

DOI: <https://doi.org/10.24275/rtediq.11.109>

Evaluación *in vitro* de nitratos derivados de la 3 β ,19-hidroxiépandrosterona sobre epimastigotes de dos aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*

López Vargas Marhian¹, Pérez Romero Dinorath¹, Santillán Baca Rosa Luisa², Ochoa Becerra Eugenia², Soto Castro Delia³, Moreno Rodríguez Adriana^{1*}

¹Laboratorio de Estudios Epidemiológicos, Clínicos, Diseños Experimentales e Investigación, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. 68000.

²Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360. Ciudad de México, México.

³CONACYT-Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Oaxaca. Hornos 1003, Col. Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, C.P. 71230. Oaxaca. México.

*Autor para correspondencia: arimor10@hotmail.com

ORCID : 0000-0003-4100-8255

Recibido:
25/abril/2025

Aceptado:
15/diciembre/2025

Palabras clave:
Trypanosoma cruzi,
in vitro,
cepas,
citotoxicidad

Keywords:
Trypanosoma cruzi,
in vitro,
strains,
cytotoxicity

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es una parasitosis que afecta a millones de personas a nivel mundial, actualmente solo se cuenta con dos medicamentos disponibles para el tratamiento, los cuales son nifurtimox (NFX) y benznidazol (BNZ), por lo cual surge la necesidad de encontrar un fármaco capaz de lograr el éxito terapéutico para tratar a los pacientes tanto en fase aguda, indeterminada y crónica, todo esto sin la aparición de efectos secundarios en los pacientes que impidan finalizar el tratamiento. Las moléculas esteroideas poseen una amplia gama de actividades farmacológicas, reportando que las moléculas de nitroderivados poseen actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*. La actividad antiparasitaria se evaluó en la forma de epimastigote de las cepas *Ninoa* y *A1*, la citotoxicidad se determinó empleando Macrófago de ratón de la línea celular J774. Mostrando una actividad sobresaliente de los compuestos C5B, C5C con aislado *Ninoa* y en *A1* el C5A, siendo potenciales candidatos.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic disease that affects millions of people worldwide. Currently, there are only two drugs available for treatment: Nifurtimox (NFX) and Benznidazole (BNZ). Therefore, there is a need to find a drug capable of achieving therapeutic success in treating patients in the acute, indeterminate, and chronic phases, all without the appearance of side effects that would prevent completion of treatment. Steroid molecules have a wide range of pharmacological activities. Nitroderivative molecules have been reported to have antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi*. Antiparasitic activity was evaluated in the epimastigote form of the *Ninoa* and *A1* strains. Cytotoxicity was determined using mouse macrophage cell line J774. Compounds C5B and C5C showed outstanding activity with *Ninoa* isolate, and C5A in *A1* isolate, representing potential candidates.

Introducción

La Tripanosomiasis americana, constituye un problema de salud pública en México, la cual es caracterizada por ser una infección generalizada que pasa clínicamente a partir de una forma aguda y evoluciona hasta llegar a una forma crónica. Tiene como agente causal al protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* el cual es transmitido a los mamíferos por triatomíneos hematófagos de la familia Reduviidae (Salazar-Schettino et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica esta enfermedad como una de las “enfermedades olvidadas”, dado que esta afecta principalmente a las poblaciones más pobres del planeta, y que por lo tanto no representa un ingreso de capital suficiente que justifique una inversión de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para su tratamiento (OMS, 2020). Esta enfermedad afecta principalmente el sistema nervioso central, el corazón, el esófago y el colon, causando múltiples problemas al organismo. En la mayoría de los casos la fase aguda no se reconoce clínicamente y en algunos casos la enfermedad puede aparecer como una infección crónica desde el principio. Después de que se cursa la fase aguda, esta cambia a una forma indeterminada de la enfermedad, en la cual no se presenta ninguna manifestación clínica en los pacientes y las pruebas complementarias son normales. Alrededor de un 30% de pacientes pueden evolucionar a una forma crónica sintomática después de 10-30 años de haberse infectado (CENAPRECE, 2015). A pesar de afectar a millones de personas en todo el mundo, actualmente, no existen tratamientos eficaces o adecuados. En el caso de la enfermedad de Chagas, desde hace más de treinta años solo existen dos fármacos disponibles en el mercado para su tratamiento: nifurtimox y benznidazol, y su utilidad en la fase crónica es deficiente.

Metodología

Procedimiento

Los compuestos fueron sintetizados y caracterizados por el grupo de investigación de la Dra. Rosa Santillán del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav). De los cuales nos proporcionaron 10 mg de cada uno de los compuestos para la realización del experimento.

Los epimastigotes de las cepas *Ninoa* y *A1* fueron cultivados en medio LIT (Medio de cultivo Liver-Infusion Tryptose) suplementado con suero fetal bovino al 10% y una combinación de penicilina-estreptomicina al 0.1 %, cada 8 días se realizó un nuevo pase con medio fresco para conservar la cepa del parásito.

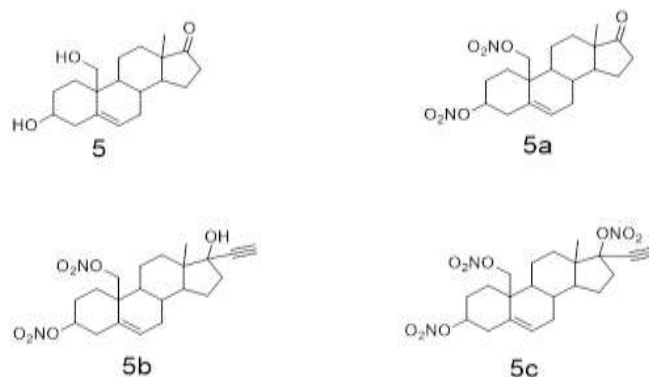


Figura 1. Estructura de los compuestos sintetizados y caracterizados por el grupo de investigación de la Dra. Rosa Santillán del Cinvestav.

Se agregaron los diferentes compuestos disueltos previamente en DimetilSulfóxido (DMSO) al 2% a concentraciones que fueron de 100 μ M a 3.75 μ M mediante una dilución seriada, llevando cada pozo a un volumen total de 200 μ L, determinando la CI_{50} por MTT, calculando por método de probit.

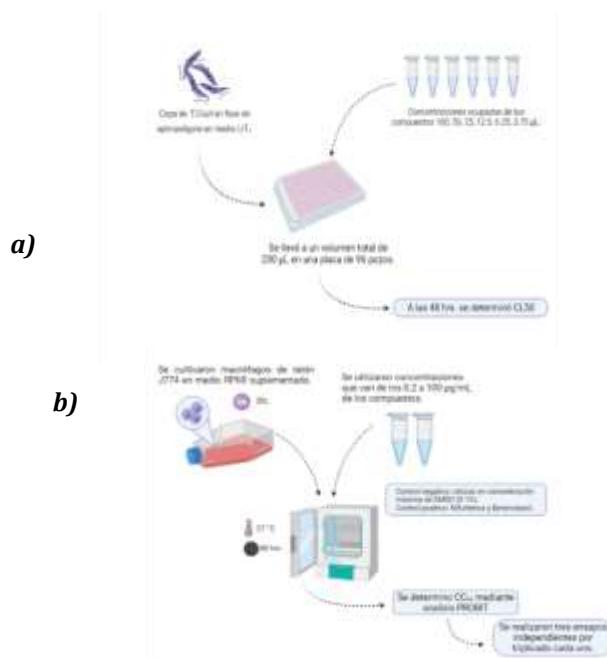


Figura 2. a) Metodología del ensayo in vitro en fase de Epimastigote y **b)** Determinación de la citotoxicidad

Los macrófagos de ratón de la línea celular J774, fueron cultivados en medio RPMI suplementado con PBS al 10% y estreptomycin al 0.1 %, en una atmósfera de CO_2 al 5% a 37 °C. El medio de cultivo se reemplazó en intervalos de 2 a 3 días, tomando en cuenta la confluencia celular.

Para realizar la evaluación de la citotoxicidad de las moléculas esteroideas se depositaron 50×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pozos, a continuación, se dejaron adherir por 24 horas a 37°C . Posterior a esto se adicionaron cada una de las moléculas a diferentes concentraciones que fueron de $0.8 \mu\text{g}$ a $100 \mu\text{g/mL}$ a través de una dilución seriada y se llevó a un volumen total de $200 \mu\text{L}$ por pocillo, después se incubaron por 48 horas a 37°C con CO_2 al 5%. Como control negativo se utilizó DMSO al 0.2% y como controles positivos a los fármacos Nifurtimox y Benznidazol. Con el método de la resazurina que se llevó a cabo por triplicado se determinó la actividad metabólica de las células, por el método Probit se calculó el porcentaje de viabilidad celular y la concentración de la citotoxicidad media máxima (CC_{50}).

Resultados y discusión

Resultados in vitro

Con los datos obtenidos en el ensayo *in vitro*, podemos observar los valores obtenidos de las CI_{50} para la forma epimastigote del parásito cepa *NINOA*; de las CI_{50} que se muestran, el compuesto C5A evidencia una baja actividad en comparación con los fármacos de referencia llegando a los $48.3 \mu\text{M}$, así como el compuesto C5 que mostró un valor comparable con Benznidazol con una concentración de $36.17 \mu\text{M}$, sin embargo, de las moléculas que si compiten directamente con los medicamentos control, las más prometedoras hasta el momento son las nombradas C5B y C5C con valores de $2.8 \mu\text{M}$ y $2.12 \mu\text{M}$ respectivamente.

Tabla 1. Resultados de los ensayos in vitro de *Trypanosoma cruzi*.

COMPUESTO	<i>T. cruzi</i> Epimastigote Cls. NINOA	<i>T. cruzi</i> Epimastigote Cls. A1	CC_{50} Citotoxicidad J774 Macrófago ratón.	Índice de Selectividad $\text{CC}_{50}\text{C5B}$ NINOA	Índice de Selectividad $\text{CC}_{50}\text{C5B}$ A1
Nifurtimox	$7.00 \pm 0.05 \mu\text{M}$	$19.30 \pm 0.079 \mu\text{M}$	$164.2 \pm 0.25 \mu\text{M}$	23.159	8.807
Benznidazol	$36.27 \pm 0.068 \mu\text{M}$	$39.98 \pm 0.253 \mu\text{M}$	$133.9 \pm 0.06 \mu\text{M}$	4.423	3.426
C5	$36.17 \pm 0.031 \mu\text{M}$	$475.99 \pm 0.018 \mu\text{M}$	$75.41 \pm 0.017 \mu\text{M}$	2.084	0.158
C5A	$48.3 \pm 0.043 \mu\text{M}$	$429.95 \pm 0.653 \mu\text{M}$	$129.77 \pm 0.0438 \mu\text{M}$	2.686	0.301
C5B	$2.8 \pm 0.016 \mu\text{M}$	$321.49 \pm 0.017 \mu\text{M}$	$39.79 \pm 0.0153 \mu\text{M}$	14.21	0.128
C5C	$2.12 \pm 0.0167 \mu\text{M}$	$321.49 \pm 0.021 \mu\text{M}$	$22.32 \pm 0.0154 \mu\text{M}$	10.528	0.969

Con respecto a la cepa A1 se muestran los valores de CI_{50} de las 4 moléculas que fueron probadas para la fase de epimastigote, de los cuales la molécula C5 obtuvo un valor de CI_{50} de $475.99 \mu\text{M}$, seguida la molécula C5A, C5B Y C5C con valores de 429.95, 321.49 y 321.49 respectivamente por lo que al ser contrapuestos con los fármacos de referencia evidenció una muy baja actividad antiparasitaria excediendo la concentración de BNZ y NFX, los cuales cuentan con una CI_{50} que va de $39.08 \mu\text{M}$ y $19.30 \mu\text{M}$ respectivamente.

Resultados de CC_{50} (citotoxicidad) para las células J774

Respecto a la citotoxicidad de estos compuestos se muestran los valores de CC_{50} de cada una de las 4 moléculas que fueron evaluadas sobre macrófagos de la línea celular J774, se espera que los compuestos potenciales en cuanto a la actividad en el epimastigote, cuenten con valores de $100 \mu\text{M}$ o comparables con Nifurtimox y Benznidazol, a partir de los resultados presentados, se observa (figura 3) que las moléculas más tóxicas fueron las nombradas C5B y C5C con valores de $39.79 \mu\text{M}$ y $22.32 \mu\text{M}$, respectivamente; al comparar la molécula C5B con NFX y BNZ es 4.85 y 3.36 veces más tóxica, mientras que la C5C evidenció 4.12 y 5.99 más toxicidad que los fármacos de referencia, por lo que hasta el momento quedan descartadas.

Con respecto a la molécula C5 se obtuvo un valor de $75.41 \mu\text{M}$ en el orden dado acercándose un poco más al valor esperado de $100 \mu\text{M}$, el compuesto C5A tiene una concentración de $129.77 \mu\text{M}$ comparando esta concentración con las de los fármacos de referencia resultan ser comparables en cuanto a citotoxicidad debido a que su CC_{50} presenta un valor cercano a los de NFX y BNZ; los cuales son $164.2 \mu\text{M}$ y $133.9 \mu\text{M}$ respectivamente, de forma ideal lo que principalmente se espera es obtener concentraciones superiores a las de los fármacos antes mencionados, siendo de esta manera lo contrario a lo que se espera de los valores de CI_{50} que entre más bajas sean las concentraciones, posee mejor efecto antiparasitario.



Figura 3. Citotoxicidad de los compuestos en comparación de los fármacos de referencia

Un factor determinante en el uso de los fármacos a pesar de la toxicidad es el índice de Selectividad de los candidatos con respecto a los fármacos de referencia, esto se calcula dividiendo el valor de la Citotoxicidad (CC_{50}) entre la CI_{50} calculados por el método Probit; el Índice de Selectividad (IS) es la propiedad que puede poseer un fármaco para unirse e inducir una respuesta en una estructura biológica.

Por esta razón es importante que sean selectivos para la estructura sobre la cual se pretende actuar y además que las dosis administradas no produzcan reacciones adversas. Utilizando experimentos en modelos *in vitro* sobre líneas celulares u órganos es como se puede valorar la selectividad. Si se busca comparar algún fármaco de referencia, el experimento debe realizarse sobre la misma línea celular y con el mismo diseño. Aun así, los datos obtenidos no se pueden extrapolar directamente a la clínica, por la influencia de las propiedades farmacocinéticas, que son las que permiten que el fármaco llegue en la concentración adecuada al lugar de acción (Morales-Olivas, 2016).



Figura 4. Comparación del índice de selectividad en ambas cepas de *T. cruzi*.

Comparación de los resultados obtenidos en ambas cepas de *Trypanosoma cruzi*

Para comparar los resultados entre sí, es necesario observar las diferencia entre ambas cepas, en el primer aislado *NinoA* se tiene CI_{50} de 7.09 μM para el Nifurtimox, en cambio, con el Benznidazol podemos encontrar valores de 30.27 μM lo cual es hasta 4.2 veces menor en comparación con el de *A1*, por consecuencia, se prefiere realizar la comparativa con el fármaco de referencia que cuente con una CI_{50} por debajo de la actividad con Benznidazol, cuyos candidatos son el compuesto C5B Y C5C, seguido del C5, por lo que, los 2 primeros mencionados cuentan con una potencial actividad en la fase de epimastigote, y el ultimo cuenta con una actividad comparable a los fármacos de referencia, no así el compuesto C5A, que en ensayos con tripomastigote sanguíneo es potencialmente activo, en aislado *NinoA*. El segundo punto a considerar son los valores de CI_{50} de los fármacos de referencia Nifurtimox y Benznidazol en la cepa *A1* con concentraciones de 19.30 y 39.08 μM , todos los valores calculados encontrados por debajo de estas concentraciones serán consideradas para una segunda fase de experimentación, dentro de los cuales ninguno de los compuestos demostró más actividad que los fármacos de referencia.

Conclusiones

Los compuestos nitratos derivados de la 3 β ,19-hidroxiépandrosterona (dinitrato de 3 β , 19-dihidroxiépandrosterona y 17 α -alquinilderivados) podrían ser nuevos prospectos como candidatos a nuevos fármacos para combatir la Enfermedad de Chagas, además podrían mostrar menor citotoxicidad que Nifurtimox y Benznidazol. Los compuestos C5B Y C5C mostraron mayor actividad que los fármacos de referencia al ser aplicados en los epimastigotes de la cepa *NinoA*, así como también el compuesto C5A puede ser comparado con los fármacos de referencia, mientras que para los epimastigotes de la Cepa *A1* el compuesto C5A fue quien mostró una actividad que puede mejorarse para ser comparada con nifurtimox y benznidazol.

Agradecimientos

Proyecto número CF-2023-I-1969 denominado "Síntesis de derivados esteroidales y caracterización de su actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* a corto y mediano plazo en aislados Oaxaqueños" Ciencia de Frontera 2023 modalidad individual, Secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e innovación.

Referencias

- Alberca, L. N. (2018). Búsqueda asistida por computadora de nuevos fármacos antichagásicos análogos de poliaminas. 1–188.
- Bargues, M. D., Schofield, C., & Dujardin, J. P. (2017). Classification and systematics of the Triatominae. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00006-X>
- Brenière, S. F., Villacis, A., & Aznar, C. (2017). Vector transmission: How it works, what transmits, where it occurs. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*, 497–515. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00023-X>
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. C., & Roque, A. L. R. (2017). Ecological aspects of *Trypanosoma cruzi*: Wild hosts and reservoirs. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00011-3>
- Krinsky, W. L. (2019). True Bugs (Hemiptera). In *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814043-7.00008-x>

Nicolás Gulin, J. E. (2018). *Evaluación in vitro e in vivo de combinaciones de drogas y nuevas drogas con potencial para el tratamiento de la enfermedad de Chagas*. 1–215.

OMS. (2020). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi, A. (2017). Clinical phases and forms of Chagas disease. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00029-0

Santos, S. S., de Araújo, R. V., Giarolla, J., Seoud, O. El, & Ferreira, E. I. (2020). Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(4), 105906. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105906