complexes Bearing Activity Against Protozoan Parasites” *Biol Trace Elem Res.* DOI 10.1007/s12011-014-9964-0
- **2015:** Campos-Estrada C, Liempi A, González-Herrera F, **Lapier M**, Kemmerling U, Pesce B, Ferreira J, López-Muñoz R, Maya JD.” Simvastatin and Benzimidazole-Mediated Prevention of Trypanosoma cruzi-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin.” *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 May 15;9(5):e0003770. doi: 10.1371/journal.pntd.0003770.

Asistencia a congreso.

Nacionales:

- 2011 II Simposio Radicales Libres y Antioxidantes. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, Santiago, Chile.
- 2012 XXXIV congreso anual de la sociedad de farmacología de Chile. Hotel park lake, Pucón, Chile.
- 2013 XXX Jornadas Chilenas de Química, Gran Hotel Pucón, Pucón, Chile.
- 2013 XV Jornadas Anuales de parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile.

Internacionales:

- 2012 EFMC-ISMC 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry Berlin, Germany
- 2013 VIII Meeting of the Society Free Radical Biology and Medicine-South American Group (VIII SFRBM-SAG), Buenos Aires, Argentina.
- 2014 IV congreso de estudiantes de farmacia de la UV. II edición internacional. Valencia, España.

Esta tesis la dedico con mucho amor a mis padres, mi hermana querida y a mi gran amor Karen Valdés, por todo el gran sacrificio que han realizado, por entregarme todo su amor, sabiduría y por sobre todo su apoyo.

"Los conceptos y principios fundamentales de la ciencia son invenciones libres del espíritu humano"

Albert Einstein

"No hay emoción más intensa para un inventor que ver una de sus creaciones funcionando"

Nikola Tesla

"El científico no busca un resultado inmediato. No espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para los que vendrán, señalar el camino"

Nikola Tesla

Agradecimientos

Me gustaría expresar mis sinceros agradecimientos a mis tutores de tesis Dr. Claudio Olea y el Dr. Rodrigo López, quienes me apoyaron durante todo el desarrollo de esta tesis. Les agradezco por confiar en mis capacidades, por ayudarme a crecer como profesional y por compartir mis éxitos y fracasos.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Claudio Olea, por recibirme en su laboratorio durante todo este tiempo. Gracias a su pasión por la ciencia, ha generado un grupo de investigación muy unido y de gran valor científico del cual estoy orgulloso de ser parte de él. Su ayuda nos permitió solucionar los inconvenientes que se presentaron en el desarrollo de esta tesis, demostrando su gran experiencia como científico y su paciencia, sobre todo en los momentos en que el tiempo no ayudaba. También quiero agradecer su preocupación y sus consejos que demuestra su calidad como profesor y persona. Sólo me queda darle nuevamente las gracias por todo, muchas gracias.

Al Dr. Rodrigo López le agradezco por enseñarme muchas cosas de la biología y la vida, que en los momentos importantes y decisivos su ayuda me permitió superar las dificultades que se presentaron, además agregar que

cuando llegue al laboratorio creamos una linda amistad, que con la distancia no desaparecerá, gracias amigo y colega.

Quiero agradecer enormemente al Dr. Juan Diego Maya por aceptarme en su laboratorio y compartir sus conocimientos con gran simpatía, además de la paciencia y del gran apoyo que me dio durante los periodos más complejos que he vivido en mi vida académica y laboral, muchas gracias.

Agradezco también a los miembros de mi comisión evaluadora quienes impulsaron, a través de sus recomendaciones y críticas, el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a mis compañeros del grupo de radicales libres y antioxidantes, los que sin duda fueron un gran apoyo para la realización de esta tesis. Me gustaría agradecer a Benjamín Aguilera, Alejandra herrera, Francisco Mura, Maria Carolina Zuñiga, Jeannette Toloza y Roberto Figueroa, por su valiosa compañía y ayuda en la realización de esta tesis, gracias por su alegría, por su amistad, por su ayuda y sobre todo por su afectuosa compañía. También agradecer a mis compañeros del programa de farmacología en especial agradezco a Carito Campos, Vikita Díaz, Lili Peredo, Félix Urra, Piri, Alfredo Molina, José Jara, Mabel Catalán, Cristian

Castillo, Anita Liempi y Daniel Droguet por todos los momentos que pasamos juntos, gracias por sus consejos y compañía.

Don Enrique y Charly, muchas gracias por hacer del trabajo en el laboratorio algo muy agradable y por ayudarme en todo sentido.

También agradecer a todas las personas, con las cuales he compartido gratos momentos de este proceso a Faby, Seba, Dany, Natalia, Andrea, Iván, Silvana.

Agradezco a la Dra. Belén Abarca y a los Drs. Rafael Ballesteros (padre e hijo) por su buena acogida en la estadía que realice en su laboratorio en Valencia, gracias por compartir sus conocimientos y compañía. Por supuesto agradecer a Rosa Adam, María Cabrero y a mi gran amigo Cesar Bernat, por su gran hospitalidad, gran simpatía y por mostrarme su gran amabilidad.

A la secretaría de postgrado por su cordialidad y apoyo durante toda mi carrera doctoral. Agradezco a CONICYT por las becas de realización de doctorado nacional y apoyo a la realización de tesis doctoral, así como también a Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Para finalizar quiero agradecer profundamente a mi familia, por su apoyo y paciencia durante el periodo de la realización de esta tesis. Gracias a mis

padres y a mi hermana por darme la fuerza y el cariño para poder seguir adelante frente a la adversidad.

Además me gustaría expresar todo el cariño a una persona que me acompañó en todo este proceso y compartió los momentos difíciles, los cuales sin ti no hubiese podido superar, gracias Karen Valdes (TQM).

ABREVIATURAS

Ag/AgCl	Plata/Cloruro de Plata
AKR	Aldo ceto reductasas
ABAP	2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloro
BNZ	Benznidazol
CYP	Citocromo P450
DMPO	5,5- dimetil-1-pirrol-N-oxido
DMPO-CH₃	Espín aducto DMPO- Metilo
DMPO-OH	Espín aducto DMPO- Hidroxilo
DMPOX	DMPO en su forma oxidada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DSA	Análisis de muestra directo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
Epa	Potencial de pico anódica
Epc	Potencial de pico catódica
HDME	Gota Colgante de Mercurio
Ipa	Intensidad de pico anódica
Ipc	Intensidad de pico catódica
KCl	Cloruro de Potasio
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro

NAC	N-acetil L-Cisteína
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleótido
Nfx	Nifurtimox
NTR1	Nitroreductasas tipo I, dependientes de oxígeno
PBS	Tampón Fosfato salino
(PY)₂CO	Bis (2-piridil) cetona
REE	Resonancia de Espín Electrónico
SBF	Suero fetal bobino
TBAP	Perclorato de tetrabutil amonio
Trx	Tioredoxinas
VC	Voltametría Cíclica

CONTENIDOS

Resumen	1
Summary	3
1 Introducción	5
1.1 La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana.....	5
1.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.	7
1.3 Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.4 Tratamiento de la enfermedad de Chagas: mecanismo de acción de drogas antichagásicas.	9
1.5 Estrés oxidativo como mecanismo de drogas antiparasitarias.....	14
1.6 Triazoles y la biosíntesis de esteroides.	18
1.7 Propiedades de las Triazolopiridinas y su interés biológico.	22
2 Hipótesis.....	25
3 Objetivos.	25
3.1 Objetivos Generales.	25
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 Materiales y Métodos.	27
4.1 Cultivos celulares.....	27
4.2 Cultivo de Epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4.3 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio.....	28
4.4 Evaluación del mecanismo de reducción de la serie triazolo piridinas por voltametría cíclica.	29
4.5 Determinación de las especies radicalarias por Resonancia Espín Electrónico.....	29
4.6 Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de <i>T. cruzi</i> y células de mamífero.....	30
4.7 Estudio de Spin Trap en modelos celulares de <i>T. cruzi</i> y células de mamífero.....	31
4.8 Estudio de biosíntesis de ergosterol por espectroscopia de masas.	31
4.9 Análisis estadístico.	33
5 Resultados y discusión.	34

5.1 Efecto de triazolo piridinas sobre la viabilidad celular en <i>T. cruzi</i> y en células de mamífero.....	34
5.2 Efecto de triazolo piridinas sobre la proliferación celular en <i>T. cruzi</i>	37
5.3 Relación estructura-actividad anti proliferativa de la serie triazolo piridina sobre <i>T. cruzi</i>	41
5.4 Estudio de reducción electroquímica.....	44
5.5 Estudio de formación de radicales libres.	50
5.6 Ensayo de atrapamiento de radicales libres en sistemas biológicos.	54
5.7 Formación especies reactivas del oxígeno en <i>T. cruzi</i> y células de mamífero expuestas a los compuestos y su relación con el efecto tripanocida.	60
5.8 Estudio de biosíntesis de ergosterol por espectroscopia de masas.	67
5.9 Diseño de nuevos fármacos antiparasitario	78
6 Conclusiones	85
7 Referencias.....	86
Anexo 1. Valores teóricos y experimentales (HFCC).....	95
Anexo2. Caracterización de nuevos derivados de [1,2,3] triazolo [1,5 α]piridinas.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , MUESTRA DE SANGRE TEÑIDA CON GIEMSA.	6
FIGURA 2: ESTRUCTURA QUÍMICA DE NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL.....	8
FIGURA 3: CICLO BIOLÓGICO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	10
FIGURA 4: MECANISMO DE REDUCCIÓN DE NIFURTIMOX POR LA NITROREDUCTASA TIPO 1 (NTR1) PRESENTE EN TRIPANOSOMÁTIDOS (ADAPTADO) [12].	12
FIGURA 5: MECANISMO DE REDUCCIÓN DE BENZNIDAZOL POR LA NITROREDUCTASA TIPO 1 (NTR1) PRESENTE EN TRIPANOSOMÁTIDOS (ADAPTADO) [13].	13
FIGURA 6: MECANISMO DE ACCIÓN DE QUINONAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y SU EFECTO EN UN SISTEMA BIOLÓGICO [15].	15
FIGURA 7: MOLÉCULA HÍBRIDA (NAFTOQUINONA TRIAZÓLICA), CON EFECTO ANTIPARASITARIO [18].	16
FIGURA 8: GENERACIÓN DEL RADICAL HIDROXILO (REACCIÓN DE HABER-WEISS). A) OXIDACIÓN DE HIERRO II A HIERRO III POR REDUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. B) FORMACIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO POR OXIDACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. C) FORMACIÓN DEL RADICAL HIDROXILO A PARTIR DE LA REACCIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO Y EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.	17
FIGURA 9: BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	19
FIGURA 10: ENZIMA CYP51. (A) UNIÓN DE UN FARMACÓFORO AL SITIO ACTIVO DE CYP51. (B) ENZIMA CYP51, EN DONDE APARECE EL CANAL HIDROFÓBICO Y EL SITIO ACTIVO PORFIRINA-HIERRO [40].....	21
FIGURA 11: REORDENAMIENTO DE 3-(2'-PIRIDIL)-[1,2,3]TRIAZOLO[1,5-A]PIRIDINAS EN SUS DOS FORMAS ISOMERICAS [44].	22
FIGURA 12: SERIE TRIAZOLO PIRIDINAS CETÓNICAS, OBTENIDAS POR LA COLABORACIÓN DE LA DRA. BELÉN ABARCA, VALENCIA ESPAÑA.....	24
FIGURA 13: CURVAS DE CRECIMIENTO REPRESENTATIVA, CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES DM28C INCUBADOS CON FLUCONAZOL Y EL COMPUESTO 4, EVALUADOS POR 3 DÍAS MEDIANTE MTT.....	38
FIGURA 14: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS. A) VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DEL COMPUESTO 8 EN MEDIO APRÓTICO (DMSO + 0,1 M PTBA) A UNA VELOCIDAD DE BARRIDO DE 2V/s. B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICO DEL COMPUESTO 2 EN MEDIO APRÓTICO (DMSO + 0,1 M TBAP) A DISTINTAS VELOCIDADES DE BARRIDO (2,5-0,25V/s).....	46
FIGURA 15: VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DEL COMPUESTO 2 A TRES BARRIDOS SUCEIVOS EN MEDIO APRÓTICO (DMSO + 0,1 M PTBA) A UNA VELOCIDAD DE BARRIDO DE 2V/s ⁻¹	47
FIGURA 16: MECANISMO DE REDUCCIÓN PROPUESTO PARA LA SERIE [1,2,3] TRIAZOLO PIRIDIN CETONA. COMO EJEMPLO SE MUESTRA LA ESTRUCTURA 2 EN DONDE SE OBSERVA LA FORMACIÓN DE LOS DERIVADOS ANIÓNICOS.....	48

FIGURA 17: RELACIÓN ENTRE LOS POTENCIALES DE REDUCCIÓN VERSUS LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EPIMASTIGOTES DM28C. GRÁFICO REALIZADO CON LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN LA TABLAS 3 Y 4	49
FIGURA 18: ESPECTROS REE EXPERIMENTAL (NEGRO) Y ESPECTRO REE SIMULADO (ROJO). A) ESPECTRO REE DE LA MOLÉCULA 9 B) ESPECTRO REE DE LA MOLÉCULA 5.	52
FIGURA 19: DENSIDAD DE ESPIN PARA LAS ESTRUCTURAS DERIVADO 1= COMPUESTO 1; DERIVADO 2=COMPUESTO 9; DERIVADO 3= COMPUESTO 10; DERIVADO 4= COMPUESTO 5	53
FIGURA 20: EJEMPLOS DE SPIN TRAP PARA RADICALES CENTRADO EN OXÍGENO Y CARBONO ATRAPADOS CON DMPO, GENERADOS DE MANERA QUÍMICA.	55
FIGURA 21: ESPECTRO REE DE MENADIONA (CONTROL POSITIVO) GENERADO EN EPIMASTIGOTES DM28C. EN EL ESPECTRO SE SIMBOLIZA A LOS SPIN TRAP: DMPO-CH ₃ (*), AL SPIN-ADUCTO DMPO-OH (+) Y A DMPOX (#).	57
FIGURA 22: ESPECTROS REE DE LOS ADUCTOS CON DMPO EN DISTINTOS CULTIVOS CELULARES. A-D-G) SPIN ADUCTOS SÓLO CON CÉLULAS B) EPIMASTIGOTES CON MENADIONA C) EPIMASTIGOTES CON EL COMPUESTO 4 E) TRIPOMASTIGOTES CON MENADIONA F) TRIPOMASTIGOTES CON COMPUESTO 4 H) MACRÓFAGOS CON MENADIONA I) MACRÓFAGOS CON COMPUESTO 9.	59
FIGURA 23: EFECTO DE PREVENCIÓN CONTRA ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.(A-B) EFECTO DEL MENADIONA Y EL COMPUESTO 9 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN MACRÓFAGOS RAW 264.7. (C-D) EFECTO DE MENADIONA Y COMPUESTO 4 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE TRIPOMASTIGOTES. ENSAYOS DE VIABILIDAD (24Hrs) EVALUADOS MEDIANTE MTT. EN ROJO VIABILIDAD DE LOS COMPUESTOS 4, 9 Y MENADIONA, EN AZUL LA COMBINACIÓN DE LOS COMPUESTOS CON NAC, ENSAYOS EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES RESPECTO AL CONTROL... ..	66
FIGURA 24: MECANISMO DE DESHIDRATACIÓN DE ERGOSTEROL, EFECTO OBSERVADO A PARTIR DE LA IONIZACIÓN DE ERGOSTEROL SOLIDO POR ESPECTROMETRIA DE MASAS.	68
FIGURA 25: ESPECTRO DE MASAS REPRESENTATIVO DE CULTIVO DE EPIMASTIGOTES DM28C, m/z 369,35 (COLESTEROL), m/z 379,33 (ERGOSTEROL), m/z 409,38 (LANOSTEROL) Y m/z 411,39 (ESCUALENO)	70
FIGURA 26: NIVELES RELATIVOS DE ESTEROLES EN <i>T. CRUZI</i> . ESTEROLES OBTENIDOS DE EPIMASTIGOTES DM28C AISLADOS (3,0x10 ⁷ PARÁSITOS/ML), INCUBADOS CON VEHICULO (DMSO < 0,05%, BARRA BLANCA) O CON 100μM DEL COMPUESTO 4(BARRA GRIS) O FLUCONAZOL (BARRA NEGRA). LOS VALORES OBTENIDOS FUERON A PARTIR DE MUESTRAS POR TRIPLICADO (N=3).....	72
FIGURA 27: DIAGRAMA METABOLITOS QUE PARTICIPAN EN LA BIOSÍNTESIS DE ERGOSTEROL EN EPIMASTIGOTES DM28C, LOS VALORES REPRESENTAN LA RELACIÓN	

ENTRE: ESCUALENO/ERGOSTEROL (SQ/ER), ESCUALENO/LANOSTEROL(SQ/LAN) Y LANOSTEROL ERGOSTEROL(LAN/ER).....	75
FIGURA 28: MECANISMO PROPUESTO PARA LA SERIE TRIAZOLO PIRIDINAS.....	77
FIGURA 29: EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN EN LA POSICIÓN TRES DE [1,2,3] TRIAZOLO [1,5- A]PIRIDINA.....	79
FIGURA 30: SUSTITUCIÓN EN LA POSICIÓN 7 POR UN GRUPO CARBONILO Y POSTERIOR REDUCCIÓN.....	80
FIGURA 31: SUSTITUCIONES EN LA POSICIÓN ALFA AL CARBONILO CON VARIADOS ELECTRÓFILOS.	81
FIGURA 32: REDUCCIÓN Y CICLACIÓN DE LA TRIAZOLO PIRIDINA.	82
FIGURA 33: NUEVA SERIE DE [1,2,3]TRIAZOLO[1,5-A]PIRIDINA, CON SUSTITUYENTES DE TIPO ELECTROFILOS COMO PIRIDINAS (<i>ORTO</i> , <i>META</i> Y <i>PARA</i>), PIRAZINA Y TIOFENO.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores porcentuales del efecto de la serie [1,2,3] triazolo piridina cetonas sobre Trypanosoma cruzi y células de mamífero tipo macrófagos RAW 264.7. Los valores son expresados como los porcentajes de viabilidad \pm la desviación estándar respecto al control para tres experimentos independientes (n=3).....	35
Tabla 2: Valores de IC50 en cultivos celulares de T. cruzi y células de mamífero. Los valores son representados como el valor \pm DS. Para tres ensayos independientes (n=3). IS: Índice de selectividad a) IC50 células macrófagos/ tripomastigotes. b) IC50 células macrófagos / amastigotes.....	37
Tabla 3: Porcentajes de inhibición de crecimiento celular de epimastigotes Dm28c. Los valores son expresados como el porcentaje de inhibición respecto al control. Los compuestos fueron agregados a 100 μ M y los valores corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos independientes.	39
Tabla 4: Parámetros electroquímicos característicos de la serie triazolo piridinas obtenidos por voltametría cíclica en medio aprótico, los valores fueron obtenidos a una velocidad de barrido de 2 Vs-1	45
Tabla 5: Efecto de la serie triazolo piridinas sobre Macrófagos murinos y en epimastigotes Dm28c, evaluación de las especies reactiva de oxígeno mediante la sonda intracelular DCFDA. Los valores son expresados como el incremento de la pendiente respecto al control \pm la desviación estándar (n=3).....	61
Tabla 6: Comparación entre el potencial de reducción electroquímico (Volts) y las ERO (número de veces que aumenta la pendiente respecto al control) en T. cruzi y Macrófagos. En rojo las moléculas que presentaron menor potencial de reducción, en verde los compuestos que generaron ERO.	63
Tabla 7: Parámetros de masas teóricas y experimentales de esteroides (sólidos) obtenidos por espectroscopia de masas por el método DSA.....	69

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Efectos de los grupos funcionales sobre la proliferación en epimastigotes Dm28c, los valores son expresados como el porcentaje de la inhibición de crecimiento de los cultivos respecto al control (H= hidrogeno; CH3= metilo; Fen= Fenilo; Pyr= piridina; Imi=imidazol).	43
Esquema 2: Efectos de los grupos funcionales (esqueleto piridin 2,6 di-il bis (2-piridin metanona) sobre la proliferación en epimastigotes Dm28c, los valores son expresados como el porcentaje de la inhibición de crecimiento de los cultivos respecto al control (H= hidrogeno; CH3= metilo; Fen= Fenilo; Pyr= piridina).....	44

RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, provocada por *Trypanosoma cruzi*, presenta un problema de salud pública en Latino América, abarcando cerca de 21 países. El proceso de globalización ha llevado a que la enfermedad se propague a otras áreas no endémicas, convirtiéndola en un problema de salud global.

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se han utilizado drogas como nifurtimox y benznidazol, estas a pesar de tener cierta eficacia en la etapa aguda son ineficaces en la erradicación del parásito. Es por ello, que se han investigado nuevas alternativas farmacológicas, entre ellas drogas antifúngicas, principalmente derivados azólicos, los cuales han demostrado un potente efecto antiparasitario *in vitro* e *in vivo*.

En este trabajo se propone una nueva serie de moléculas triazólicas, conocidas como [1,2,3] triazolo piridinas cetónicas. Las características más importantes de este grupo son la estructura triazólica y la presencia de grupos carbonilos los cuales se proponen como responsables del mecanismo antiparasitario, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y/o la inhibición de la biosíntesis de ergosterol.

Para evaluar las propiedades fisicoquímicas de esta familia, se determinó el mecanismo de reducción y se caracterizó las especies generadas en esta reducción mediante voltametría cíclica y por espectrometría de resonancia de espín electrónico, en donde se encontró la formación de una especie radicalaria, capaz de deslocalizarse a través de los grupos cetopiridinas y estabilizarse por resonancia.

Para relacionar la formación de esta especie radicalaria y la actividad biológica, se estudió y comparó la viabilidad celular en *T. cruzi* y en células de mamífero, siendo el compuesto **4** como el mejor candidato anti-*T. cruzi*. Por otro lado, los derivados **7** y **9** fueron los únicos de la serie que mostraron efectos citotóxicos en células de mamífero.

También se evaluó la formación de especies radicalarias en el parásito y en células de mamífero y se encontró la generación de radical hidroxilo se generaban en ambos sistemas celulares. Sin embargo, la baja concentración de esta especie es incapaz de producir un efecto tóxico en el parásito, por lo cual hemos descartado el estrés oxidativo como principal mecanismo antichagásico.

Como segundo posible mecanismo estudiamos la inhibición de la biosíntesis de esterol, dado que la presencia de un grupo triazólico sería capaz de inhibir la enzima CYP51. Realizamos ensayos por espectroscopia de masas para evaluar los niveles de los esteroides que participan en la biosíntesis de ergosterol. Nuevamente, encontramos que el compuesto **4** es capaz de afectar la biosíntesis de ergosterol en la etapa catabolizada por la enzima CYP51, observándose un aumento en el sustrato de la enzima (lanosterol) y una disminución de su producto (ergosterol), este efecto se observa después de 72 horas de exposición al compuesto.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos, se diseñó de manera racional una nueva serie de derivados de triazolo piridinas, cuyas características incluyen la presencia del núcleo [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridina y distintas variaciones en las posiciones 3 y 7 de esta estructura, con estas modificaciones en estudios posteriores se pretende mejorar el efecto antichagásico de la serie triazolo piridinas.

SUMMARY

American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, presents a public health issue in Latin America, covering about 21 countries. The globalization process has led to the disease spreading to other non-endemic areas, becoming this disease in a global threat.

For the treatment of Chagas disease have been used drugs such as nifurtimox and benznidazole. Although these drugs have some efficacy in the acute stage, are ineffective in eradicating the parasite. For this reason, have been investigated new pharmacological alternatives, including antifungal drugs, mainly azole derivatives, which have demonstrated a potent anti-parasitic effect *in vitro* and *in vivo*.

This work presents a new series of triazolic molecules, known as [1,2,3] triazolo pyridines ketones. The most important features of this group are the triazolic structure and the presence of ketone groups which are proposed as responsible for the antichagasic mechanism, *via* the generation of reactive oxygen species and/or inhibiting ergosterol biosynthesis.

To evaluate the physicochemical properties of this family, the reduction mechanism, and the reduction species generated, were determined by cyclic voltammetry spectrometry and electron spin resonance. We found the formation of a radical species which was able to delocalize among the keto-pyridines groups and stabilize by resonance.

To relate the formation of this radical species with the biological activity, cell viability was studied and compared in *T. cruzi* and mammalian cells. The compound **4** was

identified as the best anti-*T. cruzi* candidate. On the other hand, derivatives **7** and **9** were the only that showed cytotoxic effects on mammalian cells.

Radical species generation in the parasite and in mammalian cells was then evaluated. The generation of toxic species such as the hydroxyl radical was detected in both cell systems. However, the low concentration of this species was unable to produce a toxic effect on the parasite, so we have ruled out the formation of oxidative stress as the main antichagasic mechanism.

In addition, we studied the inhibition of the sterol biosynthesis, since the presence of a triazole group that would be capable of inhibiting the enzyme CYP51. We assessed the levels of the sterols involved in ergosterol biosynthesis by mass spectroscopy. The compound **4** was capable of affect the biosynthesis of ergosterol by inhibition of the enzyme CYP51, increasing the enzyme substrate (lanosterol) and decreasing its product (ergosterol). This effect was observed at 72 hours after exposure of the compounds.

Finally from the results, was rationally designed a new series of triazolo pyridines derivatives, whose features include the presence of the [1,2,3] triazolo [1,5- α] pyridine nucleus and several variations in the positions 3 and 7 of this structure, these modifications are intended to improve the effect of antichagasic series triazolo pyridines.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana.

La tripanosomiasis americana, conocida como la enfermedad de Chagas es una zoonosis provocada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, parásito del genero tripanosomatidae (Figura 1). Esta enfermedad es potencialmente mortal pudiendo inducir a una muerte repentina de personas aparentemente sanas. Esta parasitosis está considerada como una "enfermedad desatendida" del continente americano, afectando aproximadamente 8 millones de personas en Latinoamérica [1, 2].

En Chile, la enfermedad de Chagas ha sido detectada en áreas rurales y suburbanas de zonas áridas y semiáridas, abarcando desde la región de Arica y Parinacota hasta la región del libertador Bernardo O'Higgins. En zonas rurales el parásito es transmitido principalmente por hemípteros hematófagos y utiliza como reservorios a distintas especies animales entre ellas el humano [3].

El impacto de la enfermedad de Chagas no se limita solamente al continente Americano, las migraciones de personas infectadas con el parásito han permitido la propagación a otras regiones no endémicas, aumentando la distribución geográfica de la enfermedad, provocando alerta de salud a nivel mundial. [4].

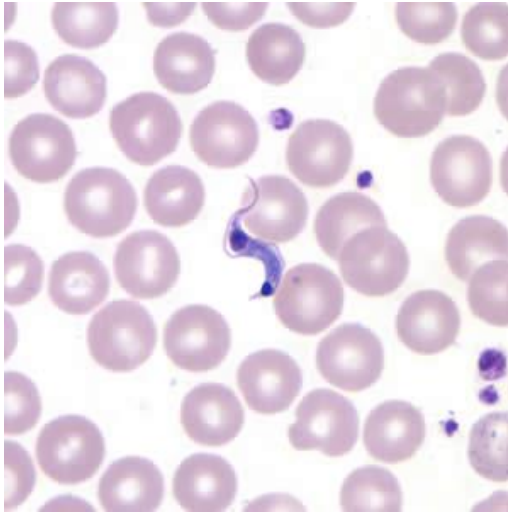


Figura 1. *Trypanosoma cruzi*, presente en un frotis sanguíneo. Muestra teñida con Giemsa y observada en microscopio óptico directo. (Imagen obtenida del CDC, center for disease control and prevention,USA)

En los últimos años se han implementado políticas públicas que buscan intervenir en la transmisión del parásito, estas medidas paliativas contemplan planes de fumigación periódica de viviendas y peri-domiciliario en áreas endémicas, pero estas medidas sólo implican el control del insecto vector conocido en Chile como vinchuca [5]. Estas iniciativas implementadas en la década del '80, han reducido significativamente la transmisión vectorial de la enfermedad. De hecho, la prevalencia de la enfermedad de Chagas en niños menores 15 años así como la tasa de infestación en viviendas ha declinado significativamente en las últimas décadas, el instituto de salud pública (ISP), confirmó solo 1.200 casos durante el 2011 [3].

1.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas comúnmente se presenta en dos fases: aguda y crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas y ser potencialmente mortales.

La fase aguda tiene lugar en las primeras semanas de la infección, generalmente pasa desapercibida por ser asintomática, solo en algunos casos se presentan signos y síntomas leves que no son exclusivos de la enfermedad de Chagas. Estos síntomas pueden incluir fiebre, fatiga, dolor corporal, dolor de cabeza, sarpullido, pérdida de apetito, diarrea y vómitos. El marcador más reconocido de la enfermedad de Chagas se conoce como signo de Romaña, el cual involucra la inflamación del párpado de la cara en las cercanías de la herida dejada por la picadura del insecto. A pesar de que los síntomas generalmente desaparecen, la infección persistirá si no se trata y puede ser grave en personas inmunodeprimidas.

Durante la fase crónica, la infección puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, algunas personas presentan: complicaciones cardíacas (30%), las cuales pueden incluir miocardiopatía, insuficiencia cardíaca, alteración del ritmo o frecuencia cardíaca y paro cardíaco (muerte súbita), además de complicaciones intestinales (10%), que pueden incluir megaesófago o megacolon [1] [3].

Para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan dos fármacos: nifurtimox (Bayer, Lapmpit®) un derivado nitrofurano y benznidazol (Roche, Radanil®) un derivado de nitroimidazol (Figura 2). Estos presentan limitada eficacia contra *Trypanosoma cruzi*, además

de provocar diversos efectos adversos en los pacientes principalmente daños hepáticos, esto ha estimulado la evaluación de nuevas propuestas farmacológicas.

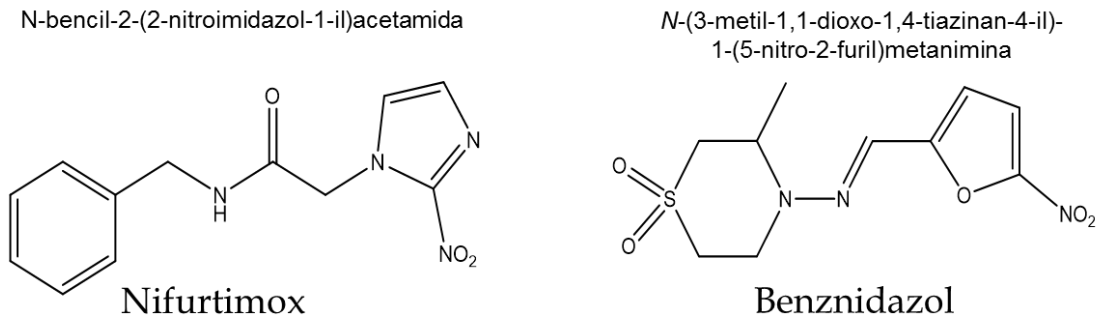


Figura 2. Estructura química de nifurtimox y benznidazol

1.3 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Figura 3) involucra tres estadios morfológicos que dependen del hospedero (mamífero o insecto) en el cual se encuentre el parásito. Las distintas formas del parásito se diferencian por la posición relativa del flagelo, kinetoplasto y núcleo, se denomina a tripomastigote (forma infectiva no replicativa del parásito, presente en sangre de los mamíferos infectados), a epimastigotes (forma replicativa, presente en el vector) y amastigotes (forma replicativa dentro de las células de mamífero).

El ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 3) se inicia cuando el vector (vinchuca) se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con el parásito (tripomastigote), una vez dentro del vector, viaja a través del sistema digestivo y se diferencia a epimastigote, estos son

capaces de multiplicarse por fisión binaria en el intestino del vector y transformarse nuevamente a tripomastigotes (metacíclicos) en la región terminal del intestino donde son eliminados junto a las heces. El vector infectado se alimenta succionando sangre de un nuevo mamífero defecando en las cercanías de la herida. Con ello el parásito es capaz de ingresar al flujo sanguíneo. En su recorrido por el torrente sanguíneo es capaz de infectar a cualquier tipo de célula nucleada, entre ellas el primer sistema de defensa los macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar al parásito. Ya en su interior el tripomastigote es capaz de evadir la acción oxidativa del macrófago e infiltrarse al citoplasma de las células, para luego diferenciarse a amastigotes. Luego de sucesivas divisiones, el parásito nuevamente se transforma a tripomastigote, el gran número de parásitos en la célula genera la lisis de la membrana plasmática dando paso a una nueva infección y completándose así el ciclo de la enfermedad [6, 7].

1.4 Tratamiento de la enfermedad de Chagas: mecanismo de acción de drogas antichagásicas.

Los tripanosomatidos, como otros parásitos, han desarrollado una gran variedad de funciones fisiológicas necesarias para su supervivencia, el uso de estas funciones son notablemente distintas del hospedero, como por ejemplo la utilización de moléculas antioxidantes. En el parásito tripanotion es el principal antioxidante [8] en comparación a las células de mamífero que utilizan glutatión [9]. No obstante, ambas cumplen la misma

función; proteger la célula de agentes citotóxicos tanto exógenos como endógenos y así mantener la homeostasis celular.

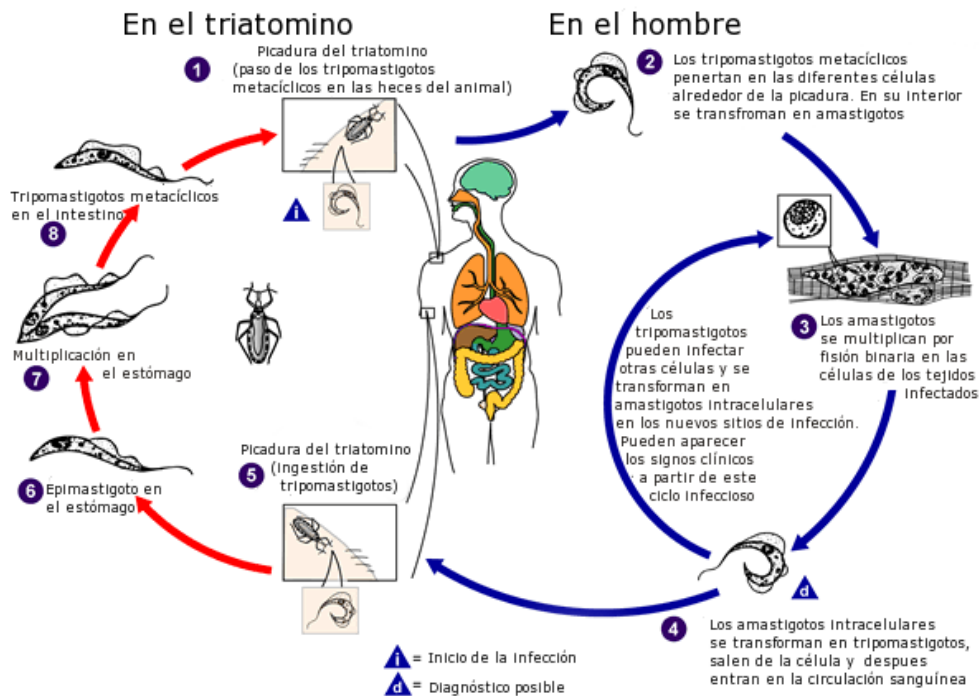


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

Los fármacos tradicionales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son nifurtimox y benznidazol. Si bien el modo de acción de estos fármacos aún no está completamente dilucidado, se ha descrito una relación entre la reducción de estas drogas y la formación de radicales libres y/o la generación de metabolitos electrofílicos [10], estos en su mayoría corresponderían a especies centradas en oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), sin embargo las especies de oxígeno cobran mayor importancia dado el caso del radical hidroxilo (OH^\cdot)

) que no existen mecanismos biológicos capaces de neutralizar esta especie, provocando mayor daño en los sistemas biológicos [11].

Estudios recientes en *T. brucei* evidenciaron que las especies radicalarias producidas por nifurtimox se generan durante la metabolización del fármaco, estas involucrarían la reducción del grupo nitro (R-NO₂) por acción de nitro-reductasas tipo I dependientes de oxígeno (NTR1) y la activación de otras enzimas, incluyendo prostaglandina F₂ sintasa, y el citocromo P450 reductasa, provocando la generación de intermediarios nitro-anión radicales (R-NO₂⁻) que en consecuencia provocarían estrés oxidativo en el parásito [10].

De esta manera la primera etapa es la activación de nifurtimox por NTR1, provoca la reducción del grupo nitro, posteriormente por la inestabilidad de estas moléculas se induce a la formación de una molécula de cadena abierta con un nitrilo insaturado (Figura 4). Esta molécula (nitrilo de cadena abierta) ha demostrado inhibir el crecimiento del parásito. Por otro lado, sólo células con niveles elevados de NTR1 muestran susceptibilidad a este nitrofurano, jugando así un rol importante en la acción del fármaco [12].

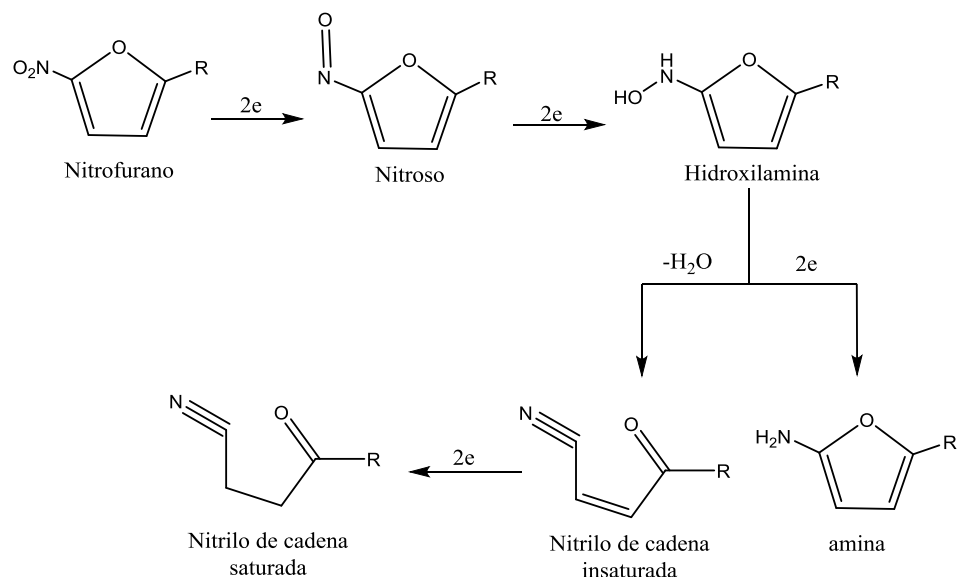


Figura 4. Mecanismo de reducción de nifurtimox por la nitroreductasa Tipo 1 (NTR1) presente en tripanosomátidos (adaptado) [12].

En el caso de benznidazol, su activación conduce a la formación de metabolitos oxidantes que pueden causar daño en el ADN y el agotamiento de tioles [10].

Al igual que nifurtimox, la reducción del benznidazol involucra en una primera etapa de reducción del grupo nitro por acción de nitroreductasas NADH-dependiente de tipo I. La interacción de esta especie inestable con el oxígeno, sumado a la interacción con productos reducidos como prodrogas, provocarían un mecanismo tipo ping-pong que afectaría la viabilidad del parásito.

El análisis metabolómico en parásitos tratados con benznidazol, mediante HPLC/MS, ha permitido identificar la presencia de 4,5-dihidro-4,5-dihidroimidazol como el principal producto de la reducción, el cual a su vez genera intermediarios de tipo hidroxilamina. La

ruptura de estos productos, inducirían a la formación de glioxal, molécula altamente reactiva, que en presencia de bases nitrogenadas como guanosina genera aductos citotóxicos (Figura 5) [13].

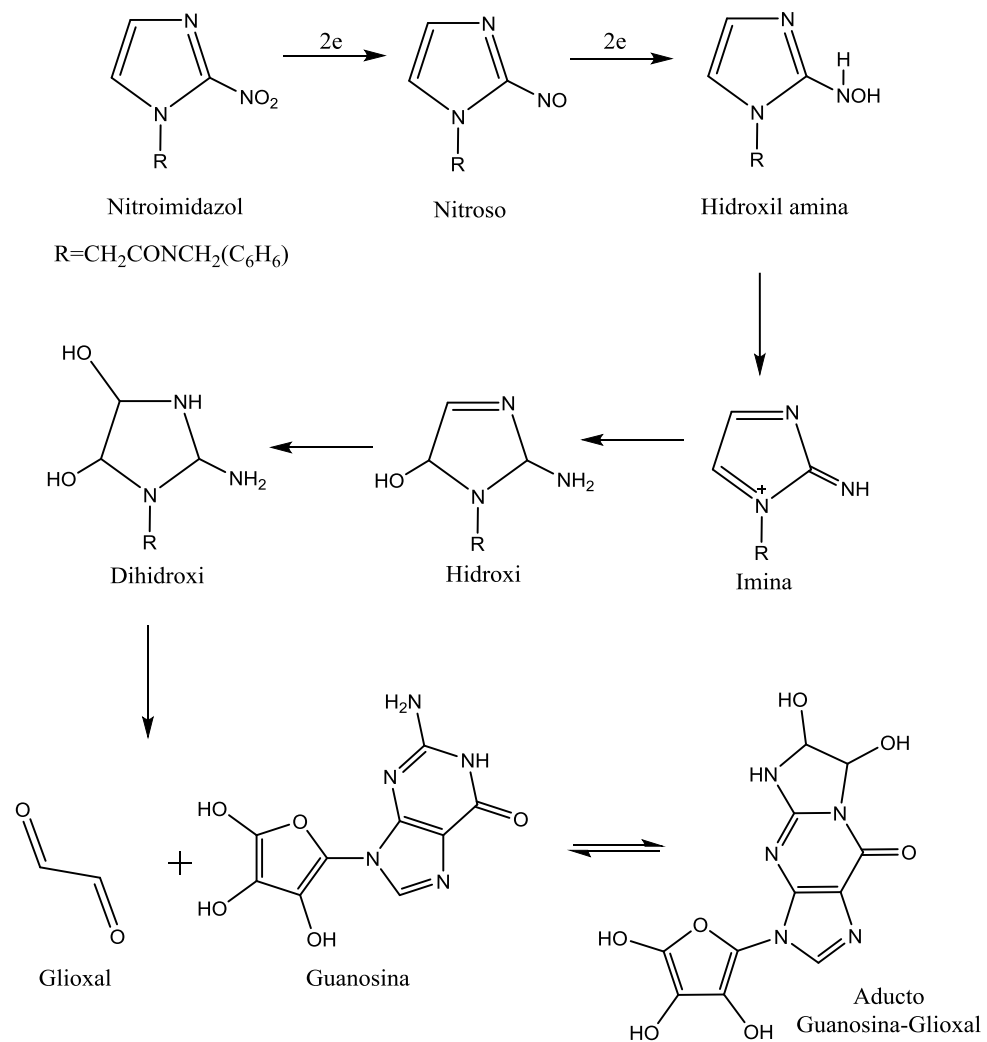


Figura 5. Mecanismo de reducción de benznidazol por la nitroreductasa Tipo 1 (NTR1) presente en tripanosomátidos (adaptado) [13].

1.5 Estrés oxidativo como mecanismo de drogas antiparasitarias.

El estrés oxidativo (desbalance de la relación entre la capacidad antioxidante y un estímulo prooxidante) se ha investigado ampliamente en diversos sistemas biológicos como parásitos y tumores, encontrándose moléculas que son susceptibles de reducirse con facilidad y generar especies radicalarias, entre estas moléculas encontramos a derivados de quinonas [14] que han presentado actividad contra *Trypanosoma cruzi*. El mecanismo de estas moléculas involucraría la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente por la formación del radical hidroxilo proveniente de la interacción de la quinona reducida con el oxígeno molecular (Figura 6), estas especies son capaces de afectar al parásito principalmente por daños al ADN, proteínas y lípidos [15].

A pesar de que las quinonas y otras moléculas reactivas poseen efectividad contra *T. cruzi*, la alta citotoxicidad que algunos de estos compuestos muestran contra células de mamífero, no ha permitido evaluarlos como buenos candidatos a fármacos antichagásicos.

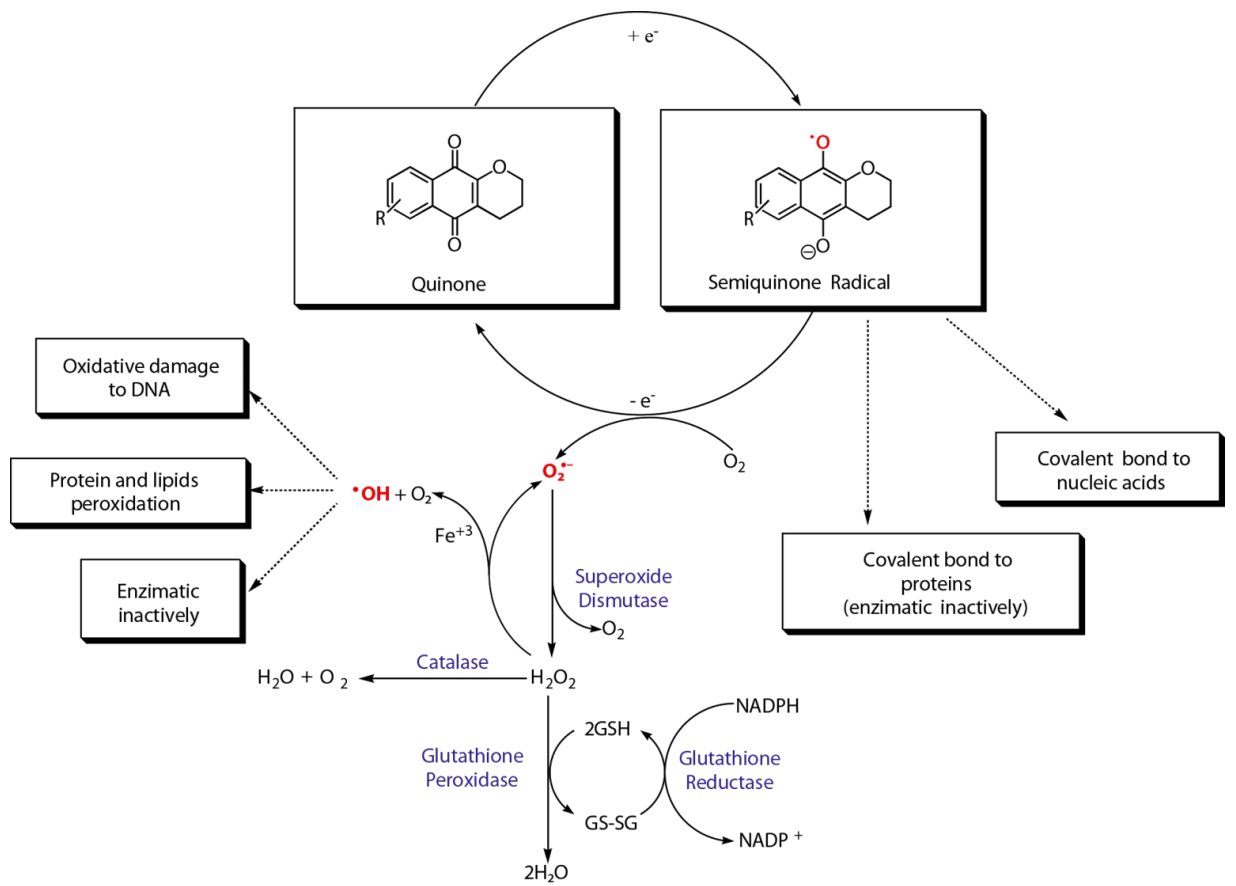


Figura 6. Mecanismo de acción de quinonas mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y su efecto en un sistema biológico [15].

Sin embargo en las últimas décadas se han reportado nuevas moléculas con interés biológico. Este es el caso de las moléculas híbridas, como las naftoquinonas triazólicas (orto-quinonas) (Figura 7). Estas moléculas híbridas presentan una amplia gama de actividades biológicas, como antimicrobiano, anticancerígeno, antiinflamatorio, entre otros [16] y han demostrado ser capaces de afectar la viabilidad de *T. cruzi* mediante la intervención de los procesos redox intracelulares debido a la reducción del grupo orto-quinona y posterior formación de ERO, mostrando efectos sobre la integridad de variados organelos, implicando una alteración en la configuración estructural del parásito [17].

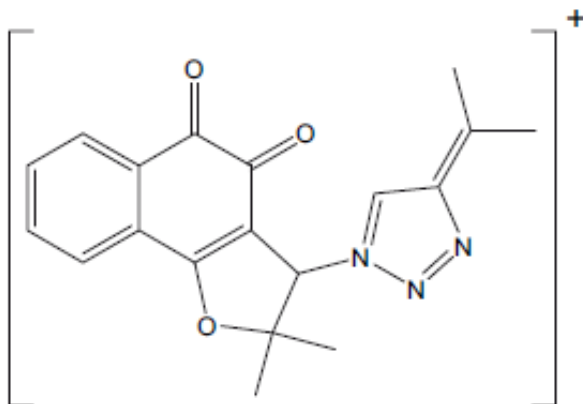


Figura 7. Molécula híbrida (naftoquinona triazólica), con efecto antiparasitario [18].

En *T. cruzi*, se ha demostrado que los principales organelos afectados por estas moléculas híbridas son el aparato de Golgi, las membranas de la zona flagelar del parásito y la mitocondria. En este último se produciría la formación de reciclaje redox, el cual se iniciaría con la reducción de la naftoquinona a semiquinona vía 1 electrón, catalizada por reductasas NADPH-dependientes. Durante esta reducción enzimática se producen

semiquinonas inestables, la interacción entre estas semi quinona y el oxígeno molecular induce a la estabilización de la semiquinona a su forma de hidroquinona. Como resultado de esta interacción el oxígeno molecular es reducido formando la especie superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es capaz de dismutar a H_2O_2 en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), para luego ser transformado a H_2O por acción de las catalasas [19, 20].

Sin embargo, una porción del H_2O_2 puede ser catalizado por metales, proceso que se conoce como la reacción de Haber-Weiss (Figura 8), la cual tiene como productos a los radicales superóxido e hidroxilo [21].

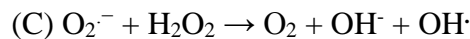
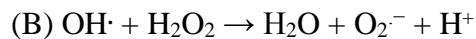
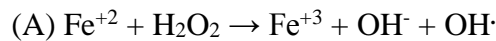


Figura 8. Generación del radical hidroxilo (reacción de Haber-Weiss). A) oxidación de hierro II a hierro III por reducción de peróxido de hidrógeno. B) Formación del radical superóxido por oxidación del peróxido de hidrógeno. C) Formación del radical hidroxilo a partir de la reacción del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Todos los radicales y pro-oxidantes mencionados son capaces de generar efectos nocivos en el interior del parásito. Como por ejemplo estas especies son capaces de reaccionar directamente con el ADN, provocando daño celular e inducir a procesos como la

apoptosis, la autofagia y/o necrosis, además de interactuar con macromoléculas tales como lípidos, proteínas y aminoácidos [22, 23].

1.6 Triazoles y la biosíntesis de esteroides.

T. cruzi, al igual que las células vegetales y de hongos requiere de esteroides específicos para mantener su integridad y viabilidad, entre los cuales ergosterol es el principal componente de las membranas celulares del parásito. Estos esteroides son requeridos para el crecimiento y desarrollo de las distintas formas del parásito [24]. La pérdida de ergosterol generalmente resulta en la desestabilización de las propiedades en la membrana, provocando un incremento en la permeabilidad y la susceptibilidad al ingreso de sustancias exógenas como drogas [25, 26]. Por otro lado, la acumulación de metabolitos intermediarios de estos esteroides, provocarían efectos nocivos para el parásito, observándose efectos citotóxicos y citoestáticos [24].

Dado que las diferencias entre las vías metabólicas de los distintos estadios del parásito son notablemente distintas a las vías metabólicas del mamífero (Figura 9), ésta diferencia se presenta como un atractivo blanco terapéutico contra los tripanosomatidos [27] [28].

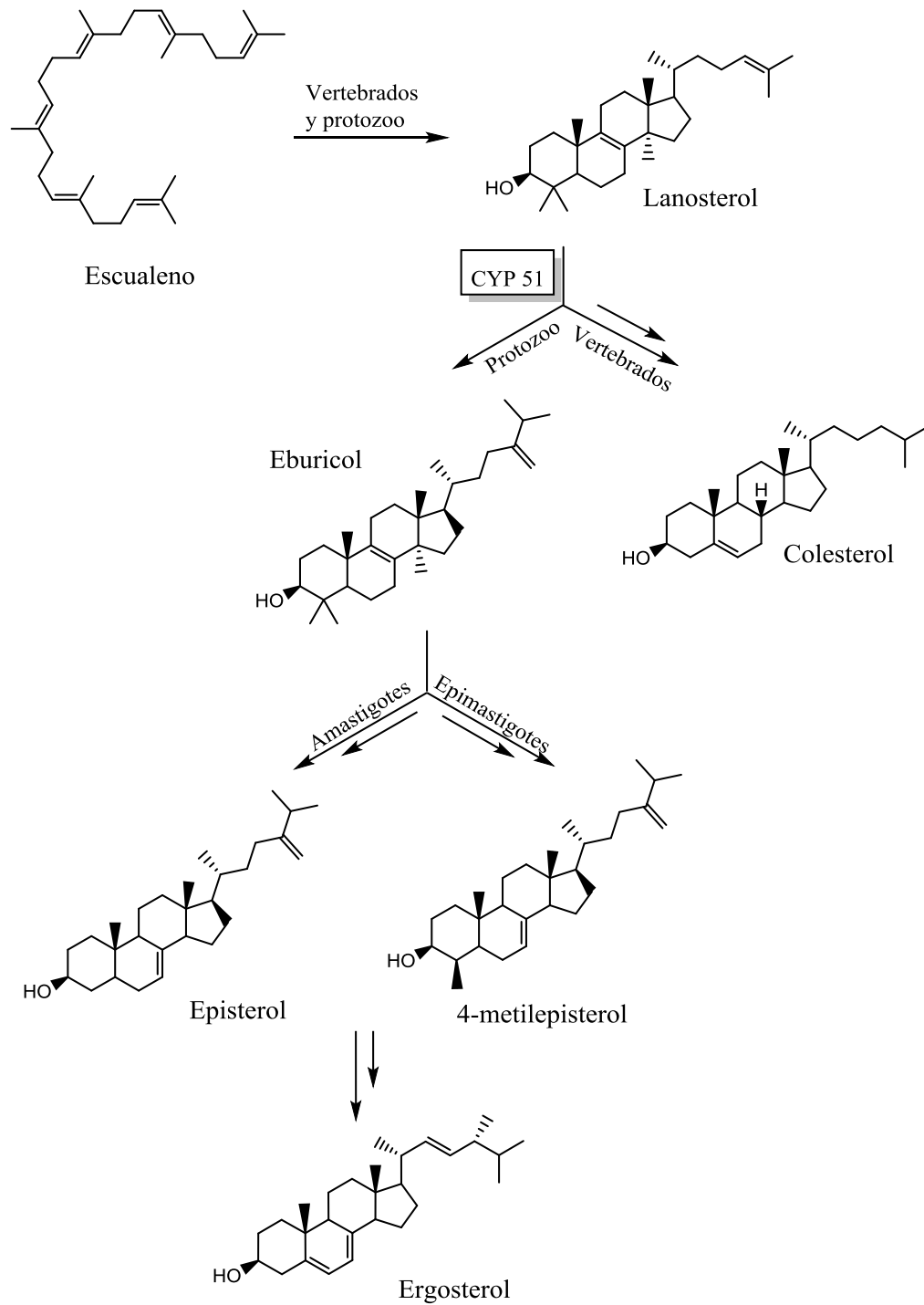


Figura 9. Biosíntesis de esteroides en sistemas biológicos.

En la ruta biosintética de ergosterol en el parásito la enzima 14α desmetilasa (CYP51) perteneciente al complejo P450, cataliza el paso limitante. En la mayoría de células eucarióticas, esta enzima está localizada en las membranas del retículo endoplásmico [29], sin embargo en tripanosomátidos, la CYP51 se encuentra en la membrana de glicosomas y mitocondrias y no se ha descartado la posibilidad de la localización en múltiples organelos [30, 31].

La enzima CYP51 está involucrada en la desmetilación de 24α esteroides, como lanosterol y eburicol, mediante procesos redox que involucran la transferencia de electrones entre la enzima y cofactores como NADPH [32]. Se ha descrito que los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* utilizan eburicol y 24-metil episterol como sustratos [33, 34] al contrario de la producción de esteroides en la forma amastigote que utiliza a episterol como principal sustrato [35, 36].

La enzima CYP51 es una proteína análoga al citocromo P450 humano. Recientemente se ha determinado las estructuras cristalinas de CYP51 [37-39], demostrando que a diferencia de la P450 de mamífero, la enzima del parásito no sufre un reordenamiento estructural tras la unión del sustrato. Esto sugiere que la enzima posee gran rigidez y conservación estructural, permitiendo la elevada susceptibilidad de los inhibidores azólicos [40].

En la mayoría de los CYP la inserción de un oxígeno en el centro catalítico, provoca que durante la reacción exista el traspaso de electrones, que son llevados al grupo porfirina con centro metálico (Hierro) por un donador como es NADPH. Se ha descrito que durante este proceso los inhibidores actúan bloqueando el sitio activo de la enzima [41]. CYP51

ha sido cristalizada y estudiada con varios inhibidores, demostrando que la mejor característica estructural de estos inhibidores es la presencia de nitrógeno (centro básico de las moléculas), el cual se une a la porfirina del sitio activo de la enzima (Figura 10a). Los antifúngicos derivados de azoles además del nitrógeno poseen átomos de oxígeno que juegan un rol importante en la inhibición de la enzima, dada su interacción con el canal hidrofóbico de la enzima. Un ejemplo son los grupos carbonilos unidos a una triazolona, quienes actúan como aceptor de hidrógeno, interaccionando con el canal hidrofóbico de la enzima (Figura 10b) [42].

La inhibición de CYP51 induce a una serie de fenómenos tóxicos en el parásito como alteraciones estructurales fundamentalmente en el complejo mitocondrion-kinetoplasto, complejo de Golgi, retículo endoplásmico y el núcleo [43].

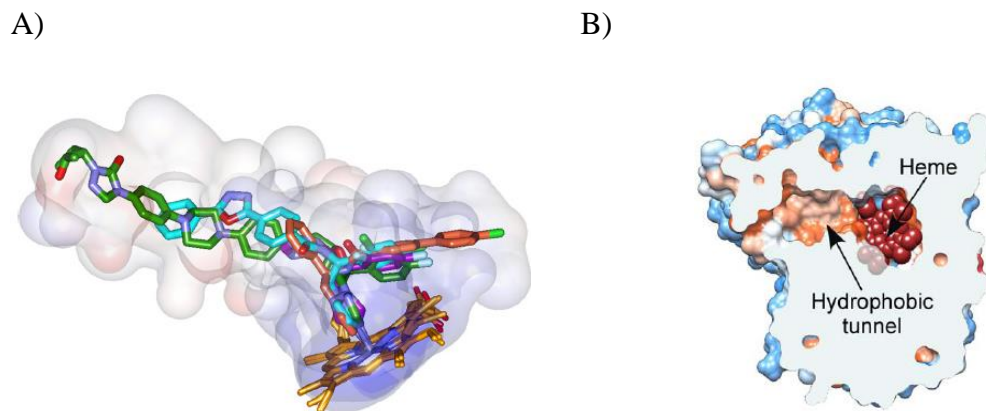


Figura 10. Simulación tridimensional de la enzima CYP51. (A) Unión de un farmacóforo triazólico al sitio activo de CYP51. (B) Ubicación del canal hidrofóbico dentro de la enzima CYP51, se puede apreciar el sitio activo porfirina-hierro [40]

1.7 Propiedades de las Triazolopiridinas y su interés biológico.

Las bis [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridinas cetonas son moléculas pequeñas pero versátiles con heterociclos capaces de formar complejos. Estas moléculas pueden actuar como sensores, o actuar como farmacóforo para la obtención de moléculas de relevancia en biomedicina o medioambientales.

Una propiedad notable de algunas triazolopiridinas, como las 3-(2'-piridil)-[1,2,3]triazolo-[1,5- α]piridinas, es el isomerismo anillo-cadena del triazol [44]. Como se muestra en la Figura 11, estos compuestos se pueden presentar en dos formas isoméricas A y B. Se ha demostrado que los sustituyentes con grupos electrón-donantes favorecen una estructura de tipo A, mientras que los sustituyentes electrón aceptores dan lugar a una estructura de tipo B.

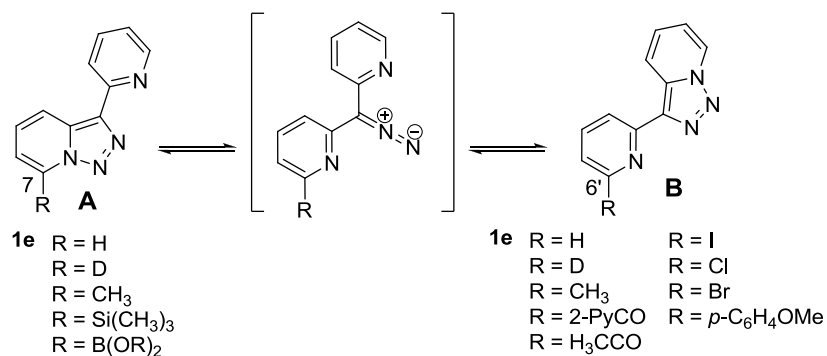


Figura 11. Reordenamiento de 3-(2'-piridil)-[1,2,3]triazolo[1,5- α]piridinas en sus dos formas isoméricas [44].

La sustitución en la posición 7 de la triazolopiridina por grupos electrodonores, permiten obtener triazolopiridinas quirales (con radicales de fenchona o sulfóxidos enantioméricamente puros) [45]. Estos compuestos derivados en la posición siete de la estructura A (Figura 11) constituyen una familia de excelentes sustratos quirales susceptibles de aplicaciones catalíticas.

El desarrollo de la química de las triazolopiridinas ha permitido, en las últimas décadas, la preparación de ligandos polinitrogenados con importantes aplicaciones en el área de la fotoquímica [46, 47].

Finalmente, dada las características de la unidad estructural de triazol, asociada frecuentemente a la actividad antimicótica, proponemos que las nuevas triazolopiridinas de la Figura 12 como son potenciales inhibidores de la síntesis de ergosterol en *T. cruzi*. Además, la presencia de grupos carbonilos en la triazolopiridinas de la Figura 12, indica que podría adicionar una actividad inductora de estrés oxidativo, incrementando su potencial como tripanocida.

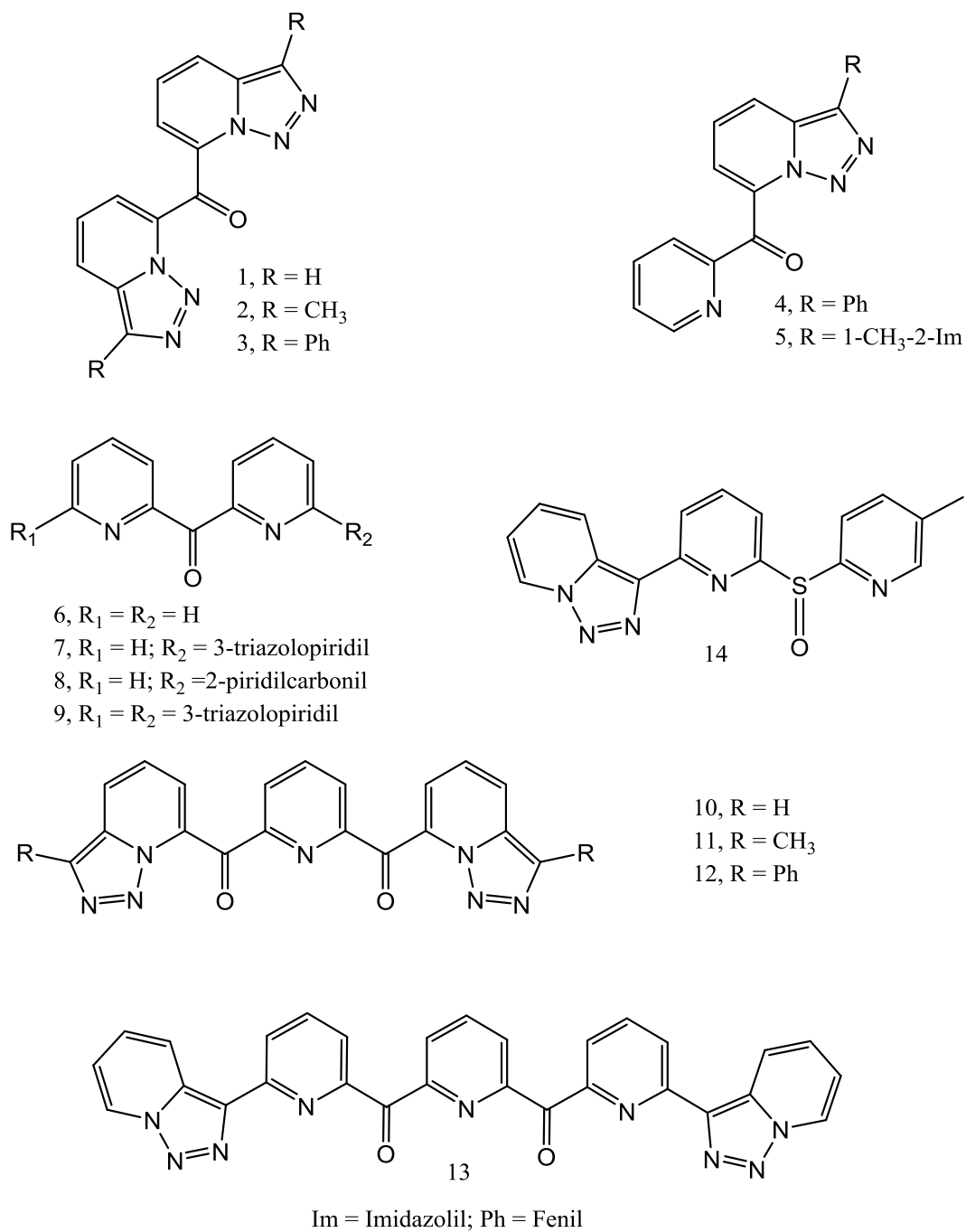


Figura 12. Serie triazolo piridinas cetónicas y bis piridilcetonas, obtenidas en el laboratorio de la Dra. Belén Abarca, Valencia España

Todos estos antecedentes nos llevan a proponer la siguiente hipótesis:

2 HIPÓTESIS.

La serie triazólica, podría afectar la viabilidad celular de *Trypanosoma cruzi*, mediante la inhibición de la síntesis de ergosterol y/o la formación de especies reactivas.

3 OBJETIVOS.

3.1 Objetivos Generales.

- ▶ Evaluar las características físico-químicas y electroquímicas de esta serie, determinando los mecanismos de reducción y la formación de especies radicalarias.
- ▶ Evaluar el efecto de la serie sobre la viabilidad celular en *Trypanosoma cruzi* y diseñar un nuevo modelo de drogas antichagásicas.

3.2 Objetivos específicos.

1. Estudiar el efecto de la serie sobre la viabilidad celular en parásito y en células de mamífero.
2. Evaluar la formación y el atrapamiento de radicales libres en sistemas químicos y biológicos.
3. Evidenciar la formación de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos.
4. Caracterizar el comportamiento electroquímico, evaluando las vías de reducción electroquímica.
5. Evaluar el efecto sobre la síntesis de ergosterol y su relación con la muerte celular inducida por estos compuestos.
6. Diseñar una nueva propuesta de drogas anti-*Trypanosoma cruzi*.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Cultivos celulares.

Los cultivos celulares de *T. cruzi* en los estadios tripomastigote, epimastigote y amastigote y células de mamífero tipo macrófagos RAW 264.7, fueron obtenidos en el Programa de Farmacología Molecular y Clínica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile.

Para la obtención de tripomastigotes y amastigotes, se infectaron células Vero con tripomastigotes aislados de macrófagos peritoneales de ratones infectados. Posteriormente células Vero se infectaron directamente con tripomastigotes a la relación de dos parásitos por célula. En el caso de amastigotes las células Vero se infectaron con tripomastigotes a una relación 1:10. Epimastigotes de *T. cruzi* clon Dm28c, fueron obtenidos de una colección del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.2 Cultivo de Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron cultivados a 28°C a una densidad inicial de 3×10^6 parásitos por mL (determinada por conteo microscópico en cámara de Neubauer), en medio Diamond (triptosa 6,25 g, triptona 6,25 g, extracto de levadura 6,25 g, NaCl 6,25 g, KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 4 g, por litro de agua), suplementado con hemina 4 μM , 5 % de suero neonato de bovino y una mezcla de penicilina sódica 100 $\mu\text{g/mL}$ y estreptomycinina

100 $\mu\text{g/mL}$. 80×10^6 epimastigotes son equivalentes a 12 mg de peso fresco y a 1 mg de proteína [48].

4.3 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio.

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, se realizó el ensayo de reducción de sales de tetrazolio (MTT). Este ensayo consiste en la reducción metabólica de MTT a un cristal de color azul (formazán). La concentración de formazán es proporcional al número de células metabólicamente activas.

Parásitos ($1,0 \times 10^7$ tripomastigotes/mL, $3,0 \times 10^7$ epimastigotes/mL, $2,0 \times 10^7$ amastigotes/mL) o células de mamífero $2,0 \times 10^6$ macrófagos/mL, fueron sembrados en microplacas (96 o 24 pocillos) e incubados a 37°C o 28°C (5% CO_2) dependiendo del cultivo celular por 24 horas con las distintas concentraciones de los compuestos disueltos en dimetilsulfoxido (DMSO, $<0,5\%$ v/v concentración final). Los cultivos fueron lavados con PBS y se agregó MTT [5mg/ml] y fenazina [0,22mg/ml], las placas fueron incubadas a 37°C o 28°C por 4 Horas, para luego agregar solubilizante SDS (decalauril sulfato) 10% en HCl 0.01N. Las placas se dejaron toda la noche a 37°C o 28°C y luego se midieron en un multilector de placa (*Asys Expert Plus*®, Austria) a 570nm. Los resultados fueron analizados mediante el software Graph Pad Prism 5 y fueron representados como el porcentaje de células viables respecto al control.

4.4 Evaluación del mecanismo de reducción de la serie triazolo piridinas por voltametría cíclica.

Para determinar el mecanismo de reducción electroquímica, se utilizó la técnica de voltametría cíclica, en donde se obtuvieron voltamogramas cíclicos que representa la relación entre el potencial (volts) y la intensidad de corriente (Amperes) durante un proceso electroquímico.

Se empleó un voltamperómetro Metrohm 693 VA, compuesto por un electrodo de trabajo de gota colgante de mercurio (HDME), un electrodo de referencia calomelano saturado (ECS) y un electrodo auxiliar de platino. Los electrodos son sumergidos en una celda de 10 mL, la cual contiene una solución 1M de electrolito de soporte perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) en dimetil sulfóxido (DMSO). Se añadieron los compuestos (1×10^{-3} M) en la celda y se purgó con nitrógeno gaseoso (N_2) durante 10 minutos antes de cada medición. Las mediciones se realizaron acotando la señal al rango de respuesta electroquímica de la cada muestra. Se obtuvieron voltamogramas a distintas velocidades de barridos desde los 0,1 V/s hasta 2 V/s. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (20°C) y las señales obtenidas fueron procesadas mediante el software Origin 8.

4.5 Determinación de las especies radicalarias por Resonancia Espín Electrónico.

Para caracterizar la formación del radical libre observado por voltametría cíclica se obtuvieron los espectros REE, la generación electroquímica de las especies radicalarias fueron realizadas a los potenciales obtenidos por voltametría cíclica, a partir de una reducción electrolítica in situ utilizando las mismas soluciones e iguales condiciones que

las usadas para los estudios de voltametría cíclica. Los espectro REE fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9,8 GHz) con cavidad rectangular y 50 kHz de modulación de campo. Las constantes de acoplamiento fueron estimadas con una precisión de 0,05G. Los espectros REE fueron simulados utilizando el programa WINEPR-Sinfonia 1.25.

4.6 Estudio de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en cultivos de *T. cruzi* y células de mamífero.

Para cuantificar la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), se utilizó el sensor intracelular fluorescente di cloro-fluorescein di acetato (DCFDA). Se sembraron placas de 96 pocillos con $1,5 \times 10^6$ epimastigotes/mL en medio diamond y $5,0 \times 10^4$ macrófagos/mL en medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementar, los cultivos se incubaron con una solución de DCFDA 20 μ M por 15 min a 28°C y 37°C respectivamente, luego se centrifugaron a 3500rpm y se lavaron 2 veces con Buffer fosfato salino pH 7,4. Las células cargadas con DCFDA se traspasaron a una placa de 96 pocillos Nunc® de fluorescencia, donde se agregó el estímulo correspondiente, para el caso del control positivo, se utilizó distintos generadores de estrés oxidativo como menadiona (50 μ M), peróxido de hidrogeno (1mM) y 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dicloruro (ABAP, 0,6mM). La serie de triazoles fue agregada en tres concentraciones (1-10-100 μ M). Se midió la fluorescencia (excitación: 488nm, emisión: 528nm) durante 40 minutos en un espectrofluorímetro Biotek Synergy HT. Se determinó la pendiente de las curvas de aumento de fluorescencia en el tiempo mediante el software Origin 8, las pendientes

fueron comparadas con el control y los resultados se expresaron como el promedio de las pendientes de control/ pendientes de los compuestos (ambas expresadas en RFU/min), los valores fueron obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

4.7 Estudio de Spin Trap en modelos celulares de *T. cruzi* y células de mamífero.

Los ensayos de REE fueron realizados en cultivos de epimastigotes Dm28c y en macrófagos RAW 264.7 a una concentración de 8×10^7 epimastigotes/mL y 6×10^8 macrófagos/mL. Los cultivos fueron diluidos en medio de reacción que contenía 1mM NADPH, 100mM DMPO y 20mM buffer fosfato salino pH 7.4, se utilizó una concentración de cada droga (2mM). Los experimentos fueron realizados en capilares de 0,5mL a temperatura ambiente (25°C) y en condiciones aeróbicas, los espectros REE fueron obtenidos en la banda X (9,5GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 con una cavidad rectangular y un campo de modulación de 50KHz. El espectro EPR fue obtenido usando el programa WINEPR Symphonia 1,25 V.

4.8 Estudio de biosíntesis de ergosterol por espectroscopia de masas.

Para evaluar los niveles de esteroides en parásitos aislados (epimastigotes Dm28c), se realizó la inyección directa de los cultivos celulares en el sistema DSA (Direct Sample Analysis) acoplado a espectroscopia de masas. Para ello se tomaron alícuotas de los cultivos de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento ($3,0 \times 10^6$ parásitos/mL), incubados previamente a 28°C a distintos tiempos (24, 48 y 72 horas) con 100 µM de fluconazol (control positivo) y los compuestos a ensayar. Se extrajo el medio de cultivo y

se reemplazó por medio Diamond sin suplementar. Se tomaron alícuotas de 10 μ L que fueron inyectadas en la cámara del instrumento DSA-TOF AxION 2 TOF MS (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). Las muestras fueron inyectadas en triplicado.

En el análisis de la muestra por *Direct sample analysis time of flight* (DSA-APCI-TOF/MS, Perkin elmer instruments) se identificó ergosterol, lanosterol, escualeno y colesterol en epimastigotes Dm28c. Se utilizaron las siguientes condiciones para la ionización de la muestra mediante la técnica de APCI/MS (DSA análisis): corriente de corona 4 μ A, la temperatura del calentador a 300°C, gas auxiliar (N_2) presión de 80 psi, gas de secado (N_2) con flujo de 3 L/min a 25°C. La ionización fue utilizada en modo positivo y atrapamiento de moléculas con un voltaje del TOF de 10KV. El voltaje del Capilar de salida fue a 110 V para ionización normal (MS) y para los ensayos de fraccionamiento (MS/MS) se utilizó un CID de 200V. Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango entre 100–1000 m/z con la adquisición de 2 espectros/s. Como curva de calibración se utilizó el método lock mass calibration con las siguientes masas m/z 121.0509, m/z 322.0481, m/z 622.0290 y m/z 922.0098. Todas las muestras fueron analizadas durante 10 segundos de exposición al spray de nitrógeno. Los estándares de los esteroides fueron obtenidos en Sigma Aldrich, USA. Las masas fueron confirmadas según su peso molecular y la distribución isotópica de los patrones de fragmentación, para ello se utilizó DSA-TOF y AxION 2 software. Las muestras fueron inyectadas en triplicado.

4.9 Análisis estadístico.

Las curvas concentración-efecto y los análisis estadísticos fueron realizadas con el *software* GraphPad Prism© 5.0 (GraphPad Software Inc.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron comparados entre sí y con los controles mediante análisis de varianza (ANOVA). Para todos los experimentos se consideró significativo aquellos resultados con valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Efecto de triazolo piridinas sobre la viabilidad celular en *T. cruzi* y en células de mamífero.

Para evaluar el efecto de la serie triazólica sobre la viabilidad celular de *T. cruzi* se utilizaron parásitos cepa Dm28c en sus distintos estadios (tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes) y en el caso de células de mamífero se utilizaron macrófagos murinos RAW 264.7. Mediante la técnica de MTT, se determinó el número de células viables a una concentración de 100µM para cada compuesto (concentración máxima). En la Tabla 1 se observan los valores de viabilidad expresados como el porcentaje de células viables respecto al control. Se utilizó como control positivo el fármaco nifurtimox a una concentración de 100µM. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Compuestos	Porcentaje (%) células viables			
	Amastigotes	Tripomastigotes	Epimastigotes	Macrófagos
1	81,0 ± 2,3	75,2 ± 4,1	65,9 ± 2,5	94,8 ± 1,2
2	87,4 ± 4,5	79,4 ± 5,1	69,3 ± 2,9	97,4 ± 1,3
3	64,6 ± 1,9	81,1 ± 5,3	61,1 ± 2,0	91,6 ± 0,8
4	23,6 ± 2,1	33,2 ± 4,1	55,4 ± 1,1	81,2 ± 7,6
5	68,5 ± 4,2	67,1 ± 3,5	81,5 ± 2,8	92,6 ± 3,4
6	91,9 ± 8,2	54,3 ± 3,7	82,7 ± 1,6	95,1 ± 3,7
7	68,8 ± 0,9	61,8 ± 3,8	53,5 ± 2,2	43,6 ± 3,2
8	102,4 ± 7,3	87,2 ± 2,9	62,8 ± 2,5	97,1 ± 1,9
9	83,5 ± 7,6	66,9 ± 0,6	75,8 ± 2,8	24,5 ± 2,6
10	66,6 ± 4,7	59,7 ± 0,3	55,1 ± 3,0	95,6 ± 5,4
11	66,9 ± 7,0	92,5 ± 5,5	75,3 ± 4,4	95,3 ± 2,9
12	71,0 ± 2,5	72,4 ± 3,7	70,7 ± 1,4	85,8 ± 5,6
13	70,1 ± 1,4	56,7 ± 3,7	72,9 ± 2,7	91,0 ± 3,0
14	76,4 ± 4,0	63,2 ± 5,3	86,4 ± 1,7	70,5 ± 2,5
Nifurtmox	0,0 ± 0,8	18,9 ± 5,2	0,0 ± 0,2	100,0 ± 1,5

Tabla 1. Valores porcentuales del efecto de la serie [1,2,3] triazolo piridina cetonas sobre *Trypanosoma cruzi* y células de mamífero tipo macrófagos RAW 264.7. Los valores son

expresados como los porcentajes de viabilidad \pm la desviación estándar respecto al control (DMSO) para tres experimentos independientes (n=3).

En el análisis de viabilidad, la serie presentó actividad tripanocida variable, en donde el compuesto 4 demostró el mayor efecto tripanocida sobre las formas tripomastigotes y amastigotes con valores por sobre el 70% en comparación a epimastigotes que sólo se ven afectados en un 45% por este compuesto. Esto nos indicaría que existe mayor actividad en las formas presentes en el hospedero humano, por otra parte, el compuesto 4 tiene baja citotoxicidad en células de mamífero con un porcentaje de viabilidad cercano al 80%, indicándonos que el compuesto 4 posee mayor selectividad hacia *T. cruzi*.

Con respecto a los demás miembros de la serie, se observaron efectos tripanocidas menores al 40% y para el caso de células de mamífero la serie triazólica mostró efectos en la viabilidad de los macrófagos entre un 10-20%, con excepción de los compuestos 7 y 9 que mostraron citotoxicidad superior al 60%.

Dado que solo tres moléculas presentaron actividad biológica relevante en los distintos sistemas biológicos, se obtuvieron los valores de IC₅₀ para estos compuestos, los resultados en la Tabla 2 nos indican que los valores de IC₅₀ del compuesto 4 son comparables al valor de IC₅₀ de nifurtimox, especialmente en la forma tripomastigotes (33,6 μ M versus 21,5 μ M, compuesto 4 y nifurtimox respectivamente).

Además es importante mencionar que el compuesto 4 posee un IC₅₀ superior a 100 μ M en cultivos de epimastigotes y en células de mamífero, indicando que existe una mayor actividad sobre la forma infectiva del parásito. Los valores de selectividad indican que el

compuesto 4 es más selectivo a la forma tripomastigote con un valor de 2,9 en comparación a la selectividad del amastigote (1,6 veces).

Comp	IC ₅₀ (μM)				Índice de Selectividad	
	Ama	Tripo	Epi	Macrófagos	Macrof/Tripo	Macrof/Amast
4	61,5±3,9	33,6±4,9	>100	>100	2,9	1,6
7	>100	>100	>100	83,6±5,6	0,8	0,8
9	>100	>100	>100	39,8±6,6	0,4	0,4
NFX	18,7±2,6	21,5±0,3	17,4±1,3	>100	4,6	5,3

Tabla 2. Valores de IC₅₀ en cultivos celulares de *T. cruzi* y células de mamífero. Los valores son representados como el promedio ± DS de tres ensayos independientes (n=3).

5.2 Efecto de triazolo piridinas sobre la proliferación celular en *T. cruzi*.

Para evaluar el efecto de la serie sobre la proliferación celular en epimastigotes Dm28c (forma replicativa extra celular del parásito), fueron sembradas en placas de 24 pocillos con 3×10^6 parásitos/mL, se añadieron los compuestos y fluconazol como control positivo a una concentración de 100 μM. Los cultivos fueron incubados durante tres días y diariamente se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de MTT.

A partir de las curvas de proliferación (Figura 13), se obtuvieron las constantes de crecimiento para cada condición de los cultivos las que fueron comparadas respecto al

control (parásitos solo con el vehículo DMSO), las curvas de crecimiento del control presentaron un comportamiento exponencial ajustando con un $R^2 \geq 0,99$ a la curva de crecimiento exponencial. Para los cultivos celulares incubados con las drogas presentaron una disminución en la constante de crecimiento, incluso se observó la nula proliferación de los cultivos celulares, en donde se mantuvo la carga inicial de parásitos, este efecto se observa en cultivos incubados con fármacos anti proliferativos [49, 50].

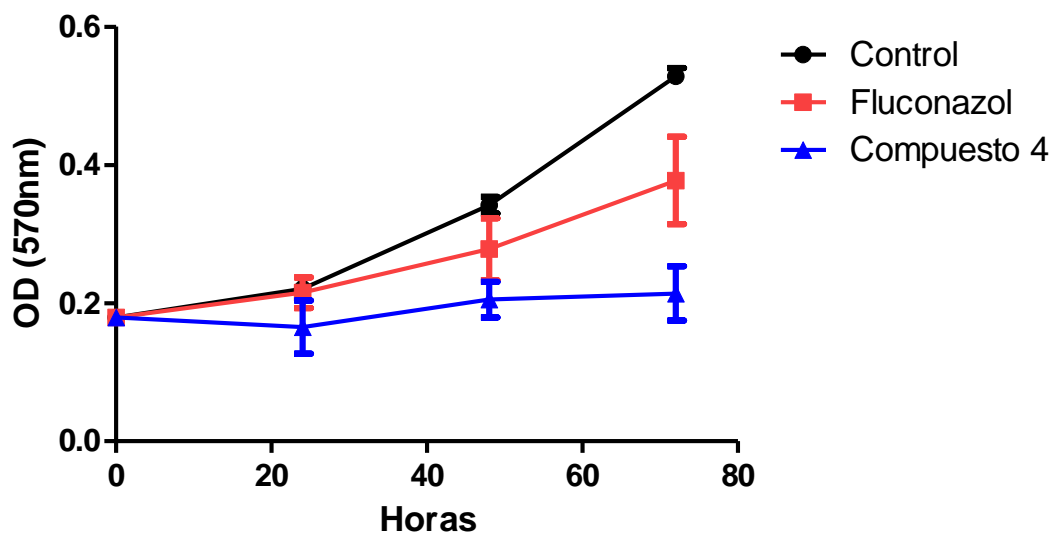


Figura 13. Curvas de crecimiento representativa, cultivos de epimastigotes Dm28c incubados con fluconazol y el compuesto 4, evaluados por 3 días mediante MTT.

Los valores de inhibición para cada compuesto se muestran en la Tabla 3 y son representados como el porcentaje de inhibición de la proliferación de los cultivos respecto al control, para validar el ensayo se utilizó nifurtimox (100 μ M) en cada medición.

Compuesto	% inhibición	Compuesto	% inhibición
1	16,3 ± 4,0	8	69,0 ± 4,9
2	19,3 ± 2,9	9	38,5 ± 3,2
3	34,3 ± 2,6	10	55,3 ± 4,7
4	95,4 ± 4,3	11	55,4 ± 4,6
5	57,6 ± 2,8	12	80,3 ± 6,4
6	29,4 ± 4,7	13	3,8 ± 2,4
7	35,3 ± 3,4	14	89,6 ± 2,3
Nifurtimox	100 ± 3,2	fluconazol	18,2 ± 2,4

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de crecimiento celular de epimastigotes Dm28c. Los valores son expresados como el porcentaje de inhibición respecto al control. Los compuestos fueron agregados a 100 μ M y los valores corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos independientes.

Los resultados mostraron que el compuesto 4 posee la mayor actividad respecto a la serie (95% de inhibición de la proliferación en epimastigote) y en contraste el compuesto 13 presentó la menor actividad (3% de inhibición). En el caso de las estructuras 6 y 8 que sólo están constituidas por grupos 2-piridil cetonas, éstas tienen un porcentaje de inhibición cercano al 30% y 70% respectivamente, éstas estructuras estarían relacionadas directamente con la formación y deslocalización del radical formado en la piridil cetona y como consecuencia pudiesen generar estrés oxidativo en los sistemas celulares utilizados

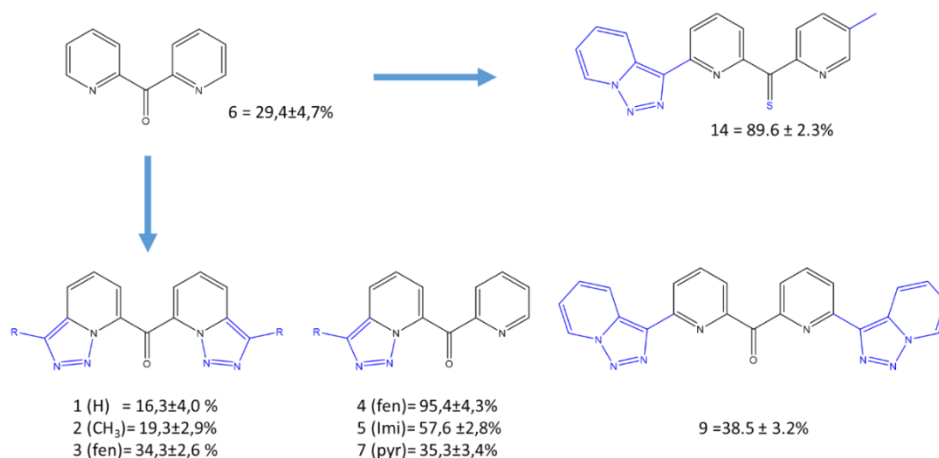
en esta tesis. Para el caso de las moléculas 1 y 2 poseen una actividad comparable a fluconazol, en cambio el resto de la serie mostraron una actividad mayor que fluconazol. En resumen, respecto a la viabilidad celular el compuesto 4 mostró ser el más activo de la serie y poseer cierta selectividad hacia tripomastigotes a 24 horas. Por otro lado la actividad en epimastigote fue menor en este periodo, pero en tratamientos prolongados (3 días) el efecto de la serie aumenta, esto se podría explicar por qué la inhibición de la biosíntesis de ergosterol tendría efectos más importantes en la proliferación celular en donde se requiere una activa síntesis de membranas, teniendo un rol más importante que en la mantención de la viabilidad en estadios no proliferativos. Por otro lado mediante MTT no es posible discriminar si la inhibición del crecimiento se debe a la inducción de muerte celular (efecto citotóxico) o a la detención de la progresión del ciclo celular (efecto citostático) [51].

En el caso de células de mamífero mostraron baja toxicidad a excepción de los compuesto 7 y 9.

5.3 Relación estructura-actividad anti proliferativa de la serie triazolo piridina sobre *T. cruzi*.

Al comparar las distintas estructuras de la serie con la actividad anti proliferativa podemos observar la importancia del grupo 3-fenil-[1,2,3] triazolo [1,5- α]piridina. La presencia de esta estructura aumenta la actividad anti proliferativa. De la misma forma, el reemplazo de este grupo por una piridina disminuye el porcentaje de inhibición.

Para poder entender mejor el efecto de los grupos funcionales hemos dividido las estructuras en dos grupos, primero los compuestos que poseen solo un grupo carbonilo (Esquema 1A), estos presentaron variada actividad, siendo el menor el compuesto 1 con un 16% y el otro extremo el compuesto 4 que presentó un 95% de la actividad tripanocida.



Esquema 1. Efectos de los grupos funcionales (esqueleto di (piridin 2-il) metanona sobre la proliferación en epimastigotes Dm28c, los valores son expresados como el porcentaje

de la inhibición de crecimiento de los cultivos respecto al control (H= hidrogeno; CH₃= metilo; Fen= Fenilo; Pyr= piridina).

La presencia de dos grupos [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridina provocan una disminución de la actividad antiproliferativa (compuestos 1 y 2), por otra parte, la presencia del grupo 3 fenil-[1,2,3]triazolo[1,5- α]piridin (compuesto 3), mejora la actividad antiproliferativa respecto a sus análogos (compuestos 1 y 2).

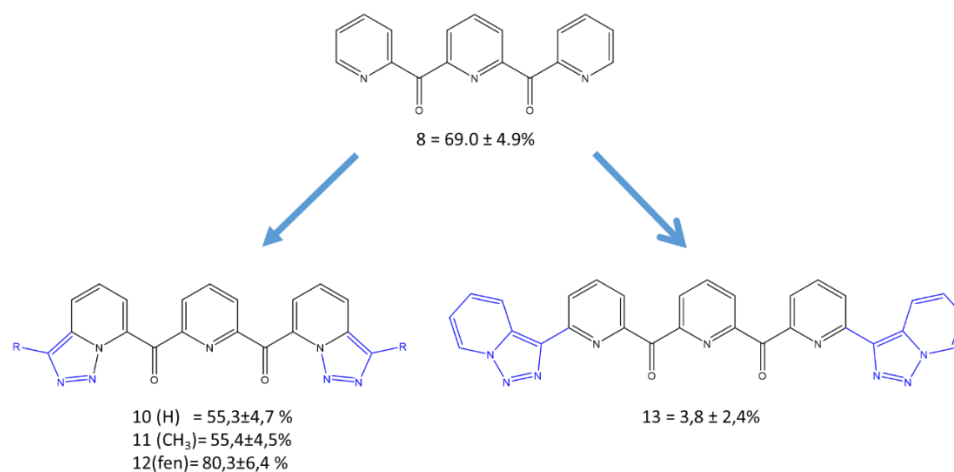
Además la unión de la piridina en posición 3 de la ([1,2,3] triazolo [1,5- α]piridin)-7-etanona (por ejemplo estructuras 7 y 9) en todos los casos es desfavorable para el efecto tripanocida y por el contrario aumenta los efectos citotóxicos en células de mamífero.

En el segundo grupo de moléculas (Esquema 1B) nos encontramos con estructuras que poseen dos grupos carbonilos, estos derivados de la estructura 8 (compuestos 10, 11, 12 y 13) inhibieron la proliferación de los parásitos entre un 50% y un 80% con la excepción del compuesto 13 que generó sólo un 3% de inhibición.

La estructura 8 inhibe la proliferación del parásito en un 70%, si a esta estructura se le adiciona un grupo [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridina genera una estructura de poca actividad anti proliferativa, por el contrario si insertamos los grupos triazolo-piridina de manera que en la posición 3 de [1,2,3] triazolo [1,5- α]piridina solo esté el grupo fenil, se ve un aumento en la actividad anti proliferativa.

En resumen, si queremos aumentar la actividad de la serie triazolo piridinas, una sustitución favorable sería la presencia del grupo (3-fenil-[1,2,3] triazolo [1,5- α] piridin)-

7-etanona, lo que probablemente nos permitiría iniciar con una proyección de valores anti proliferativos cercanos a un 80-90%.



Esquema 2. Efectos de los grupos funcionales (esqueleto piridin 2,6 di-il bis (2-piridin metanona) sobre la proliferación en epimastigotes Dm28c, los valores son expresados como el porcentaje de la inhibición de crecimiento de los cultivos respecto al control (H= hidrogeno; CH₃= metilo; Fen= Fenilo; Pyr= piridina).

5.4 Estudio de reducción electroquímica.

El potencial de reducción es un parámetro que determina la energía necesaria para que un compuesto capte electrones. Los valores de potencial de reducción se relacionan con la generación de especies radicalarias, dado que en un proceso de óxido-reducción existe la transferencia de uno o más electrones. Las reacciones redox que más han sido estudiadas son las reducciones de los grupos quinonas, cetonas y nitrocompuestos por sus efectos en sistemas biológicos, como en la generación de estrés oxidativo [52, 53]. En ese sentido, una de las técnicas electroquímicas más aplicada en el estudio de la reducción de compuestos es la voltametría cíclica [54].

El estudio electroquímico de nuestros compuestos se llevó a cabo en condiciones que permitieron la estabilización del radical libre, en otras palabras, en un solvente donde se aprecia la aparición de las señales de reducción electroquímica. En estas condiciones se obtuvieron los voltamogramas cíclicos de la Figura 14 y los parámetros de reducción que se observan en la Tabla 4.

Se realizaron barridos a distintas velocidades (2 Vs^{-1} hasta $0,1 \text{ Vs}^{-1}$) y se obtuvieron los voltamogramas cíclicos de los compuestos 8 y 5 que mostraron dos picos anódicos y dos picos catódicos de reducción (Figura 14A, Voltamograma representativo del compuesto **8**). Por otra parte, los compuestos 1, 2, 6, 10, 11, 12 y 13, mostraron la presencia de dos picos catódicos y un pico anódico (Figura 14B), mientras que los compuestos 4, 7 y 9 presentaron una cupla electroquímica. En aspectos generales los voltamogramas cíclicos

mostraron patrones similares y un amplio rango de potenciales de reducción entre -1,0V a -1,5V.

Compuestos	Epc I	Epa I	Epc II	EpaII	$\Delta E/V$	Ipa/ipc	Ref
1	-1.05	-0.91	-1.78	-	0.13	0.4	
2	-1.01	-0.94	-1.70	-	0.07	0.7	
3	-	-	-	-	-	-	
4	-1.26	-1.18	-	-	0.08	0.9	[55]
5	-1.20	-1.08	-1.60	-0.76	0.12	0.8	
6	-1.47	-1.27	-1.67	-	0.20	0.9	
7	-1.24	-1.18	-	-	0.06	0.7	[55]
8	-1.40	-1.46	-1.85	-1.12	0.06	0.6	[56]
9	-1.34	-1.25	-	-	0.08	0.6	
10	-1.14	-1.04	-1.45	-	0.07	0.5	[55]
11	-1.20	-1.07	-1.54	-	0.13	0.6	[55]
12	-1.25	-1.15	-1.79	-	0.10	0.8	[55]
13	-1.33	-1.23	-1.60	-	0.10	0.7	[55]
14	-	-	-	-	-	-	

Tabla 4. Parámetros electroquímicos característicos de la serie triazolo piridinas obtenidos por voltametría cíclica en medio aprótico, los valores fueron obtenidos a una velocidad de barrido de 2 Vs⁻¹. Epa: Potencial anódico. EPc: Potencial catódico. Ipa/iPc: Relación entre la intensidad de picos

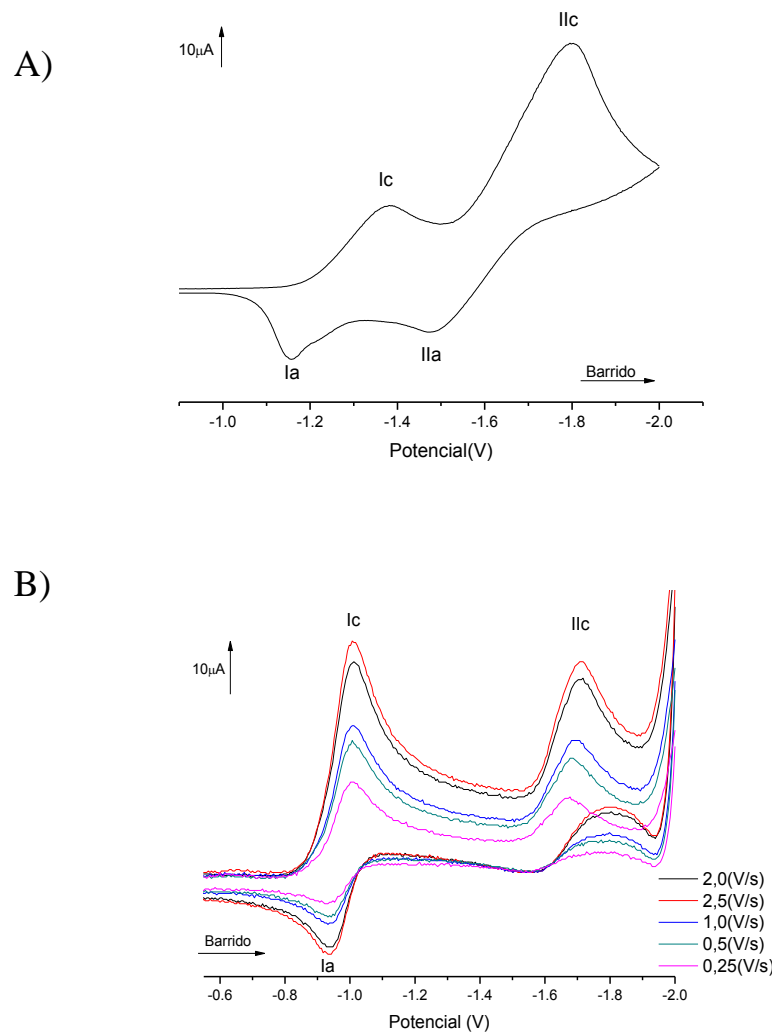


Figura 14. Voltamogramas cíclicos de la reducción de triazolo piridinas. A) Voltamograma cíclico del compuesto **8** en medio aprótico (DMSO + 0,1 M PTBA) a una velocidad de barrido de 2V/s. B) Voltamogramas cíclico del compuesto **2** en medio aprótico (DMSO + 0,1 M TBAP) a distintas velocidades de barrido (2,5-0,25V/s).

Para corroborar el mecanismo de reducción electroquímica, se realizaron barridos sucesivos a una velocidad de barrido fija de 2 Vs^{-1} (Figura 15), en tal caso los voltamogramas cíclicos no mostraron cambios en los procesos de reducción, esto se observó en todos los compuestos indicándonos que el mecanismo de reducción es exclusivamente electroquímico [57].

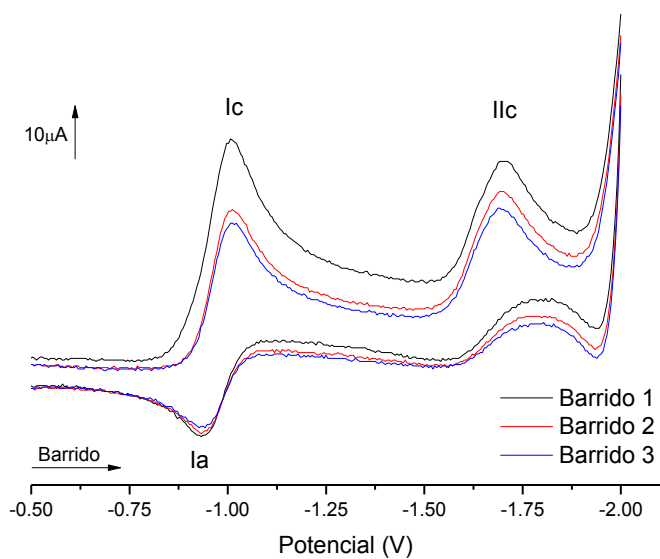


Figura 15. Voltamograma cíclico del compuesto 2 (1 mM) a tres barridos sucesivos en medio aprótico (DMSO + 0,1 M PTBA) a una velocidad de barrido de 2 V/s^{-1} .

El mecanismo de reducción electroquímica (Figura 16) involucraría una primera señal correspondiente a una cupla cuasi reversible (Ic y Ia) proveniente de la reducción del carbonilo por transferencia mono-electrónica [58]. La segunda cupla (IIc) correspondería a un proceso electroquímico irreversible o cuasi reversible, esta segunda cupla corresponde a la formación de derivados anionicos según los criterios de reversibilidad [59]. Además la presencia de una cupla irreversible pudiese asociarse a la formación de un radical centrado en carbono [52, 60].

A pesar de que los miembros de la serie mostraron un patrón de reducción electroquímica similar, los compuestos 3 y 14 no mostraron señal de reducción, debido a que probablemente los potenciales estén en otros rangos de reducción.

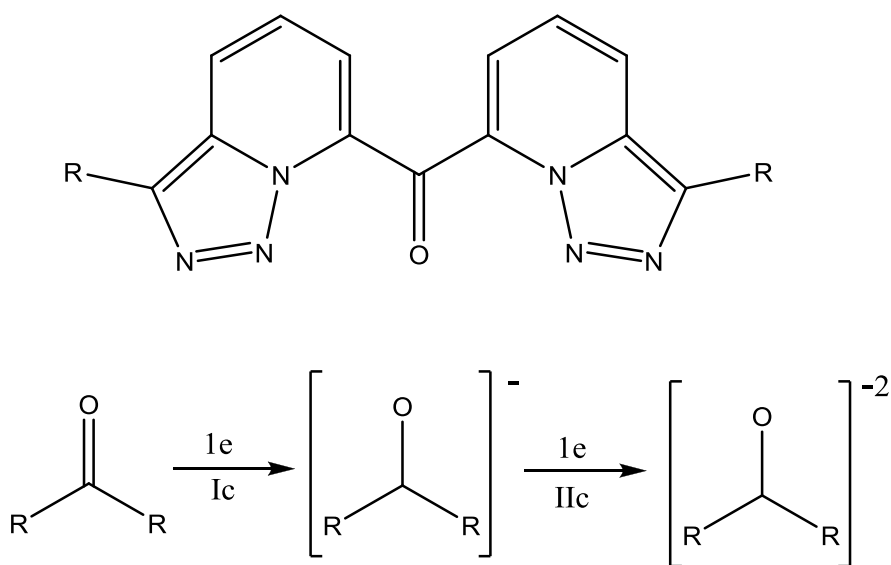


Figura 16. Mecanismo de reducción propuesto para la serie [1,2,3] triazolo piridin cetona. Como ejemplo se muestra la estructura 2 en donde se observa la formación de los derivados anionicos.

Para relacionar el potencial de reducción de los compuestos con los efectos sobre la proliferación celular se graficaron ambas variables (Figura 17). Lamentablemente, no se observa relación entre estas variables.

Si bien el efecto generado por la estructura [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridina respecto a la viabilidad es variable respecto a los análogos (estructuras con uno o dos grupos triazolicos). Hemos observado que la estructura [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridina disminuye el potencial de reducción respecto a las estructuras 6 y 8 [61].

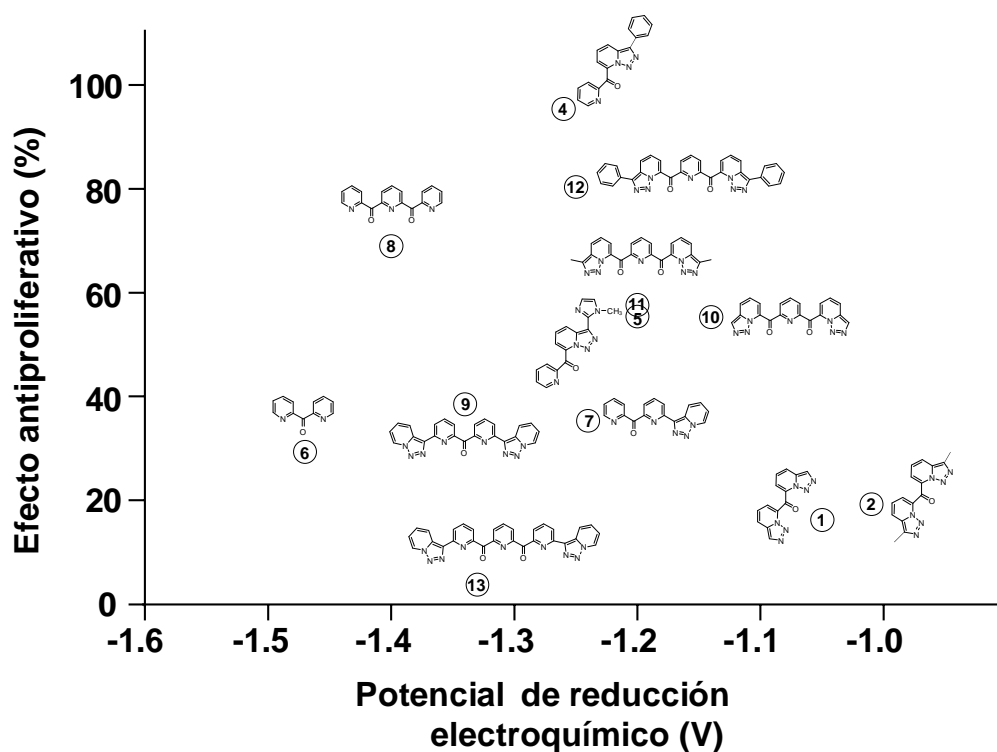


Figura 17. Relación entre los potenciales de reducción versus la proliferación celular en epimastigotes Dm28c. Gráfico realizado con la información contenida en la Tablas 3 y 4

5.5 Estudio de formación de radicales libres.

La espectroscopia de Resonancia de espín electrónica (REE) es una técnica que permite la detección y cuantificación de especies paramagnéticas de muy baja concentración. Además, permite evaluar radicales libres tanto en matrices químicas como biológicas, siendo la mayor ventaja la caracterización de la especie que se genera en estos sistemas mediante su patrón hiperfino [62, 63]. Para la determinación por REE, la muestra es inmersa en un fuerte campo magnético, siendo expuesta a una radiación de frecuencia en el orden de las microondas (9,8 GHz, banda X) con ello se logra el desdoblamiento de los niveles energéticos de las moléculas en la muestra y en consiguiente sólo las transiciones electrónicas permitidas generan un patrón característico para cada especie.

Para evaluar por REE los radicales libres detectados por voltametría cíclica, se realizaron experimentos donde se generaron las mismas especies a través de reducción electroquímica *in situ*, en iguales condiciones que en los experimentos de voltametría cíclica en una cavidad de resonancia y luego caracterizados mediante sus patrones hiperfinos (espectros REE).

Se obtuvieron los espectros experimentales, estos fueron simulados con el programa SimFonia V1.25 utilizando las constantes de acoplamiento hiperfinas experimentales, variando la relación lorentziana/gaussiana en la forma de las líneas para obtener la mayor semejanza posible entre los espectros experimentales y teóricos, para así asegurar una correcta asignación de las constantes de acoplamiento, y por ende una correcta interpretación del espectro [64].

La Figura 18 muestra el espectro experimental y el espectro simulado para el radical generado en las moléculas 9 y 4, el desdoblamiento hiperfino para esta especie radicalaria corresponde a un multiplete con una $aH = 1.76$ G este se generaría por la interacción del radical con los átomos de hidrógeno en la molécula. Este radical libre se genera por la reducción del grupo carbonilo (grupo electro-activo), este radical es capaz de deslocalizarse a través de la estructura di-(2-piridin) metanona. Los otros miembros de la serie mostraron el mismo patrón hiperfino y con constantes de acoplamiento similares a los compuestos 5 y 9.

Dado que es necesario caracterizar el comportamiento de la especie radicalaria, hemos realizado cálculos teóricos (Anexo 1) y de densidad de espín electrónico [65] los cuales se presenta en la Figura 19.

La Figura 19 muestra los átomos en los que se deslocaliza preferentemente el electrón. Según los cálculos este electrón originado en el carbonilo de la molécula es capaz de deslocalizarse en la estructura di-(2-piridin) metanona y según las constantes de acoplamiento la interacción involucraría solo a los átomos de hidrogeno del heterociclo nitrogenado (piridina). Esto se debe a la rápida deslocalización del radical [56].

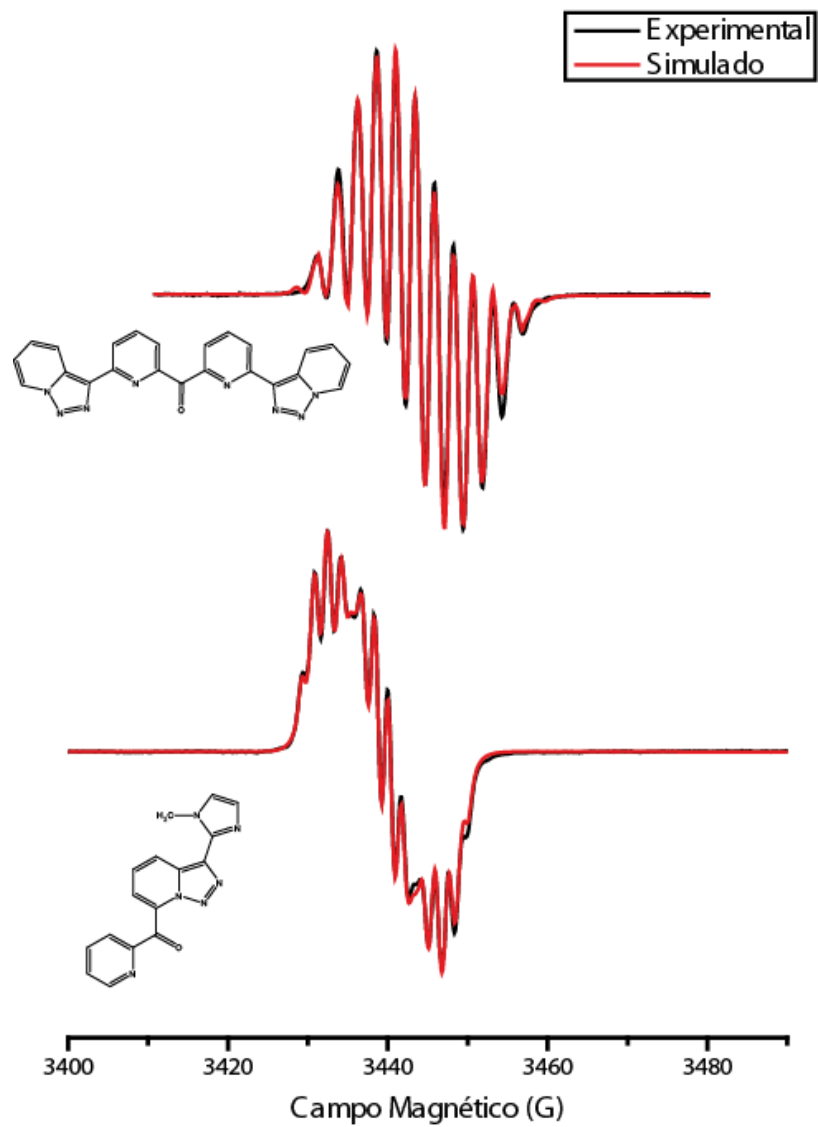


Figura 18. Espectros REE experimental (negro) y espectro REE simulado (rojo). A) espectro REE de la molécula 9 B) Espectro REE de la molécula 5.

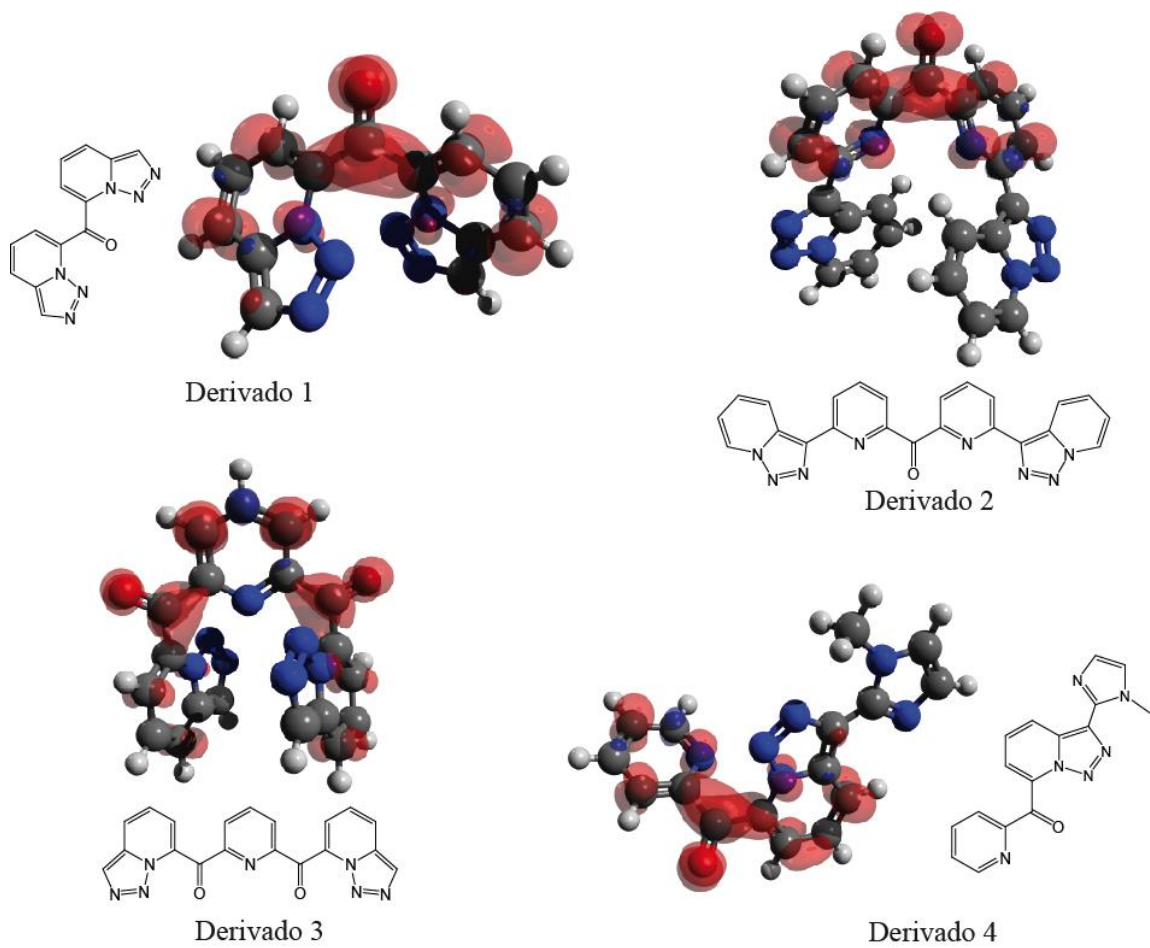


Figura 19. Densidad de espín para las estructuras derivado 1= compuesto 1; derivado 2=compuesto 9; derivado 3= compuesto 10; derivado 4= compuesto 5

5.6 Ensayo de atrapamiento de radicales libres en sistemas biológicos.

Con el objeto de poder analizar la capacidad de esta familia para provocar la formación de especies radicalarias en un medio biológico como posibles mecanismos de acción tripanocida [66], se realizaron estudios de atrapamiento de radicales libres mediante REE en cultivos de epimastigotes Dm28c, para ello se utilizó como atrapador la sonda 5,5-Dimetil-1-Pirrolina-N-Oxido (DMPO).

DMPO es un atrapador (Spin-trap) de radicales libres capaz de diferenciar las especies radicalarias mediante el patrón hiperfino que generan en REE (Figura 20), presentando gran ventaja frente a otros atrapadores que sólo pueden detectar radicales y no identificarlos. En sistemas biológicos DMPO es capaz de atravesar membranas celulares y reaccionar con diferentes radicales libres centrados en carbono y oxígeno [67].

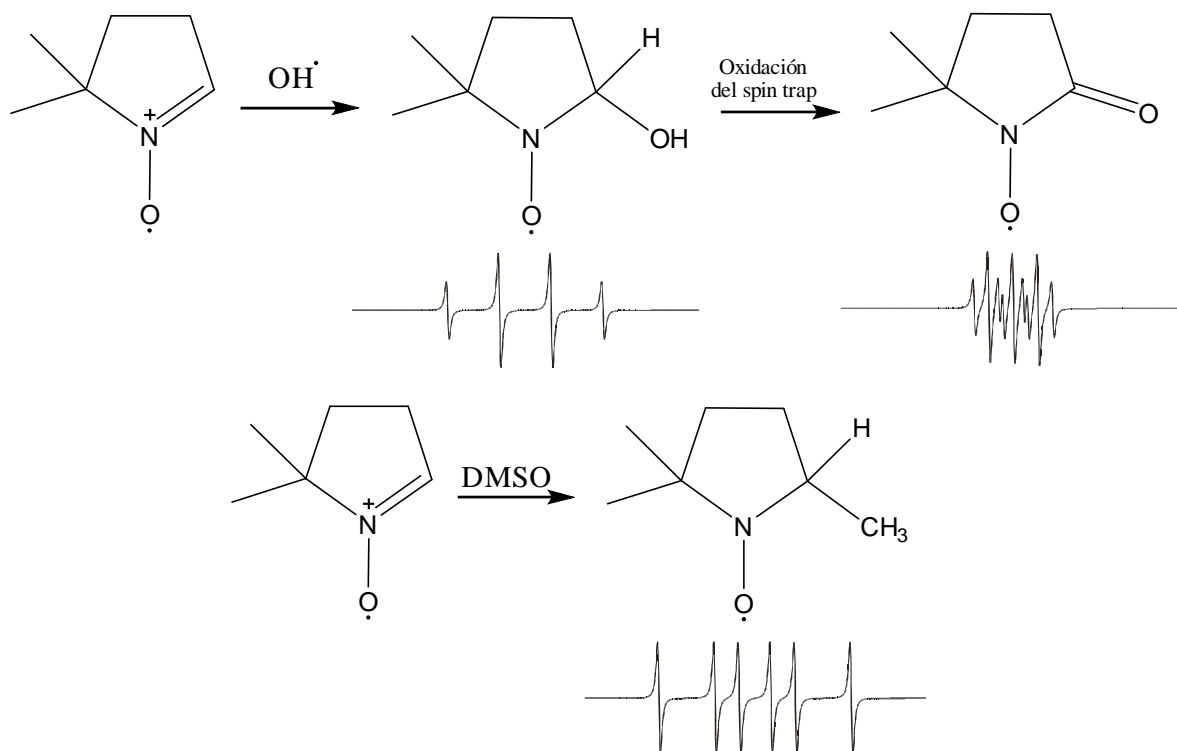


Figura 20. Ejemplos de Spin trap para radicales centrado en oxígeno y carbono atrapados con DMPO, generados de manera química.

Los ensayos de atrapamiento de radicales fueron realizados en epimastigotes Dm28c y en macrófagos RAW264.7 en ellos se evaluaron la serie de moléculas y se obtuvieron los espectros REE, a partir de los cuales se obtuvieron los patrones hiperfinos para cada molécula. Los espectros obtenidos presentaron patrones similares pero con distintas intensidades, dicha intensidad está relacionada con la concentración de las especies que atrapa DMPO y en consecuencia con la cantidad que se produce en los sistemas celulares. Como control positivo de la generación de especies radicalarias se utilizó menadiona, ya que es un potente generador de estrés oxidativo [68, 69].

La Figura 21 muestra el espectro REE de menadiona en la cual se observa un sexteto denotado con asteriscos (*) que hacen referencia a la formación del spin-aducto DMPO-CH₃ que surge de la interacción del radical OH⁻ con el vehículo (DMSO) con una constante de acoplamiento de $a_N=15,2G$.

En el caso del cuarteto denotado con signos positivos (+), correspondiente al spin-aducto DMPO-OH con constantes de acoplamiento $a_H=a_N=14.9 G$, esta especie es generada a partir de la interacción del radical semiquinona con el oxígeno molecular en el interior del parásito (reacción de Haber-Weiss). Por otra parte se observa un triplete intenso denotado con el símbolo numeral (#) y que corresponde a la oxidación del DMPO (DMPOX) con una constante de acoplamiento $a_N= 14,2 G$. La aparición de este triplete se atribuye a la oxidación del atrapador DMPO, pero la formación del triplete puede corresponder a otro proceso, ya que es factible la descomposición del spin aducto DMPO-OH y provocar la oxidación del atrapador DMPOX, con la consecuencia de generar un triplete con mayor intensidad [67, 70].

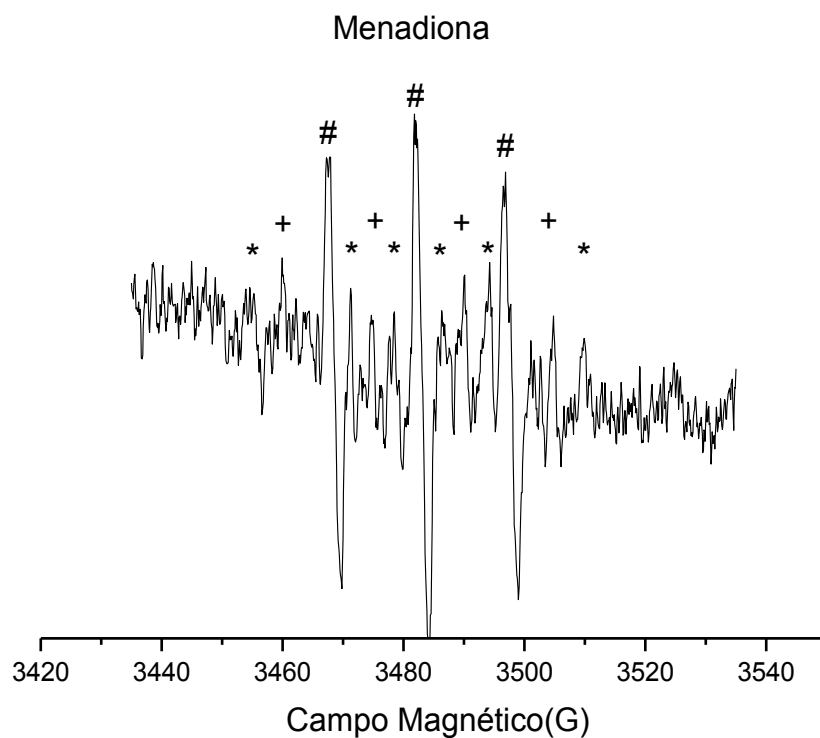


Figura 21. Espectro REE de Menadiona (control positivo) generado en epimastigotes Dm28c. En el espectro se simboliza a los spin trap: DMPO-CH₃ (*), al spin-adiucto DMPO-OH (+) y a DMPOX (#).

Además se obtuvieron los espin aductos (REE) para las moléculas 4 y 9 que generaron la mayor actividad en los sistemas celulares de *T. cruzi* y macrófagos respectivamente. La Figura 22 muestra en los paneles A, B y C los espectros REE para atrapamiento de radicales en epimastigotes Dm28c en donde se observó un triplete intenso para menadiona y el compuesto 4 correspondiente a la descomposición del spin-trap, sin embargo para el compuesto 4 se observa con una menor intensidad el sexteto correspondiente al atrapamiento del aducto DMPO-CH₃.

En los paneles D, E y F se presentan los espectros REE (spin-trap) obtenidos en tripomastigotes en donde se aprecia un cuarteto intenso correspondiente al espin aducto de DMPO-OH para el caso de menadiona, sin embargo en el espectro del compuesto 4 se aprecia una baja concentración de especies atrapadas por DMPO, indicándonos que la formación de radicales libres es muy baja, esto corroboraría que el mecanismo de acción de la molécula 4 no involucraría la acción de estas especies y por ende la generación de estrés oxidativo no sería el principal mecanismo de acción de la serie trizólica.

Finalmente en los paneles G, H y I, se muestran los espectros REE en macrófagos, en los cuales se observan patrones similares entre menadiona y la molécula 9, sin embargo para esta última las señales son de menor intensidad indicándonos que la molécula 9 es capaz de generar especies radicalarias pero en menor proporción que menadiona.

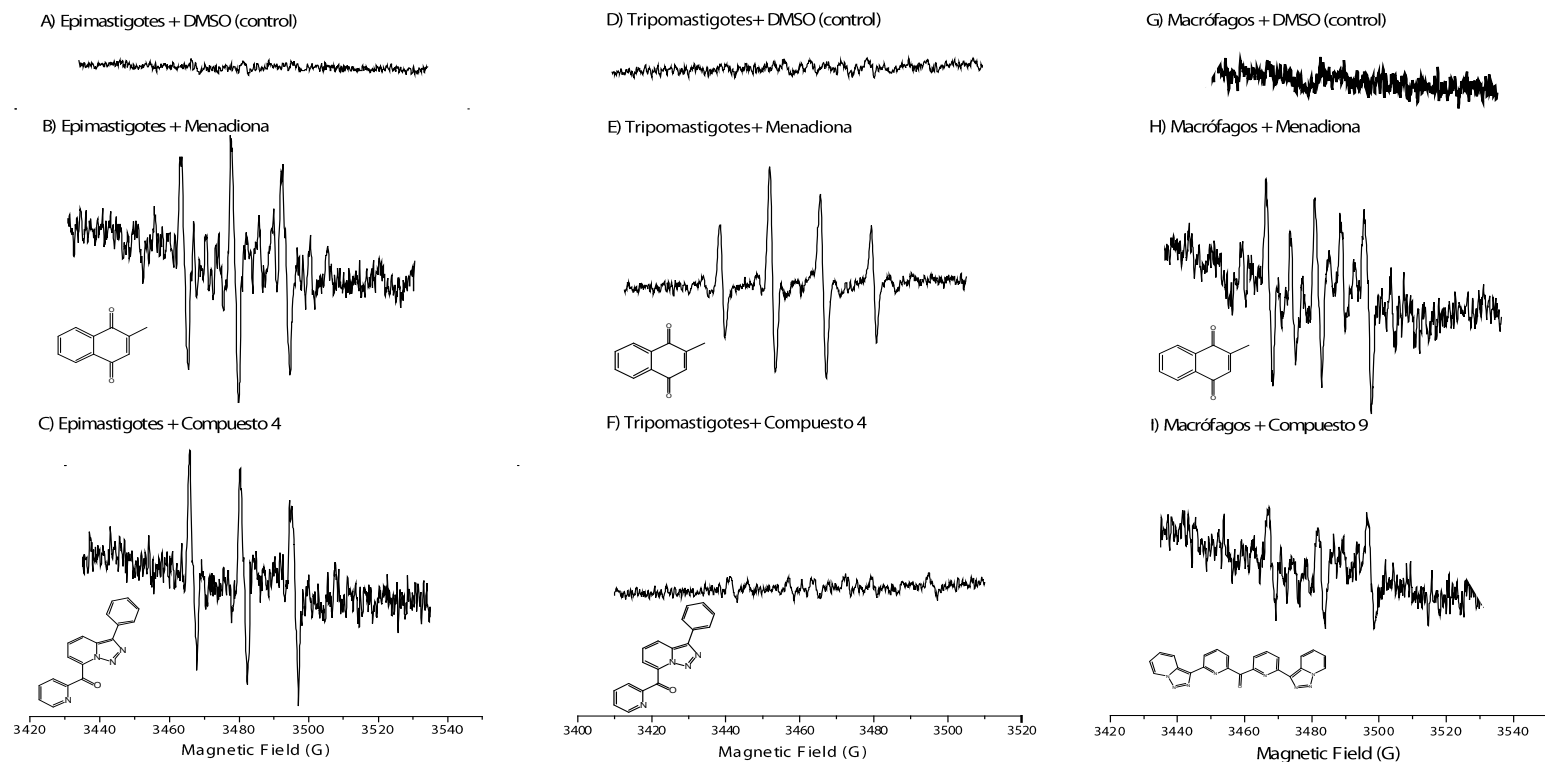


Figura 22. Espectros REE de los aductos con DMPO en distintos cultivos celulares. A-D-G) Spin aductos sólo con células B) epimastigotes con menadiona C) epimastigotes con el compuesto 4 E) tripomastigotes con menadiona F) tripomastigotes con compuesto 4 H) macrófagos con menadiona I) macrófagos con compuesto 9.

5.7 Formación especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi* y células de mamífero expuestas a los compuestos y su relación con el efecto tripanocida.

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 células de mamífero el principal sistema antioxidante es el glutatión [71, 72], mientras que en tripanosomátidos es tripanotión y cumple el papel fundamental en la supervivencia del parásito [73, 74].

Otro importante mecanismo de defensa contra ERO son las tioredoxinas (Trx), sistema antioxidante, que regula el balance de las proteínas que contienen ditioles/disulfuros. Este sistema es capaz de remover ERO y RNS en cortos tiempos de reacción [75].

Para determinar la formación de ERO hemos utilizado el sensor intracelular diclorofluoresceín-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) [76, 77].

Se determinó la formación de ERO en macrófagos RAW 264.7 y en epimastigotes Dm28c de *T. cruzi*, los resultados se muestran en la Tabla 5.

Moléculas	Pendiente de fluorescencia (veces respecto al control)		
	Macrófagos	Epimastigotes	tripomastigotes
1	2,25±0,11	1,92±0,18	0,97±0,04
2	3,30±0,11	1,79±0,10	0,95±0,02
3	0,36±0,05	0,83±0,09	0,79±0,05
4	1,04±0,02	0,99±0,11	0,76±0,02
5	1,07±0,10	1,06±0,09	0,84±0,04
6	1,22±0,16	1,02±0,05	0,87±0,06
7	1,04±0,01	0,97±0,10	0,75±0,07
8	1,06±0,01	0,93±0,04	1,14±0,05
9	1,06±0,09	1,57±0,07	0,73±0,06
10	1,09±0,03	1,40±0,01	0,83±0,02
11	1,10±0,01	1,02±0,01	0,68±0,04
12	1,01±0,03	1,03±0,01	0,54±0,01
13	0,75±0,07	1,03±0,08	0,61±0,05
14	1,06±0,13	ND	0,86±0,04
Control	1,00±0,04	1,00±0,03	1,00±0,05
Menadiona	1,68±0,17	2,70±0,02	1,23±0,04
H ₂ O ₂	1,86±0,34	4,32±0,09	-

Tabla 5. Efecto de la serie triazolo piridinas sobre la generación de especies radicalarias en macrófagos murinos y **T. cruzi** (epimastigotes y tripomastigotes Dm28c). Evaluación de las especies reactiva de oxígeno mediante la sonda intracelular DCFDA. Menadiona (0,05mM) y H₂O₂ (1mM) fueron agregados como control positivo, los compuestos fueron ensayados a 1 µM. Los valores son expresados como el incremento de la pendiente respecto al control ± la desviación estándar (n=3).

Los resultados mostraron que solo algunos miembros de la serie son capaces de generar ERO, entre los cuales los compuestos 1 y 2 son los que generaron mayor cantidad de ERO en todos los tipos celulares. Los otros miembros de la serie no presentaron un aumento significativo en la formación de especies oxidativas.

A pesar de que es posible cuantificar la formación de especies oxidativas con esta técnica no podemos determinar el tipo de radical que oxida a la sonda, pero si podemos asegurar que el aumento de la fluorescencia se debe a la presencia de oxidantes exógenos [78].

Además, otro fenómeno importante es la disminución de la intensidad de la fluorescencia, como en algunos casos de los compuestos 3, 4, 5, 6, 7, 9,10, 11, 12, 13 y 14, ocurridos en tripomastigotes, esta disminución se produciría por acción de los sistemas antioxidante del tripomastigote ya que es conocida la resistencia al estrés oxidativo [79].

Al relacionar la formación de ERO con el potencial de reducción (Tabla 6) hemos observado que los compuesto 1 y 2 que poseen el potencial de reducción más bajo de la serie son capaces de generar en mayor proporción ERO en epimastigotes y macrófagos, pero para el caso de tripomastigotes éstos no generan efectos sobre la fluorescencia.

Por otro lado hemos observado que los compuestos 6, 9 y 10 generan ERO, pero en menor proporción a los compuestos 1 y 2, en tal caso no existe relación entre el potencial de reducción y la formación de ERO.

Moléculas	Potencial reducción EPc (V)	ERO en Macrófagos	ERO en Epimastigotes	ERO en Tripomastigotes
1	-1.05	2,25±0,11	1,92±0,18	0,97±0,04
2	-1.01	3,30±0,11	1,79±0,10	0,95±0,02
3	-	0,36±0,05	0,83±0,09	0,79±0,05
4	-1.26	1,04±0,02	0,99±0,11	0,76±0,02
5	-1.20	1,07±0,10	1,06±0,09	0,84±0,04
6	-1.47	1,22±0,16	1,02±0,05	0,87±0,06
7	-1.24	1,04±0,01	0,97±0,10	0,75±0,07
8	-1.40	1,06±0,01	0,93±0,04	1,14±0,05
9	-1.34	1,06±0,09	1,57±0,07	0,73±0,06
10	-1.14	1,09±0,03	1,40±0,01	0,83±0,02
11	-1.20	1,10±0,01	1,02±0,01	0,68±0,04
12	-1.25	1,01±0,03	1,03±0,01	0,54±0,01
13	-1.33	0,75±0,07	1,03±0,08	0,61±0,05
14	-	1,06±0,13	ND	0,86±0,04

Tabla 6. Comparación entre el potencial de reducción electroquímico (Volts) y las ERO (número de veces que aumenta la pendiente respecto al control) en *T. cruzi* y Macrófagos, todos los compuestos fueron ensayados a 1 μ M. En rojo las moléculas que presentaron menor potencial de reducción, en verde los compuestos que generaron ERO.

Dentro de los diferentes estadios morfológicos del parásito, el tripomastigote es la forma del parásito que posee mayor resistencia al estrés oxidativo, mientras que el epimastigote es susceptible a las ERO, principalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^\cdot), como fue observado en los ensayos de fluorescencia.

La formación de radicales libres puede ser prevenido mediante la utilización de N-Acetil-L-Cisteína (NAC) un antioxidante capaz de apagar radicales libres, principalmente por labilidad del hidrógeno que posee el grupo sulfidrilo [80]. Para evaluar el efecto de los radicales libres sobre la viabilidad de las células se utilizaron las mismas condiciones que en los ensayos de viabilidad con MTT anteriormente mencionados (ver sección 4.2).

Para relacionar la generación de ERO sobre la viabilidad de los cultivos de parásitos y de células de mamífero, hemos escogido el compuesto 4 por ser el mejor de la serie contra la forma tripomastigote y al compuesto 9 para macrófagos. Los cultivos fueron previamente incubados N-acetil L-cisteína (1 mM en el caso de tripomastigotes y 100 μM para macrófagos), para luego agregar los compuestos y como control positivo menadiona.

Los resultados de viabilidad (Figura 23) mostraron que menadiona genera un efecto dosis dependiente en los cultivos celulares, Sin embargo al probar la combinación de menadiona con NAC observamos que existe prevención del efecto y en consecuencia un aumento de la viabilidad celular (Figura 23. A y C), esto hace presente que el efecto de menadiona sobre los cultivos celulares es en gran medida por la formación de estrés oxidativo.

Por otro lado, para cultivos de macrófagos incubados con el compuesto 9 y NAC en concentraciones de 1, 10, 100 μM de compuesto 9, no mostró efecto significativo en la viabilidad respecto al mismo compuesto sin NAC (Figura 3B), esto nos indicaría que el

efecto citotóxico de este compuesto no está relacionado con la formación de estrés oxidativo.

En el caso de tripomastigotes incubados con el compuesto 4 a 1 μM y 10 μM no mostró efecto significativo en la prevención del efecto, sin embargo a 100 μM se observó un aumento significativo de un 16% en la viabilidad del parásito. Probablemente el mecanismo de estrés oxidativo no sea el mecanismo principal, pero no descartamos la formación de estas especies en tripomastigotes por efecto de nuestros compuestos.

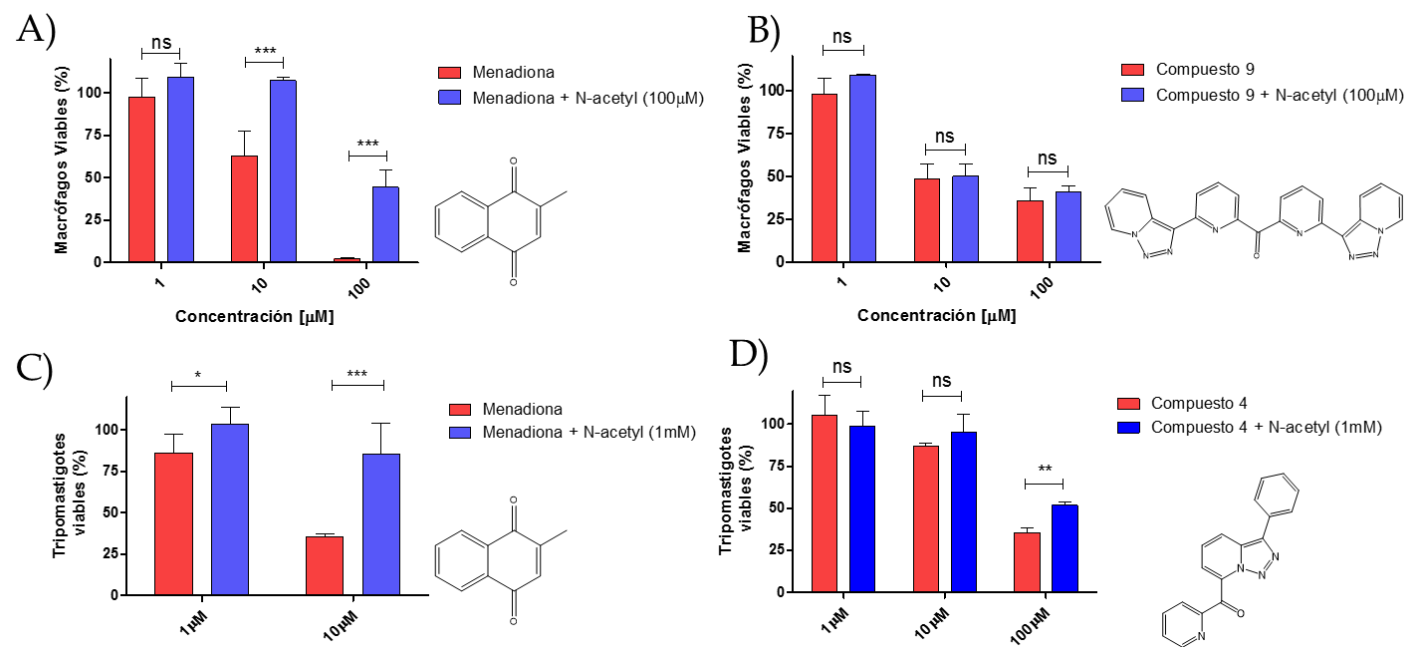


Figura 23. Efecto de prevención contra especies reactivas de oxígeno.(A-B) Efecto del menadiona y el compuesto 9 sobre la viabilidad celular en macrófagos Raw 264.7. (C-D) Efecto de menadiona y compuesto 4 sobre la viabilidad celular de tripomastigotes. Ensayos de viabilidad (24Hrs) evaluados mediante MTT. En rojo viabilidad de los compuestos 4, 9 y menadiona, en azul la combinación de los compuestos con NAC, ensayos expresados como el porcentaje de células viables respecto al control.

5.8 Estudio de biosíntesis de ergosterol por espectroscopia de masas.

El ergosterol es el principal esteroles presente en las membranas de *T. cruzi* [81]. La biosíntesis de ergosterol involucra una serie de sustratos y enzimas que pueden ser evaluados específicamente y sensiblemente mediante espectrometría de masas (MS, por su sigla en inglés) [82]. De esta manera hemos evaluado por MS los niveles de esteroides como escualeno, lanosterol, ergosterol y colesterol, este último, a pesar de no participar de manera directa en la vía metabólica de ergosterol tiene gran importancia en la supervivencia del parásito y probablemente está relacionado con la formación de ergosterol [83].

Hemos evaluado el patrón de fragmentación de lanosterol, ergosterol, escualeno y colesterol en donde se observó el ion molecular ($[M+H]$) con una baja intensidad para estos esteroides, sin embargo hemos observado la aparición del $[M+H]$ con la pérdida de una m/z 18 con gran intensidad. Esta masa ($[M+H] - 18$) se asocia a la pérdida de una molécula de agua, indicándonos que durante la ionización existe un proceso de deshidratación (Figura 24).

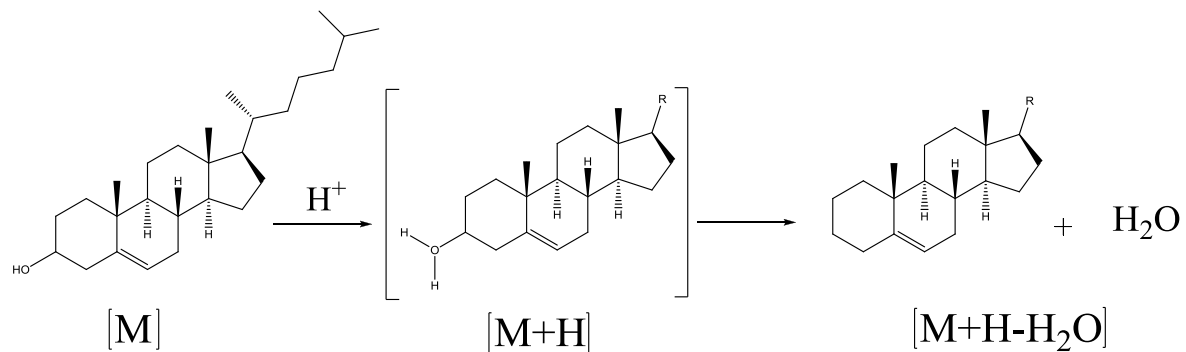


Figura 24. Mecanismo de deshidratación de ergosterol, efecto observado a partir de la ionización de ergosterol sólido por espectrometría de masas.

De esta manera, dado que la formación del $[M+H]$ es de muy baja intensidad en los estándares, que la aparición del ion molecular deshidratado $[M+H-H_2O]$ es de mayor relevancia y que la ionización en cultivos biológicos del ion molecular no se aprecia, hemos decidido cuantificar el efecto relativo de los niveles de esteroides mediante la señal deshidratada.

Metabolito	Ion observado	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Error (ppm)	Ion observado	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Error (ppm)
Ergosterol	[M+H]	397,3465	397,3444	5,28	[M+H-H ₂ O]	379,3365	379,3373	-2,11
Lanosterol	[M+H]	427,3934	427,3902	7,48	[M+H-H ₂ O]	409,3834	409,3841	-1,71
Escualeno	[M+H]	411,3985	411,4003	-4,37	-	-	-	-
Colesterol	[M+H]	387,3621	387,3610	2,84	[M+H-H ₂ O]	369,3521	369,3518	0,81

Tabla 7. Parámetros de masas teóricas y experimentales de esteroides (sólidos) obtenidos por espectroscopia de masas por el método DSA.

Luego de encontrar las condiciones óptimas de ionización para la aparición de los cuatro analitos en estudio y caracterizar las señales m/z, se incubaron los parásitos con las distintas drogas a dos tiempos 24 y 72 horas, en cada tiempo se recolectaron los parásitos y se resuspendieron en medio de cultivo sin suplementar. Se realizó un análisis semi-cuantitativo en donde fueron comparados los cultivos con los distintos tratamientos respecto al control que sólo contiene el vehículo DMSO (<0,5% v/v) en la Figura 25 se muestra un espectro de masas del control, en donde se observa la presencia de los cuatro analitos.

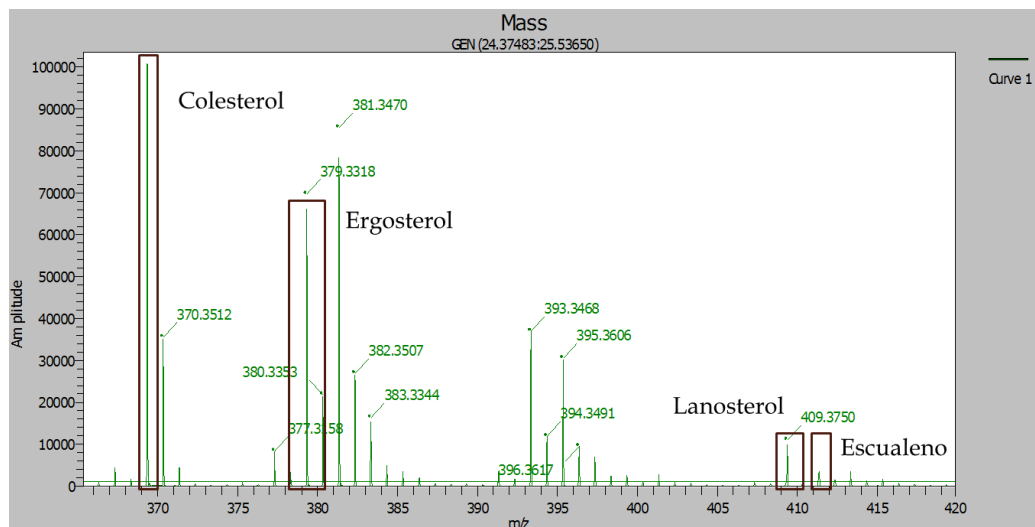


Figura 25. Espectro de masas representativo de cultivo de epimastigotes Dm28c, m/z 369,35 (colesterol), m/z 379,33 (ergosterol), m/z 409,38 (lanosterol) y m/z 411,39 (escualeno)

La Figura 26 muestra los niveles de esteroides respecto al control y sus respectivas intensidades, de manera general podemos observar que a las 24 horas hay un incremento en la señal de los cuatro esteroides respecto al control, es importante recordar que en este tiempo la viabilidad del parásito en el caso de fluconazol es un 100% y en el caso del compuesto 4 alcanza un 50%, sin embargo, en ambos casos se observa el mismo efecto, probablemente en este periodo el parásito es capaz de modular el efecto tóxico de las moléculas (fluconazol y el compuesto 4) a través del incremento de la actividad de las enzimas que participan en la metabolización de estos sustratos, esto permitiría disminuir rápidamente los esteroides metilados que pueden llegar a ser nocivos para el parásito al igual que ocurre en los hongos [84].

Por otro lado hemos observado que a las 72 horas los esteroides tienden a disminuir respecto a las 24 horas, siendo el compuesto 4 el que genera un decaimiento mayor sobre este proceso (Figura 26).

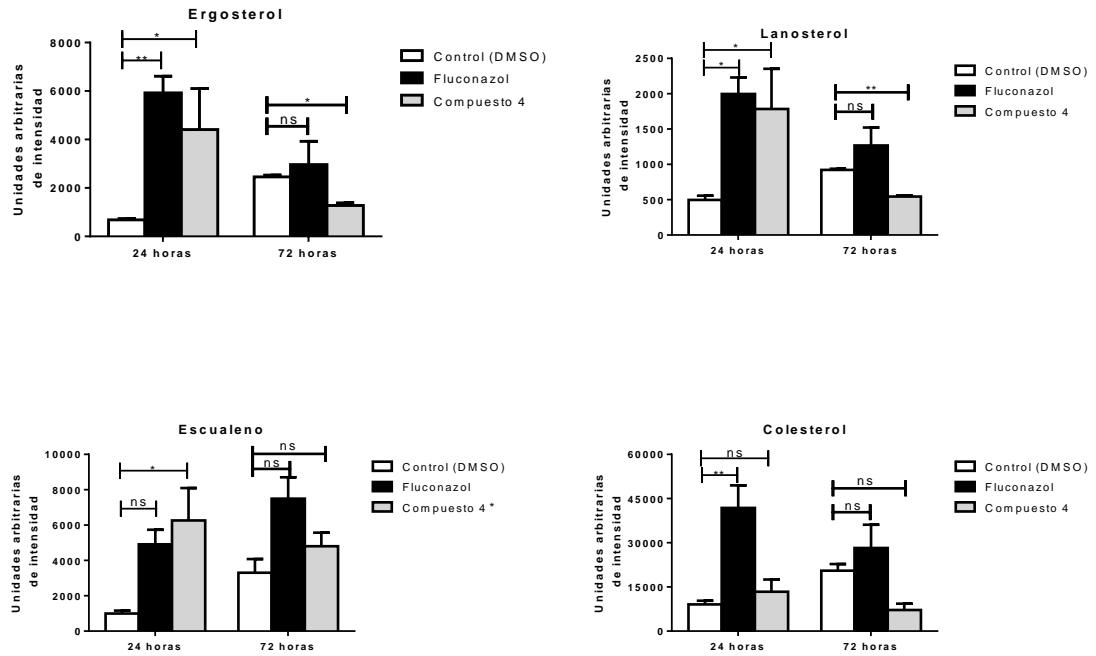


Figura 26. Niveles relativos de esteroides en *T. cruzi*. Esteroides obtenidos de epimastigotes Dm28c aislados ($3,0 \times 10^7$ parásitos/mL), incubados con vehículo (DMSO < 0,05%, barra blanca) o con 100µM del compuesto 4 (barra gris) o fluconazol (barra negra). Los valores obtenidos fueron a partir de muestras por triplicado (n=3), *p<0,05 **P<0,01, ns P>0,05, Dos vías ANOVA con post test Bonferroni.

Para profundizar mejor el análisis de esteroides, hemos comparado los niveles de cada esteroide respecto a los otros esteroides estudiados que participan en la síntesis de ergosterol (Figura 27). En base a los análisis podemos establecer las proporciones de esteroides que participan en cada etapa de la vía metabólica en la síntesis de ergosterol y compararlos con el control que no posee ningún estímulo externo. De esta manera, cuando la relación entre el sustrato y el producto es mayor a uno implica que el sustrato está en mayor proporción que el producto, para el caso contrario en donde el producto es mayor que el sustrato el valor es menor a uno.

En el primer caso evaluamos la relación escualeno/ergosterol (SQ/Er) a las 24 horas, encontrando que el control y el compuesto 4 varían similarmente esta relación (1,5 y 1,4 veces, respectivamente). Por otro lado, observamos que fluconazol disminuye la proporción SQ/Er respecto al control, indicando que el escualeno está en menor concentración que ergosterol. A las 72 horas, fluconazol y el compuesto 4 indujeron un aumento de escualeno por sobre el control, indicando que el escualeno está en mayor concentración que ergosterol.

Al evaluar la relación escualeno/ lanosterol (SQ/Lan) a las 24 horas, podemos observar que fluconazol no genera un efecto significativo en relación al control (2,65 y 2,46 veces respectivamente), por el contrario el compuesto 4 induce una relación de SQ/Lan de 0,87 veces, indicando que lanosterol está en mayor proporción que escualeno, indicándonos que existe una acumulación de lanosterol. A 72 horas, fluconazol indujo un aumento de la relación SQ/Lan de 5,92 veces, mientras que el compuesto 4 la aumento 8,80 veces. Ambos valores están por sobre los niveles del control (3,58 veces), sugiriendo una

acumulación de escualeno. Probablemente, el parásito requiere de mayor cantidad de escualeno para el proceso de proliferación ya que su sistema de síntesis de esteroides está alterada.

Para la etapa metabólica catalizada por CYP51, observamos que la proporción original entre el sustrato lanosterol y el producto final Ergosterol (Lan/Er) es de 0,06 veces, lo cual quiere decir que lanosterol está en menor concentración que ergosterol. Fluconazol aumenta esta relación (Lan/Er 0,34 veces), indicando un aumento de lanosterol. Por otra parte el compuesto 4 induce una acumulación de lanosterol que lleva a una relación Lan/Er por sobre el valor de uno, indicando claramente que existe una acumulación de lanosterol. Todos estos resultados sugieren que el compuesto 4 genera alteraciones metabólicas en la ruta sintética del ergosterol, pudiendo estar involucrada la inhibición de la enzima CYP51, además hemos observado que a las 72 horas fluconazol y el compuesto 4 aumentan de la misma manera relación Lan/Er. Sin embargo, al relacionar el ergosterol con el colesterol (Er/Col) hemos observado que los niveles de colesterol disminuyen (Figura 26).

Por otro lado, no está claro la participación de colesterol cuando hay una disminución de ergosterol, probablemente existan mecanismos de compensación a la inhibición de la síntesis de ergosterol.

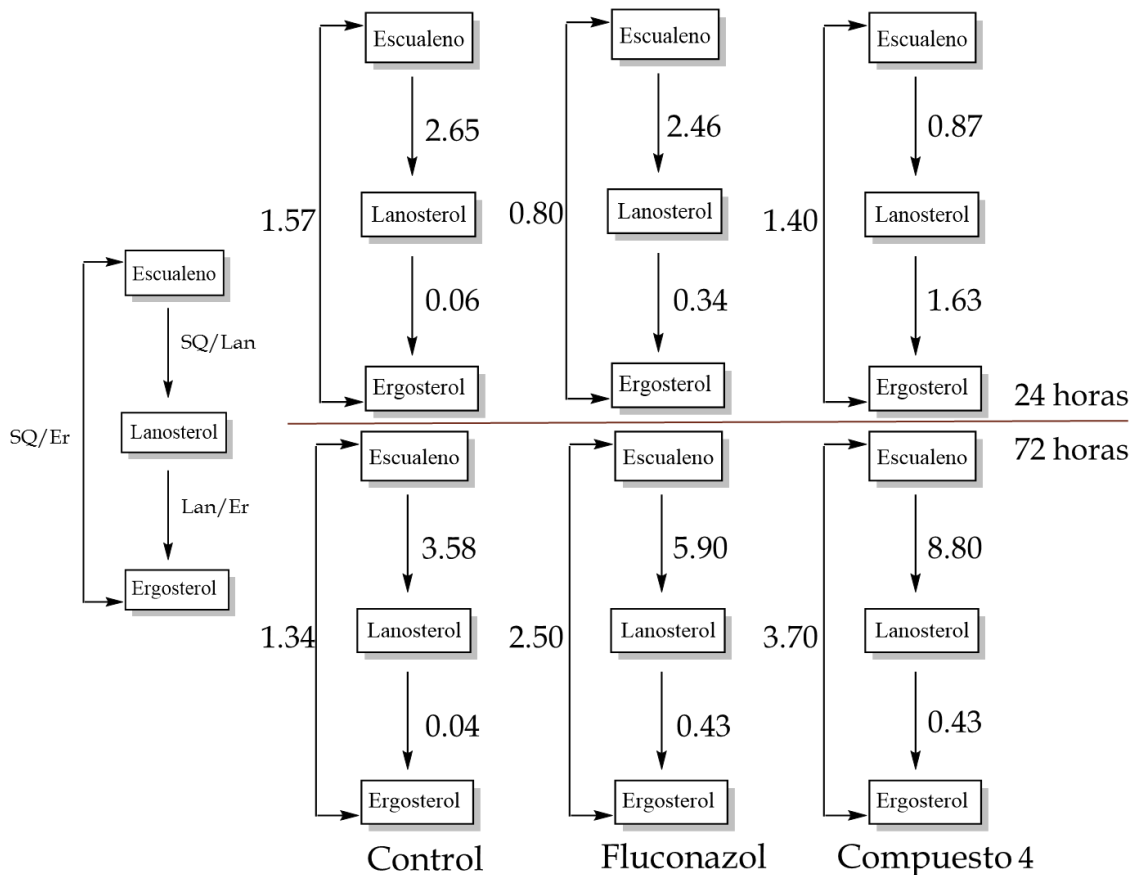


Figura 27. Diagrama metabolitos que participan en la biosíntesis de ergosterol en epimastigotes Dm28c, los valores representan la relación entre: escualeno/ergosterol (SQ/Er), escualeno/lanosterol(SQ/Lan) y lanosterol ergosterol(Lan/Er).

En resumen, los análisis realizados a los cultivos celulares tanto de *T. cruzi* como células de mamífero muestran que el mecanismo de acción de esta serie estaría ligado a la inhibición de la biosíntesis de esteroides, siendo la formación de especies radicalarias un mecanismo secundario de baja relevancia. Sin embargo, es importante observar que estas especies pudiesen generarse por la acción de dos clases de enzimas, las aldo ceto

reductasas (AKR) que se encuentran en el citoplasma del parásito y por otro lado enzimas que pertenecen al citocromo P450, encargado de la metabolización de sustancias exógenas (drogas).

Estructuralmente, dado que la estructura triazolica (nitro heterociclos) posee afinidad a enzimas con un centro metálico (como es la CYP51, que posee un grupo porfirina), es probablemente ahí donde el nitro heterociclo (piridina o triazolo) interactúa generando la inhibición de esta enzima. No obstante, pero no descartamos que las moléculas inhiban otras enzimas con características similares. En resumen, en la Figura 28 se propone el mecanismo de acción de la serie triazolo piridinas, incluyendo la inhibición de la enzima CYP51, y los subsecuentes aumento de lanosterol y disminución de ergosterol, sin embargo es importante destacar que el parásito es capaz de resistir al efecto citotóxico de la serie mediante el aumento de la actividad enzimática.

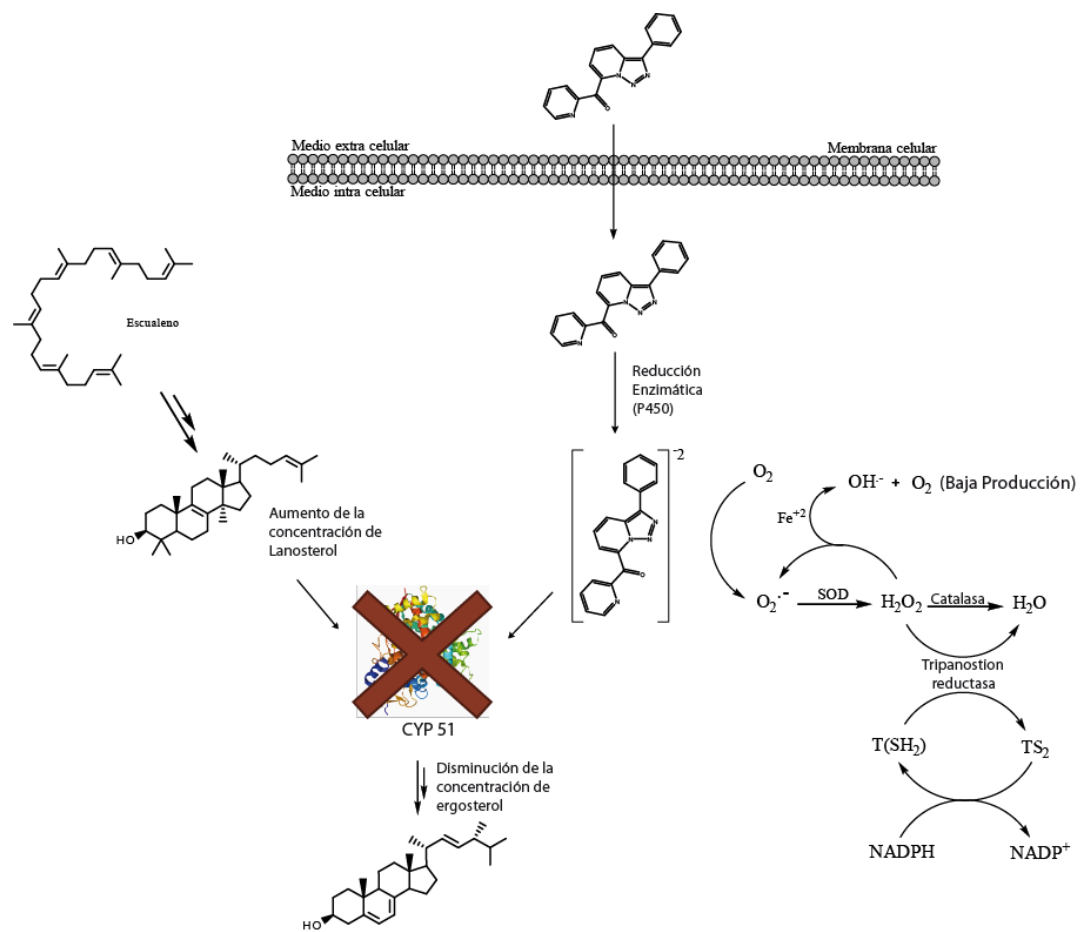


Figura 28: Mecanismo propuesto para la serie triazolo piridinas.

5.9 Diseño de nuevos fármacos antiparasitarios.

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados y los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos una estructura basada en el esqueleto 3-fenil-[1,2,3] triazolo [1,5- α]piridina. Esta estructura activa frente al parásito posee dos posiciones sustituibles, la primera es la posición tres correspondiente al anillo triazólico y la posición 7, estas posiciones jugarían un rol importante en la actividad tripanocida.

La presencia de ciertos grupos funcionales pudiesen aumentar o disminuir la actividad tripanocida, como el caso de la piridina en la posición 3 de [1,2,3] triazolo [1,5- α]piridina que provoca una disminución en la actividad tripanocida y un aumento en la toxicidad en células de mamífero. Al contrario, la sustitución del hidrógeno en la posición 3 por un grupo fenil demostró mejorar la selectividad antiparasitaria del compuesto, es por ello que cobra mayor importancia sintetizar una serie basada en la sustitución en la posición 3 por un grupo fenil en vez de una piridina (Figura 29).

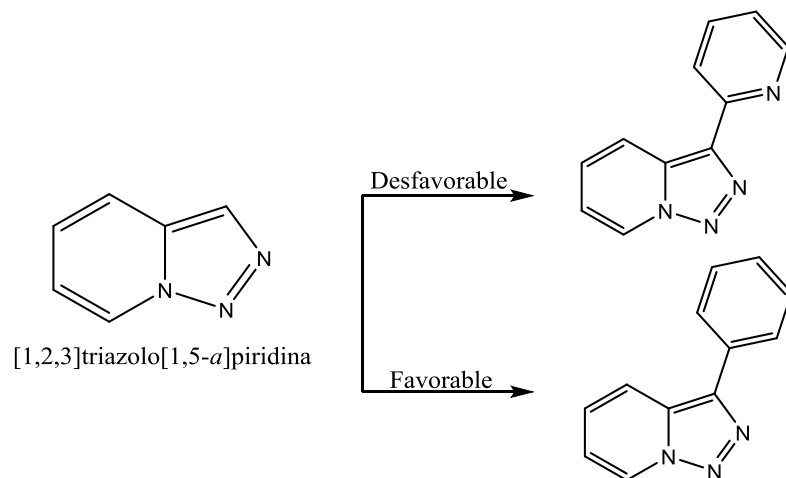


Figura 29. Efecto de la sustitución en la posición tres de [1,2,3] triazolo [1,5- α]piridina

Por otra parte, la importancia de la posición 7 radica en la posibilidad de generar especies radicalarias en el parásito, mediante la reducción del grupo carbonilo, por lo tanto es importante sustituir en la posición 7 el hidrógeno por un grupo carbonilo (Figura 30), dado que los compuestos que presentaban esta sustitución presentaron mayor formación de ERO como en los casos de los compuestos 1-2-3 no así en los casos que poseen dos carbonilos.

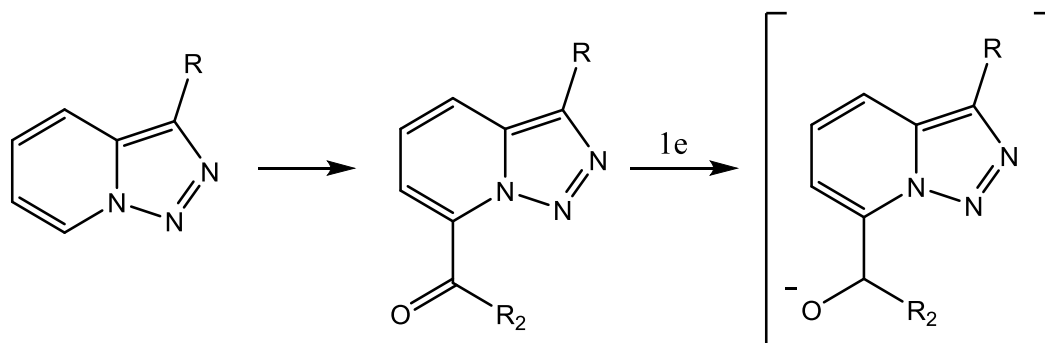


Figura 30. Sustitución en la posición 7 por un grupo carbonilo y posterior reducción.

Por otro lado, dada la estructura de la molécula 4 que presentó la mayor actividad antichagásica de la serie, es probable que la piridina en la posición contigua al carbonilo pudiese ser de importancia en el efecto inhibitorio de la enzima CYP51, ya que es una posición básica al igual que el triazol y en consecuencia podría unirse al sitio activo de la enzima [85]. Otro aspecto interesante de la modificación en esta posición sería evaluar el efecto del nitrógeno en las posiciones *orto*, *meta* y *para*, dado que existen moléculas que participan en la inhibición de enzimas y su actividad está determinada por la posición relativa del nitrógeno en la piridina [86].

Además, Para evaluar el efecto en la posición 7 la nueva serie debiesen tener sustituciones de grupos con similitud en las propiedades químicas como por ejemplo tiofenos, piridinas y pirazinas (Figura 31).

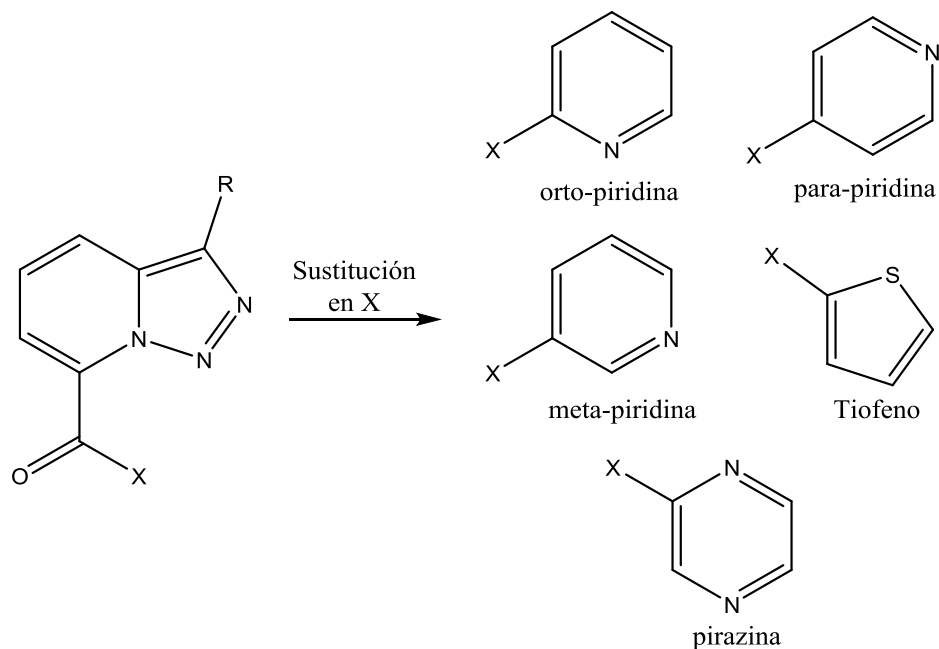


Figura 31. Sustituciones en la posición alfa al carbonilo con variados electrófilos.

Con esta información y con la colaboración de Dra. Belén Abarca y Dr. Rafael Ballesteros del laboratorio de química orgánica de la Universitat de Valencia, España. Hemos realizado la síntesis de una nueva serie de compuestos la cual se realizó en dos pasos:

El primer paso, consistió en reducir derivados de la 2-piridil a la forma de hidrazina para luego mediante la oxidación con óxido de manganeso formar la [1,2,3]triazolo[1,5- α]piridina (Figura 32) y así obtener las triazolopiridinas iniciales, los rendimientos de esta reacción esta fueron cercanos al 95%.

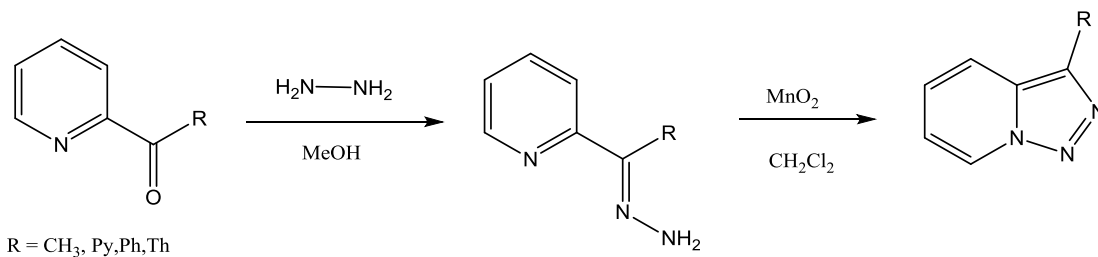


Figura 32. Reducción y ciclación de la triazolo piridina.

El segundo paso consistió en la litiación de la posición 7 de la [1,2,3] triazolo [1,5- α] piridina, para luego agregar los distintos electrófilos según la reacción de la Figura 33, para ello se disolvió la triazolo piridina de partida en tolueno y se procedió a agregar n-butil litio a baja temperatura (-40°C), la reacción fue llevada a cabo por 30 minutos. Luego se agregó el electrófilo y la mezcla de reacción fue agitada por 10 minutos, para luego agregar una solución de cloruro de amonio saturado, la solución fue filtrada con acetato de etilo.

Luego para la extracción de las triazolopiridinas, el sólido fue extraído mediante evaporación en rotavapor. Con este procedimiento se obtuvieron 18 compuestos nuevos más los triazoles de partida que poseen sustituyentes en la posición 3 de la triazolo piridina, los rendimientos de estas moléculas están entre los 30% a los 80%.

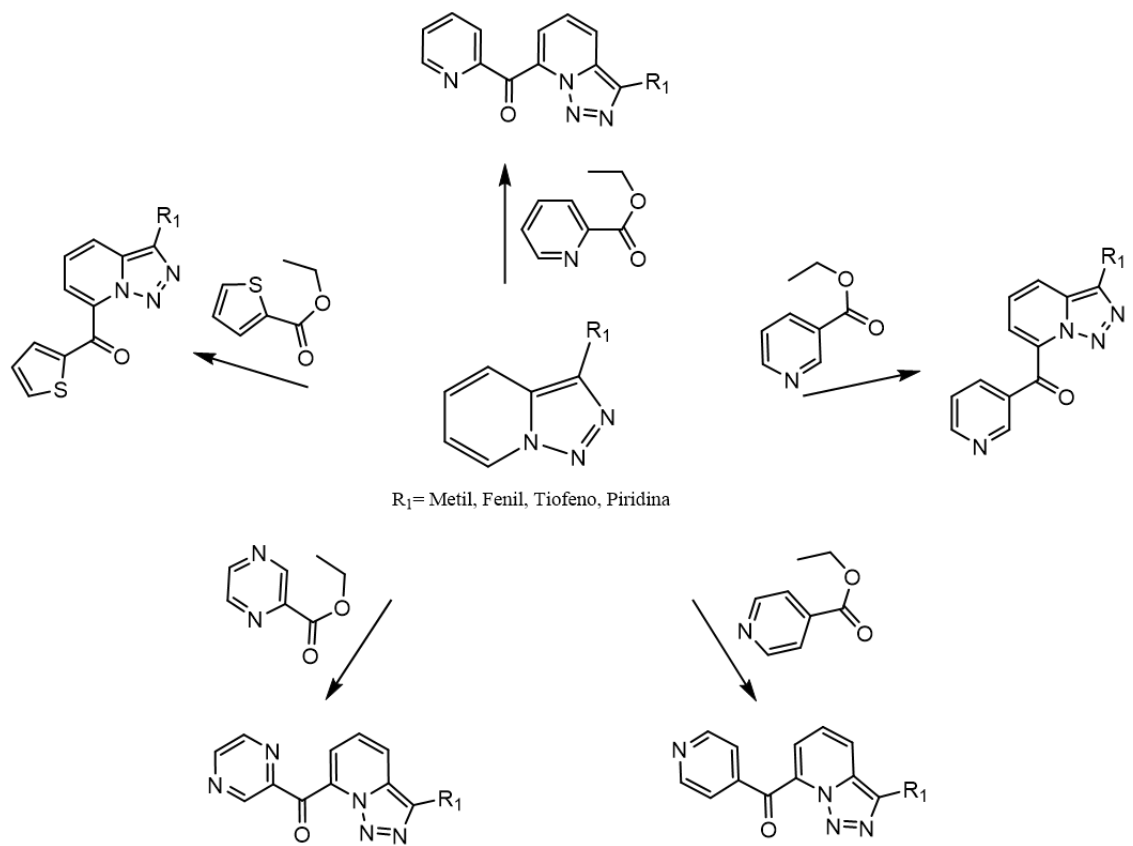


Figura 33. Nueva serie de [1,2,3]triazolo[1,5- α]piridina, con sustituyentes de tipo electrofilos como piridinas (*orto*, *meta* y *para*), pirazina y tiofeno.

Para determinar las estructuras triazólicas se obtuvieron los espectros ^1H RMN (300 MHz) y los espectros ^{13}C RMN (75MHz) en cloroformo deuterado, además se obtuvieron los espectros IR (cm^{-1}) en donde se confirmó la presencia del grupo carbonilo en todas las moléculas. Otros ensayos realizados fueron el punto de fusión y se determinó la masa molecular mediante espectrometría de masas de alta resolución, los detalles de la caracterización de estos compuestos se encuentran en el anexo 2.

En esta Tesis se encontró una estructura química (compuesto 4) que presentó actividad tripanocida, esta estructura [1,2,3] triazolo [1,5 α] piridina pequeña y versátil sería considerada como farmacóforos para el diseño racional de nuevos compuestos, para así poder buscar diversas aplicaciones para esta clase de compuestos.

6 CONCLUSIONES

- ☞ Los miembros de la serie derivados de [1,2,3] Triazolo [1,5 α] piridinas son antichagásicos menos potentes que las drogas tradicionales, siendo la más activa el compuesto 4 en el parásito. Por otro lado, los compuestos 7 y 9 presentaron toxicidad en macrófagos.
- ☞ Durante la reducción de los compuestos existe la formación de una especie radical aniónica, la cual es estable gracias a la deslocalización en los anillos piridínicos (resonancia), en este proceso no existe la participación del esqueleto [1,2,3] Triazolo [1,5 α] piridina, pero juega un rol importante en la reducción electroquímica.
- ☞ La reducción del carbonilo generaría la especie radicalaria en el parásito esta especie a pesar de que esta especie se generaría en los distintos sistemas biológicos no sería persistente, esto implicaría que no se generaran las condiciones para la formación del estrés oxidativo.
- ☞ La serie es capaz de alterar la vía metabólica de ergosterol por la inhibición de la enzima CYP51.
- ☞ La estructura [1,2,3] Triazolo [1,5 α] piridinas sería un buen punto de partida para realizar modificaciones estructurales que permitiesen mejorar la actividad antichagásica de la serie.

7 REFERENCIAS

1. Organization, W.H., *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Updated March 2015. **Fact sheet N°340**.
2. Dias, J., A. Silveira, and C. Schofield, *The impact of Chagas disease control in Latin America: a review*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002. **97**: p. 603-612.
3. Publica, I.d.S., *Vigilancia de Enfermedad de Chagas 2005 – 2013: Componente vectorial*. Boletín ISP, 2014. **4** (6).
4. Rassi Jr, A., A. Rassi, and J. Marcondes de Rezende, *American Trypanosomiasis (Chagas Disease)*. Infectious Disease Clinics of North America, 2012. **26**(2): p. 275-291.
5. Coura, J.R., *Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible?* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013. **108**: p. 962-967.
6. Flávia Nardy, A., C.G. Freire-de-Lima, and A. Morrot, *Immune Evasion Strategies of Trypanosoma cruzi*. Journal of Immunology Research, 2015. **2015**: p. 178947.
7. Bern, C., *Chagas' Disease*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(5): p. 456-466.
8. Lo Presti, M.S., et al., *Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease*. Acta Tropica, 2015. **145**: p. 79-87.
9. Bhowmick, D., et al., *Highly Efficient Glutathione Peroxidase and Peroxiredoxin Mimetics Protect Mammalian Cells against Oxidative Damage*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015. **54**(29): p. 8449-53.
10. Maya, J.D., et al., *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, 2007. **146**(4): p. 601-20.

11. Dodson, M., V. Darley-USmar, and J. Zhang, *Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling*. Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 207-21.
12. Hall, B.S., C. Bot, and S.R. Wilkinson, *Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13088-95.
13. Hall, B.S. and S.R. Wilkinson, *Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(1): p. 115-23.
14. Jan, Y.H., et al., *Vitamin K3 (menadione) redox cycling inhibits cytochrome P450-mediated metabolism and inhibits parathion intoxication*. Toxicol Appl Pharmacol, 2015. **288**(1): p. 114-120.
15. Cristian O. Salas, M.F., Antonio Morello, Juan Diego Maya and Ricardo A. Tapia, *Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against Trypanosoma Cruzi, An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease*. Current Medicinal Chemistry, 2011. **18**: p. 144-161.
16. Prati, F., et al., *2-Phenoxy-1,4-naphthoquinones: from a multitarget antitrypanosomal to a potential antitumor profile*. J Med Chem, 2015.
17. da Silva Júnior, E.N., et al., *Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008. **16**(9): p. 5030-5038.
18. da Silva, E.N., Jr., et al., *Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against Trypanosoma cruzi*. Eur J Med Chem, 2008. **43**(8): p. 1774-80.
19. Hillion, M. and H. Antelmann, *Thiol-based redox switches in prokaryotes*. Biol Chem, 2015. **396**(5): p. 415-44.
20. Hrycay, E.G. and S.M. Bandiera, *Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer*. Adv Pharmacol, 2015. **74**: p. 35-84.

21. Jozefczak, M., et al., *Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(3): p. 3145-3175.
22. da Silva, E.N., Jr., et al., *The evaluation of quinonoid compounds against Trypanosoma cruzi: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-beta-lapachone derivatives and beta-lapachone-based 1,2,3-triazoles*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(9): p. 3224-30.
23. Menna-Barreto, R.F., et al., *The effects on Trypanosoma cruzi of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(5): p. 644-53.
24. de Macedo-Silva, S.T., W. de Souza, and J.C. Rodrigues, *Sterol Biosynthesis Pathway as an Alternative for the Anti-Protozoan Parasite Chemotherapy*. Curr Med Chem, 2015. **22**(18): p. 2186-98.
25. Parks, L.W. and W.M. Casey, *Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 95-116.
26. De Vas, M.G., et al., *The NADPH-cytochrome P450 reductase family in Trypanosoma cruzi is involved in the sterol biosynthesis pathway*. Int J Parasitol, 2011. **41**(1): p. 99-108.
27. Meyer, H. and G.G. Holz, Jr., *Biosynthesis of lipids by kinetoplastid flagellates*. J Biol Chem, 1966. **241**(21): p. 5000-7.
28. Chen, C.K., et al., *Structural characterization of CYP51 from Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(4): p. e651.
29. Yu, X., et al., *Dynamics of CYP51: implications for function and inhibitor design*. J Mol Recognit, 2015. **28**(2): p. 59-73.
30. Peña-Díaz, J., et al., *Mitochondrial Localization of the Mevalonate Pathway Enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Reductase in the Trypanosomatidae*. Molecular Biology of the Cell, 2004. **15**(3): p. 1356-1363.

31. Quiñones, W., et al., *The glycosome membrane of Trypanosoma cruzi epimastigotes: protein and lipid composition*. Experimental Parasitology, 2004. **106**(3–4): p. 135-149.
32. Lepesheva, G.I., F. Villalta, and M.R. Waterman, *Targeting Trypanosoma cruzi Sterol 14 α -Demethylase (CYP51)*. Advances in parasitology, 2011. **75**: p. 65-87.
33. Liendo, A., K. Lazardi, and J.A. Urbina, *In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against Trypanosoma cruzi*. J Antimicrob Chemother, 1998. **41**(2): p. 197-205.
34. Urbina, J.A., et al., *Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(7): p. 1771-7.
35. Liendo, A., et al., *Sterol composition and biosynthesis in Trypanosoma cruzi amastigotes*. Mol Biochem Parasitol, 1999. **104**(1): p. 81-91.
36. Doyle Patricia S., et al., *A Nonazole CYP51 Inhibitor Cures Chagas' Disease in a Mouse Model of Acute Infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(6): p. 2480–2488.
37. Hargrove, T.Y., et al., *Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from Leishmania infantum*. J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26838-48.
38. Lepesheva, G.I., et al., *Crystal structures of Trypanosoma brucei sterol 14 α -demethylase and implications for selective treatment of human infections*. J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 1773-80.
39. Ji, H., et al., *A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of Candida albicans and its interaction with azole antifungals*. J Med Chem, 2000. **43**(13): p. 2493-505.
40. Lepesheva, G.I., et al., *Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25582-90.

41. Xu, J., et al., *Design, synthesis and antifungal activities of novel 1,2,4-triazole derivatives*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(7): p. 3142-8.
42. Buckner, F.S. and J.A. Urbina, *Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 2012.
43. de Souza, W. and J.C. Rodrigues, *Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs*. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2009. **2009**: p. 642502.
44. Blanco, F., et al., *[1,2,3]Triazolo[1,5-a]pyridines. A theoretical (DFT) study of the ring-chain isomerization*. Tetrahedron, 2008. **64**(49): p. 11150-11158.
45. Abarca, B., et al., *Triazolopyridines. Part 25: Synthesis of new chiral ligands from [1,2,3]triazolo[1,5-a]pyridines*. Tetrahedron, 2007. **63**(42): p. 10479-10485.
46. Abarca, B., R. Ballesteros, and M. Chadlaoui, *Triazolopyridines. Part 24: New polynitrogenated potential helicating ligands*. Tetrahedron, 2004. **60**(27): p. 5785-5792.
47. Abarca, B., R. Ballesteros, and M. Elmasnaouy, *A facile route to new potential helicating ligands*. Tetrahedron, 1998. **54**(50): p. 15287-15292.
48. Maya, J.D., et al., *Trypanosoma cruzi: inhibition of parasite growth and respiration by oxazolo(thiazolo)pyridine derivatives and its relationship to redox potential and lipophilicity*. Exp Parasitol, 2001. **99**(1): p. 1-6.
49. Temburnikar, K.W., et al., *Antiproliferative activities of halogenated pyrrolo[3,2-d]pyrimidines*. Bioorg Med Chem, 2015. **23**(15): p. 4354-63.
50. Onoda, N., et al., *Significant cytostatic effect of everolimus on a gefitinib-resistant anaplastic thyroid cancer cell line harboring PI3KCA gene mutation*. Mol Clin Oncol, 2015. **3**(3): p. 522-526.
51. Cattaneo, L., et al., *Anti-Proliferative Effect of Rosmarinus officinalis L. Extract on Human Melanoma A375 Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132439.
52. Neta, P., *Redox properties of free radicals*. Journal of Chemical Education, 1981. **58**(2): p. 110.

53. Jones, D.P., *Radical-free biology of oxidative stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(4): p. C849-868.
54. Kissinger, P.T. and W.R. Heineman, *Cyclic voltammetry*. Journal of Chemical Education, 1983. **60**(9): p. 702-706.
55. Olea-Azar, C., et al., *ESR, electrochemical and cyclodextrin-inclusion studies of triazolopyridyl pyridyl ketones and dipyridyl ketones derivatives*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2008. **71**(2): p. 703-709.
56. Olea-Azar, C., et al., *ESR and electrochemical studies of 2-acylpyridines and 6,6'-diacyl-2,2'-bipyridines*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2005. **61**(9): p. 2261-2266.
57. Evans, D.H., et al., *Cyclic voltammetry*. Journal of Chemical Education, 1983. **60**(4): p. 290-295.
58. Staley, P.A., et al., *The Effect of Glassy Carbon Surface Oxides in Non-Aqueous Voltammetry: The Case of Quinones in Acetonitrile*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(21): p. 10917-10924.
59. Nicholson, R.S. and I. Shain, *Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems*. Analytical Chemistry, 1964. **36**(4): p. 706-723.
60. Webster, R.D., A.M. Bond, and T. Schmidt, *Electrochemical reduction of some 2,6-disubstituted pyridine-based esters and thioic S-esters in acetonitrile*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1995(7): p. 1365-1374.
61. Lucio, A.J. and S.K. Shaw, *Pyridine and Pyridinium Electrochemistry on Polycrystalline Gold Electrodes and Implications for CO₂ Reduction*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(22): p. 12523-12530.
62. Clément, J.-L., et al., *Assignment of the EPR Spectrum of 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide (DMPO) Superoxide Spin Adduct[†]*. The Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**(4): p. 1198-1203.

63. Haire, D.L., J.W. Hilborn, and E.G. Janzen, *A more efficient synthesis of DMPO-type (Nitron) spin traps*. The Journal of Organic Chemistry, 1986. **51**(22): p. 4298-4300.
64. Aguilera-Venegas, B., et al., *ESR, electrochemical, molecular modeling and biological evaluation of 4-substituted and 1,4-disubstituted 7-nitroquinoxalin-2-ones as potential anti-Trypanosoma cruzi agents*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011. **78**(3): p. 1004-12.
65. Rigol, C., et al., *Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2005. **61**(13-14): p. 2933-8.
66. Olea-Azar, C., et al., *Applications of electron spin resonance and spin trapping in tropical parasitic diseases*. Mini Rev Med Chem, 2006. **6**(2): p. 211-20.
67. Aguilera-Venegas, B. and H. Speisky, *Identification of the transition state for fast reactions: the trapping of hydroxyl and methyl radicals by DMPO-A DFT approach*. J Mol Graph Model, 2014. **52**: p. 57-70.
68. Loor, G., et al., *Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(12): p. 1925-36.
69. Klotz, L.O., X. Hou, and C. Jacob, *1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling*. Molecules, 2014. **19**(9): p. 14902-18.
70. Diaz-Urrutia, C.A., et al., *Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2012. **95**: p. 670-8.
71. Weydert, C.J. and J.J. Cullen, *MEASUREMENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CULTURED CELLS AND TISSUE*. Nature protocols, 2010. **5**(1): p. 51-66.
72. Sung, C.-C., et al., *Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013. **2013**: p. 301982.

73. Thomson, L., A. Denicola, and R. Radi, *The trypanothione-thiol system in Trypanosoma cruzi as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity*. Arch Biochem Biophys, 2003. **412**(1): p. 55-64.
74. Olin-Sandoval, V., R. Moreno-Sanchez, and E. Saavedra, *Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(12): p. 1614-30.
75. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 75-87.
76. Wardman, P., *Use of the dichlorofluorescein assay to measure "reactive oxygen species"*. Radiat Res, 2008. **170**(3): p. 406-7.
77. Wardman, P., *Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(7): p. 995-1022.
78. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-6.
79. Spagnuolo, G., et al., *Effect of N-acetyl-l-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1803-1809.
80. Manta, B., et al., *Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2013. **1830**(5): p. 3199-3216.
81. Kessler, R.L., et al., *Trypanosoma cruzi response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55497.
82. Heimark, L., et al., *Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis*. J Mass Spectrom, 2002. **37**(3): p. 265-9.

83. Pereira, M.G., et al., *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservosome Lipid Inclusions. PLoS ONE, 2011. **6**(7): p. e22359.
84. Mellado, E., M. Cuenca-Estrella, and J. Luis Rodríguez-Tudela, *Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2015. **33**(07): p. 523-530.
85. Moraes, C.B., et al., *Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against Trypanosoma cruzi: implications for Chagas disease drug discovery and development*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4703.
86. Olmo, F., et al., *Scorpiand-like azamacrocycles prevent the chronic establishment of Trypanosoma cruzi in a murine model*. Eur J Med Chem, 2013. **70**: p. 189-98.

ANEXO 1. VALORES TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES (HFCC)

La serie triazolo piridinas fue optimizada de acuerdo a los conformeros de mínima energía obtenidos a través de métodos mecánicos moleculares (MMFF) implementados en Spartan[®]14. El mejor conformero fue optimizado con AM1, método semiempírico, la geometría final de cada conformero fue seleccionada en base a la teoría de densidad funcional (DFT). Los cálculos de la estructura hiperfina fueron realizados con GAUSSIAN[®]09.

Molécula 1 (g = 2.0115637)

Átomo	N	H	H	H	N	H	N	H	H	H	N	H
Numero	1	5	7	9	12	13	15	19	21	23	26	27
Experimental	2.2809	2.9035	0.3956	3.4870	0.3439	0.1949	1.8429	3.0340	0.8163	3.6775	0.7926	0.3435
Teórico	1.3913	2.4138	0.4332	3.4571	0.6566	0.3693	1.3904	2.4146	0.4335	3.4582	0.6575	0.3696

Molécula 9 (g = 2.0118341)

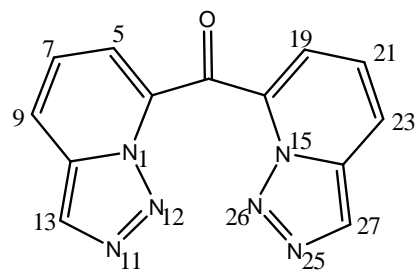
Átomo	N	N	H	H	H	N	H	H	H	N
Numero	11	16	20	21	22	26	30	31	32	44
Experimental	0.1696	1.8700	3.7901	0.4213	1.9956	1.3878	1.8786	0.3511	3.3430	0.1160
Teórico	0.0685	1.6128	3.4946	0.3843	2.0935	1.6289	2.0712	0.3781	3.4715	0.0681

Molécula 10 (g=2.0142259)

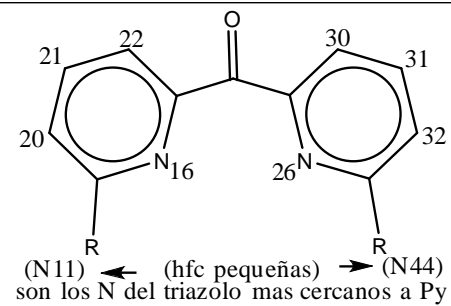
Átomo	N	H	H	N	N	H	H	H	N	H	H	N
Numero	1	5	9	12	18	22	23	24	27	31	35	38
Experimental	0.8402	0.4044	1.8942	0.8399	1.3042	3.183	1.2902	3.3322	0.8415	0.2043	1.5447	0.7974
Teórico	0.8361	0.9263	1.4551	0.5569	1.4501	5.1665	1.3048	5.1755	0.8263	0.9087	1.4286	0.5555

Molécula 5 (g=2.0100300)

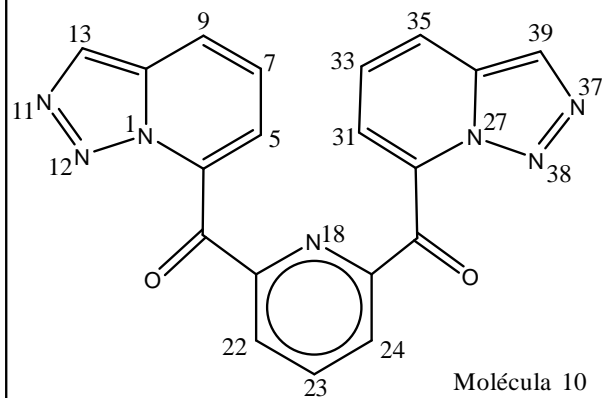
Átomo	N	H	H	H	N	N	H	H	H	H	H
Numero	1	5	7	9	12	17	21	22	23	24	29
Experimental	1.8436	1.3128	0.1847	5.9752	0.3322	1.9145	1.7017	0.2719	1.052	4.151	0.038
Teórico	1.7257	1.7735	0.1764	3.5014	0.6528	1.8705	1.7964	0.3855	0.6493	2.9645	0.1245



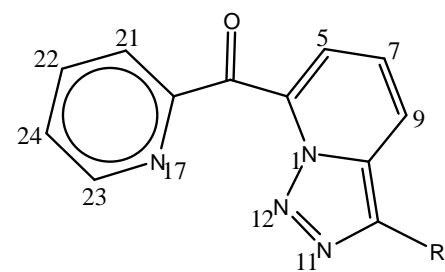
Molécula 1



Molécula 9

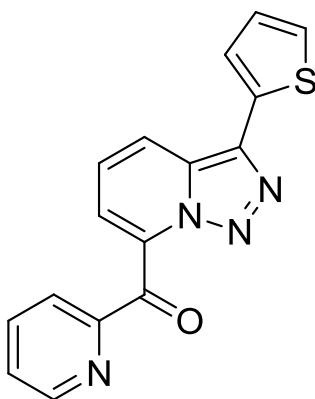


Molécula 10



Molécula 5

ANEXO2. CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE [1,2,3] TRIAZOLO [1,5A]PIRIDINAS



(AB4089)

328mg 43%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

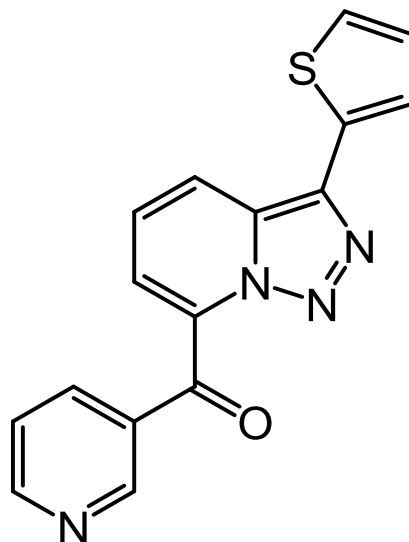
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.51 (ddd, $J=4.7, 1.6, 0.9$, 1H), 8.22 (dt, $J=7.8, 1.0$, 1H), 8.15 (p, $J=2.8$, 1H), 7.96 (td, $J=7.7, 1.7$, 1H), 7.59 (dd, $J=3.6, 1.1$, 1H), 7.50 (ddd, $J=7.7, 4.8, 1.2$, 1H), 7.44 (dd, $J=5.1, 1.0$, 2H), 7.39 (dd, $J=5.1, 1.1$, 1H), 7.17 (dd, $J=5.1, 3.6$, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ = 188.44, 153.18, 149.41, 137.48, 135.31, 133.15, 130.13, 127.94, 127.87, 125.46, 125.27, 124.40, 123.83, 121.02, 118.42.

IR 3111,8; 3045,2; 1676,8; 1304,9; 1216,0; 1024,5; 827,4; 785,8; 722,0; 680,3.

Pf 169,5-170,6°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 129.05, 141.05, 172.02, 173.03, 205.07, 217.07, 218.08, 249.04, 250.05, 279.06



(AB4090)

228mg 30%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

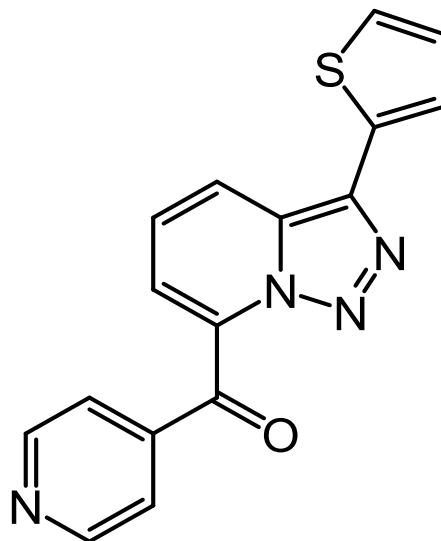
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.96 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.84 (dd, $J = 4.9, 1.6$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.9, 1.2$ Hz, 1H), 8.17 – 8.12 (m, 1H), 7.61 (dd, $J = 3.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.50 – 7.38 (m, 3H), 7.35 (dd, $J = 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 187.43, 154.99, 151.47, 137.37, 134.78, 134.32, 132.93, 131.94, 130.63, 128.37, 126.18, 125.51, 125.12, 124.21, 122.05, 119.09.

IR 3095,1; 3053,5; 1671,2; 1291,0; 1266,0; 1013,4; 946,8; 896,8; 824,7; 738,6; 691,4.

Pf 148,9-150,0°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 106.03, 141.05, 172.02, 173.03, 205.07, 217.07, 218.08, 223.04, 235.0828, 245.07, 246.07, 249.04, 250.05, 261.04, 277.04, 278.04, 279.05



(AB4087)

362mg 48%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

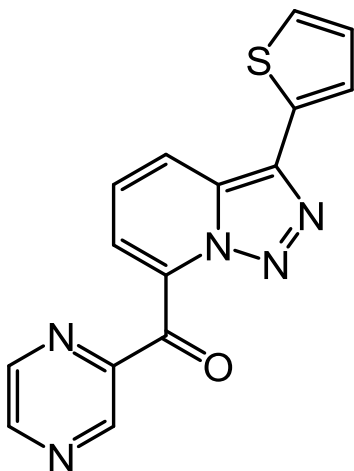
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (dd, $J = 4.4, 1.7$ Hz, 1H), 8.22 (dd, $J = 8.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.61 (ddd, $J = 6.1, 4.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.51 – 7.31 (m, 2H), 7.20 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 187.34, 151.15, 142.23, 133.56, 132.49, 130.21, 128.09, 125.98, 125.06, 124.93, 122.26, 122.21, 119.51, 77.36.

IR 3109,0; 3070,2; 3023,0; 1662,9; 1535,2; 1402,0; 1274,3; 1218,8; 1041,2; 830,2; 752,5; 733,1; 685,9.

Pf 177,3-178,6°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 172.02, 173.03, 250.05, 251.06, 252.07, 279.06, 311.08



(AB4088)

350mg 46%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

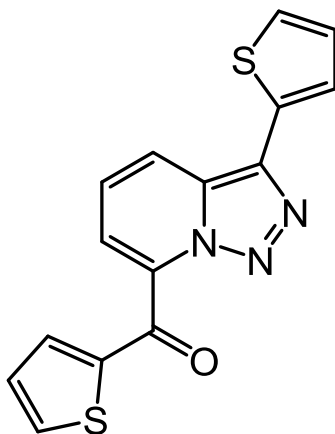
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 9.38 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.2$, 1.9 Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 3.6$, 1.1 Hz, 1H), 7.53 – 7.34 (m, 3H), 7.18 (dd, $J = 5.1$, 3.6 Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 187.46, 148.45, 144.91, 143.76, 134.23, 132.78, 129.98, 128.01, 127.40, 125.72, 125.22, 124.62, 121.89, 119.13, 77.58, 77.16, 76.74.

IR 3095,1; 3050,7; 3006,3; 1676,8; 1302,1; 1274,3; 1168,8; 1046,7; 1013,4; 824,7; 766,4; 691,4; 683,1.

Pf 177,2-178,3°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 141.06, 172.02, 173.03, 280.05



(AB4110)

527mg 97%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

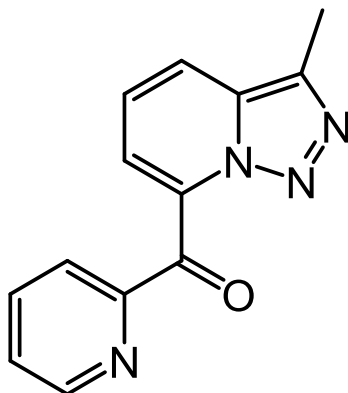
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (dd, $J = 8.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.84 (dd, $J = 4.9, 1.1$ Hz, 1H), 7.66 – 7.59 (m, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 3H), 7.29 (dd, $J = 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.17 (ddd, $J = 10.2, 5.0, 3.8$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 179.95, 142.85, 137.26, 136.35, 134.81, 133.21, 130.79, 129.03, 128.31, 125.95, 125.38, 124.96, 121.12, 117.61, 77.59, 77.16, 76.73.

IR 3106,2; 3092,4; 1629,6; 1607,4; 1407,6; 1349,3; 1293,8; 802,5;738,6; 685,9.

Pf 130,5-131,0°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 110.99, 128.05, 145.01, 172.02, 173.03, 210.03, 223.04, 255.01, 284.02



(AB4052)

1,07g 60%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

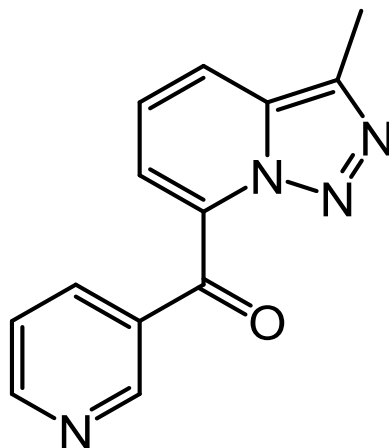
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (ddd, $J = 4.7, 1.6, 0.9$ Hz, 1H), 8.21 (dt, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 1H), 7.95 (td, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.83 – 7.76 (m, 1H), 7.49 (ddd, $J = 7.7, 4.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 6.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 5.4, 3.4$ Hz, 1H), 2.64 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 188.72, 153.59, 149.55, 137.71, 135.07, 134.87, 132.40, 127.96, 124.23, 123.37, 120.76, 118.81, 10.76.

IR 3050,7; 2925,8; 2853,7; 1682,3; 1574,1; 1310,4; 1277,1; 780,3; 752,5; 733,1; 691,4.

Pf 167-168°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 117.06, 128.05, 130.06, 140.05, 141.06, 142.06, 154.06, 155.06, 156.08, 166.06, 167.07, 168.07 181.07, 182.08, 183.09, 184.06, 192.07, 193.07, 194.06, 209.07, 210.08, 211.08, 239.09



(AB4051)

1.24g 69%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

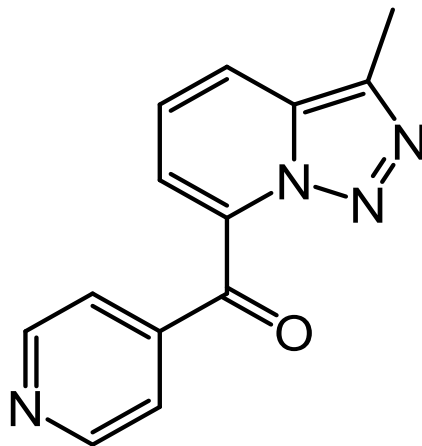
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (dd, $J = 2.3, 0.8$ Hz, 1H), 8.75 (dd, $J = 4.9, 1.7$ Hz, 1H), 8.10 – 7.97 (m, 1H), 7.83 – 7.71 (m, 1H), 7.36 (dtd, $J = 5.9, 4.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.28 – 7.13 (m, 2H), 2.59 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 186.95, 154.30, 150.97, 137.02, 135.44, 133.44, 132.29, 131.67, 123.83, 123.51, 123.13, 121.16, 118.73, 77.58, 77.16, 76.74, 10.44.

IR 3017,4; 2923,1; 2848,1; 1657,4; 1571,3; 1410,3; 1304,1; 1282,7; 899,6; 744,2; 727,6; 697,0.

Pf 172,7-173,9°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 117.06, 128.05, 129.07, 130.06, 154.06, 155.06, 156.08, 166.06, 167.07, 168.07, 181.07, 182.08, 183.09, 184.06, 192.07, 193.07, 194.08, 196.06, 209.07, 210.08, 211.08, 239.09



(AB4091)

926mg 52%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

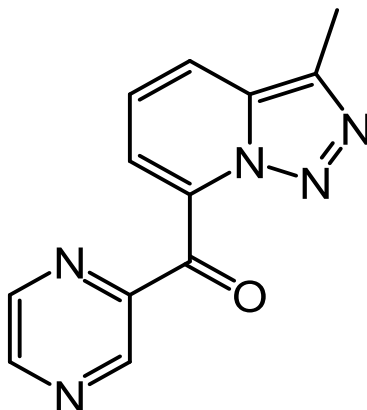
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.80 (ddd, $J = 11.5, 4.4, 1.6$ Hz, 1H), 7.89 – 7.78 (m, 1H), 7.55 (dd, $J = 4.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.29 – 7.24 (m, 1H), 2.64 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 188.17, 151.47, 150.72, 142.81, 139.06, 135.99, 133.40, 132.69, 128.18, 125.23, 124.27, 123.28, 122.62, 121.91, 119.80, 10.05.

IR 3079,5; 3056,4; 3017,4; 1668,5; 1529,7; 1410,3; 1263,2; 1238,2; 1224,4; 1027,3; 838,6; 730,3; 669,2

Pf 196,3-196,7°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 104.05, 155.06, 156.08, 168.07, 181.07, 182.08, 183.09, 211.08



(AB4092)

440mg 49%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

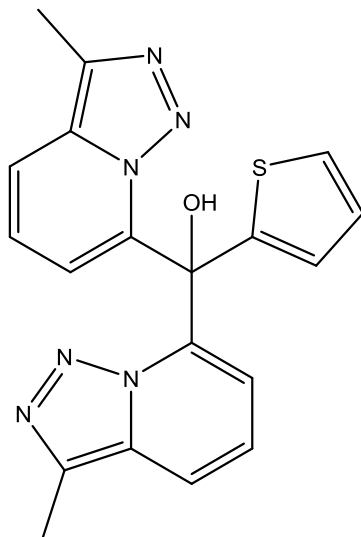
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.35 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.78 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.47 (dd, $J = 2.4, 1.5$ Hz, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 2.64 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 188.20, 148.75, 148.71, 145.47, 144.05, 135.53, 134.16, 132.46, 123.41, 121.61, 119.39, 77.59, 77.16, 76.73, 10.07.

IR 3081,3; 3056,3; 1679,6; 1538,0; 1415,9; 1304,9; 1155,0; 1127,2; 1041,2; 902,4; 877,4; 796,9; 771,9; 738,6.

Pf 211,4-211,9°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 104.05, 105.06, 107.02, 116.05, 130.06, 142.05, 143.06, 156.05, 157.07, 182.07, 183.08, 184.08, 212.08, 240.08



(AB4098)

527mg 58%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

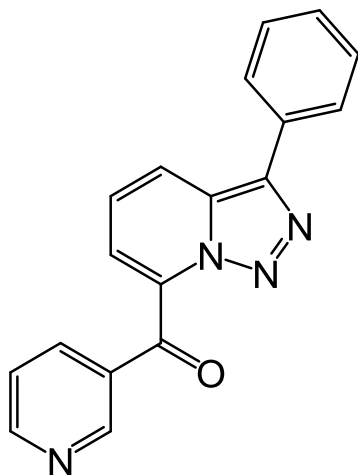
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.27 (qd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 2H), 7.09 (dd, $J = 3.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.00 (dd, $J = 5.1, 3.7$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 143.80, 139.02, 134.82, 133.22, 127.33, 127.10, 126.97, 124.73, 117.83, 116.60, 77.68, 77.59, 77.16, 76.73, 10.05.

IR 1629,6; 1438,1; 1171,6;1127,2; 1018,9;852,4; 769,2; 719,2.

Pf 259,2-260,0°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 172.02, 173.03, 218.08, 250.05, 279.06



(AB4048)

472mg 31%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

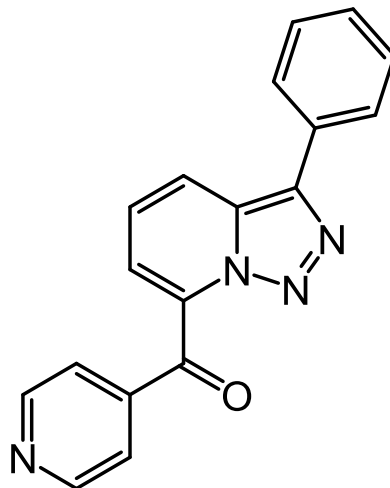
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.97 (dd, $J = 2.3, 0.8$ Hz, 3H), 8.84 (dd, $J = 4.9, 1.7$ Hz, 3H), 8.27 – 8.11 (m, 6H), 8.00 – 7.90 (m, 7H), 7.59 – 7.39 (m, 16H), 7.34 (dd, $J = 6.8, 1.2$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 186.88, 154.48, 151.05, 138.91, 137.03, 134.01, 131.65, 131.07, 130.87, 129.27, 128.57, 127.12, 125.08, 123.93, 121.92, 118.59.

IR 3092,7; 3050,7; 2925,8; 1654,6; 1574,1; 1413,1; 1277,1; 738,6; 688,7.

Pf 129,9-134,0°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 139.05, 166.06, 167.07, 194.06, 204.08, 217.09, 218.09, 228.08, 232.07, 243.09, 244.10, 245.11, 246.09, 255.09, 256.10, 271.09, 272.10, 301.11



(AB4047)

770mg 50%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

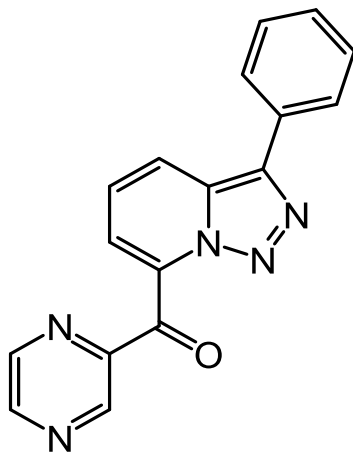
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H), 8.23 (dd, $J = 8.9, 1.3$ Hz, 1H), 8.00 – 7.88 (m, 22H), 7.65 – 7.30 (m, 77H), 7.26 (s, 4H), 1.67 (s, 7H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 187.45, 151.13, 142.28, 139.02, 133.58, 131.08, 130.78, 129.29, 128.64, 127.13, 124.94, 122.36, 122.30, 119.29.

IR 3092,4; 3036,9; 3028,5; 1665,7; 1277,1; 1260,4; 1055,1; 777,4; 733,1; 677,6.

Pf 199,6-201,2°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 139.05, 166.06, 167.07, 194.06, 204.08, 216.08, 217.09, 218.09, 228.08, 230.08, 242.08, 243.09, 244.10, 245.11, 246.09, 255.09, 256.07, 258.10, 271.08, 272.09, 273.10, 301.11



(AB4095)

368mg 48%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

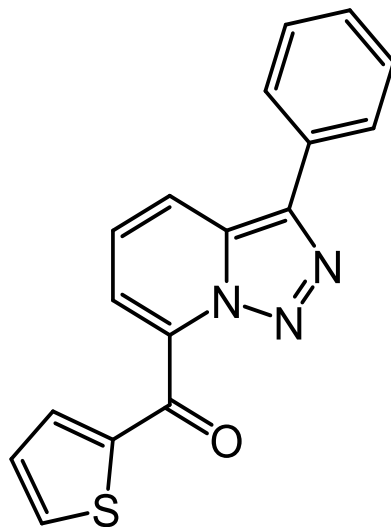
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.40 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.58 – 7.38 (m, 5H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 185.77, 168.54, 156.17, 151.85, 150.14, 148.43, 144.97, 143.75, 139.12, 129.25, 128.46, 127.06, 125.10, 122.27, 122.08, 118.93.

IR 3075,7; 3056,3; 1679,6; 1304,9; 1066,2; 1013,42; 733,1;

Pf 228,2-228,7°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 139.05, 166.06, 167.07



(AB4108)

707mg 90%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

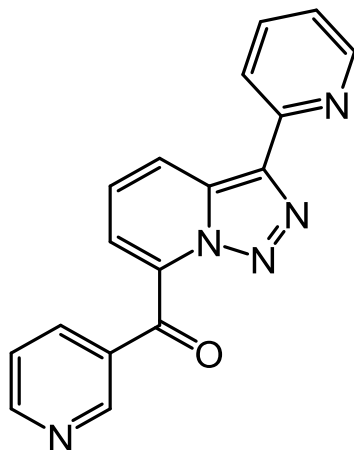
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (dd, $J = 8.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.99 – 7.94 (m, 2H), 7.87 – 7.83 (m, 1H), 7.65 (dd, $J = 3.9, 1.1$ Hz, 1H), 7.57 – 7.34 (m, 6H), 7.29 (dd, $J = 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 4.9, 3.9$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 180.14, 142.95, 137.23, 136.35, 134.85, 131.54, 131.47, 129.54, 129.46, 129.01, 128.71, 128.54, 127.45, 127.20, 126.76, 125.23, 121.27, 118.84, 117.36, 77.59, 77.16, 76.73.

IR 3081,3; 3056,3; 1640,7;1404,8; 1349,3; 1285,4; 1060,6; 1021,7; 766,4; 727,5; 688,7.

Pf 72,4-73,8°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 110.99, 139.05, 140.05, 166.06, 167.07, 168.08, 191.07, 204.08, 216.08, 217.09, 233.08, 244.07, 248.05, 249.06, 260.05, 276.04, 306.0



(AB4094-49)

1,3g 85%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

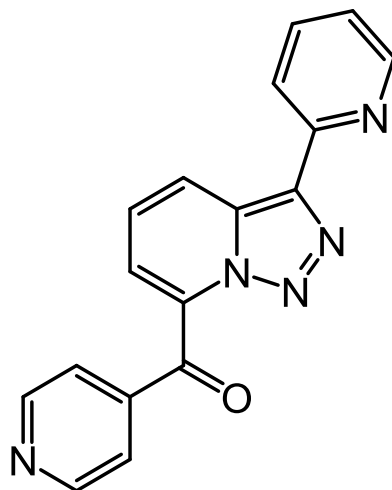
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.38 (dd, $J = 2.2, 0.8$ Hz, 1H), 8.86 (dd, $J = 4.9, 1.7$ Hz, 1H), 8.76 (dt, $J = 7.0, 1.0$ Hz, 1H), 8.63 (dd, $J = 6.5, 2.6$ Hz, 1H), 8.46 – 8.39 (m, 1H), 8.17 (dt, $J = 9.0, 1.2$ Hz, 1H), 8.10 – 8.01 (m, 2H), 7.48 (ddd, $J = 7.9, 4.9, 0.8$ Hz, 1H), 7.22 (ddd, $J = 8.9, 6.7, 1.0$ Hz, 1H), 7.03 (td, $J = 6.8, 1.3$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 192.83, 153.61, 153.23, 152.54, 151.55, 138.59, 138.50, 132.87, 132.50, 127.42, 125.82, 123.96, 123.43, 123.12, 120.99, 116.43.

IR 3111,8; 3078,5; 1662,9; 1579,6; 1524,1; 1321,5; 1193,6; 1116,1; 1032,8; 946,8; 771,9; 694,2; 683,1.

Pf 205,0-206,1°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 140.05, 167.06, 195.05, 246.10, 247.08, 256.09, 257.07, 274.10.



(AB4050)

610mg 40%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

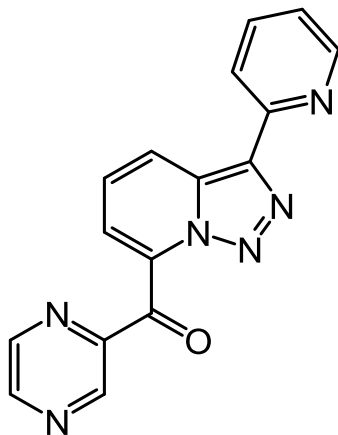
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (dd, $J = 4.4, 1.6$ Hz, 2H), 8.76 (dt, $J = 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 8.65 – 8.60 (m, 1H), 8.10 – 8.00 (m, 3H), 7.88 (dd, $J = 4.4, 1.7$ Hz, 2H), 7.20 (ddd, $J = 9.0, 6.7, 1.0$ Hz, 1H), 7.03 (td, $J = 6.9, 1.3$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 193.40, 152.98, 151.63, 150.47, 144.28, 138.51, 136.70, 132.51, 127.39, 125.84, 124.20, 124.11, 123.01, 120.90, 116.48, 116.25.

IR 2928,6; 2848,1; 1674,0; 1596,3; 1526,9; 1404,8; 1043,95; 769,2; 744,2; 680,3.

Pf 227,8-228,3°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 140.05, 167.06, 168.07, 195.05, 218.08, 219.09, 244.09, 245.09, 246.10, 247.09, 256.09, 257.09, 273.09, 274.10.



(AB4093)

486mg 63%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

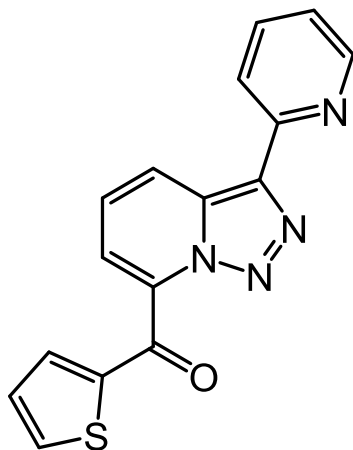
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.32 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.87 – 8.78 (m, 2H), 8.76 (dt, $J = 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 8.62 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H), 8.16 – 8.01 (m, 4H), 7.26 – 7.18 (m, 2H), 7.03 (td, $J = 6.8, 1.3$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 182.74, 149.88, 147.75, 147.17, 146.96, 144.44, 138.36, 127.26, 125.86, 124.37, 123.44, 121.03, 116.04.

IR 3100,7; 3045,2; 1668,5;1590,7; 1518,6; 1327,1; 1019,0; 952,3; 774,7; 746,9; 730,3; 685,9.

Pf 197,0-198,2°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 107.02, 167.06, 168.06, 275.09



(AB4106)

300mg 48%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (dt, $J = 7.0, 1.0$ Hz, 1H), 8.55 (dt, $J = 9.0, 1.2$ Hz, 1H), 8.43 (dd, $J = 7.4, 1.7$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 3.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.99 – 7.87 (m, 2H), 7.71 (dd, $J = 4.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 7.13 (dd, $J = 4.9, 3.8$ Hz, 1H), 7.04 (td, $J = 6.9, 1.3$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 185.51, 154.67, 151.05, 141.04, 138.46, 137.15, 136.42, 132.47, 128.21, 127.42, 125.66, 123.81, 122.63, 121.13, 116.71.

IR 3092,4; 3042,4; 1632,4; 1582,4; 1521,4; 1154,97; 1035,6; 760,6; 744,4; 716,4; 688,7.

Pf 215,8-216,4°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 110.99, 139.05, 140.05, 166.05, 167.06, 195.05, 279.05